HAL open science

Impact des exosomes dérivés du carcinome corticosurrénalien sur la reprogrammation des cellules endothéliales

Josiane Lampert Denis

To cite this version:

Josiane Lampert Denis. Impact des exosomes dérivés du carcinome corticosurrénalien sur la reprogrammation des cellules endothéliales. Sciences du Vivant [q-bio]. 2022. hal-03634652

HAL Id: hal-03634652

https://ephe.hal.science/hal-03634652v1

Submitted on 7 Apr 2022

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.

MINISTÈRE DE L'ENSEIGNEMENT SUPÉRIEUR ET DE LA RECHERCHE

ECOLE PRATIQUE DES HAUTES ETUDES
Sciences de la Vie et de la Terre

MÉMOIRE

présenté par
Josiane LAMPERT DENIS

pour l'obtention du Diplôme de l'École Pratique des Hautes Études – PSL

Impact des exosomes dérivés du carcinome corticosurrénalien sur la reprogrammation des cellules endothéliales

Soutenu le 17 février 2022 **devant le jury suivant :**

Dr Sophie GAD-LAPITEAU- **Présidente**
Dr Nadia CHERRADI **- Tuteur scientifique**
Dr Véronique Frachet **- Tuteur pédagogique**
Dr Sandrine Fraboulet**- Rapporteur**
Dr Claire Bouvard - **Examinateur**

Mémoire préparé sous la direction de :
Dr Nadia Cherradi,
Intitulé de la structure d'accueil : Laboratoire de Biologie et Biotechnologie pour la Santé, INSERM UMR 1292 -17, rue des Martyrs 38054 CEA GRENOBLE
Directrice : Catherine Picart
Et de Dr Véronique FRACHET, EPHE
Intitulé de la structure d'accueil EPHE-PSL (Science de la vie et de la terre) : Institute for Advanced Biosciences CR UGA/INSERM U1209 - CNRS UMR 5309 La Tronche

ÉCOLE PRATIQUE DES HAUTES ÉTUDES
SCIENCES DE LA VIE ET DE LA TERRE

Impact des exosomes dérivés du carcinome corticosurrénalien sur la reprogrammation des cellules endothéliales

Josiane LAMPERT DENIS

Février 2022

Résumé

Le carcinome corticosurrénalien (CCS) est une tumeur rare mais agressive dans laquelle nous avons identifié une expression aberrante de plusieurs microARN. Les microARN sont de petits ARN non-codants qui régulent l'expression des gènes au niveau post-transcriptionnel. Parmi les miRs trouvés surexprimés dans le CCS, miR-139-5p et miR-483-5p sont impliqués dans le phénotype invasif de ce cancer. Notre équipe a montré que les cellules de CCS humain en culture produisent des exosomes. Ces microvésicules riches en protéines, lipides et acides nucléiques reflètent la composition de leurs cellules parentales et sont retrouvés dans plusieurs fluides biologiques. Nous avons émis l'hypothèse que les exosomes favoriseraient la communication entre les cellules tumorales et les cellules de leur microenvironnement. Etant donné que le CCS est une tumeur fortement vascularisée, notre objectif était de déterminer l'effet des exosomes sur le phénotype des cellules endothéliales. Pour cela, nous avons tout d'abord mis en place la purification des exosomes de cellules de CCS (NCI H295R), puis nous avons caractérisé leur contenu en microARN et en protéines. Nous avons montré que miR-483-5p est plus enrichi dans les exosomes que miR-139-5p. MiR-139-5p est préférentiellement exprimé dans les cellules comparées aux exosomes. De nombreuses protéines connues pour promouvoir la tumorigenèse et l'angiogenèse sont également enrichies dans les exosomes de NCI H295R. Nous avons ensuite étudié l'internalisation en temps réel des exosomes par les cellules endothéliales de veine ombilicale humaine (HUVEC) ainsi que leurs effets sur la migration, la tubulogenèse et la signalisation cellulaire. L'internalisation des exosomes induit une augmentation du contenu en miR-139-5p et miR-483-5p des HUVEC et accélère significativement leur migration et leur organisation en pseudo-tubes. D'autre part, les exosomes augmentent la phosphorylation de la protéine kinase AKT de manière dose-dépendante. Bien que miR-483-5p et miR-139-5p soient très peu exprimés dans les HUVEC comparées aux cellules tumorales, l'inhibition de leur expression endogène ou l'inhibition par un antagomiR contrôle atténue l'effet pro-migratoire des exosomes. Cependant, la transfection de miR-483-5p et miR-139-5p exogènes dans les HUVEC à des doses comparables à celles apportées par les exosomes n'a pas montré d'effet sur leur migration. Ces résultats suggèrent que l'utilisation d'exosomes déplétés en miR-483-5p et miR-139-5p, tout en conservant d'autres molécules agissant de concert avec ces 2 microARN, serait la condition optimale pour tester leur rôle dans la fonction des cellules endothéliales. Des cellules NCI H295R exprimant des éponges à microARN de façon inductible sont en cours de génération afin de produire ces microvésicules.

Mots Clés: *carcinome corticosurrénalien, exosomes, microARN, angiogenèse*

REMERCIEMENTS ix
ABREVIATIONS xi
1 INTRODUCTION 1
1.1 Contexte 1
1.2 Structure et fonction de la glande surrénale 2
1.3 Les tumeurs de la glande corticosurrénale 3
1.3.1 Généralités 3
1.3.2 Les différents types de tumeurs de la corticosurrénale 3
1.3.2.1 Les adénomes corticosurrénaliens (ACS) 3
1.3.3 Le carcinome corticosurrénalien 3
1.3.4 Altérations génétiques du carcinome corticosurrénalien 4
1.4 Les microARN 7
1.4.1 Définition 7
1.4.2 Nomenclature 7
1.4.3 Biogenèse des microARN 7
1.4.4 Transcription des microARN 8
1.4.5 Rôle des microARN 9
1.4.6 Inhibition de la traduction par les microARN chez les mammifères 9
1.4.6.1 Protéine Argonaute associée au microARN 9
1.4.6.2 Interaction microARN-ARN messager 10
1.4.6.3 Mécanismes de répression des gènes par les miRs 11
1.4.6.4 Identification des gènes cibles des miRs 12
1.4.7 Dérégulation des microARN dans le cancer 13
1.4.7.1 Généralités 13
1.4.7.2 MicroARN impliqués dans la Transition Epithélio-Mesenchymateuse (EMT) 13
1.4.7.3 MicroARN et angiogenèse tumorale 14
1.4.7.3.1 L'angiogenèse physiologique 14
1.4.7.3.2 L'angiogenèse tumorale 16
1.4.7.3.3 MicroARN pro-et anti-angiogéniques. 17
1.4.8 MicroARN étudiés dans le carcinome corticosurrénalien 18
1.4.8.1 Relations gène hôte et miR-483 ou miR-139 19
1.5 Les vésicules extracellulaires 20
1.5.1 Historique 20
1.5.2 Types de vésicules extracellulaires 20

1.5.2.1 Les corps apoptotiques 20
1.5.2.2 Les microvésicules 21
1.5.2.3 Les exosomes 22
- Taille 22
- Biogenèse 22
1.6 Molécules communes ou spécifiques des exosomes et des microvésicules 24
1.6.1 Les Tétraspanines 24
1.6.2 Molécules de transduction du signal 24
1.6.3 Molécules d'adhérence cellulaire 24
1.6.4 Argonaute 2 (Ago2) 24
1.6.5 Molécules du trafic intracellulaire 24
1.6.6 Les molécules nécessaires au complexe ESCRT 24
1.6.7 Les lipides 24
1.6.8 Les molécules chaperones 25
1.6.9 Les acides nucléiques 25
1.6.10 L'incorporation de microARN dans les exosomes 25
1.7 Interaction des vésicules extracellulaires avec des cellules receveuses 27
1.7.1 Internalisation des vésicules extracellulaires 27
1.7.2 Devenir des vésicules extracellulaires après contact avec les cellules receveuses 27
1.7.2.1 Les exosomes incorporés au niveau de la membrane plasmique 27
1.7.2.2 Endocytose des exosomes 28
1.7.3 Exosomes et communication cellulaire 28
1.7.3.1 Généralités 28
1.7.3.2 Régulation de la biosynthèse des exosomes 28
1.7.3.3 Exosomes et progression tumorale 29
1.7.3.3.1 Modifications du contenu des exosomes dans les cellules cancéreuses (microARN et protéines) 29
1.7.3.3.2 Conséquence de la dérégulation en microARN et en protéines dans les exosomes 29
1.8 Rôle des microARN et des exosomes dans le diagnostic et la thérapie 31
1.8.1 Les microARN biomarqueurs en cancérologie. 31
1.8.2 Les microARN et les exosomes dans la thérapie anti-cancéreuse 31
2 OBJECTIFS DU TRAVAIL 32
3 MATERIEL ET METHODES 33
3.1 Sérum de veau (SV) déprivé en exosomes 33

3.2 Culture des cellules NCI-H295R 33
3.3 Culture des cellules HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cells) 33
3.4 Comptage des cellules 34
3.5 Collecte des exosomes de milieu de culture des NCI H295R et traitement des échantillons 34
• Par centrifugation différentielle puis ultracentrifugation. 34
3.6 Mesures au Nanosight NS-300 35
3.7 Détermination de la teneur en protéines des exosomes isolés, et des lysats de cellules HUVEC. ... 35
3.8 Etude du miRnome et du protéome des cellules parentales NCI-H295R et de leurs exosomes. 35
3.8.1 Analyse du miRnome 35
3.8.2 Analyse du protéome 35
3.9 Extraction des miRs 36
3.10 Quantification des miRs par Retro-Transcription (RT) et PCR quantitative (qPCR) 36
3.11 Western Blot 37
3.12 Transfections cellulaires 38
3.12.1 Inhibition des microARN endogènes 38
3.13 Surexpression des microARN 39
Selon les expériences, ... 39
3.14 Traitement des HUVEC par les exosomes de NCI-H295R 39
3.15 Test de blessure 40
3.16 Tubulogénèse 40
3.17 Microscopie de fluorescence 40
3.17.1 Cinétique d'internalisation des exosomes 40
3.17.2 Communication entre cellules NCI-H295R et HUVEC en co-culture 2D. 41
3.17.3 Co-culture de cellules NCI-H295R et HUVEC en 3D. 41
3.18 Analyses statistiques 42
4 RESULTATS 44
4.1 Production et caractérisation des exosomes de cellules NCI-H295R 44
4.1.1 Caractéristiques des nanoparticules dans le milieu de culture initial et dans les fractions enrichies par ultracentrifugation 44
4.1.1.1 Mesure de l'homogénéité et de la taille des nanoparticules 44
4.1.1.2 Mesure de la concentration en nanoparticules des échantillons 45
4.1.1.3 Rendement d'extraction des nanoparticules 46
4.1.1.4 Nombres de nanoparticules produites par les cellules 46
4.2 Répartition des microARN et des ARN longs dans les différents échantillons 47

4.3 Expression de microARN sélectionnés dans les cellules NCI-H295R et les exosomes 48

4.3.1 Expression de miR-139-5p, miR-483-5p et miR-483-3p dans les cellules NCI-H295R et les exosomes 49

4.3.2 Abondance de miR-139-5p, miR-483-5p et miR-483-3p dans la population de microARN endogènes 50

4.4 Contenu en protéines des cellules NCI-H295R et de leurs exosomes..... 50

4.5 51

4.6 Comparaison des méthodes de préparation des exosomes : ultracentrifugation et kits commerciaux Exo-Spin et ExoQuick 51

4.7 Analyse des marqueurs spécifiques des exosomes par western blot 53

4.8 Effet des vésicules extracellulaires (exosomes et microvésicules) sur la migration et la tubulogénèse des cellules HUVEC 54

4.8.1 Internalisation des vésicules extracellulaires par les HUVEC 54

4.8.1.1 Cinétique d'incorporation des vésicules extracellulaires de NCI-H295R dans les cellules HUVEC 54

4.8.1.2 Capture des vésicules extracellulaires par les HUVEC dans des co-culture de NCI-H295R et d'HUVEC 55

4.9 Effets des vésicules extracellulaires de NCI H295R sur la migration des HUVEC. 55

4.9.1 Migration des HUVEC en présence de VE de NCI H295R 56

4.9.2 Migration des HUVEC déplétées en miR-139-5p et miR-483-5p et exposées aux VE 57

4.10 Effets des VE de NCI H295R sur la tubulogenèse des HUVEC 60

4.10.1 Paramètres de la tubulogenèse..... 60

4.10.2 Tubulogenèse des HUVEC en présence de VE 61

4.11 Effets des VE de NCI H295R sur la signalisation des HUVEC. 63

4.12 Mesure de miR-483-5p et de miR-139-5p dans les HUVEC après internalisation des VE 64

4.12.1 Dosage des miRs dans les VE de NCI-H295R et dans les HUVEC 64

4.12.2 Dosage des miRs dans les HUVEC en présence de VE 64

4.13 Rôle de miR-483-5p et miR-139-5p dans les HUVEC 65

4.13.1 Recherche de gènes cibles des miRs dans les HUVEC. 65

4.13.2 Effets de miR-483-5p et de miR-139-5p exogènes (10 nM) sur la migration et la tubulogenèse. 66

4.13.2.1 Migration des HUVEC transfectées par 10 nM de miRs mimics 67

4.13.2.2 Viabilité cellulaire des HUVEC transfectées par les miRs mimics à 10nM 68

4.13.2.3 Test de tubulogenèse 69

4.13.3 Effets de faibles doses de miR-483-5p et de miR-139-5p exogènes sur la migration et la tubulogenèse. 72

4.13.3.1 Efficacité de la transfection avec des doses de 0.01nM et 0.1nM de miRs mimics 72
4.13.3.2 Test de viabilité cellulaire au PrestoBlue 73
4.13.3.3 Tubulogenèse 0.01nM et 0.1nM 74
4.13.3.4 Migration des HUVEC transfectées par 0.01nM et 0.1nM de miRs mimics 77
4.13.3.5 Mise en place de la co-culture de NCI h295R et des HUVEC en 3D (sphéroïdes). 77
5 DISCUSSION 80
6 PERSPECTIVES 87
7 BIBLIOGRAPHIE 89

FIGURES

Figure 1 : Structure de la glande surrénale, adapté de Alamyimages 2
Figure 2 : Mécanismes de signalisation de la voie Wnt/β-caténine 5
Figure 3 : IGF2 et empreinte parentale, d'après David A. F. 5
Figure 4 : Voies de signalisation de l'insuline, de l'IGF1 et de l'IGF2 6
Figure 5 : Exemple de séquence de miR 7
Figure 6 : Biogenèse des microARN 8
Figure 7 : Localisation des séquences codant pour les miRs 9
Figure 8 : Structure en domaines de Argonaute 2 9
Figure 9 : Représentation des interactions miR-ARNm canoniques et non canoniques 10
Figure 10 : Mécanismes d'action des miRs 11
Figure 11 **:** Identification des ARNm cibles des miRs 12
Figure 12 : Implication des miRs dans le cancer 13
Figure 13 : Action des miRs sur la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) et la formation de cellules souches cancéreuses 14
Figure 14 : Mécanismes de l'angiogenèse 15
Figure 15 : Les différents VEGF et leurs récepteurs 16
Figure 16 : Les étapes clés de l'angiogenèse tumorale 17
Figure 17 : Localisation et séquences de miR-483-5p/3p et miR-5p selon miRbase. 18
Figure 18 : Le gène IGF2 foetal et ses promoteurs. 19
Figure 19 : Les corps apoptotiques 21
Figure 20 : Biogenèse des microvésicules par bourgeonnement 21
Figure 21 : Biogenèse des exosomes 22
Figure 22 : Synthèse des exosomes avec ou sans ESCRT. 23
Figure 23 : Composition des exosomes 25
Figure 24 : Sélection des miRs dans les EV 26
Figure 25 : Distribution de la taille des nanoparticules 44
Figure 26 : Taille moyenne des exosomes obtenus en nm. 45
Figure 27 : Concentration des échantillons en nanoparticules. 46
Figure 28 : Nombre de nanoparticules produites par million de cellules. 47
Figure 29 : Répartition des miRs et ARNs longs dans le lysat celulaire. 47

Figure 30 : Nombre de copies de miR-139-5p, miR-483-5p et miR-483-3p par million de cellules. 49
Figure 31 : Nombre de copies de miR-139-5p, miR-483-3p et miR-483-5p/ng de miR. 50
Figure 32 : Exosomes isolés par la méthode Exo-Spin (Intershim)..... 52
Figure 33 : Exosomes isolés par la méthode ExoQuick (Amsbio**)**.. 52
Figure 34 : Analyse par Western Blot de l'expression des marqueurs des exosomes dans le lysat cellulaire et les exosomes obtenus par différentes méthodes. 53
Figure 35 : Cinétique d'incorporation des VE de NCI H295R dans les HUVEC..... 54
Figure 36 : Visualisation de la capture de VE de NCI H295R par les HUVEC dans des co-cultures des deux types cellulaires. 55
Figure 37 : Test de fermeture de la blessure d'une monocouche de cellules endothéliales avec ou sans VE. 56
Figure 38 : Quantification de la fermeture de la blessure des HUVEC en absence ou en présence de VE. 57
Figure 39 : Test de fermeture de la blessure d'une monocouche de cellules endothéliales avec ou sans VE pour la condition AntagomiR Contrôle (10nM) avec ou sans VE, AntagomiR (même test qu'en figure 37) 58
Figure 40 : Test de fermeture de la blessure d'une monocouche de cellules endothéliales avec ou sans VE pour la condition AntagomiR-139-5p, AntagomiR-483-5p 10nM et antagomiR-mix (antagomiR-483-5p (10nM et antagomiR-139-5p10nM), (même test qu'en figure 37). 59
Figure 41 : Effet des VE sur la migration des HUVEC après antagonisation de miR-139-5p et miR-483-5p intracellulaire. 60
Figure 42 : Cinétique de tubulogenèse (échantillon non traité). 61
Figure 43 : Test de tubulogenèse en présence de différentes concentrations de VE (0, 1, 2, 4, et 8 µg)..... 62
Figure 44 : Effet des VE sur la phosphorylation d'AKT. 63
Figure 45 : Expression des miRs dans les HUVEC et les VE..... 64
Figure 46 : Dosage de miRs après ajout de VE dans les HUVEC. 64
Figure 47 : Effet de miR-483-5p et miR-139-5p sur l'expression de leurs gènes cibles NDRG2 et NDRG4 dans les HUVEC**.** 65
Figure 48 : Dosage de miRs après 6 jours de transfection des HUVEC. 66
Figure 49 : Test de blessure après transfection des HUVEC par des miRs mimics contrôle ou miR-483-5p. ... 67
Figure 50 : Effets de miR-483-5p et de miR-139-5p transfectés à une concentration de 10 nM sur la migration des HUVEC. 68
Figure 51 : Test de viabilité après transfection de miRs mimics à 10nM.. 68
Figure 52 : Tubulogenèse des HUVEC après transfection des miRs à 10 nM. 69
Figure 53 : Utilisation de la macro pour quantifier la tubulogenèse des HUVEC après transfection des miRs à 10 nM 70
Figure 54 : Quantification de la tubulogénèse après transfection des miRs à 10 nM dans les HUVEC. 71
Figure 55 : Expression de miR-139-5p et de miR-483-5p à 0.01nM et 0.1nM à 6 jours post-transfection..... 72
Figure 56 : Test de viabilité cellulaire après transfection de miR-139-5p et miR-483-5p à 0.01nM et 0.1 nM. 73
Figure 57 : Tubulogénèse des HUVEC après transfection des miRs mimics à 0.01nM. 75
Figure 58 : Tubulogenèse des HUVEC transfectées par 0.1nM de miRs mimics. 76
Figure 59 : Migration des HUVEC transfectées par 0.01nM et 0.1nM de miRs mimics. 77
Figure 60 : Images de sphéroïdes HUVEC/NCI-H295R le jour de leur formation (J0) et à J7. 78
Figure 61 : Image de sphéroïdes HUVEC/NCI-H295R, 7 et 10 jours après leur formation..... 78

TABLEAUX

Tableau 1 : Exemples de miRs impliqués dans le contrôle de l'angiogenèse..... 17
Table 2 : Liste des anticorps utilisés 38
Tableau 3: Pourcentage du rendement d'extraction des nanoparticules..... 46
Tableau 4: concentration en ARN des cellules, du MAvC, et des Exosomes (ng/10^6 cellules, 3 expèriences indépendantes)..... 48
Tableau 5 exosomes/cellules..... 51

REMERCIEMENTS

Je remercie tout d'abord, Jean-Jacqes Feige, Directeur de mon ancien laboratoire intitulé « Biologie du Cancer et de l'Infection », de m'avoir soutenue dans mon projet de réalisation du diplôme de l'EPHE. Merci également à Sabine Bailly et Catherine Picart qui ont ensuite pris le relais au niveau de la direction du nouveau laboratoire intitulé « Laboratoire de Biologie et Biotechnologies pour la Santé ».

Je remercie, ma tutrice scientifique, Nadia Cherradi pour m'avoir consacré du temps pour la réalisation de ce mémoire et d'avoir pu moi-même disposer de temps pour le rédiger.

Je remercie ma tutrice pédagogique, Véronique Frachet, sans qui rien n'aurait été possible : mon projet me permettant de disposer de plus de connaissances scientifiques et de savoir comment les utiliser dans mon laboratoire pouvaient enfin se concrétiser.
Je remercie Sandrine Fraboulet d'avoir accepter d'évaluer ce travail.
Merci à Sophie Gad-Lapiteau pour ses encouragements et pour avoir accepter d'être la Présidente de ma soutenance.

Merci à Madame Chatelard Christine pour l'accès au dispositif Nanosight de la plateforme Instruct-ERIC Center (ISBG/ UMS 3518 CNRS-CEA-UGA-EMBL) supportée par l'infrastructure FRISBI (ANR-10-INBS-05-02° et GRAL (ANR-10-LABX-49-01) en partenariat avec l'Institut de Biologie Structurale.

Ce projet a reçu l'aide du centre d'imagerie MuLife, qui est financé par le GRAL, programme du Diplôme Chimie Biologie Santé, Ecole Supérieure Grenoble Alpes (ANR-17-EURE-0003).

Merci à Justine, Soha, Katell nos trois doctorantes pour leur gentillesse et leur compréhension.

Merci à Claude et Odile pour leur aide dans l'utilisation de l'incucyte ou pour tous leurs conseils.

Merci à Agnès, Emma, Claire aux trois Nicolas, Inrinka, Mohammad, Tala, Mohamed, Constance, Nadia Alfaidy, Kevin, Lisa, Paul, Cyrielle et Fred pour leur aide.

Merci à Aude, pour la préparation des cellules HUVEC. Merci à Mariela et Daniel, Isabelle et Violaine pour vos connaissances sur les cellules endothéliales et l'utilisation des microscopes.

Merci à Christine et Célie pour leur gentillesse, leur aide dans les tâches communes.

Merci à Christophe et Delphine pour les analyses protéomiques.

Merci à Laurent, Stéphanie et Laetitia pour leur aide en microscopie confocale et vidéomicroscopie.

Merci à Cathy, Irinka, Caro, Christelle, et Florence pour la bonne ambiance au labo.

Je souhaite rendre hommage à Gustave Roussy
- un hommage à l'homme pour avoir su associer soins aux malades, recherche et enseignement et être à l'origine de la lutte contre le cancer en France.
-un hommage à l'institut Gustave Roussy pour avoir guéri, mon neuveu Georges d'un médulloblastome.

Pierre, Julien, Isabelle et Keh Shuan (Kate), merci à vous et surtout à Auriane : puisse la curiosité scientifique ne jamais vous faire défaut. Merci à mes beaux-parents pour leur accueil toujours chaleureux, merci à mes parents pour m'avoir toujours poussée à faire des études.

Un grand merci à Pascal, sans qui la logistique n'aurait pu être assurée dans notre foyer et merci d'avoir supporté mon manque de disponibilité.

ABREVIATIONS

ACA	Adrenocortical adenoma-(Adénome Corticosurrénalien)
ACS	Adénome Corticosurrénalien
ACh	Acetylcholine
ACTH	Adrenocorticotropic hormone
ALIX	Apoptotic linked-gene-product 2 (ALG-2) interacting protein X
ARF	ADP Ribosylation Factor
Ago2	Protein argonaute 2
AKT	Protein kinase B
APC	Adenomatous polyposis coli
B FGF	Basic Fibroblast Growth Factor
BCL-2	BCL-2 interacting mediator of cell death
CCS	Carcinome Corticosurrénalien
CD9, CD63, CD81	Differentiation cluster 9, Differentiation cluster 63, Differentiation cluster 81
CDKN1C	Cyclin-Dependant Kinase Inhibitor 1C
CSC	Cancer Stem Cell
CXCR4	C-X-C motif chemokine receptor 4
DHEA	Dehydroepiandrosterone
Dvl	Disheveled
dll4	delta like canonical Notch ligand 4
DMD	Domain Méthylé Différencié
EC	Endothelial cell
ELK	ETS-Like transcription factor
Erk	Extracellular-signal-regulated kinases
ESCRT	The endosomal sorting complex required for transport
ENSAT	European Network for the Study of Adrenal Tumours
FOXO	Forkhead Box Protein O
GFP	Green fluorescent protein
GSK3	Glycogen Synthase Kinase 3
HAPLN1	Hyaluronan And Proteoglycan Link Protein 1
HDL	High-density lipoprotein
HSP90	Heat shock protein 90
HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cells
hnRNP	heterogeneous nuclear Ribonucleoproteins (hnRNPs)
IGF2	Insulin-like growth factor2

IGFBP	IGF-binding protein
ICAM	Intercellular Adhesion Molecule
ILV	Intraluminal Vesicle
KRAS	Kirsten rat sarcoma virus
LEF/TCF	T cell factor/lymphoid enhancer factor
LIMK 1	LIM Domain Kinase 1
lncRNA	Long non coding RiboNucleicAcid
LRP	Lipoprotein receptor –related protein
LRG5	Leucine Rich Repeat containing G protein-coupled receptor 5
MApC	Milieu après ultracentrifugation
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MAvC	Milieu avant ultracentrigugation
MEX3C	Mex-3 RNA Binding Family Member C (MEX3C)
miR	Micro ARN
mTOR	mammalian target of rapamycin
MEF2a	Myocyte Enhancer Factor 2a
MHC	Major Histocompatibility Complex
MVB	Multivesicular body
MRE	Micro ARN Recognition Element
MVB	Multivesicular body
MVE	Multivesicular Endosome
nSMase	Neutral sphingomyelinases
NO	Nitrogen oxide
P	Phosphorylated
PABPC	Cytoplasmic poly(A)-binding protein
PBS	Phosphate-buffered saline
PBS+/+	Phosphate-buffered saline with calcium and magnesium
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PI3K	Phosphoinoside 3 kinase
PIWI	P-element-induced wimpy testis
PKC	Protein Kinase C
PLC-y	Phospholipase C
PTB-1b	Protein Tyrosin Phosphatase 1B
RasGAP	Ras GTPase activating protein
RNFR43	RING Finger Protein 43
RISC	RNA Induced silencing complex
RNA	Ribonucleic acid
RT-qPCR	Reverse transcription-quantitative polymerase chain reaction
RSpo	R-spondin
Sck	Shc-related adaptor protein
SDS	Sodium dodecyl sulfate
sFRP2	Secreted frizzled-related protein II
SOD	Superoxide Dismutase
SYNCRIP	Synaptotagmin-binding cytoplasmic RNA-interaction protein

SPRED1	Sprouty Relates EVH1 Doamin Containing 1
SVF	Serum de Veau Foetal
TBS	Tris-buffered saline
TCF	T cell Factor
TGF- β1	Transforming growth factor béta 1
TME	Tetraspanin enrichied domain
TRBP	Transactivation-responsive RNA-binding protein
TIMP 1	Tissue inhibitors of metalloproteinases 1
TSP1	Thrombospondin 1
TRYP1	Thiol-specific peroxydase
TSG101	Tumour susceptibility gene 101
Tyr	Tyrosine
ULK	Uncoordinated-Like Kinase
UTR	Untranslated Region
VCAM	Vascular Endothelial Growth Factor
VE	Vésicule extracellulaire
VEGF	Vascular endothelial growth factor
VEGFR	Vascular endothelial growth factor receptor
VPSAP4	Vacuolar Protein Sorting-Associated Protein 4
YBX-1	Y-Box Binding Protein 1
ZEB	Zinc finger E-box-binding homeobox 1
ZNRF3	Zinc And Ring Finger 3
4EBP1	4E binding protein 1

1 INTRODUCTION

1.1 Contexte

Notre équipe étudie le carcinome corticosurrénalien (CCS), un cancer rare de mauvais pronostic. Grâce à sa participation active au réseau national INCA-COMETE (Institut National du Cancer-COrtico-MEdullo-Tumeurs Endocrines) en France et à l'ENSAT (European Network for the Study of Adrenal Tumors), le Dr Nadia Cherradi, Directrice de Recherche INSERM et ma supérieure hiérachique, a mis en évidence la dérégulation de certains miRs tumoraux et circulants dans des cohortes de patients porteurs de CCS. Les CCS sont traités par ablation chirurgicale et sont réfractaires aux thérapies conventionnelles (chimio- et radio-thérapies) ainsi qu'aux thérapies ciblées. Les récidives locales ou l'apparition de métastases sont fréquentes.
Le CCS se développe au niveau de la corticosurrénale, une glande endocrine très vascularisée. La vascularisation des tumeurs favorise leur croissance et permet également aux cellules cancéreuses invasives d'atteindre la circulation sanguine pour aller coloniser des organes cibles à distance. De nombreux travaux ont montré que les cellules cancéreuses sécrètent des nanovésicules, appelées exosomes, enrichies en diverses biomolécules qui reflètent l'identité des cellules parentales. Ces vésicules extracellulaires peuvent être internalisées par des cellules cibles dans le microenvironnement tumoral ou à distance et modifier leur phénotype. Ces exosomes émergent actuellement comme des vecteurs de communication intercellulaire. Leur implication dans la progression tumorale, la dissémination métastatique et la résistance aux thérapies anti-tumorales a été rapportée. A ce jour, la caractérisation des exosomes secrétés par les cellules de CCS, ainsi que l'étude de leur rôle dans le microenvironnement du CCS n'ont pas été réalisées.

Nos travaux récents ont révélé que certains miRs, que nous avons trouvé surexprimés dans le CCS sont enrichis dans les exosomes secrétés par les cellules tumorales en culture. L'objectif de ce travail était de déterminer le rôle des exosomes dans la communication entre les cellules tumorales de CCS et les cellules endothéliales et d'étudier leur fonction potentielle dans le remodelage du réseau vasculaire de ces tumeurs. Nous avons formulé l'hypothèse que la capture des exosomes par les cellules endothéliales leur confère un phénotype pro-angiogénique qui pourrait favoriser l'échappement des cellules tumorales. Pour réaliser ces études, nous avons (1) mis en place les méthodes de préparation des exosomes au laboratoire, (2) caractérisé les exosomes sur le plan moléculaire (séquençage du miRnome et analyse du protéome) et (3) étudié l'impact des exosomes internalisés par les cellules endothéliales sur leur fonction.

1.2 Structure et fonction de la glande surrénale

Les glandes surrénales sont des glandes endocrines paires situées au-dessus du pôle supérieur du rein. Elles sont composées de la médullosurrénale et de la corticosurrénale qui dérivent de deux tissus embryonnaires différents et présentent des fonctions distinctes (Figure 1). La médullosurrénale, qui correspond à la zone interne de la surrénale et qui dérive des cellules de la crête neurale, est le lieu de synthèse des catécholamines (adrénaline et noradrénaline, épinéphrine ou hormones du stress). La corticosurrénale, qui correspond à la zone périphérique de la surrénale, provient du mésoblaste intermédiaire, permet la synthèse d'hormones stéroïdiennes. La corticosurrénale est divisée en trois zones fonctionnelles qui résultent d'une expression enzymatique différentielle : la zone glomérulée (ZG), la zone fasciculée (ZF) et la zone réticulée (ZR) [1].
La ZG synthétise des minéralocorticoïdes, principalement l'aldostérone, responsable de la réabsorption du sodium au niveau du rein. La ZF, qui constitue 50% du cortex, secrète des glucocorticoïdes, principalement le cortisol chez l'homme. Le cortisol est une hormone hyperglycémiante et immunosuppressive. Elle augmente le catabolisme des protéines et le stockage des graisses. La ZR est la zone du cortex la plus interne. Elle produit des précurseurs d'androgènes comme la déhydroépiandrostérone (DHEA), la DHEA- sulfate et l'androstènedione.

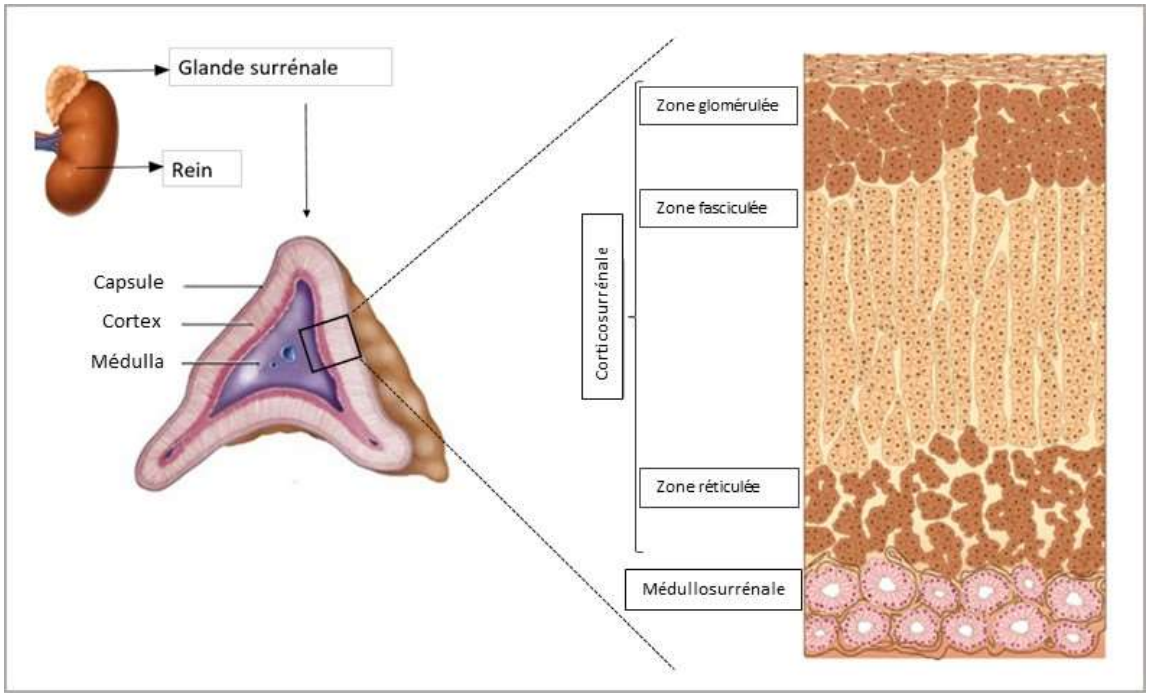


Figure 1 : Structure de la glande surrénale, adapté de Alamyimages (https://www.alamyimages.fr/). La surrénale est composée de la corticosurrénale et de la médullosurrénale. La corticosurrénale se subdivise en trois zones fonctionnellement distinctes : la zone glomérulée, la zone fasciculée et la zone réticulée.

1.3 Les tumeurs de la glande corticosurrénale

1.3.1 Généralités

Les tumeurs corticosurrénaliennes, classées en adénomes (bénins) et carcinomes (malins), peuvent être sécrétantes ou non sur le plan hormonal. On parle d'incidentalomes surrénaliens lorsque des tumeurs non-secrétantes sont découvertes fortuitement lors d'examens d'imagerie réalisés initialement pour une autre pathologie[2]. Environ 50 % des carcinomes ne secrètent pas d'hormones stéroïdes et sont diagnostiqués à un stade tumoral avancé, parfois déjà métastatique. Lorsqu'une tumeur est suspectée, une tomodensitométrie (scanner) est effectuée en première intention. La classification des tumeurs corticosurrénaliennes est réalisée par les anatomopathologistes selon plusieurs critères, notamment le score de Weiss, le stade ENSAT (réseau européen pour l'étude des tumeurs surrénaliennes) et l'index de prolifération (Ki67)[3].

1.3.2 Les différents types de tumeurs de la corticosurrénale

1.3.2.1 Les adénomes corticosurrénaliens (ACS)

La plupart des "incidentalomes" surrénaliens sont des adénomes non-secrétants. Les "incidentalomes" sont découverts de manière fortuite chez 5 à 8 % de la population âgée[4]; cependant, certains adénomes surrénaliens sont sécrétants et peuvent être à l'origine :

- d'un syndrome de Cushing, dû à une hypersécrétion de cortisol.
- de troubles de l'ovulation et d'hirsutisme par hypersécrétion d'hormone androgènes, surtout chez la femme.
- d'un syndrome de Conn, qui se traduit par une hypertension artérielle et une hypokaliémie dues à une hypersécrétion d'aldostérone.

Les adénomes sécrétants, mis en évidence par un dosage hormonal, peuvent être réséqués par intervention chirurgicale.

1.3.3 Le carcinome corticosurrénalien

Le carcinome corticosurrénalien (CCS) est un cancer rare. Il atteint entre 0.7 à 2 personnes/million d'habitants par an[5]. Il est plus souvent observé chez la femme que chez l'homme, sans qu'on en connaisse la raison (sexe ratio de 1,5). Pour les formes localisées, la chirurgie est le traitement recommandé par l'ENSAT[6]. Un examen histologique permet d'établir le diagnostic de la tumeur, après ablation chirurgicale. Une tumeur maligne est suspectée si le score de Weiss est supérieur ou égal à 3[7]. Ce score repose sur des paramètres histologiques tels que la taille des noyaux, la nécrose, l'invasion veineuse, les mitoses anormales[8]. L'apparition de métastases après chirurgie est fréquente, notamment pour les stades avancés (stades 3 et 4). Les examens par imagerie et les dosages hormonaux permettent de suivre la progression du carcinome corticosurrénalien.

1.3.4 Altérations génétiques du carcinome corticosurrénalien

L'analyse pan-génomique de plusieurs cohortes de CCS a révélé de nombreuses altérations moléculaires dont des amplifications/délétions chromosomiques, une hyperméthylation de certains gènes, une dérégulation du transcriptome et du miRnome ainsi que des mutations génétiques[9,10]. Les mutations les plus fréquentes sont somatiques ou germinales dans certaines formes familiales[11].

Parmi les altérations génétiques majeures identifiées dans le CCS, on note des mutations du gène suppresseur de tumeur TP53, des mutations de gènes de la voie Wnt/β-caténine, une perte d'hétérozygotie des locus 17p13 et 11p15 et une surexpression considérable du gène Insuline Like Growth Factor 2 (IGF2)[12].

Une mutation germinale du gène TP53 a été rapportée pour 60 à 80% des enfants et 4% des adultes[13] atteints de carcinome corticosurrénalien. Des mutations somatiques, ainsi que des délétions de p53, ont été rapportées dans environ 15% des cas sporadiques chez l'adulte[9,10].

La voie de signalisation Wnt/β-caténine (Figure 2) est activée de manière anormale dans 40% des CCS via des mutations gain de fonction de la β-caténine elle-même ou des mutations perte de fonction de ZNRF3, une ubiquitine ligase qui exerce un rétrocontrôle négatif de la voie[9] en facilitant la dégradation du récepteur Frizzled (FRZ)[14]. Les mutations de la β-caténine sont localisées dans l'exon 3 qui code pour des résidus Ser/Thr essentiels dans le mécanisme de dégradation de la β-caténine. Les mutations de ces acides aminés empêchent la phosphorylation et la dégradation de la β-caténine par le complexe de destruction AXIN-Glycogène Kinase Synthase 3, Adenomatous Polyposis Coli (AXIN-GSK-APC) induisant une accumulation de la β-caténine dans le cytoplasme et le noyau, où elle active la transcription de ses gènes cibles[15] tels que ceux codant pour l'axine 2, la protéine Leucine Rich Repeat containing G protein-coupled receptor 5 (LRG5) et aussi la cyclin D1[16] et c-myc[17]. La cyclin D et c-myc induisent alors une augmentation de la prolifération cellulaire. Des altérations de la voie p53 ajoutées à celles de la voie Wnt/β-caténine sont associées à des CCS de mauvais pronostic. Des souris transgéniques porteuses de mutations de p53 et de la β-caténine simultanées dans la surrénale développent un carcinome corticosurrénalien[18].

Plusieurs autres anomalies génétiques/épigénétiques, notamment celle du locus chromosomique 11p15 soumis à empreinte parentale ont été décrites dans les CCS[19]. Dans la corticosurrénale normale, seuls l'allèle paternel d'IGF-2 et les allèles maternels de *C*yclin-*Dependant Kinase I*nhibitor 1C (CDKN1C) et H19 sont exprimés. Les anomalies en 11p15 dans le CCS aboutissent à une répression des gènes H19 et CDKN1C exprimés à partir de l'allèle maternel et/ou à une surexpression du gène IGF2 à partir de l'allèle paternel. Les mécanismes entraînant cette surexpression sont le plus fréquemment une disomie uniparentale avec perte de l'allèle maternel et duplication de l'allèle paternel actif ou plus rarement à une perte d'empreinte (Loss Of Imprinting ou LOI) avec expression du gène IGF-II par les deux allèles paternel et maternel. Lorsqu'on compare les carcinomes aux adénomes corticosurrénaliens, l'IGF2 est surexprimé dans 90% des CCS[18,20].

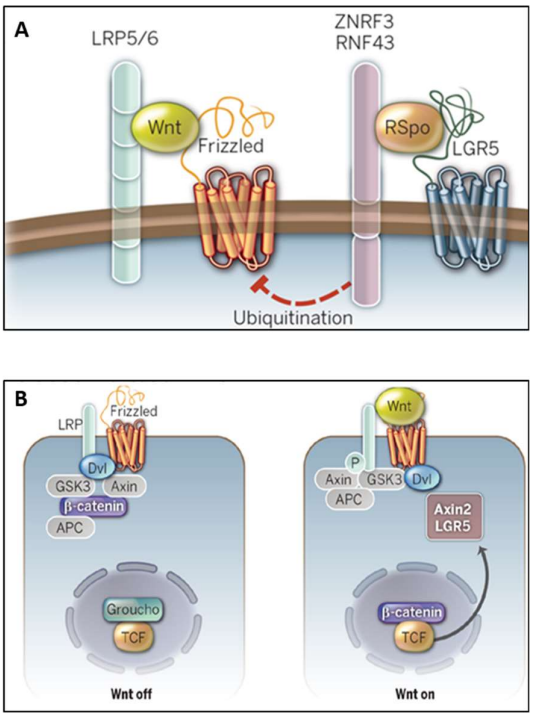


Figure 2 : Mécanismes de signalisation de la voie Wnt/β-caténine, d'après Clever, 2014[21]. (A) Récepteurs de Wnt**.** En situation physiologique, Wnt est un ligand qui se lie à Frizzled et aux récepteurs LRP5/6. Il active alors la voie de signalisation en aval. Les protéines membranaires ZNRF3 et RNF43 sont des ubiquitines ligases qui régulent négativement Frizzled par ubiquitination. La liaison de R-spondin (Rspo) avec Zinc And Ring Finger 3 (ZNRF3), RING Finger Protein 43 (RNFR43) et le récepteur Leucine Rich Repeat containing G protein-coupled receptor 5 (LGR5), inhibe l'activité de ZNRF3 et RNF43 et stabilise alors Frizzled. **(B)** Signalisation Wnt. A gauche, en absence du ligand Wnt, le complexe de dégradation constitué de l'Axine, de la Glycogène Synthase Kinase 3 (GSK3) et de l'Adenomatous Polyposis Coli (APC), se lie à la β-caténine; celle-ci est phosphorylée puis dégradée. Disheveld (DvL) est aussi nécessaire à l'activation de cette voie. Dans le noyau, le facteur de transcription TCF (T Cell Factor) est sous une forme inactive car il est associé à Groucho. A droite, en présence de Wnt, l'axine est associée à la protéine phosphorylée LRP (lipoprotein receptor-related protein). Le complexe de destruction est détruit et la β-caténine est stabilisée. Elle pénètre dans le noyau où elle se fixe à TCF et régule positivement ses multiples gènes cibles dont l'Axine 2 et LGR5.

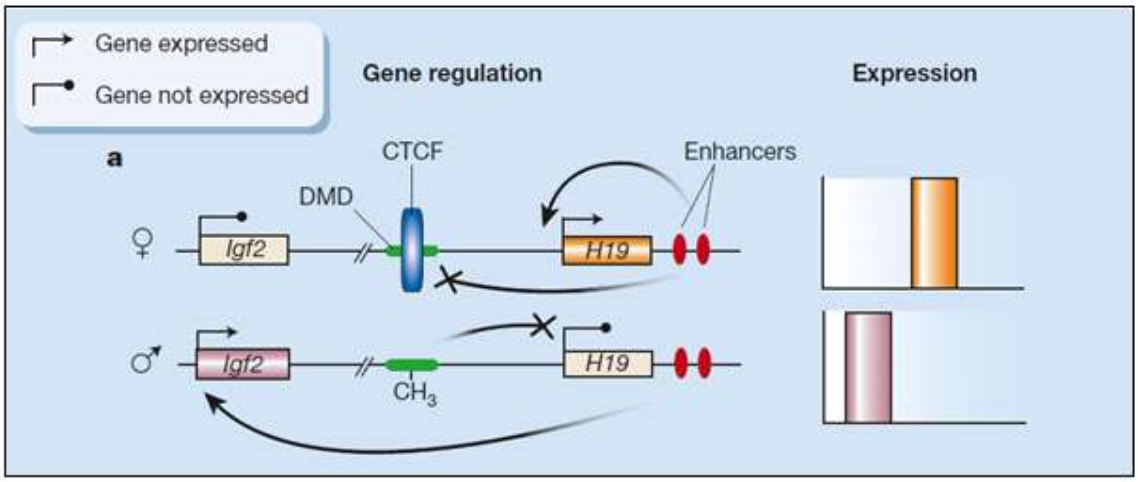


Figure 3 : IGF2 et empreinte parentale, d'après David A. F. Loebel and Patrick P. L. Tam, 2004 [22]. En situation physiologique, l'allèle maternel du gène IGF2 n'est pas exprimé car le répresseur transcriptionnel CTCF se lie avec le Domain Méthylé Différencié DMD alors que H19 est exprimé. L'allèle paternel est exprimé car le DMD est méthylé (représenté par CH3), CTCF ne peut plus se lier à DMD, H19 n'est plus exprimé mais les activateurs de gènes peuvent activer le gène IGF2. En situation pathologique, il y a absence d'empreinte parentale, l'allèle maternel se comporte comme l'allèle paternel. La synthèse d'IGF2 est augmentée.

L'IGF2 est impliqué dans un grand nombre de voies de signalisation et peut être le ligand de quatre récepteurs (Figure 4) : IGF1R et IGF2R, le récepteur hybride pour l'insuline ainsi que le récepteur pour l'insuline. L'activation de IGF1R induit l'activation de la voie RAS et aboutit à la transcription de gènes et à la prolifération. L'activation du récepteur hybride ou du récepteur à insuline induit la voie PI3K/AKT qui va permettre la survie cellulaire en inhibant l'apoptose, en activant l'autophagie, en diminuant le stress oxydatif et permettant la traduction des ARNm en protéines. Dans une cohorte de 13 patients porteurs de CCS et 14 patients porteurs d'ACS non-secrétants d'hormones, le pourcentage de l'aire tumorale positivement marquée avec un anticorps anti-IGF2 était de 35.97 ± 1.38 pour les CCS, de 16.79 ± 2.09 pour les ACSn et de 13.45 ± 1.94 pour les corticosurrénales normales. Les différences étaient statistiquement significatives entre le groupe CCS et le groupe ACSn. D'autre part, la stimulation des cellules de carcinome surrénalien NCI-H295R par IGF2 induit une augmentation de la viabilité et de la prolifération cellulaire[23] suggérant l'implication possible de ce facteur de croissance dans la tumorigénèse. Cependant, IGF2 n'a pu induire à lui seul une tumeur CCS[24] chez des souris transgéniques surexprimant IGF2.

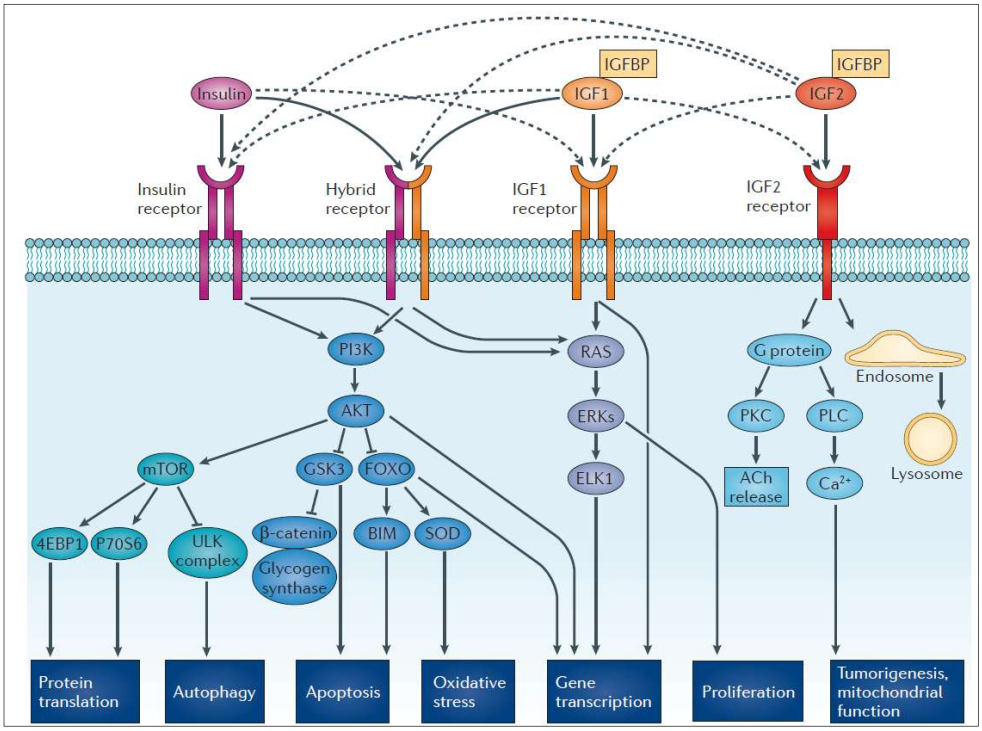


Figure 4 **: Voies de signalisation de l'insuline, de l'IGF1 et de l'IGF2**, d'après M. Fernandes, 2012[25]. Chez les mammifères, l'insuline et l'IGF1 se lient à différents types de récepteurs : le récepteur à insuline, le récepteur hybride, le récepteur de l'IGF1 et le récepteur de l'IGF2. Les voies de signalisation de l'insuline et de IGF1 peuvent activer la voie RAS/ERK, et la voie PI3K-AKT. IGF2 peut se lier à tous les récepteurs précédents ainsi qu'au récepteur de l'IGF2. Le récepteur IGF2R peut induire l'endocytose et activer le trafic lysosomal. Il peut également, par l'intermédiaire de la protéine G, activer la la protéine kinase C (PKC) et la phospholipase C (PLC). Abréviations: 4EBP1, 4E binding protein 1; ACh, acetylcholine; BIM, BCL-2 interacting mediator of cell death; ELK, ETS-like transcription factor; FOXO, forkhead box protein O; GSK3, glycogen synthase kinase 3; IGFBP, IGF-binding protein; mTOR: mammalian target of rapamycin; PI3K: Phosphoinositide 3-kinase, SOD: superoxide dismutase; ULK, uncoordinated-like kinase.

1.4 Les microARN

1.4.1 Définition

Les microARN (miRs) sont de petits ARNs non-codants constitués de 20 à 25 nucléotides. Le premier miR (cel-lin4) a été découvert chez Caenorhabditis Elegans en 1993. Il a une structure complémentaire de l'ARNm de lin14 et inhibe la synthèse de la protéine LIN-14[26] . Depuis cette découverte, le nombre de miRs identifiés a considérablement augmenté : en effet, en 2021, la base de données miRBase comptabilise 48860 miRs matures et 38589 précurseurs de miRs[27], identifiés dans 271 organismes. Chez l'homme, 1917 précurseurs et 2654 séquences de miRs matures ont été annotés.

1.4.2 Nomenclature

Le premier terme caractérise l'espèce comme hsa pour l'homme, ggo pour le gorille, mmu pour la souris, cel pour C. elegans. Ce préfixe précède le terme de « miR », suivi de chiffres et de lettres pour discerner les miRs : par exemple hsa-miR-139. Les premiers miRs découverts échappent à cette nomenclature (exemple cel-lin4). Lorsque des miRs identiques sont obtenus à partir de deux gènes différents, on écrira hsa-mir-24-1 et hsa-mir-24-2 pour désigner les gènes, et par exemple hsa-miR-24-5p ou hsa-miR-24-3p pour désigner les deux formes du miR mature. Pour deux miRs similaires (produits par deux gènes différents) qui ne diffèrent que de quelques nucléotides dans les parties 3', on désignera les deux miRs en leur conservant un même nombre, mais on les distinguera en ajoutant une lettre (exemple : hsa-miR-103a-1, hsa-miR-103a-2, hsa-miR-103b-1, hsa-miR-103b-2). Le précurseur du miR est en forme d'épingle à cheveux; il est constitué de 2 brins qui ne sont pas entièrement complémentaires (Figure 5).

```
          -              a  a  g   -u   ucc |
5'  gagggg gaagacgggagga ag ag gag  ggu   a
    |||||| |||||||||||||| || || |||  |||
3'  cucucc cuucugcccuccu uc uc cuc  ccg   u
           u              c  c  a   cu   cac
```

Figure 5 : Exemple de séquence de miR : hsa-miR-483-5p. Dans miRBase, les 2 futurs brins matures apparaissent en rose au niveau du précurseur. Le sens de lecture s'effectue de 5' en 3'. Le miR mature de hsp-miR-483-5p en 5' est AAGACGGGAGGAAAGAAGGGAG. Le miR mature de hsp-miR-483-3p en 3' est UCACUCCUCUCCUCCCGUCUU.

Dans certaines publications antérieures, le brin le plus abondant ne possède pas de suffixe et le brin le moins abondant porte un astérisque * comme pour miR-200c. Cependant cette classification peut générer des erreurs et elle est remplacée progressivement par les suffixes 3p ou 5p.

1.4.3 Biogenèse des microARN

Les gènes codant pour les miRs sont transcrits par l'enzyme RNA polymérase II ou III en de longs transcrits primaires appelés « pri-miRNA », qui peuvent atteindre plusieurs milliers de nucléotides (Figure 6). Ils possèdent, comme pour les pre-miRNA, une « coiffe » en 5' (7-méthylguanosine triphosphate [m7G]), et une « queue » polyadénylée à leur extrémité 3'. Les pri-miRNA ont une

structure tridimensionnelle comportant des régions en épingle à cheveux (constituées par une tige et une boucle), parmi lesquelles se trouvent les séquences du futur miR. Le complexe Drosha/DGCR8 permet le clivage du pri-miRNA en pre-miRNA. L'exportine 5 assure le transport du pre-miR du noyau vers le cytoplasme. L'enzyme Dicer va couper le pre-miR pour donner un miR double brin. Celui-ci est pris en charge par le complexe RISC (RNA Induced Silencing Complex) qui contient des protéines de la famille Argonaute (Ago). Un des deux brins est sélectionné selon des principes complexes et constituera de ce fait le brin « guide » ou brin « majeur », le brin complémentaire constituant alors brin « passager » ou brin « mineur », qui est généralement soumis à dégradation. Lorsque le miR a une complémentarité parfaite avec un ARNm, il s'ensuit une dégradation de ce dernier. Ce cas a été initialement décrit chez les plantes[28]. Chez les mammifères, les miRs inhibent la traduction de l'ARNm en protéines lorsque la complémentarité est imparfaite ou induisent la déstabilisation des ARNm en cas de complémentarité parfaite.

La complémentarité parfaite existe cependant sur une partie limitée de la séquence du miR : elle se situe entre les nucléotides 2 et 8 dans une région appelée « seed » ou « graine ». Cette complémentarité au niveau d'une séquence limitée de nucléotides confère aux miRs un grand nombre de cibles potentielles.

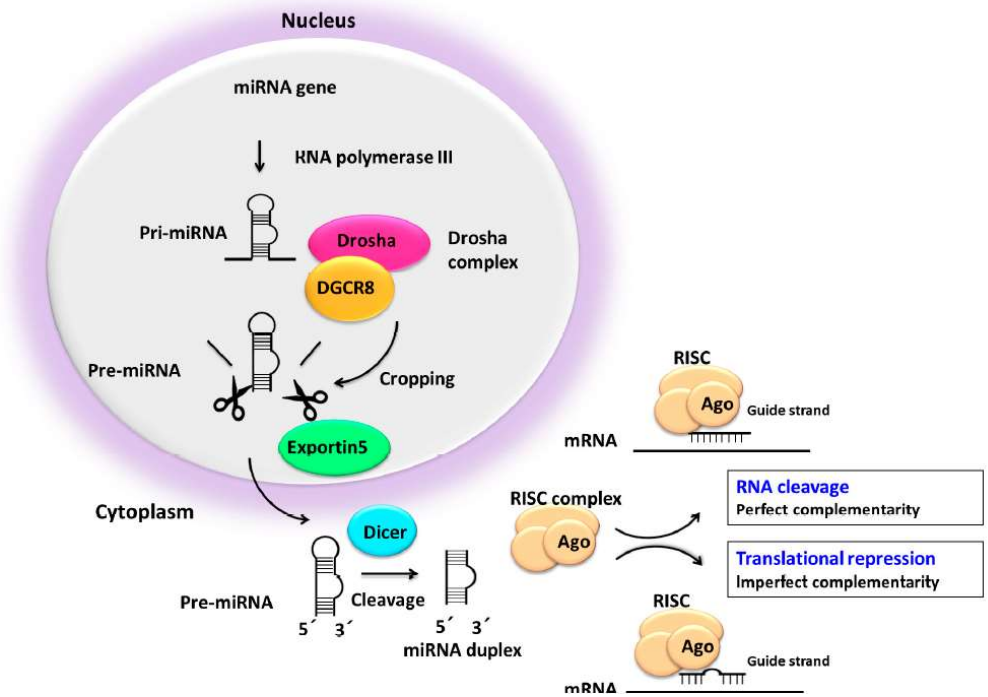


Figure 6 : **Biogenèse des microARN, d'après Irena Mieswik, 2019** [29]. RISC: RNA-induced silencing complex; Ago: Argonaute family proteins.

1.4.4 Transcription des microARN

Il existe différents types d'organisation génique des miRs (Figure 7) :

-Les miRs intergéniques sont des miRs localisés entre 2 gènes, ils ont leur propre promoteur et sont transcrits de manière indépendante. Ils représentent environ 39% des miRs[30].

-La plupart des miRs ont un gène hôte (host gene) qui peut être transcrit en ARN messager (traduit en protéines) ou en ARN long non-codant (long non-coding RNA ou lncRNA). Les miRs provenant de

ces gènes hôtes sont appelés des miRs intragéniques : ils sont introniques à 90%[30], exoniques ou peuvent chevaucher une zone intron-exon (« site-overlaping miR » : SO miR). La quantité de miRs synthétisée est souvent en corrélation avec les ARN messagers provenant du gène hôte : Dans une étude de 2004, cette corrélation a été montrée pour 4 cas sur les 5 étudiés[31]. Certains de ces miRs peuvent exercer un feed-back négatif sur l'ARN messager de leurs gènes hôtes[30]. Les miRs les plus anciens dans l'évolution (communs aux oiseaux et mammifères) sont des miRs intragéniques.

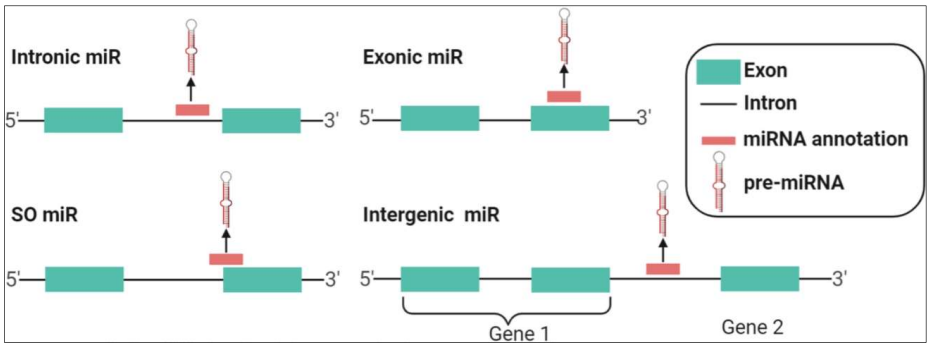


Figure 7 : Localisation des séquences codant pour les miRs, d'après Q Sun et al, 2020[32]. Les miRs sont introniques, exoniques ou intergéniques.

1.4.5 Rôle des microARN

Les microARN ont un rôle essentiel dans la régulation de l'expression des gènes en déstabilisant les ARNs messagers (ARNm) ou en inhibant leur traduction. Ils se fixent en général sur l'extrémité 3'-non traduite (3'UTR ou 3' Untranslated Region) qui peut avoir plusieurs sites de liaison avec le miR. Chez l'homme, ils ciblent potentiellement plus de 60 % des ARNm[33].

1.4.6 Inhibition de la traduction par les microARN chez les mammifères

1.4.6.1 Protéine Argonaute associée au microARN

Chez les mammifères, l'ARNm cible des miRs ne présente pas un appariement parfait avec ses miRs régulateurs, contrairement aux plantes. Le miR est pris en charge par Argonaute (Ago) dans le complexe RISC. Argonaute est une protéine composée de 4 domaines[34]: le domaine N-terminal, le domaine PAZ (Piwi-Argonaute-Zwille), le domaine MID (Middle) et le domaine PIWI (P-element-Induced WImpy testis) (Figure 8).

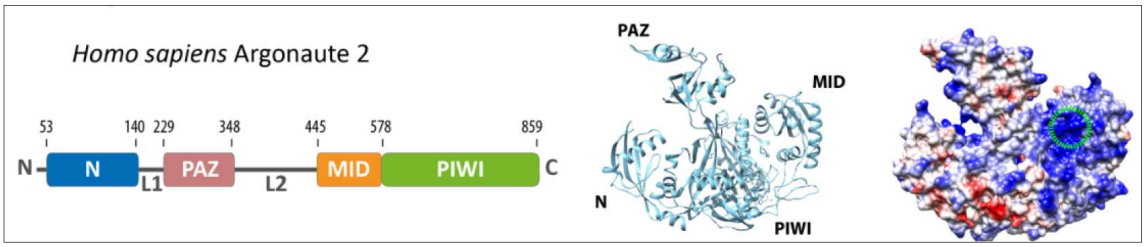


Figure 8 : Structure en domaines de Argonaute 2 chez l'homme, d'après S WillKomm et al, 2015. L1 et L2 : Linkers 1 et 2. Le domaine de liaison de l'extrémité 5' du miR est entouré par un cercle vert dans la stucture en 3 dimensions à droite.

1.4.6.2 Interaction microARN-ARN messager

La spécificité de reconnaissance d'un miR est principalement déterminée par la séquence de ses nucléotides 2 à 7 ou 2 à 8, correspondant à la région dénommée « seed » située du côté 5' (Figure 9). Les trois types d'appariement dits canoniques existant entre un miR et sa cible sont :

- la configuration 7mer : elle se caractérise par un appariement parfait du seed positionné après l'adénine du messager faisant face au nucléotide en position 1 du miR.

- la configuration 7mer-m8 : l'appariement du seed est parfait sur les 7 nucléotides et présente un appariement additionnel de type Watson-Crick en position 8 : A-T, G-C (la base azotée adénine (A) s'apparie avec la thymine (T) et la guanine (G) s'apparie avec la cytosine (C).

- la configuration 8mer : caractérisée à la fois par la présence de l'adénine et de l'appariement additionnel en position 8.

Trois autres types d'appariements ne suivent pas ces modèles canoniques (Figure 9). Le modèle 6mer présente un appariement de la région seed parfaite, sans autre élément de reconnaissance du site, conduisant ainsi à une moindre spécificité. Les types d'appariements 3'-supplémentaires et 3'-compensatoires se caractérisent par un appariement Watson-Crick additionnel de la région 3' du miR pour renforcer l'interaction avec la cible ou compenser un mésappariement dans la séquence 5'.

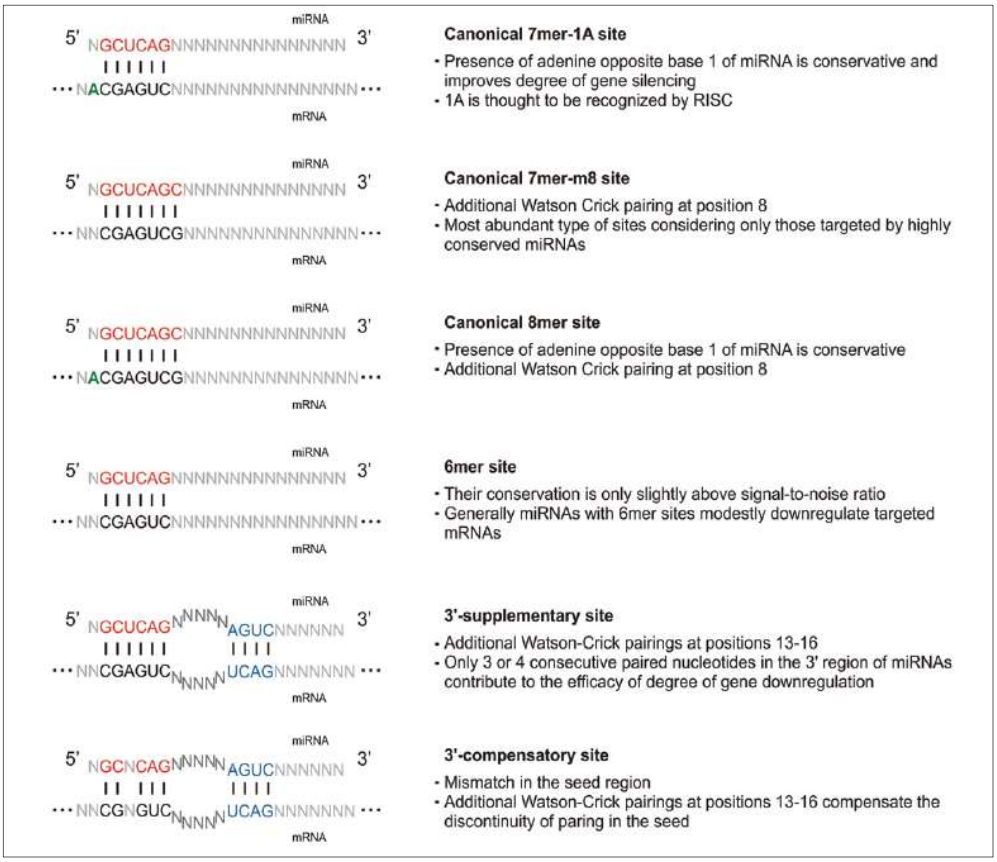


Figure 9 : Représentation des interactions miR-ARNm canoniques et non canoniques, d'après Witkos et al, 2011[35].

1.4.6.3 Mécanismes de répression des gènes par les miRs

La plupart des études indiquent que les miRs agissent soit sur la traduction, soit sur la stabilité des ARNm. La traduction est dépendante du recrutement de la protéine PABP (Poly-A-Binding Protein) au niveau de la queue poly-A de l'ARNm, qui interagit avec les facteurs d'initiation de la traduction eIF4G, eIF4E et eIF4A (complexe eIF4F), recrutés au niveau de la coiffe en 5' de l'ARNm. L'élément important de l'activité de répression par les miRs va être la formation du complexe miRISC (miR et RISC) composé du miR mature, de la protéine Ago et de son partenaire GW182 (Figure 10).

La fixation du complexe miRISC au niveau de la séquence 3' non-codante du messager permet alors à GW182 d'entrer en compétition avec la queue poly-A pour induire la dissociation de la protéine PABCP (Figure 10). Cette perturbation se traduit par une diminution de l'efficacité de la traduction (recrutement des facteurs d'initiation de la traduction) et conduit à la déstabilisation de l'ARNm par élimination de la coiffe et dégradation de la queue poly-A.

L'activité de répression des gènes par les miRs peut également s'exercer par déstabilisation directe des ARNm. De nombreuses études indiquent que la dégradation des cibles de miRs est catalysée par des enzymes impliquées dans la voie de dégradation de l'ARNm de l'extrémité 3' vers l'extrémité 5'. Dans cette voie, les ARNm sont d'abord déadénylés par l'action consécutive et partiellement redondante des complexes de déadénylation PAN2–PAN3 et CCR4–NOT (Figure 10). Les ARNm déadénylés sont ensuite « décoiffés » par la protéine DCP2 (decapping protein 2), ce qui nécessite des cofacteurs supplémentaires pour une activité complète, notamment DCP1. Enfin, les ARNm déadénylés et décoiffés sont dégradés de l'extrémité 5' vers l'extrémité 3' par la principale nucléase cytoplasmique Exoribonucléase 1 (XRN1)[36].

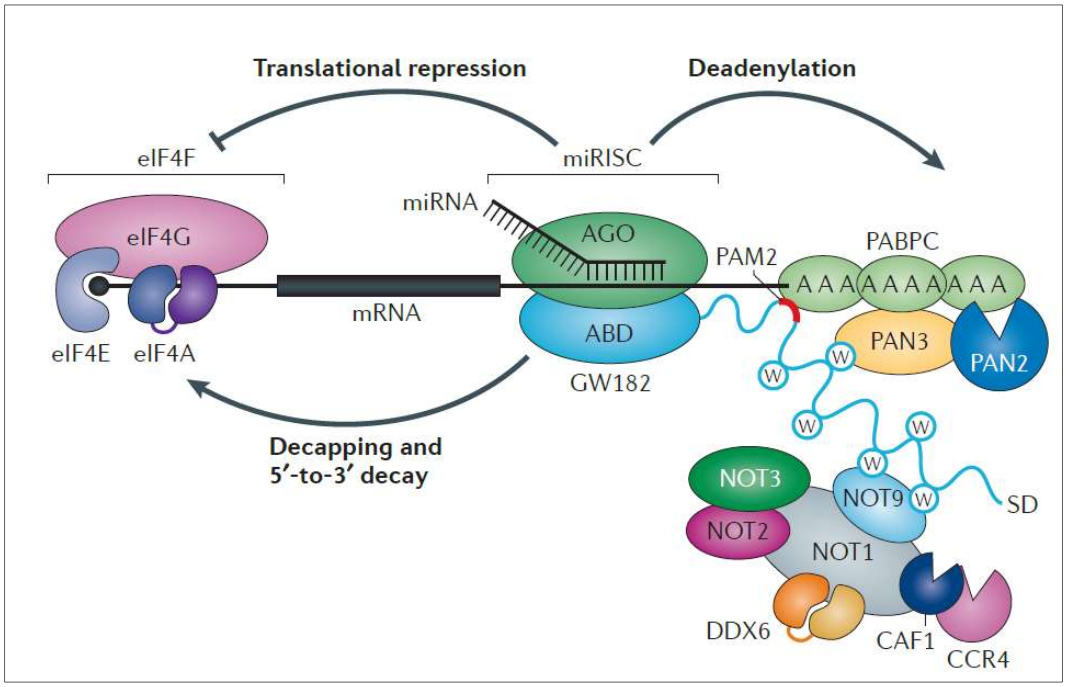


Figure 10 : Mécanismes d'action des miRs , d'après S. Jonas, 2015[36]

1.4.6.4 Identification des gènes cibles des miRs

Un miR peut avoir plusieurs ARNm cibles et un ARNm peut être ciblé par plusieurs miRs. Des logiciels de prédiction ont été développés afin de faciliter l'identification des cibles potentielles d'un miR en fonction de sa séquence de fixation. Ces logiciels comparent la séquence « *seed* » du miR avec les séquences de transcrits répertoriées dans des bases de données (par exemple RefSeq ou Ensembl). Les logiciels classiquement utilisés sont TargetSan, miRanda, PicTar, DIANA-microT, et rna22[35]. Les résultats se présentent sous une forme de liste d'ARNm cibles potentiels du miR d'intérêt en fonction d'un score de prédiction qui représente la spécificité de l'interaction miR-ARNm. Cette spécificité dépend de différents paramètres pris en compte par les logiciels (mésappariements identifiés, énergie de l'interaction, conservation entre espèces). Il est nécessaire de compléter cette approche bioinformatique par des approches expérimentales afin de déterminer des cibles fonctionnelles de miR. Une des méthodes le plus souvent utilisée est l'analyse de l'expression de la protéine d'intérêt en réponse à une sur-expression ou une sous-expression d'un miR synthétique. Les variations d'expression observées dans la protéine d'intérêt permettent alors de confirmer que l'ARNm dont elle est issue constitue une cible potentielle du miR étudié[37]. L'interaction miR-ARNm est ensuite confirmée in vitro par transfection de construction plasmidique portant un gène rapporteur (généralement la luciférase) auquel est ajoutée la région 3' non-traduite d'un ARNm d'intérêt. L'effet de l'expression du miR sur l'expression de la luciférase permet de confirmer ou non l'interaction miR-ARNm étudiée.

Des méthodes d'immunoprécipitation des protéines Argonaute ont également été développées mais sont plus rarement utilisées en raison de la complexité des différentes étapes. Le séquençage des ARN (miR et ARNm cibles) associé aux protéines Argonaute immunoprécipitées permet d'identifier des interactions fonctionnelles entre les miRs et les ARNm cible[38]. Alternativement, le miR d'intérêt est biotynylé puis transfecté dans les cellules étudiées (expériences de « pulldown »). L'expression des ARNs totaux par microarray permet de déterminer les transcrits qui sont sous-exprimés après transfection. La précipitation des complexes miR biotinylé-ARN à l'aide de billes de streptavidine suivie d'une purification des ARN et de leur séquençage permet d'identifier les ARN cibles (Figure 11). En lysant l'ARN avec une Rnase, seules les « Micro ARN Recognition Element » (MRE) sont isolés. Un recoupement des 3 méthodes et des tests de fonctionnalité permettent d'identifier les cibles du miR étudié[39].

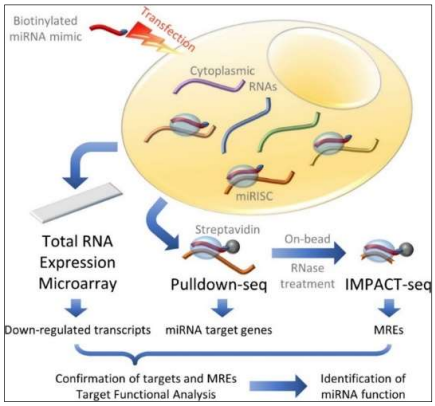


Figure 11 : **Identification des ARNm cibles des miRs par « pulldown», d'après Shen Mynn Tan et all, 2014**[39]

1.4.7 Dérégulation des microARN dans le cancer

1.4.7.1 Généralités

De par leur variété et leur grand champ d'action, les microARN peuvent en théorie réguler toutes les caractéristiques de la cellule cancéreuse décrites par Weinberg[40]: prolifération soutenue, échappement à la destruction par le système immunitaire, immortalité, promotion de l'inflammation tumorale, instabilité génétique et mutation, résistance à la mort cellulaire, reprogrammation du métabolisme énergétique, induction de l'angiogenèse et activation de l'invasion cellulaire et de la transition épithélio-mésenchymateuse. En Figure 12, le schéma de Weinberg a ainsi été adapté aux miRs.

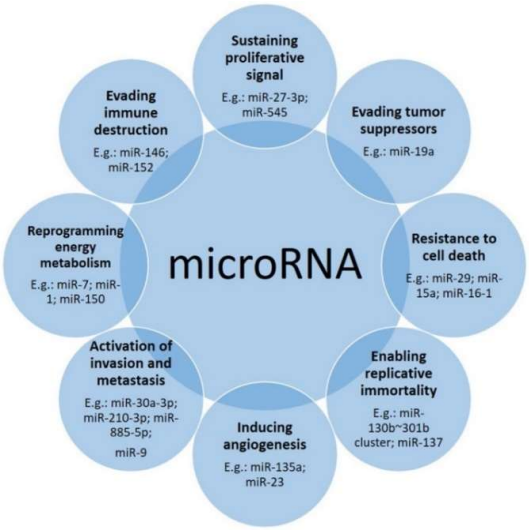


Figure 12 : Implication des miRs dans le cancer, d'après Detassis et al, 2017[41].

L'implication des miRs dans l'acquisition de caractères tumorigènes a été largement rapportée pour nombre d'entre eux. Certains miRs sous-exprimés dans le cancer sont anti-tumoraux (supresseurs de tumeur) tandis que des miRs surexprimés peuvent au contraire faciliter la progression du cancer (miRs oncogéniques).

1.4.7.2 MicroARN impliqués dans la Transition Epithélio-Mesenchymateuse (EMT)

La transition épithélio-mésenchymateuse permet à des cellules épithéliales d'acquérir des caractéristiques de cellules mésenchymateuses. L'EMT est déclenchée sous l'action des facteurs de transcription ZEB, SNAIL et TWIST qui inhibent l'expression des gènes associés aux cellules épithéliales comme la E-cadhérine[42]. L'EMT favorise la progression du cancer et la dissémination de métastases. Certains miRs vont inhiber les protéines qui interviennent dans le processus de l'EMT[43]. Par exemple, dans le cancer du sein (Figure 13), miR-375 inhibe SHOX2 et IGFR, deux protéines qui favorisent l'EMT. MiR-7 inhibe l'EMT en réprimant SETDB1, un inducteur de l'expression de Myc/Twist/miR-9 via le facteur de transcription STAT1. De même, miR-205 bloque l'EMT en réprimant ZEB1/2. Les miRs 205, 200b et 200c, inhibent respectivement Notch2B, BM1 et Suz12 et

inhibent ainsi la formation de cellules souches cancéreuses (CSCs). D'autre miRs, comme miR-495 et miR-181, vont au contraire promouvoir l'EMT et les CSCs.

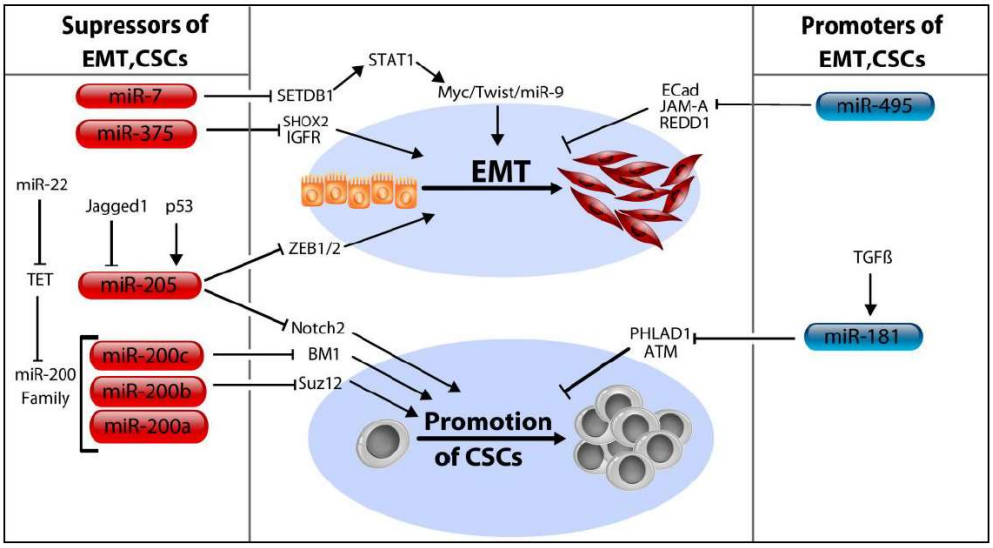


Figure 13 : Action des miRs sur la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) et la formation de cellules souches cancéreuses d'après d'après Steven[44].

1.4.7.3 MicroARN et angiogenèse tumorale

1.4.7.3.1 L'angiogenèse physiologique

L'angiogenèse est le processus de formation de nouveaux vaisseaux à partir de vaisseaux pré-existants. Elle peut être physiologique (de la croissance fœtale jusqu'à l'adulte : menstruations, blessure, grossesse)[45] ou pathologique dans le cancer. Ce processus implique la prolifération des cellules endothéliales puis le recrutement de cellules péricytaires qui concourent à stabiliser le nouveau réseau vasculaire et à lui donner une efficacité fonctionnelle. Un acteur majeur de l'angiogenèse est le facteur de croissance VEGF ou Vascular Endothelial Growth Factor[46]. La prépondérance de signaux pro-angiogéniques entraîne l'activation des cellules endothéliales en favorisant leur prolifération et leur migration (Figure 14). Le VEGF induit l'expression du DLL4 (delta-like ligand 4) dans la cellule de front (tip cell) du vaisseau et l'activation de la voie de signalisation impliquant son récepteur, Notch, dans les cellules de soutien (stalk cells). La matrice extracellulaire est dégradée localement et les interactions péricytes-cellules endothéliales sont affaiblies[47]. Les cellules de soutien vont alors proliférer et permettrent la croissance et la rencontre de deux bourgeonnements vasculaires. Les processus de vacuolisation suivis de la fusion des vacuoles endothéliales conduit à la formation de la lumière et permet la perfusion du nouveau vaisseau. Une nouvelle membrane basale est produite et le recrutement de péricytes stabilise les jonctions endothéliales.

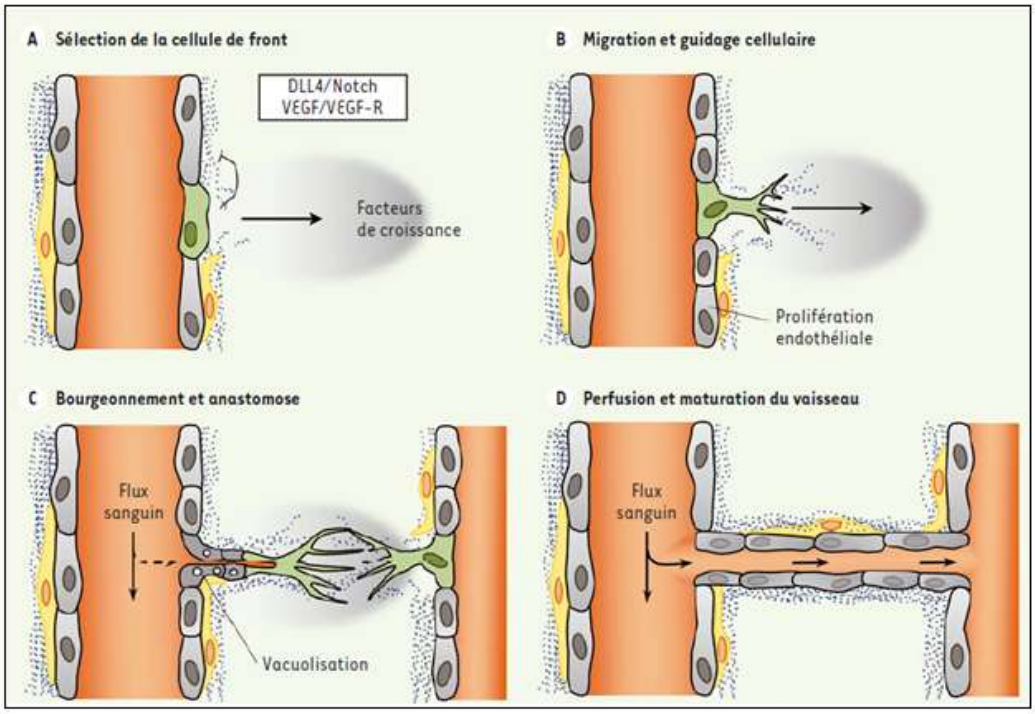


Figure 14 : Mécanismes de l'angiogenèse, d'après L. TREPS et al., 2015[48]

Il existe différents types de VEGF (Figure 15). Le plus abondant est le VEGF-A[49] ou VEGF dont les différentes isoformes sont issues de la transcription alternative d'un gène unique qui aboutit à la formation de quatre protéines de poids moléculaire de 121, 165, 189 et 206 kDa chez l'homme. Le VEGF 165 est secrété et se lie à la surface des cellules endothéliales et à la membrane extracellulaire. Les VEGF 189 et 206 sont séquestrés dans la matrice extracellulaire dont ils peuvent être libérés par des héparinases. D'autres VEGF relativement proches de la structure du VEGF-A ont été isolés : VEGF-B, C, D et E. Les VEGF C et D sont impliqués dans la lymphangiogenèse. Il existe deux récepteurs du VEGF, VEGF-R1 (Flt-1) et VEGF-R2 (Flk-1/KDR). Ce sont des récepteurs à activité tyrosine kinase dont la partie extracellulaire lie le VEGF. Ces récepteurs sont dimérisés par des ponts disulfures. Le VEGF se lie à ses récepteurs sous la forme d'un homodimère. Un troisième récepteur, le VEGF-R3 (Flt-4) lie en particulier le VEGF-C. Le système VEGF-R3/VEGF-C joue un rôle important dans la formation des vaisseaux lymphatiques. Un co-récepteur du VEGF est la neuropiline-1, une protéine impliquée dans les interactions cellulaires et/ou moléculaires, notamment dans le guidage des axones neuronaux lors du développement. La co-expression de la neuropiline-1 et du récepteur VEGF-R2 augmente l'activité chimiotactique du VEGF 165.

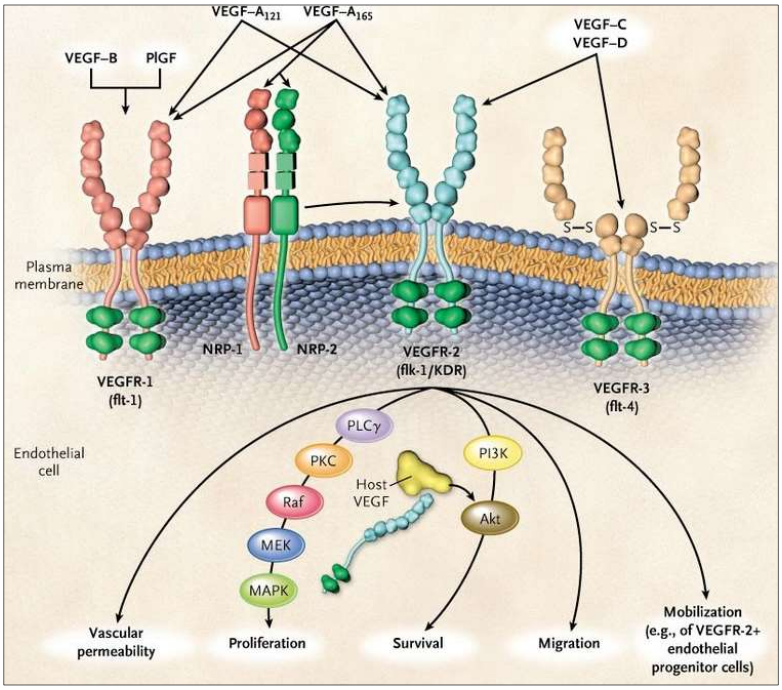


Figure 15 : Les différents VEGF et leurs récepteurs, d'après Kerbel,2008[50]. Le VEGF stimule la prolifération et la migration des cellules endothéliales via son récepteur VEGF-R2 présent sur la membrane des cellules endothéliales. Il s'en suit une cascade d'activation de différentes voies de signalisation (voies AKT-PI3Kinase, MAP-kinase p38, MAP-Kinase Erk) impliquées dans la prolifération et la migration des cellules endothéliales, ainsi que dans l'augmentation de la perméabilité vasculaire (perte des jonctions entre les cellules endothéliales) ; AKT (Protein kinase B), PI3K (phosphoinositide 3-kinase), MAP-kinase(Mitogen-activated protein kinases) ; ERK(Extracellular Signal Regulated Kinase).

1.4.7.3.2 L'angiogenèse tumorale

L'importance de l'angiogenèse tumorale a été évoquée dès les années 70 par les travaux pionniers de Judah Folkman, qui a postulé que la croissance d'une tumeur au-delà de quelques mm^3 nécessite la mise en place préalable de sa vascularisation[51]. Une tumeur peut rester à l'état de dormance pendant plusieurs années, un équilibre se créant entre facteurs anti-angiogènes et pro-angiogènes. Cet équilibre va être rompu en faveur des facteurs pro-angiogènes par un « switch » angiogénique déclenché par l'hypoxie qui survient au sein de la tumeur, un stress métabolique ou encore une réponse inflammatoire. Le VEGF, produit par les cellules tumorales, stimule la prolifération et la migration des cellules endothéliales et induit la formation de nouveaux vaisseaux en direction de la tumeur (Figure 16). D'autres facteurs de croissance pro-angiogéniques, tels le Platelet Derived Growth Factor (PDGF), le basic Fibroblast Growth Factor (bFGF), ainsi que les angiopoiétines 1 et 2 participent à la mise en place de la vascularisation tumorale via leurs récepteurs spécifiques (Figure 16).

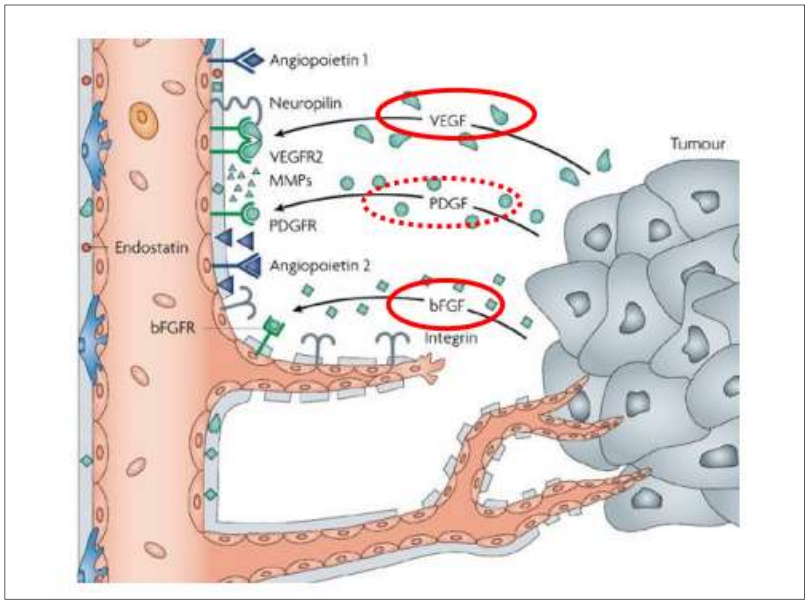


Figure 16 : Les étapes clés de l'angiogenèse tumorale, d'après J. Folkman 2007[52].

1.4.7.3.3 MicroARN pro-et anti-angiogéniques.

Tous les miRs qui ciblent les facteurs de croissance impliqués dans l'angiogenèse ou des molécules impliquées dans les voies de signalisation de ces facteurs ont une activité potentielle sur l'angiogenèse[52]. L'expression de certains miRs est induite après stimulation des cellules avec un facteur de croissance[53]. Par exemple, miR-132 est induit par le bFGF et le VEGF[54]. Il favorise l'angiogenèse en ciblant p120RasGAP (Ras GTPase activating protein), une protéine impliquée dans l'inhibition de la voie de signalisation des MAP-Kinases activée par le VEGF.

Les miRs du cluster miR-17-92 (miR-17-5p, miR-17-3p, miR-18a, miR-19a, miR19b, miR-20a et miR-92a) sont présents en faible quantité dans l'endothélium quiescent. Le VEGF induit la transcription de ces miRs, qui sont nécessaires à la prolifération et au bourgeonnement[55] des cellules endothéliales. Dans ces mêmes cellules, l'hypoxie stimule d'une part l'Ephrine A3, une protéine transmembranaire impliquée dans la communication cellule-cellule et d'autre part, miR-210 qui exerce un rétrocontrôle négatif sur la synthèse de l'Ephrine A3 en inhibant son expression[56].

Tableau 1 : Exemples de miRs impliqués dans le contrôle de l'angiogenèse

miRs	Gènes cibles	Angiogenèse	Références
miR-126	SPRED1-VCAM-1-PI3KR2	activation	57
miR-27b	VEGF-C	inhibition	58
miR-132	SPRED1	activation	56
miR-210	Ephrin A3, PTP1b	activation	56
miR-329	MEF2A	inhibition	56
Cluster miR-17-92		activation	55
miR-100	mTOR	inhibition	56
miR-205c	Zeb1	inhibition	60

SPRED1: Sprouty Related EVH1 Domain Containing 1; VCAM: vascular cell adhesion molecule 1; PI3KR2: Phosphoinositide-3-kinase Regulatory Subunit 2; PTB1b: Protein Tyrosin Phosphatase 1b; MEF2A: Myocyte Enhancer Factor 2a; Zeb1: Zinc finger E-box-binding homeobox 1.

Dans le Tableau 1 sont décrits des miRs connus pour leur activité sur l'angiogenèse. Certains de ces miRs ont pour cibles des protéines de voie de signalisation[61]. Ainsi, miR-126 est l'un des miRs les plus exprimés au niveau des cellules endothéliales. L'inhibition de miR-126 chez la souris montre une désorganisation des vaisseaux sanguins à l'origine d'hémorragies embryonnaires. Ses deux cibles sont SPRED1 et PI3KR2. SPRED1, un inhibiteur de la voie RAS-MAPK [62] et PI3KR2[57], une sous-unité régulatrice de PI3K dans la voie PI3K-AKT-mTOR[63], régulent négativement ces voies de signalisation. Leur inhibition par miR-126 active l'angiogenèse. En ciblant mTOR (mammalian target of rapamycin) dans la voie de signalisation PI3K-AKT-mTOR, miR-100 diminue la tubulogenèse et le bourgeonnement[64,56]. Certains miRs comme miR-205c, sont induits sous l'action des ROS (Reactive Oxygen Species)[60] et sont des inhibiteurs de l'angiogenèse. Le nombre important de miRs rapportés comme impliqués dans l'angiogenèse suggèrent qu'ils ont un rôle déterminant dans ce processus.

1.4.8 MicroARN étudiés dans le carcinome corticosurrénalien

Notre équipe a montré que l'expression de nombreux miRs est dérégulée dans le CCS[65]. Des études réalisées par le réseau national COMETE (Cortico-Médullo-Tumeurs Endocrines) et le réseau européen ENSAT (European Network for the Study of Adrenal Tumors) ont confirmé ces résultats sur des cohortes de patients plus larges[65,10]. Ces travaux ont par exemple montré que miR-483-5p et miR-483-3p sont surexprimés dans le CCS comparé aux tumeurs bénignes (adénomes ou ACS) alors que miR-195, miR-497, et miR-335 sont sous-exprimés. D'autre part, ces miRs sont associés à un mauvais pronostic des patients[66]. Notre équipe a également montré que la dérégulation de certains miRs tumoraux et circulants est associée à l'agressivité du CCS. Parmi ces miRs, miR-483-5p et miR-139-5p, ont été particulièrement étudiés[67]. De plus, nous avons observé que miR-483-5p est un biomarqueur prédictif de la récidive des patients après chirurgie[68]. Nous nous sommes particulièrement concentrés sur l'étude de ces deux miRs. Leur séquence est décrite dans miRBase (https://www.mirbase.org), une base qui archive les séquences et les annotations de miRs (Figure 17). MiR-483-5p, miR-483-3p et miR-139-5p sont des miRs introniques. La séquence codant pour miR-483-5p/3p est localisée dans le deuxième intron du gène *IGF2* et celle codant pour miR-139-5p est située dans le deuxième intron de la phosphodiestérase 2A (*PDE2A*).

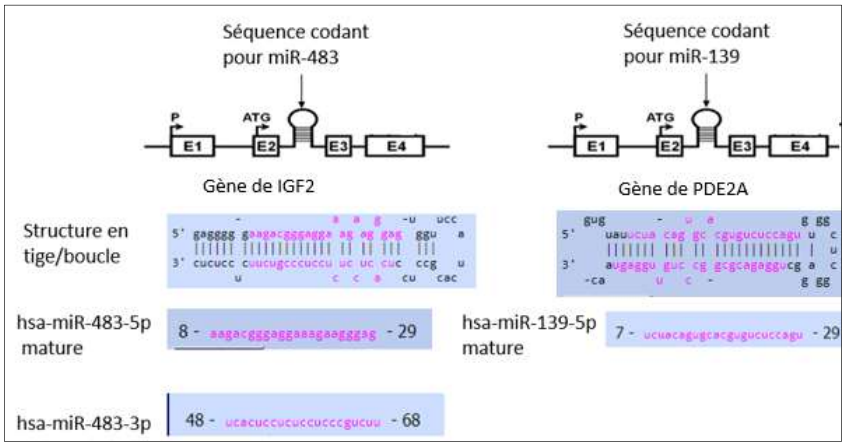


Figure 17 : Localisation et séquences de miR-483-5p/3p et miR-5p selon miRbase. P : Promoteur ; ATG : codon d'initiation de la traduction, E1, E2, E3, E4 : Exons 1,2,3,4

1.4.8.1 Relations gène hôte et miR-483 ou miR-139

Les miRs intragéniques, intégrés dans les introns ou les exons de gènes sur le même brin, sont co-régulés avec leurs gènes hôtes par l'ARN polymérase II (Pol II) [70] tandis que les miRs intergéniques, situés entre les gènes, seraient transcrits à partir de leurs propres promoteurs par Pol II ou Pol III. Des études récentes ont cependant révélé que les miRs intragéniques, même les miARN introniques, ne sont pas toujours co-transcrits avec leurs gènes hôtes[69,70]. Il a été découvert que certains miRs introniques interagissent avec leurs gènes hôtes pour affecter leur stabilité[71]. Plus important encore, des études bioinformatiques ont prédit qu'environ 20 % des miARN introniques ciblent les transcrits de l'ARNm de l'hôte dans une boucle de rétroaction[71,72].

L'*IGF2* dispose de promoteurs P0 et P1 chez l'adulte. Des promoteurs P2, P3 et P4 additionnels sont présents chez le fœtus (Figure 18). Les promoteurs P2, P3 et P4 persistent dans certaines tumeurs comme celle de Wilm's, une tumeur du rein chez l'enfant, et certains sarcomes.

Chez le fœtus et pour les cellules de sarcome humain MHH-ES-1 où les promoteurs P2, P3 et P4 co-existent, miR-483-5p active la transcription de IGF2 par l'intermédiaire de ces promoteurs et augmente sa concentration[73]. L'induction expérimentale de miR-483-5p confirme la corrélation entre la taille de la tumeur et la concentration en miR-483-5p et en IGF2[73]: En effet, les cellules MHH-ES-1 transduites avec un lentivirus exprimant miR-483-5p et implantées chez des souris immunodéficientes donnent des tumeurs plus volumineuses, avec une corrélation entre la taille de la tumeur et la concentration en miR-483-5p et en IGF2.

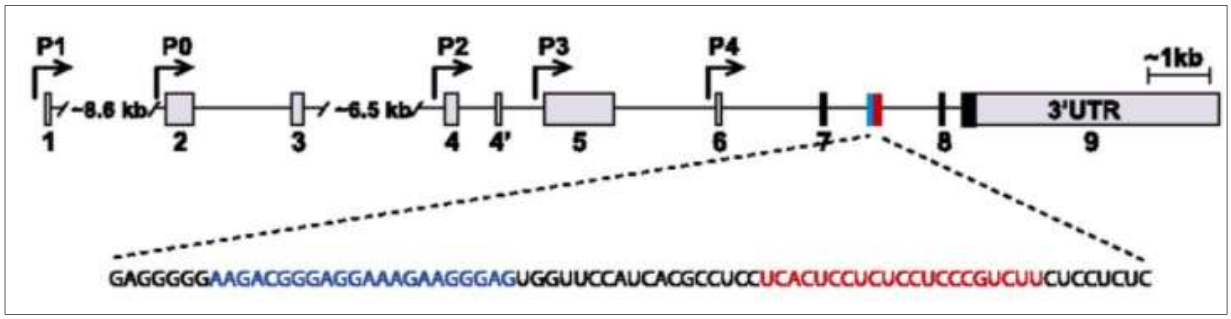


Figure 18 : Le gène IGF2 foetal et ses promoteurs. MiR-483 est localisé dans un intron de IGF2. Les flèches indiquent les sites d'initiation de la transcription des promoteurs P0 à P4. Les rectangles gris indiquent les promoteurs spécifiques en 5'UTR et la région 3'UTR. Les rectangles noirs indiquent les régions codantes, les exons sont numérotés[71]. La séquence de miR-483-5p est en bleu et celle de miR-483-5p est en rouge.

Dans le cancer colorectal (CRC), IGF2 est surexprimé dans la tumeur par rapport au tissu sain adjacent. D'autre part, il y a une corrélation positive entre miR-483-5p, miR-483-3p et IGF2 dans les tissus sains et les tissus tumoraux. Ces résultats suggèrent que pour ce cancer, IGF2 et les 2 miRs sont transcrits en même temps[74]. Cependant, certaines études ont rapporté que miR-483-5p est exprimé de manière indépendante de son gène hôte IGF2[75] dans les cellules Hela en condition d'hypothermie modérée. Nous avons par ailleurs mis en évidence l'augmentation de miR-139-5p dans lesCarcinomes Corticosurrénaliens (CCS). De façon intéressante, l'expression de son gène hôte PDE2A est augmentée dans le CCS[76]. Cependant, la co-régulation potentielle de PDE2A et de miR-139 n'a pas été étudiée à ce jour.

1.5 Les vésicules extracellulaires

1.5.1 Historique

En 1967, des particules riches en phospholipides provenant des plaquettes et présentant des propriétés anticoagulantes ont été isolées après ultra-centrifugation de plasma par Peter Wolf. Ces particules ont été observées au microscope électronique[77]. Deux ans plus tard, des vésicules provenant de matrice osseuse ont été isolées par H. Anderson[78] .

En 1984, la microscopie électronique a permis de visualiser des endosomes multivésiculaires (MVEs) : des réticulocytes de rat ont été incubés avec de la transferrine marquée à l'or (Au-Tf). Des MVE, composés de vésicules contenant de l'Au-Tf ont été observés. De plus, ce marquage a permis de visualiser des MVEs qui déversent par exocytose leur contenu, à savoir des vésicules marquées à l'or (Au-Tf)[79]. Cela montre par ailleurs que la transferrine a été incorporée dans ces vésicules.

En 1996, Rapso G. montre que des cellules lymphoblastoïdes B contiennent un compartiment endocytique riche en Complexe Majeur d'Histocompatibilité de classe II (Major Histocompatibility Complex Class II ou MHCII). Ce compartiment abrite des vésicules dont la membrane est également riche en MHCII. Lorsque le compartiment endocytique fusionne avec la membrane plasmique, il libère ces vésicules qui sont appelées exosomes. Ces derniers présentent à leur surface des molécules du MHCII sous forme compacte car liées à des anticorps. Ces exosomes peuvent alors déclencher une activation des Lymphocytes T[80].

En 2007, de l'ARN et des microARN ont été détectés dans les exosomes de cellules murines de mastocytes MC/9. L'analyse de leur contenu en ARN à l'aide de puces « microarrays » a permis d'identifier 1300 ARNm et 121 microARN[81]. Les ARNm isolés sont fonctionnels pour la production de protéines. Un transfert de ces exosomes entre cellules donneuses et cellules receveuses suggère un nouveau mécanisme de communication cellulaire[81] Les exosomes ont été détectés dans divers fluides biologiques comme le sang, le plasma, la salive, les fluides issus de lavage nasal et bronchial, les urines, le sperme, et le lait[82].

1.5.2 Types de vésicules extracellulaires

Il existe 3 types de vésicules extracellulaires chez les eucaryotes: les corps apoptotiques, les microvésicules et les exosomes. Les tailles de ces 3 types de vésicules sont très hétérogènes et leur biogenèse diffère.

1.5.2.1 Les corps apoptotiques

- Taille

Ils sont de taille hétérogène avec un diamètre supérieur à 5µm ou compris entre 1 et 5 µm[83].

- Origine

Les corps apoptotiques (apoptotics bodies) sont issus de l'apoptose, un processus physiologique qui assure l'homéostasie cellulaire (Figure 19).

- Composition

Ils contiennent des molécules qui peuvent être réutilisées par d'autres cellules. Ces corps apoptotiques peuvent contenir de l'ADN, de l'ARN et des miRs.

- Rôle et utilisation thérapeutique

Les corps apoptotiques permettent d'éliminer les fragments de cellules mortes. Leur élimination rapide évite les réponses auto-immunes[83]. Des applications thérapeutiques des corps apoptotiques sont en développement. Par exemple, chez des souris souffrant d'athérosclérose, des corps apoptotiques contenant miR-126 induisent la production de CXCL12 dans les cellules luminales aortiques et permettent ainsi de réparer les parois avec un recrutement de progéniteurs endothéliaux.

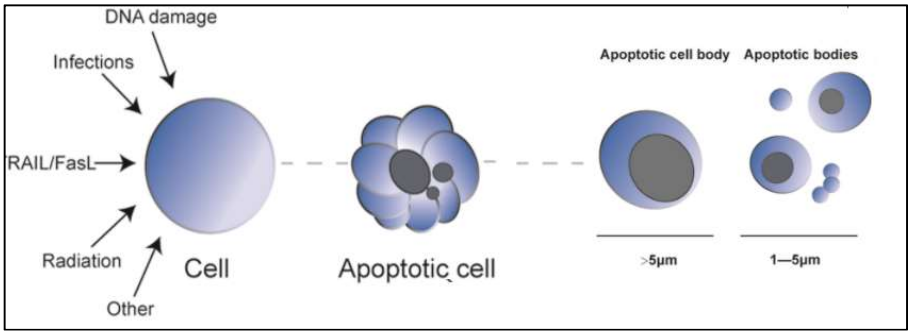


Figure 19 : Les corps apoptotiques, adapté de X. Xuebo, 2019

1.5.2.2 Les microvésicules

- Taille

Elles ont un diamètre de 50 à 500nm, voire 1 µm.

- Biogenèse

Les microvésicules sont formées par bourgeonnement de la membrane plasmique vers le milieu extracellulaire (Figure 20). Les protéines transmembranaires de la membrane cytoplasmique vont également se retrouver au niveau de la membrane des microvésicules.
La composition en protéines des microvésicules dépend également de leur cellule d'origine[84].

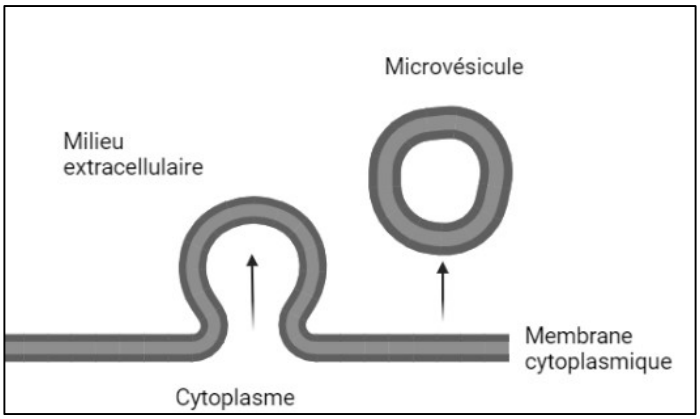


Figure 20 **: Biogenèse des microvésicules par bourgeonnement**

Dans un premier temps, les lipides et les protéines membranaires sont regroupées et forment des micro-domaines membranaires. Cette biogenèse est sous la dépendance de modifications au niveau

de la membrane plasmique qui affectent sa teneur en protéines, lipides et Ca^{2+}. Elle implique l'intervention d'enzymes comme les aminolipides translocases et les scramblases. Une déficience en LIM kinase (LIMK) dans la voie de signalisation Rho/ROCK empêche la synthèse des microvésicules dans les cellules cancéreuses du sein MDA-MB-231[85]. Le mécanisme d'incorporation d'ARN et de miRs dans les microvésicules n'est pas encore connu.
Dans un deuxième temps, la microvésicule se détache de la membrane plasmique. Ce mécanisme dépend de la présence d'ATP au niveau du complexe actine-myosine qui permet la contraction des filaments d'actine. Pour les cellules cancéreuses, le détachement des microvésicules se fait par l'action des enzymes ADP Ribosylation Factor 1/2 (ARF1/ARF2), qui phosphorylent la myosine et permettent à la microvésicule de se détacher[84].

1.5.2.3 Les exosomes

- Taille

Les exosomes sont des nanovésicules de 30 à 150 nm de diamètre.

- Biogenèse

La biogenèse des exosomes débute par une invagination du cytoplasme pour la formation d'un endosome précoce (Figure 21). Cet endosome donne naissance à des corps multivésiculaires (multivesicular bodies ou MVB) qui se transforment en MVB tardifs (late MVB).

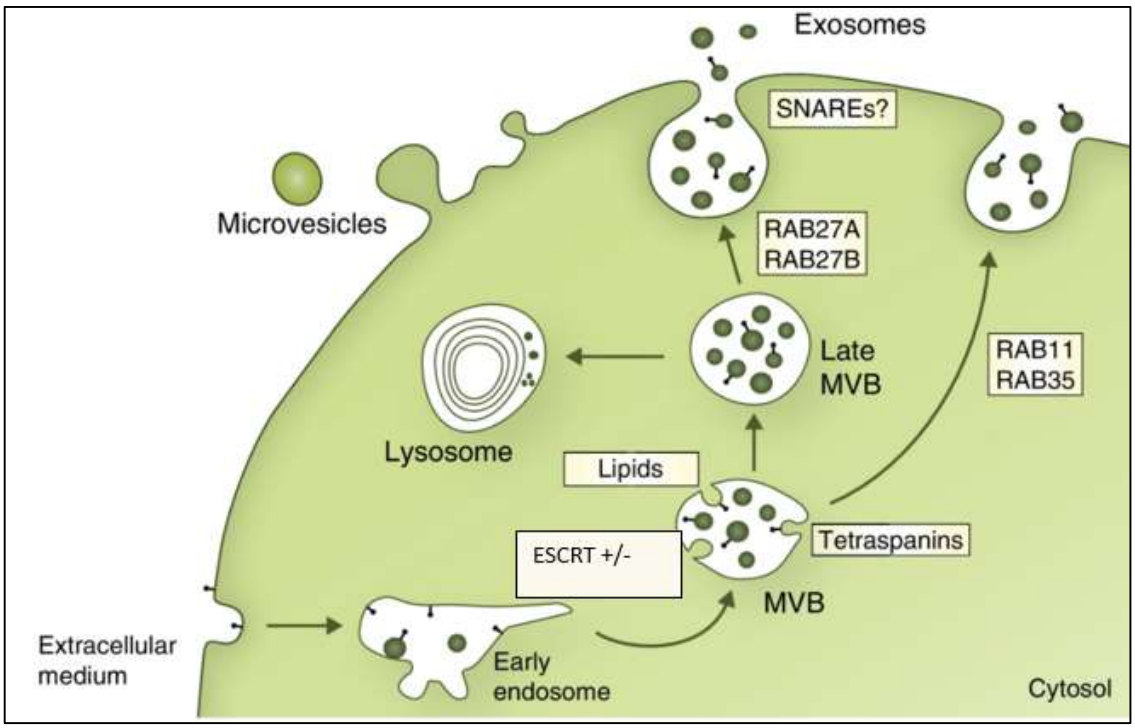


Figure 21 : Biogenèse des exosomes, adapté de J.Kowal,2014, [86]

Les « late MVB » peuvent être détruits par fusion avec les lysosomes ou devenir matures et être alors transportés à l'aide de protéines appelées RAB (RAB11, RAB27, RAB35) jusqu'à la membrane plasmique. Celles-ci permettent également le déversement de leur contenu, c'est à dire des exosomes, dans le milieu extracellulaire. Les protéines SNAREs sont probablement aussi impliquées dans la fusion des MVB avec la membrane plasmique.

La synthèse des exosomes est réalisée par deux voies différentes :
- soit par la machinerie multimoléculaire appelée Endosomal Sorting Complex Required for Transport (ESCRT), composée de 4 sous-unités (ESCRT-0, I, II, III) et sous la dépendance de la GTPase RAS : ESCRT-0 et I s'associent dans la membrane endosomale et recrute ESCRT-III. Ce nouveau complexe s'associe à ESCRT-II qui va permettre le relargage des exosomes dans le milieu extracellulaire. La protéine "Apoptosis Link Gene 2 Interacting Protein X" (ALIX) joue un rôle dans la voie ESCRT[87] en recrutant les protéines du complexe ESCRTIII et permet la formation des vésicules intraluminales (ILV)[88].
- soit sans ESCRT : les sphingolipides sont convertis en céramide sous l'action de shingomyélinases. Les céramides résultants forment de grands microdomaines induisant le bourgeonnement et la formation d'ILVs dans les MVB[89].
Les deux voies de synthèse des exosomes sont décrites dans la Figure 22.

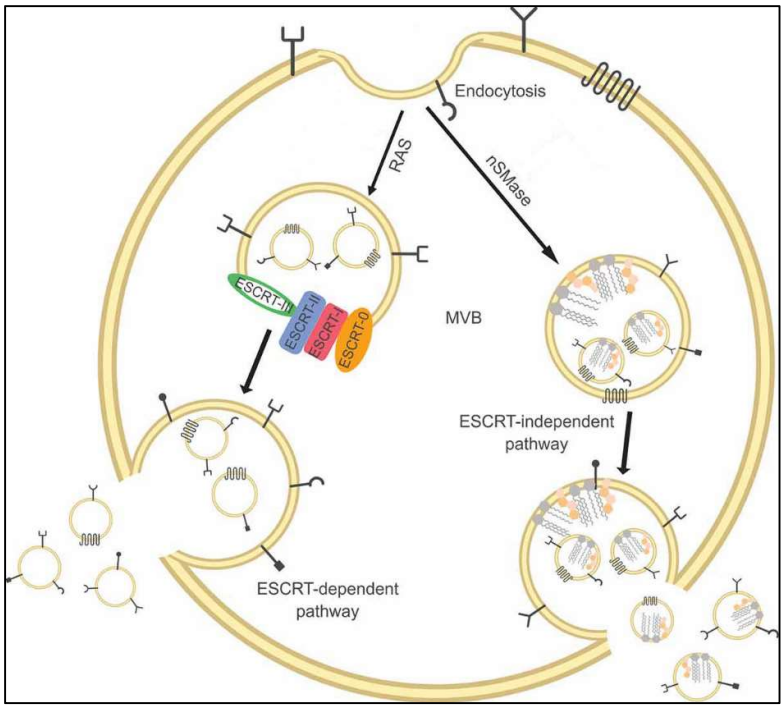


Figure 22 : Synthèse des exosomes avec ou sans ESCRT, d'après M.Catalano, 2019[87]. La voie ESCRT serait dépendante des GTPases RAS. La voie indépendante de ESCRT est la voie des sphingomyélinases neutres (nSMase), appartenant à la famille des enzymes capables de convertir la sphingomyéline, présente dans les radeaux lipidiques, en céramide.

1.6 Molécules communes ou spécifiques des exosomes et des microvésicules

Même si leur biogenèse est différente, les microvésicules et les exosomes partagent des molécules communes. La structure d'un exosome est détaillée en Figure 23.

1.6.1 Les Tétraspanines

Ce sont des molécules transmembranaires qui sont présentes à la surface des exosomes et des microvésicules. Elles sont associées à du cholestérol et des gangliosides. Elles forment des « tetraspanin-enriched microdomains » ou TME. CD9, CD81[90] ont été à la fois identifiées dans les microvésicules et les exosomes[84]. Elles ont un rôle dans l'incorporation des molécules dans la voie sans ESCRT, mais CD63 particulièrement présent à la surface des exosomes, a aussi un rôle dans l'incorporation de l'apolipoprotéine E dans les 2 voies de biogenèse des exosomes dans les mélanocytes[84]. CD63 a également été trouvé dans les microvésicules[90].

1.6.2 Molécules de transduction du signal

Des proteines kinases, la β-caténine, les protéines 14-3-3, des protéines G et plusieurs protéines de voies de signalisation ont été identifiées dans les exosomes et les microvésicules[84]

1.6.3 Molécules d'adhérence cellulaire

La lactadhérine et les protéines ICAM sont retrouvées uniquement dans les exosomes mais les intégrines sont présentes dans les 2 types de vésicules extracellulaires (EV).

1.6.4 Argonaute 2 (Ago2)

Argonaute 2 est associée à Dicer dans les exosomes de cellules de cancer du sein humaines MDA-MB-231 mais n'est pas détectable ceux des cellules MCF-10A (cellules mammaires saines)[91].
L'activation constitutive de KRAS (Kirsten Rat Sarcoma Virus) dans les cellules tumorales inhibe la localisation de Ago2 dans les MVB et diminue sa sécrétion dans les exosomes.[92]

1.6.5 Molécules du trafic intracellulaire

Les molécules RAB, comme Rab27[93] sont des GTPases qui permettent l'exocytose des exosomes dans le milieu extracellulaire. Les annexines, comme l'annexine II sont capables de fixer les membranes de manière dépendante du calcium via les phospholipides anioniques. L'annexine II est très abondante dans les exosomes et elle promeut l'angiogenèse[94].

1.6.6 Les molécules nécessaires au complexe ESCRT

Les protéines ALIX et Tumour Susceptibility Gene 101 (TSG-101) sont présentes dans les exosomes et les microvésicules. ALIX, associée à ESCRT III, permet la formation des ILV. TSG-101 est associée au complexe ESCRT I, qui permet le recrutement de ESCRT III[90].

1.6.7 Les lipides

La membrane des exosomes est une double couche phospholipidique enrichie en certains lipides comme les céramides, le cholestérol, la phosphatidylsérine, et les sphingomyélines[95].
La phosphatidylsérine, la phosphatidylethanolamine et les sphingolipides sont aussi des constituants des microvésicules.

1.6.8 Les molécules chaperones

Les « Heat Shock Protein » HSP90 et HSP70 se trouvent dans les 2 types d'EV[84]. Les HSP sont des protéines chaperones induites par différentes formes de stress. Elles assurent le bon repliement et l'activation des protéines intracellulaires. Elles sont impliquées dans la régulation de l'apoptose, la formation de métastases, l'angiogenèse, la réponse immunitaire et la résistance au traitement[96].

1.6.9 Les acides nucléiques

Les microARN, d'autres ARNs non-codants comme les ARNs longs et les ARNs circulaires, de l'ARNm et des histones se trouvent dans les 2 types de vésicules. Certains microARN exosomaux peuvent réguler le système immunitaire[92].

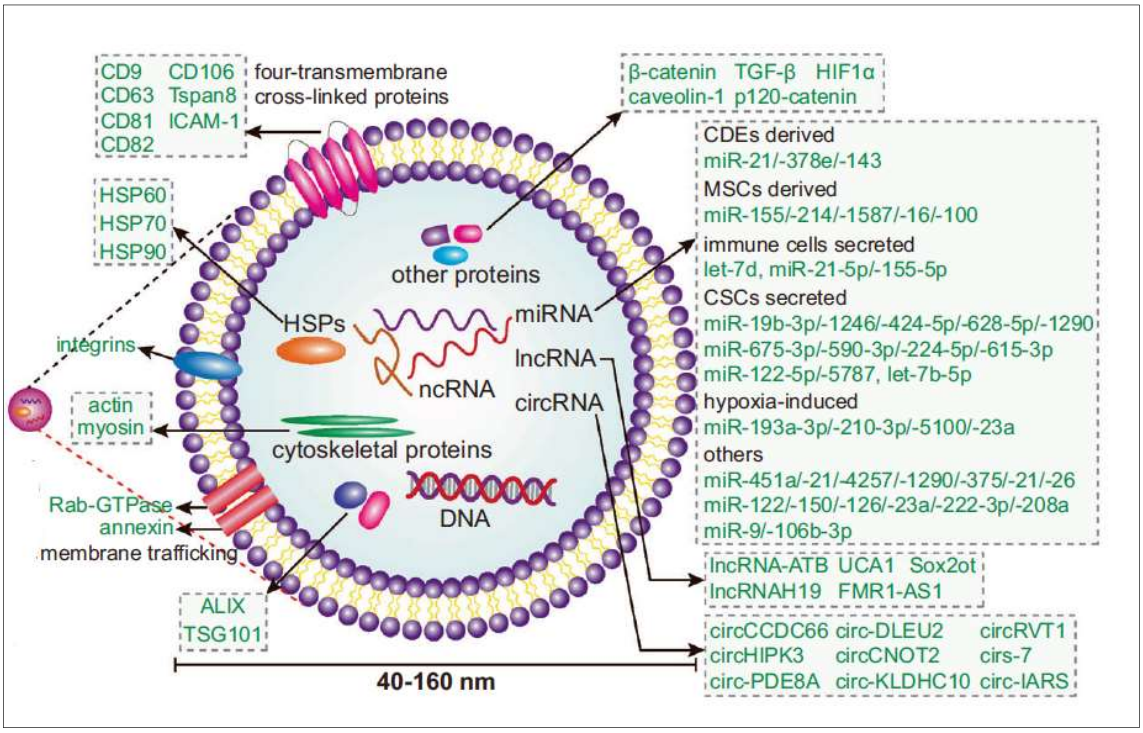


Figure 23 : Composition des exosomes, d'après Dai, 2020 [97]. Les exosomes sont constitués d'une bicouche lipidique. Les tétrasapanines Tspan8, CD9, CD63, CD81 sont transmembranaires. Certaines protéines comme la Rab-GTPAse sont impliquées dans l'exocytose des exosomes. Les intégrines à la surface des exosomes, permettent leur internalisation dans une cellule réceptrice. ALIX et TSG101 contribuent à la formation des exosomes. L'incorporation de protéines du cytosquelette comme l'actine et la myosine suggère qu'elles ont un rôle dans la formation des exosomes et/ou dans la fonction de signalisation de ces vésicules. Hsp90 contribuerait à la fusion des MVBs et de la membrane plasmique. Son rôle pro-tumoral est clairement démontré. Les protéines et acides nucléiques présents peuvent être spécifiques à la cellule productrice[97].

1.6.10 L'incorporation de microARN dans les exosomes

L'incorporation sélective de certains miRs cellulaires dans les exosomes peut être effectuée par une protéine appelée « Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein » ou HNRNPA2/B1[98], une protéine de

liaison à l'ARN. La sumoylation de HNRNPA2/B1 contrôle sa liaison avec certains miRs au niveau d'une séquence de nucléotides spécifique GGAG. De façon intéressante, miR-483-5p contient 2 fois cette séquence[99]. D'autre part, HNRPA2/B1 effectue la sélection de miR-483-5p, mais HNRNPA1 est encore plus efficace dans ce processus. Une étude combinant des microarrays, la mise en évidence de la co-localisation de HNRNPA1 et de miR-483-5p ainsi que l'immunoprécipitation de l'ARN confirme cette sélection[100]. Une autre protéine nécessaire à l'incorporation de miR-223 dans les exosomes de cellules HEK a été isolée: la Y BOX protein I (YBX-1)[101]. Cette sélection de miRs existerait aussi pour les microvésicules. La Figure 24 illustre quelques molécules qui participent à la sélection des miRs dans les EV[102].

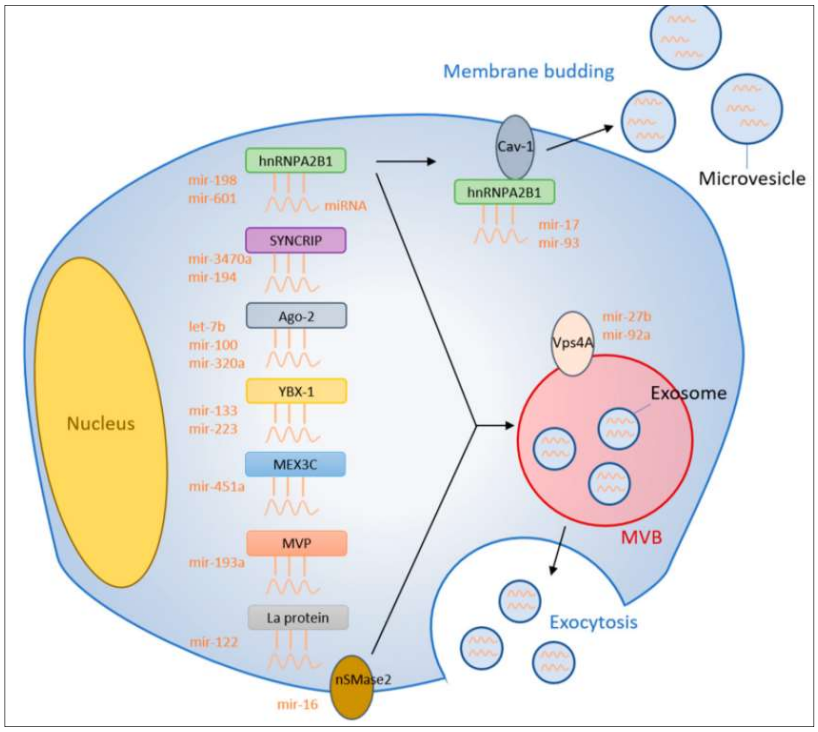


Figure 24 : Sélection des miRs dans les EV, **d'après M. Groot, 2020.** Les protéines « Heterogeneous Nuclear Ribonucleoproteins » (hnRNPs) se lient aux microARN sur des séquences spécifiques (GGAG) présentes par exemple dans miR-198 qui est reconnu par hnRNPA2/B1. La « Synaptotagmin-binding cytoplasmic RNA-interaction protein » (SYNCRIP), une autre hnRNP, se lie aux miRs qui possèdent une séquence GGCU comme miR-3470a. Dans le complexe RISC, Argonaute 2 est associée aux miRs et les stabilise. Y-Box Binding Protein 1 (YBX-1) est une autre protéine possèdant un site de liaison avec l'ARN. « Mex-3 RNA Binding Family Member C » (MEX3C) se lie avec Argonaute et pourrait participer à la sélection des miRs dans les exosomes. Major vault protein (MVP) est une ribonucléoprotéine qui peut également être impliquée dans la sélection des miRs. « La protein » est une protéine de liaison à l'ARN qui interagit avec miR-122. La Caveolin-1 (Cav-1), localisée dans les cavéoles, guide l'export du complexe hnRNPA2/B1-miR dans les microvésicules. La « Neural Sphingomyelinase 2 » (nSMase2) est une enzyme impliquée dans la synthèse des sphingolipides dont les céramides. La « Vacuolar Protein Sorting-Associated Protein 4 » (VSP4A) est impliquée dans le trafic endosomal[102].

1.7 Interaction des vésicules extracellulaires avec des cellules receveuses

1.7.1 Internalisation des vésicules extracellulaires

Certains exosomes contenus dans le sang sont internalisés par les cellules dendritiques. Ils sont une source d'antigènes présentés par le CMH de classe I. Les cellules dendritiques activent alors les lymphocytes T CD8[79]. Pour expliquer cette internalisation, l'hypothèse proposée est l'interaction des intégrines des vésicules extracellulaires avec les molécules ICAM (InterCellular Adhesion Molecules) à la surface des cellules receveuses[84] .

La fibronectine possède des sites de liaison avec les intégrines[103]. Des interactions des intégrines avec les protéines de la matrice extracellulaire comme la fibronectine ou la laminine ont été mises en évidence. La composition en intégrines de la surface des exosomes déterminerait l'organe cible de ces exosomes. Ainsi, des variants 4173, 4175 et 4180 de cellules cancéreuses du sein MDA-MB-231, expriment à la surface de leurs exosomes l'intégrine α6β4. Ces variants ont un tropisme pour le poumon, et l'intégrine α6β4, permet l'adhérence de ces exosomes au niveau du poumon. Ceux-ci vont alors préparer des niches pré-métastasiques pour les cellules tumorales circulantes qui vont pouvoir former une métastase organe-dépendante[104] et se multiplier dans l'organe cible.
Certaines tétraspanines qui se trouvent au niveau de la membrane des exosomes peuvent également déterminer la nature des cellules réceptrices : la tétraspanine 8 (Tspan8) s'associe de manière préférentielle aux chaînes α4 de l'intégrine.
Ainsi, les exosomes exprimant le complexe Tspan8/sous-unité α4 de l'intégrine sont facilement internalisés par les cellules endothéliales et pancréatiques. Le ligand de ces cellules réceptrices qui se lie à ce complexe est CD54[90]. Les lipides peuvent aussi avoir un rôle dans l'incorporation des exosomes : ainsi, la phosphatidylsérine peut se lier avec la galectine 5 à la surface des exosomes pour permettre l'internalisation des vésicules dans la cellule hôte[84].

1.7.2 Devenir des vésicules extracellulaires après contact avec les cellules receveuses

1.7.2.1 Les exosomes incorporés au niveau de la membrane plasmique

La membrane exosomale peut directement fusionner avec la membrane plasmique de la cellule receveuse. Les molécules exosomales solubles se retrouvent dans le cytoplasme de celle-ci. Les molécules exosomales membranaires sont incorporées dans la membrane plasmique ou dans les membranes endosomales de la cellule cible. Par exemple, les lymphocytes B secrètent des exosomes présentant à leur surface des molécules du CMH de classe II complexées à des tétraspanines comme CD63 et capables de se lier aux cellules dendritiques. Les cellules dendritiques peuvent intégrer ces exosomes dans la membrane plasmique et présenter ces antigènes aux lymphocytes T[105].

1.7.2.2 Endocytose des exosomes

Plusieurs études ont observé l'endocytose des exosomes selon des mécanismes moléculaires différents. Par exemple, Tian et collaborateurs ont montré que l'endocytose des exosomes de cellules cancéreuses de la médullo-surrénale (PC-12), met en jeu la macropinocytose et une endocytose dépendante de la clathrine[84]. En revanche, les exosomes de glioblastome (U87) seraient endocytés par un mécanisme indépendant de la clathrine mais dépendant des radeaux lipidiques[103]. Les exosomes peuvent être également endocytés par des cellules qui ont la capacité de phagocytose comme les macrophages (RAW 264.7), de manière beaucoup plus efficace que dans d'autres types cellulaires, comme les fibroblastes de souris (NIH 3T3). La micropinocytose peut également être un moyen non spécifique pour l'internalisation des exosomes[84].

Les exosomes peuvent alors rejoindre les Multivesicular Bodies (MVB) puis être dégradés par des lysosomes : la colocalisation entre lysosome et exosome a pu être observée à l'aide de la microscopie confocale spinning disk[106]. Cependant, la destruction du contenu de ces exosomes n'est pas systématique. Le miR-224-5p, provenant des fibroblastes associés au cancer (CAF) et internalisé par des cellules de carcinome du rein à cellules claires (ccRCC), augmente les capacités tumorigéniques de ces cellules[107], ce qui suggère que ce miR est fonctionnel dans les cellules réceptrices. Cependant, les mécanismes mis en jeu pour la conservation des ARNm ou des miRs des exosomes provenant de cellules donneuses n'est pas encore connu.

1.7.3 Exosomes et communication cellulaire

1.7.3.1 Généralités

Les exosomes jouent un rôle important dans la communication entre les cellules au niveau local ou entre divers organes. Ils sont en effet associés à de nombreuses situations physiologiques comme la réponse immunitaire et la grossesse, mais aussi à de nombreuses maladies comme les maladies cardio-vasculaires, les maladies du système nerveux central ou le cancer[108]. Leur apport en ARNm, miRs, ARN longs non-codant et protéines peuvent modifier le devenir de la cellule réceptrice. Ils peuvent modifier la signalisation cellulaire[108].

1.7.3.2 Régulation de la biosynthèse des exosomes

L'ajout d'exosomes provenant de cellules normales du sein HMEC B42 à ces mêmes cellules ou à des cellules cancéreuses dérivant de ces cellules normales (B42 clone 16) entraîne une diminution de la production d'exosomes dans le milieu de culture. Ce « feed-back » négatif de synthèse des exosomes semble être sous la dépendance d'un processus intracellulaire non identifié[109].
La sécrétion d'exosomes est stimulée par différentes conditions physiologiques ou pathologiques. Elle serait induite par le calcium intracellulaire qui régule la fusion des MVE à la membrane plasmique,

conduisant à la sécrétion des exosomes[110]. Les ionophores du calcium, qui augmentent la concentration intracellulaire ont par exemple été utilisés pour stimuler la sécrétion des exosomes dans différents types cellulaires dont les cellules K562 (lignée d'érythroleucémie)[110] ou de cellules dendritiques[111]. Le pH du milieu extracellulaire jouerait également un rôle dans la sécrétion des exosomes. Une augmentation de la sécrétion des exosomes de mélanome métastatique à pH acide (pH 6,0) par rapport à un pH physiologique a été rapportée[112]. L'hypoxie tumorale, qui induit un microenvironnement acide, a été décrite comme un puissant inducteur de la sécrétion d'exosomes[113].

1.7.3.3 Exosomes et progression tumorale

1.7.3.3.1 Modifications du contenu des exosomes dans les cellules cancéreuses (microARN et protéines)

Des microvésicules extraites à partir de plasma de patients atteints de carcinome et d'adénomes corticosurrénaliens ont permis de mettre en évidence la surexpression de 2 microARN : hsa-miR-483-5p et hsa-miR-100. Seul miR-483-5p a permis de différencier les CCS des ACA[65]. Les exosomes de cellules de mélanome A375 surexpriment miR-7a, miR-182, miR-221, miR-222, miR-31, miR-19b-2, miR-20b, miR-92a-2, miR-21, miR-15b, miR-210, miR-30b, miR-30d, et miR-532-5p par rapport aux cellules de mélanocytes normaux HEMa-LP. Des corrélations étroites entre le profil des ARNm des exosomes et celui de leurs cellules parentales ont été observées. Cette corrélation est beaucoup moins importante entre le profil des miRs des exosomes et celui des cellules parentales[114]. Cela est en faveur de l'hypothèse d'un tri sélectif des miRs contenus dans les exosomes. D'autre part, la distribution de certaines protéines est modifiée dans les exosomes de mélanome comparés aux exosomes de mélanocytes. Par exemple, la « Tyrosinase-Related Protein 1 » (TYRP1), molécule impliquée dans la synthèse de mélanine, est surexprimée dans les exosomes de mélanome tandis que la « Hyaluronan And Proteoglycan Link Protein 1 » (HAPLN1) est sous-exprimée dans ces exosomes par rapport aux exosomes de cellules normales.

1.7.3.3.2 Conséquence de la dérégulation en microARN et en protéines dans les exosomes

- Les miRs exosomaux peuvent modifier la prolifération cellulaire des cellules cibles[115].

Dans le cancer du côlon, TGF-β1 inhibe la prolifération cellulaire dans les stades précoces mais au contraire, induit la prolifération dans les stades plus avancés de ce cancer. Les exosomes provenant de milieu de culture de cellules de cancer du côlon HCT-116 traitées avec du TGF-β1 se caractérisent par la surexpression de 63 micro-ARNs par rapport à des exosomes de cellules non traitées (technique de séquençage à haut débit ou RNA-Sequencing). Le miR le plus surexprimé dans ces conditions est miR-200b-3p. Afin de définir l'implication du miR-200b-3p exosomal sur la prolifération cellulaire, son expression a été abolie par la technologie CRISPR-Cas9 dans les cellules HCT-116 afin de produire des exosomes déplétés en miR-200b-3p après stimulation par le TGF-β1. L'ajout d'exosomes déplétés en miR-200b-3p aux HCT-116 diminue la prolifération de celles-ci comparées aux mêmes cellules ayant reçu des exosomes contenant miR-200b-3p. Cette expérience suggère le rôle pro-proliératif de miR-200b-3p des exosomes de cellules HCT-116. Les cibles de miR-200b-3p ont été recherchées

grâce au logiciel TargetScan. Deux gènes cibles potentiels impliqués dans la prolifération cellulaire, P27 et RND3 (Rho family GTPase 3), ont été mis en évidence. P27 contrôle la progression dans le cycle cellulaire en inactivant les complexes cycline-CDK (cyclin-dependent kinase) et RND3 est un membre de la famille des Rho GTPases impliqué dans l'organisation du cytosquelette d'actine. Des expériences de gène rapporteur luciférase fusionné à la région 3'UTR des ARNm ont permis de confirmer que les exosomes contenant miR-200b-3p ciblent P27 et RND3.

- Les exosomes peuvent augmenter les capacités invasives.

Les exosomes de mélanome mis en contact avec des cellules de mélanocytes normaux augmentent les capacités invasives de ces derniers[114].

- Les exosomes favorisent les métastases.

Le miR-25-3p des exosomes dérivés de cancer colorectal augmente la perméabilité des cellules endothéliales en ciblant Krüppel-like factor 2 (KLF2) et Krüppel-like factor 4 (KLF4) et favorise la mise en place d'une niche pré-métastasique[116].

- Les exosomes peuvent activer l'angiogenèse.

-Par l'intermédiaire de la tétraspanine 8

Les exosomes des cellules de la lignée pancréatique cancéreuse Bsp73AS surexprimant la tétraspanine 8 (AS-tspan 8) mis en contact avec des cellules endothéliales sont internalisés par celles-ci et induisent la synthèse de VEGF[117]. Ces cellules endothéliales ont une prolifération, une migration et un bourgeonnement accélérés par rapport aux cellules traitées avec des exosomes de cellules contrôles ne surexprimant pas tspan 8.

-Par l'intermédiaire des miRs

Le miR-1246 est diminiué chez les patients atteints de cancer du côlon, mais il est abondant dans les microvésicules provenant de plasma de souris greffées avec des tissus issus de tumeurs du colon (Patient-Derived Xenografts ou PDX)[118]. Ce miR est également plus abondant dans les microvésicules issues de 3 lignées parentales d'adénocarcinome du colon : WIDr, DLD1 ET SW480. D'autre part, l'ajout d'exosomes de cellules DLD1 à des cellules HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cells) entraîne une augmentation intracellulaire de miR-1246 dans celles-ci (1,5 fois)[118]. Pour déterminer l'effet spécifique de ce miR, des exosomes dérivés de cellules DLD1 transfectées avec un antagomiR-1246 ou un antagomiR contrôle ont été préparés. La tubulogenèse et la migration des cellules HUVEC ont été diminuées en présence des exosomes déplétés en miR-1246 comparés aux exosomes contrôles de cellules DLD1. MiR-1246 a pour cible l'ARNm codant pour PML (promyelocytic leukemia protein), une protéine qui inhibe la migration et l'organisation des cellules endothéliales en pseudo-tube[118].

Ainsi, les exosomes émergent comme des acteurs importants dans la communication cellulaire au sein de la tumeur et aussi à distance, notamment pour favoriser la néo-angiogénèse tumorale et le développement de métastase[119]. Le carcinome corticosurrénalien étant une tumeur très vascularisée[120], ce processus pourrait être impliqué lors de la dissémination métastatique[120] de ce cancer.

1.8 Rôle des microARN et des exosomes dans le diagnostic et la thérapie

1.8.1 Les microARN biomarqueurs en cancérologie.

Les techniques de microarrays (puces à ADN), de PCR en temps réel et les technologies de séquençage de nouvelle génération ont permis d'identifier les miRs dérégulés dans les tumeurs et également dans les fluides biologiques comme le sang, l'urine et la salive[81].
La dérégulation de certains miRs dans les tumeurs peut être directement établie après exérèse de la tumeur ou après dosage des miRs dans les fluides biologiques où ils sont souvent protégés des Rnases car transportés à l'intérieur de microvésicules ou d'exosomes. Ils peuvent être utilisés comme des biomarqueurs non-invasifs. Par exemple, deux microARN, miR-182-5p et miR-375-3p ont été identifiés dans le plasma de personnes atteintes du cancer du pancréas comme biomarqueurs de métastases ou de prédiction de métastases[121]. Notre équipe a montré que miR-483-5p détecté dans le sérum de patients porteurs de CCS est prédictif de la récidive[65]. MiR-21 a été détecté comme biomarqueur dans les exosomes de cellules squameuses de l'oesophage, il est corrélé positivement avec l'agressivité et la progression tumorale de ce cancer[122].
Par ailleurs, le dosage des miRs dans les exosomes permettrait également de répertorier des miRs qui pourraient jouer un rôle dans la communication entre cellules[122].

1.8.2 Les microARN et les exosomes dans la thérapie anti-cancéreuse

Les miRs sont impliqués dans la résistance à certains traitements anti-cancéreux : ainsi miR-155-5p est surexprimé dans diverses leucémies comme les lymphomes à grandes cellules B, où il est associé à une résistance à la cisplatine ou à la doxorubicine. Un traitement supprimant ce miR à l'aide d'inhibiteurs spécifiques (séquences anti-sens simple-brin) augmenterait la sensibilité à la chimiothérapie[123]. Les cellules cancéreuses humaines de pancréas PATU8988 surexpriment miR-21 qui a comme cible PDCD4 et sont résistantes à la 5-fluorouracil (5-FU). La transfection de ces cellules avec un inhibiteur de miR-21 (LNA-anti-miR-21) rétablit l'expression de l'ARNm de PDC4 et l'effet pro-apoptotique de ce gène[124].
Des thérapies à bases de miRNA « mimics » (mimétiques de miRs) peuvent aussi être envisagées lorsque qu'un miR est sous-exprimé dans un cancer. Les mimics sont des miRs double-brin chimiquement modifiés qui imitent les miRs endogènes. Des cellules de lignées de cancer du sein MDA-MB231, MDA-MB-468 ainsi que des cellules mammaires normales transfectées avec des mimics de miR-143 ou de miR-31 puis implantées chez la souris inhibent l'invasion et la formation de métastases après 6 semaines. MiR-31 s'est révélé plus efficace que miR-143 dans l'inhibition de ces deux processus[125].
Les thérapies basées sur l'utilisation d'antimiRs ou de miR mimics font de plus en plus appel à l'utilisation de nanoparticules pour cibler les tumeurs et éviter l'adressage non-spécifique des miRs aux tissus sains. Des nanoparticules constituées de lipides comme les liposomes, de polymères cationiques ou encore de matières inorganiques comme l'or ou la silice ont été largement testées. De façon intéressante, des nanosytèmes mimant des exosomes ont également été évalués comme vecteurs de miRs thérapeutiques[126].

2 OBJECTIFS DU TRAVAIL

Le carcinome corticosurrénalien (CCS) est une tumeur agressive richement vascularisée et de mauvais pronostic. Plus de la moitié des patients se présentent à un stade métastatique au diagnostic. L'objectif principal de ce travail était d'évaluer l'impact des exosomes issus de cellules de carcinome corticosurrénalien et de miRs exosomaux sélectionnés sur le phénotype des cellules endothéliales.

Ce travail décrit :

(1) La production et la caractérisation des exosomes de cellules NCI H295R, notre modèle de référence pour l'étude du CCS.

(2) L'effet fonctionnel des exosomes, de miR-483-5p et de miR-139-sur les cellules endothéliales de veine ombilicale humaine (HUVEC), en étudiant l'internalisation en temps réel des exosomes, leurs effets sur la migration, la tubulogenèse et la signalisation cellulaire.

(3) La mise au point de co-cultures entre les cellules NCI-H295R et les HUVEC afin d'observer ultérieurement la communication entre ces deux types cellulaires *via* les exosomes.

3 MATERIEL ET METHODES

3.1 Sérum de veau (SV) déprivé en exosomes

Le sérum utilisé (Nu-sérum, Corning™, référence 355100) est composé de 25 % de sérum de veau de nouveau-né et d'une formulation constante avec facteurs de croissance brevetée par Corning. Il est dilué à 20 % dans le milieu de culture adéquat pour les cellules puis ultra-centrifugé à 100000 g à 4°C pendant une nuit. Le culot obtenu et contenant les exosomes est éliminé. Le surnageant est alors collecté et passé sur un filtre de 0.2 µm (milieu sans exosomes à 20% de SV). Les milieux de culture et le sérum sont différents selon les types cellulaires (NCI-H295R ou HUVEC).

3.2 Culture des cellules NCI-H295R

Les cellules NCI-H295R sont des cellules invasives de carcinome corticosurrénalien humain commercialisées par la compagnie American Type Culture Collection (ATCC). La surface des boîtes de culture est recouverte avec du collagène de rat de type I à 0.07mg/ml (Corning, référence 356236). Le fournisseur du milieu de culture et des antibiotiques est Thermo Fisher Scientific. Les cellules sont cultivées dans du milieu DMEM/F12 (référence 11330057) contenant des antibiotiques Pénicilline/Streptomycine (pénicilline 100 U/ml et streptomycine 100 µg/ml, référence 15140130) et Gentamycine (30µg/ml, référence 15750045) et avec 2.5 % de sérum. Le milieu est supplémenté avec 1 % d'ITS (Insuline-Transferrine-Sélénium, Corning, référence 354352). Les cellules sont détachées des supports de culture pour un nouvel ensemencement après 2 lavages au PBS -/- (Thermo-Fisher, référence 1419019) et incubation dans 3 ml de trypsine/EDTA à 0.05 % (Thermo-Fisher, référence 25300096) pour une boîte de pétri de 10 cm de diamètre (BP100) et ajout de 6 ml de milieu DMEM/F12 à 10 % de Nu-sérum pour neutraliser la trypsine. Les cellules sont incubées à 37°C dans une atmosphère à 5 % de dioxyde de carbone (CO_2) et 95 % d'air.

3.3 Culture des cellules HUVEC (Human Umbilical Vein Endothelial Cells)

Les cellules endothéliales de veines ombilicales humaines (HUVEC) sont extraites au laboratoire à partir de cordons ombilicaux selon un protocole décrit précédemment[127]. Les surfaces de culture sont recouvertes avec de la fibronectine à 7.7µg/ml (référence F2006 de Sigma). Le milieu de culture complet utilisé (référence CC-3162, Lonza) comprend le milieu de base EBM™-2 (référence CC3156) et les suppléments EGM™-2 (référence CC-4176, contenant des facteurs de croissance et du sérum de veau fœtal (SVF)). Pour les protocoles impliquant les miRs et les exosomes, le SVF utilisé est sans exosomes et à une concentration finale de 2 %.
Pour les passages des cellules, celles-ci sont détachées par trypsination après 2 lavages au PBS -/- (5x2mL), dans 1 ml de trypsine/EDTA à 0.025 % (référence CC-5012 Lonza) pour une boite de Pétri BP60. La trypsination est arrêtée par ajout de 3mL de milieu Lonza contenant 10 % de sérum. Les cellules sont incubées à 37°C dans une atmosphère à 5 % de dioxyde de carbone (CO2) et 95 % d'air.

3.4 Comptage des cellules

Le comptage des cellules se fait avec l'automate TC20 de Biorad qui utilise une technique d'autofocus et un algorithme de comptage.

3.5 Collecte des exosomes de milieu de culture des NCI H295R et traitement des échantillons

- **Par centrifugation différentielle puis ultracentrifugation.**

Pour les NCI-H295R, le Nu-sérum sans exosomes est utilisé. Pour chaque collecte, 10 flacons de 75 ml sont ensemencés après revêtement au collagène de type I, avec $7x10^6$ cellules NCI-H295R par flacon dans 30 ml de milieu DMEM/F12 avec antibiotiques, en présence de 2.5% de Nu-sérum sans exosomes et 1% d'ITS. A J3, J7 et à J10, les milieux sont récoltés et traités stérilement avant congélation à -80°C. Chaque récolte est centrifugée à température ambiante à 300 g 10 min, puis à 1500 g 10 min à 4°C, puis à 10000 g 30 min à 4°C. Le surnageant de cette dernière étape est prélevé puis filtré à 0.2µm et congelé. Pour l'ultracentrifugation, les milieux des 3 récoltes sont décongelées, mélangés pour faire un premier prélèvement avant centrifugation, et ultracentrifugés à 100000 g, 2h30 à 4°C. Le culot est récolté et lavé 2 fois avec 8ml de PBS-/- à 100000 g pendant 1h00 à 4°C. Le culot contenant les exosomes est homogénéisé dans 300µl de PBS-/- à l'aide d'un mini-Potter, puis congelé à -80°C. Les milieux après ultracentrifugation sont réunis et des aliquotes avant et après ultracentrifugation sont conservées (2ml x 4 aliquotes) à -80°C.

Les cellules des 10 flacons sont trypsinées (4 ml de trypsine-EDTA par flacon), la trypsine est neutralisée avec du milieu à 20% de Nusérum sans exosomes. Les cellules de chaque flacon sont comptées à l'aide d'un compteur de cellules Biorad. L'extraction d'ARN se fait à partir de 50 µg de protéines pour les exosomes et les cellules (Lysat cellulaire), et à partir de 1 ml pour les milieux de culture. Pour comparer les concentrations en miRs d'intérêts des différents compartiments, nous les rapporterons à la concentration en miRs totaux (en ng) par million de cellules. Le dosage des miRs totaux et des ARN totaux se font à l'aide du système Qubit® 3.0 Fluorometer (Thermo Fisher Scientific).

Des échantillons de $5x10^6$ cellules ont été prélevés pour analyse des culots cellulaires par spectrométrie de masse, ou remis en suspension dans du « cell disruption buffer » provenant du miRvana Paris Kit » (AM1556, Thermo Fisher Scientific), pour la préparation des ARNs et le dosage de miRs du lysat cellulaire.

- **Par précipitation et chromatographie d'exclusion de taille (pour des volumes de milieu entre 1 et 50 ml)**

Les exosomes ont également été préparés à l'aide du kit Exo-spin™ (référence EXO-1, Interchim) afin de comparer ce protocole avec la méthode d'ultracentrifugation. L'objectif était de réduire les quantités de milieu conditionné utilisé pour ces préparations, tout en vérifiant la qualité des exosomes obtenus avec ce kit commercial. Le milieu est centrifugé à 300 g 10 min, puis à 1500 g 10 min à 4°C. Le surnageant de cette dernière étape est prélevé puis filtré à 0.2µm et congelé jusqu'à utilisation. Le milieu décongelé est centrifugé à 300 g pendant 10 minutes. Le surnageant est

centrifugé 30 minutes à 16000 g. Les recommandations du fournisseur sont appliquées pour le traitement des milieux. Les exosomes sont élués dans 200 µL de PBS.

- **Par précipitation puis colonne de purification (pour des volumes de milieu entre 5 et 15ml).**

Les exosomes ont été préparés à l'aide du kit ExoQuick-TC® ULTRA EV Isolation Kit for Tissue Culture Media de Amsbio (référence EQULTRA-20TC-1). Ce kit était recommandé pour une utilisation sur cellules réceptrices. L'objectif était de réduire les quantités de milieu et de comparer ce kit au précédent et à la méthode d'ultracentrifugation. Le milieu est centrifugé à 300 g 10 min, puis à 1500 g 10 min à 4°C. Le surnageant de cette dernière étape est prélevé puis filtré à 0.2µm et congelé. 15 ml de milieu ont été traités après décongélation selon les recommandations du fournisseur.

3.6 Mesures au Nanosight NS-300

La quantité, l'homogénéité et la taille des exosomes sont évaluées dans les milieux de culture et dans les préparations d'exosomes à l'aide du système Nanosight NS-300 SOFTWARE NTA 3.2 (Nanoparticle Tracking Analysis ou NTA). Cette technologie combine les propriétés de diffusion de la lumière et du mouvement Brownien des particules pour déterminer leur répartition par taille et leur concentration. L'appareil détecte les nanoparticules en solution de taille comprise entre 10 et 2000nm. Le tampon utilisé pour diluer les échantillons est du tampon PBS-/- préalablement filtré à 0.2µm. Le dosage des exosomes se fait à partir d'une solution d'exosomes diluée au 1/1000 dans du tampon PBS-/- pour les échantillons provenant de l'ultracentrifugation. Ils sont dilués au 1/10 pour le kit Exoquick et au 1/100 pour le kit Exospin afin que le nombre de particules à la lecture soit compris entre 1E+6 et 1E+9. Les milieux de culture initiaux sont dilués au 1/10ème.

3.7 Détermination de la teneur en protéines des exosomes isolés, et des lysats de cellules HUVEC.

La concentration en protéines de chaque préparation est dosée par la méthode Micro BCA (référence 23235, Thermo Fisher Scientific) selon les recommandations du fournisseur.

3.8 Etude du miRnome et du protéome des cellules parentales NCI-H295R et de leurs exosomes.

3.8.1 Analyse du miRnome

L'ARN total a été extrait à partir de 100µg de protéines d'exosomes et à partir de 5x10^6 cellules parentales de chaque récolte (après lyse cellulaire) pour le séquençage des microARN.Trois récoltes ont été réalisées. Le séquençage a été effectué sur une plateforme de séquençage externe (CNRGH, Evry).

3.8.2 Analyse du protéome

Pour la protéomique, des culots cellulaires et des exosomes ont été transmis à la plateforme de protéomique de l'équipe « Etude de la dynamique des Protéomes » (EDYP, Laboratoire de Biologie à Grande Echelle) du CEA. Les protéines ont été extraites à partir de 3 récoltes indépendantes de cellules NCI-H295R et de leurs exosomes. Après chaque récolte, les protéines des culots cellulaires

sont réduites avec le dithiothréitol, alkylées au niveau de la cystéine avec de l'iodoacétamide puis digérées dans un gel contenant de la trypsine (Référence V5111, Promega). Les peptides résultants ont été séchés à l'aide d'un concentrateur à vide Speedvac et remis en suspension dans de l'acétonitrile à 5 % et de l'acide trifluoroacétique à 0,01 % avant d'être séparés par chromatographie liquide sur une colonne C18 de 75µm sur 250 mm (Reprosyl, CIL) à l'aide du système UltiMate 3000RSLCnano (Thermo Fisher Scientific) couplé à un spectromètre de masse HF Q-Exactive (Thermo Fisher scientific). Les 20 ions précurseurs les plus intenses ont été sélectionnés pour l'analyse par spectrométrie de masse en tandem MS/MS. Pour l'identification des peptides et des protéines en résultant, les spectres de MS/MS obtenus ont été soumis au moteur de recherche Masco (www.matrixscience.com/), qui explore une base de données sur les protéines humaines dans SwissProt[128]. Pour la quantification relative, le programme Proline (http://www. profiproteomics.fr/ proline/) a été utilisé et les données quantitatives ont été normalisées en tenant compte d'une quantité totale constante de protéines dans chaque cas.

3.9 Extraction des miRs

L'extraction des ARNs et des miRs a été réalisée avec le « miRvana Paris Kit » (AM1556, Thermo Fisher Scientific) selon les recommandations du fournisseur. Pour normaliser la quantité de miRs dans des échantillons de nature différente, la méthode du « spike-in » a été utilisée. Des microARN de *Caenorhabditis Elegans*, Cel-miR-39 et Cel-miR-54, ont été ajoutés (25 fentomoles) après dénaturation des ARNs. Le lysat est préalablement dosé par la méthode microBCA.

<u>Exosomes préparés par la méthode Exo-spin et Exoquick :</u>
Après extraction des exosomes, un volume identique est utilisé pour l'extraction d'ARN.

<u>Exosomes préparés par ultracentrifugation :</u>
Pour le lysat cellulaire et les exosomes, les ARNs totaux sont extraits à partir de 50µg de protéines. Pour le milieu, l'extraction est effectuée à partir de 1ml avant et après ultracentrifugation.

3.10 Quantification des miRs par Retro-Transcription (RT) et PCR quantitative (qPCR)

Le fournisseur de tous les réactifs est Thermo-Fisher. L'expression des miRs est mesurée par la technique de RT-qPCR Taqman. 10 ng d'ARN total sont rétro-transcrits avec le kit de transcription inverse TaqMan® MicroARN (référence 4366597) en ajoutant 0.75µl d'amorces 20X Taqman spécifiques aux réactifs de RT (0.15µL de 100mM dNTPs, 1.5µl 10xRT tampon, 0.19 µL d'inhibiteur de Rnases, 6.41µL d'eau distillée, 1µl d'enzyme RT multiscribe) et à 5µl d'échantillon d'ARN dans un volume final de 15µl. Les échantillons sont incubés 30 minutes à 16°C, puis 30 minutes à 42° et 5 minutes à 85°C. Ils sont ensuite maintenus à 4°C.
La qPCR en temps réel est réalisée dans un mélange contenant 5 µL de « Universal Master Mix TaqMan2x » et 0,5µl d'amorces PCR spécifiques de chaque miR (hsa-miR-483-5p référence 002338, hsa-mir-483-3p référence 002339, hsa-miR-139-5p référence 002289, hsa-miR-16-5p

référence 000391, cel-miR-39 référence 000200, cel-miR-54 référence 001361, RNU48 référence 001006). A ces 5.5µL sont ajoutés 4.5µL d'échantillon d'ADN complémentaire dilué au 2.5ème (volume final 10 µl). La PCR en temps réel est réalisée avec un thermo-cycleur (CFX96 Real time system, Bio-Rad) selon le protocole : 95°C 10 minutes, puis 40 cycles de 95°C pendant 15 secondes, puis 60°C pendant 1 min. Les données sont analysées avec le CFX Manager software version 3.1.1517.823. Chaque miR est analysé en duplicats. RNU48 est utilisé comme gène contrôle endogène pour la normalisation des résultats pour les lysats cellulaires. RNU48 sera utilisé pour comparer des lysats entre eux, mais ne peut pas être utilisé pour les milieux de culture et les exosomes car il n'est pas quantifiable dans ces 2 types d'échantillon. L'expression normalisée est calculée en utilisant la méthode comparative des cycles seuil (cycles threshold ou Ct) $2^{-\Delta\Delta CT}$ ou en utilisant des gammes étalons pour la quantification absolue. Pour la normalisation de l'expression des miRs[65] : La médiane des Ct de Cel-miR-54 et Cel-miR-39 pour tous les échantillons d'un même type est calculée. Le facteur de normalisation (FN) est alors calculé avec la formule :

FN =1/ [2ˆ(Mediane des Ct miR Spike-in)- (Ct miRSpike-in de chaque échantillon)].

Ce facteur est calculé pour Cel-miR-39 et pour Cel-miR-54 et la moyenne des 2 valeurs sert à normaliser le nombre de copies.

3.11 Western Blot

Pour les comparaisons cellules parentales et exosomes, 7µg de protéines, sont dénaturés avec du tampon de Laemmli 5x (concentration finale de 60mM de Tris-HCL, pH 6.8, 2 % de SDS, 5 % de β-mercaptoéthanol et 10 % de glycérol, 0.01 % de bleu de bromophénol) pendant 5 min à 95°C. Les échantillons sont chargés sur un gel SDS-PAGE à 4–20 % (Mini-PROTEAN® TGX™ Precast Protein Gels, 10-well, réf 4561094, Biorad) et migrent par électrophorèse pendant environ 1 h à 140V dans du tampon 10x Tris/Glycine/SDS (Référence 1610772, Biorad). Le transfert des protéines est effectué sur membrane en nitrocellulose par la méthode de transfert rapide (référence 1702420 Trans-Blot Turbo RTA Transfer Kit, Mini, Nitrocellulose Biorad) à l'aide d'un « Trans-Blot Turbo Transfer System » de Biorad. La saturation de la membrane se fait avec du lait écrémé à 5 % dans du TBS/Tween 0.1%. Chaque incubation (sous agitation) avec un anticorps, est suivie de 3 lavages de 10 minutes sous agitation. Les anticorps sont dilués dans du TBS/Tween 0.1 % contenant 5 % de BSA et sont incubés à 4°C jusqu'au lendemain. Selon l'espèce d'origine de l'anticorps primaire, un anticorps secondaire anti-souris ou anti-lapin est utilisé.

L'anticorps secondaire anti-souris (conjugué à la Horse Radish Peroxydase HRP, référence 115-035-062, Jackson ImmunoResearch) est dilué au 1/10 000ème en concentration finale dans du TBS/Tween 0.1%. Il est incubé pendant 1h à température ambiante. L'anticorps secondaire anti-lapin conjugué à la HRP (réf 115-035-144, Jackson ImmunoResearch) est dilué au 1/6 000èmeen concentration finale, dans du TBS/Tween 0.1% et incubé 1h à température ambiante.

Après 3 lavages, la révélation par chimiluminescence se fait avec le réactif « Clarity Western ECL Substrate» (référence 1705061, Biorad). La révélation des protéines d'intérêt est effectuée à l'aide

du « Chemidoc Imaging System » de Biorad. La quantification des protéines est effectuée avec le logiciel Image Lab 4.0 de Biorad. Les membranes peuvent être ré-utilisées pour détecter des protéines différentes. Elles sont dans ce cas incubées avec une solution de « Re-Blot Mild » (référence 2502, Millipore) pendant 15 minutes, saturées une heure avec du lait écrémé à 5% dans du TBS/Tween 0.1% puis ré-incubées avec de nouveaux anticorps primaires. La β-actine ou la tubuline sont utilisées comme témoins de charge. Les différents anticorps utilisés sont listés dans le Tableau 2.

Tableau 2 : Liste des anticorps utilisés

Anticorps (anti)	Fournisseur	Poids moléculaire (kDa)	Référence	Espèce	Dilution
Alix (3A9)	Cell Signaling	80-100	2171	souris	1/1000
CD63	Santa-Cruz Biotechnology	34-50	Sc-5275	souris	1/500
Argonaute 2(c34c6)	Cell Signaling	97	2897	lapin	1/1000
CD81	Abcam	20-26	ab109201	lapin	1/2000
CD9	Sigma Aldrich	26	ab92726	souris	1/500
TSG101	Abcam	47	ab83	souris	1/500
Tubuline	Sigma Aldrich	50	T6199	souris	1/2500
Flotilline	Cell Signaling	49	3253	lapin	1/1000
Béta-actine	Sigma Aldrich	42	A5441	souris	1/5000
AKT	Cell Signaling	60	9272	lapin	1/1000
p-AKT(sérine 473)	Cell Signaling	60	4060	lapin	1/2000
NDRG2	Cell Signaling	45	5667S	lapin	1/1000
NDRG4	Cell Signaling	37-45	9039S	lapin	1/1000

3.12 Transfections cellulaires

3.12.1 Inhibition des microARN endogènes

L'inhibition des miR-483-5p et miR-139-5p endogènes est effectuée à l'aide d'antagomiRs qui sont constitués d'un seul brin d'ARN et se lient au miR ciblé de façon complémentaire et irréversible, afin d'empêcher son action.

<u>Cellules NCI-H295R</u>

Les cellules sont ensemencées dans du milieu DMEM/F12 contenant 5% de Nu-sérum sans exosomes ($5x10^6$ cellules/Pétri de 100 mm). 24 h après l'ensemencement, les cellules sont lavées au PBS+/+ (Tampon phosphate contenant du calcium et du magnésium) et sont transfectées avec la lipofectamine RNAimax (réf 13778150, Thermofisher, 20µL par boîte) à une concentration finale de 10nM d'antagomiR (antagomiR contrôle, antagomiR-483-5p, antagomiR-139-5p). Le milieu Optimem est utilisé pour diluer les antagomiRs. Un mélange d'antagomiRs (antagomiR mix) constitué de 5nM de miR-483-5p et 5nM de miR-139-5p a aussi été testé. 24 h post-transfection, les cellules sont lavées

au PBS+/+, puis incubées avec 10 mL de milieu DMEM/F12 et de l'ITS à 1% et sans sérum. 72 heures post-transfection, le milieu est récupéré, centrifugé à 300g 10min puis 1200 g 10 min, filtré sur membrane 0.2µm puis congelé à- 80°C. Les cellules sont rincées au PBS+/+ puis sont lysées avec du tampon « cell disruption buffer ». Le dosage de miR-483-5p et miR-139-5p est effectué dans les lysats cellulaires et les exosomes. Les exosomes sont extraits par chromatographie d'exclusion de taille (exospin et exoquick).

Cellules HUVEC

Dans ce test, des Pétri de 60 mm sont ensemencées avec 10^6 cellules HUVEC après revêtement à la fibronectine. La transfection est réalisée comme décrit ci-dessus (10nM d'AntagomiR contrôle, antagomiR-483-5p, antagomiR-139-5p) 24h après l'ensemencement. Un contrôle avec lipofectamine et sans antagomiR est également préparé. « L'AntagomiR mix 10nM » est constitué de 10nM de miR-483-5p et 10nM de miR-139-5p. La même quantité d'exosomes est ajoutée aux différentes conditions.

3.13 **Surexpression des microARN**

La transfection de miRs synthétiques dans les HUVEC a été réalisée afin de mimer l'action des miRs apportés par les exosomes de cellules NCI-H295R. Les miRs « mimics » utilisés ont une structure double-brin. Lorsqu'ils sont introduits dans la cellule, ils vont induire l'inhibition des ARNm cibles de la même façon que le miR endogène.

Selon les expériences, les cellules HUVEC (passage maximal de 4) sont ensemencées en plaque de 6 ou 12 puits à une densité de 50 000 à 300 000 cellules par puits. 24 h après l'ensemencement, les cellules sont lavées avec du milieu EBM™-2 sans additif et sont transfectées avec la lipofectamine RNAimax à raison de 6µL par puits en présence de différentes concentrations de miRs « mimics » (0.1 à 10 nM). Le milieu de transfection est remplacé 6 heures après par du milieu de culture complet pour HUVEC. Les cellules sont lavées au PBS+/+ 48h après la transfection puis lysées avec 150µl de « cell disruption buffer » contenant des inhibiteurs de protéases (Cocktail P8340, Sigma, dilué au 1/100). Les analyses des protéines par Western Blot sont effectuées à partir de 20µg de protéines.

3.14 **Traitement des HUVEC par les exosomes de NCI-H295R**

Les cellules HUVEC ont été ensemencées dans des plaques de 12 puits dans un milieu de culture complet (50 000 cellules/puitss). L'expérience a été réalisée avec des exosomes préparés par la méthode d'ultracentrifugation et dont le contenu en miR-139-5p et miR-483-5p a été déterminé. Après 24h, le milieu de culture est remplacé par du milieu complet contenant 2% de sérum sans exosomes et 1µg/ml ou 10µg/ml (protéines) de suspension d'exosomes en duplicat. Après 24h d'incubation à 37°C, les puitss sont lavés au PBS+/+ et 300µl de « cell disruption buffer » sont ajoutés.

Une extraction de l'ARN total puis un dosage de miR-139-5p et miR-483-5p par RT-qPCR sont effectués. RNU48 est utilisé comme gène contrôle endogène pour la normalisation des résultats.

3.15 Test de blessure

Les cellules sont ensemencées dans des plaques de 96 puitss à fond plat (40 000 cellules/puitss) en présence de mitomycine (concentration finale de 2 µg/mL, Sigma) pour inhiber la prolifération cellulaire. Les HUVEC sont transfectées avec les antagomiRs comme décrit précédemment.
Pour chaque condition, 24h après transfection, les cellules sont trypsinées puis ensemencées dans une plaque de 96 puits (40 000 cellules par puits). Le milieu de culture est aspiré 24h plus tard et 100µl de milieu complet contenant 5µg/ml d'exosomes ou sans exosomes sont ajoutés.
Le test de blessure se fait avec le « WoundMaker™» de Essen Bioscience selon les recommandations du fournisseur. Les lectures sont programmées toutes les heures à 37°C dans un appareil InCucyte® Zoom System (Essen).

3.16 Tubulogénèse

Le matrigel (référence 354230, Corning) congelé et aliquoté à -20° C est décongelé dans la glace. Une plaque de 48 puits (référence 353078, Falcon) ainsi que les pointes servant au pipetage sont refroidies à 4°C. La plaque est préparée en mettant 150µl de matrigel (concentration 9 à 11mg/ml de protéines) par puitss. Le dépôt sur la plaque doit se faire en évitant les bulles. La plaque est incubée 1 heure à 37°C dans l'incubateur à CO_2.
Les HUVEC cultivées puis trypsinées comme décrit précédemment sont filtrées à l'aide d'un filtre à 0.70 µm puis centrifugées à température ambiante à 1000 rpm pendant 5min. Le surnageant est aspiré et le culot est mis en suspension dans du milieu Lonza à 2% de sérum sans exosomes. Une suspension à 250 000 cellules/mL est ensemencée à raison de 200µl par puitss (50 000 cellules). Les cellules sont incubées 20 minutes à 37°C dans un incubateur à CO_2.
Après adhérence des cellules au matrigel, 100 µL de milieu sont alors aspirés pour chaque puits avant ajout de quantités variables d'exosomes dilués dans le milieu Lonza sans additif. Dans ces expériences, 0, 1, 2, 4 ou 8µg de protéines d'exosomes ont été ajoutés en triplicat. Cela correspond respectivement à 0, 1.67 x 10^9, 3.30 x 10^9, 6.65x 10^9 et 1.33 x 10^9 particules par puitss. Le système Incucyte est programmé pour générer des images en contraste de phase toutes les heures. Les statistiques sont effectuées sur GraphPad pour des images acquises après 24h d'incubation. La quantification de la tubulogénèse a été réalisée avec la macro « Angiogenesis analyser for Image J 2012 de Gilles Carpentier ».

3.17 Microscopie de fluorescence

3.17.1 Cinétique d'internalisation des exosomes

Les cellules NCI-H295R sont ensemencées dans une boîte de Pétri de 100mm, après 2 électroporations de 4x10^6 cellules par boîte, selon les recommandations du fournisseur (Lonza

CellLine Nucleofactor kit, référence VCA-1001) avec le programme T-16 du Nucleofector™. 5ng de plasmide GFP-CD63 sont transfectés pour chaque électroporation, dans un milieu DMEM/F12 contenant 5% de Nu-Sérum. 24h après transfection, le milieu de culture est remplacé par du milieu sans exosomes. Après 72h, ce milieu est filtré à 0.2µm et congélé à -80°C.
Pour l'analyse de la cinétique d'internalisation des exosomes dans les HUVEC, 15 000 cellules sont ensemencées sur un puits de lab-Tek Nunc™ 155382 Lab-Tek® recouvert de fibronectine pendant 48h. Les cellules HUVEC sont colorées avec le kit « Image-IT™ LIVE Plasma Membrane and Nuclear labeling » de Thermo-fisher Scientific qui comprend la coloration du noyau avec le colorant Hoechst 33342 (1µM, fluorescence bleue), et l'agglutinine de germe de blé (WGA) Alexa Fluor® 594 (5 µg/ml, fluorescence rouge) qui colore les membranes et le cytoplasme.
Après coloration, le milieu de culture des HUVEC est remplacé par le milieu de culture des NCI-H295R contenant des exosomes fluorescents exprimant le marqueur GFP-CD63. Une cinétique de l'internalisation des exosomes est réalisée pendant 5h30 au microscope confocal spinnig disk. Les images sont acquises à l'objectif 40x à immersion d'huile. Chaque pile d'images en z (25 images) a été aplatie pour obtenir une image finale (en collaboration avec Laurent Guyon, chercheur de l'équipe).

3.17.2 Communication entre cellules NCI-H295R et HUVEC en co-culture 2D.

Les NCI-H295R ont été transfectées comme décrit précédement avec le plasmide CD63-GFP. Les HUVEC (600 000 cellules) ont été colorées au CellTracker™ Orange CMTMR Dye (C2927, ThermoFisher Scientific, concentration finale 2µM) selon les recommandations de fournisseur. Un mélange de 1000 cellules NCI-H295R et 500 cellules HUVEC en suspension dans du milieu de culture d'HUVEC complet a été déposé sur des puits Lab-Tek® II (Nunc™ 155382, 1.75 cm^2) recouverts de collagène de type 1 de rat et séchés. 48 heures après ensemencement, les cellules sont colorées au Hoechst (référence 33258, Thermofisher, à une concentration de 0.1µM dans du milieu complet pour HUVEC sans exosomes pendant 45 minutes. Les cellules sont rincées dans du milieu de culture complet sans exosomes et observées au vidéomicroscope IX71 Olympus contrôlé par le système CellR Olympus, automatisé pour les axes x, y et z et piloté par le logiciel Xcellence, Olympus (collaboration avec Stéphanie Bouillot, ingénieure d'étude du laboratoire).

3.17.3 Co-culture de cellules NCI-H295R et HUVEC en 3D.

L'objectif de la co-culture en 3D était d'observer l'organisation des 2 types cellulaires co-cultivés en sphéroïdes sur une période minimale de 10 jours.

Expression stable de protéines fluorescentes

Des vecteurs lentiviraux ont été utilisés pour produire des cellules HUVEC et NCI-H295R fluorescentes. Les vecteurs lentiviraux permettent des expressions de gène stables car le gène d'intérêt est intégré à l'ADN génomique. Cependant, pour favoriser la croissance des cellules transduites par rapport aux autres, une pression de sélection est mise en place en introduisant des antibiotiques dans le milieu de culture. Les HUVEC ont été transduites avec des lentivirus contenant un plasmide codant pour le gène FLT1-RFP (RFP ou Red Fluorescent Protein). Le gène FLT1 code pour

le récepteur « Vascular Endothelial Growth Factor receptor 1 » (VEGFR1) qui s'exprime spécifiquement dans les cellules endothéliales. L'expression de RFP va permettre de visualiser les HUVEC par une fluorescence rouge (longueurs d'onde d'excitation-émission : 545nm-620nm). Le plasmide contient également une résistance à la néomycine qui permet de sélectionner les cellules transduites. La concentration de 500µg/ml de néomycine a été retenue. Les cellules NCI-H295R ont été transduites avec un lentivirus contenant un plasmide exprimant la Green Fluorescent Protein GFP (fluorescence verte) et une résistance à la kanamycine et à la puromycine (utilisée à 5µg/ml).

Formation des sphéroides

Le réactif Poly (hydroxyethyl methacrylate) DDMAT terminated (PolyHéma, référence p3932, Sigma) est utilisé afin que les cellules n'adhèrent pas au fond du puits. Il est préconisé pour le revêtement des plaques de culture cellulaire destinées à des cultures en 3D. La solution stock à 50mg/ml est préparée dans de l'éthanol à 95%. Après un chauffage de 3 à 4 heures, à 65°C la solution est filtrée avec un filtre à 0.2µm. La solution fille, préparée dans de l'éthanol absolu à une concentration de 20mg/ml de polyHema, a été utilisée pour recouvrir des puits à fond rond de plaques de 96 puits (50µl par puits). La solution doit sécher en laissant la plaque ouverte pendant une nuit sous un PSM.

Ensemencement des cellules

Chaque puits contient 1000 cellules HUVEC et 2000 cellules NCI-H295R. Le milieu de culture utilisé est celui des cellules HUVEC contenant 2% sérum de veau fœtal sans exosomes et des facteurs de croissance.

Fixation des sphéroïdes

Les sphéroïdes sont fixés dans une solution de PFA (référence HT5014, Sigma) contenant 4% de formaldéhyde et du réactif de Hoechst à 1µM. Ce mélange est laissé en contact avec les sphéroïdes pendant une heure. Trois rincages au PBS+/+ sont ensuite effectués pour éliminer le PFA. Des lames « Polylysine slides » (réf 6055100, Thermo Fisher Scientific) sont utilisées pour recueillir les sphéroïdes après collage d'un anneau (référence P 24740, Invitrogen) au niveau de leur surface, afin de ne pas écraser les sphéroïdes. Ceux-ci sont rassemblés sur une même lame et déposés à l'intérieur de l'anneau. Le réactif « ProLong™ Glass Antifade Mountant » (P36980, Invitrogen) permet de coller une lamelle de 22x22 mm, Knittel Glass par-dessus cette préparation. Les cellules NCI-H295R exprimant GFP et les cellules HUVEC exprimant FLT1-RFP apparaissent respectivement en vert et en rouge à l'observation en microscopie de fluorescence observé avec le Airyscan LSM880 Fast.

3.18 Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées à l'aide du logiciel GraphPad Prism version 7.04 (San Diego, CA) en utilisant le test de normalité de Shapiro-Wilk pour la vérification de la répartition gaussienne des échantillons. Si ce test permet d'affirmer la distribution gaussienne, un test ANOVA est effectué, suivi s'il est positif par un test de comparaisons multiples de Tukey. La significativité statistique est indiquée pour des valeurs inférieures à 0.05. Si la ditribution gaussienne n'est pas assumée, un test de Kruskal-Wallis est effectué, suivi s'il est positif d'un test de comparaisons multiples de Dunn's.

Pour la comparaison de deux conditions, un test de Mann-Whitney (non-paramétrique) est effectué. Pour la comparaison de deux conditions avec plusieurs mesures dans le temps, un t-test multiple est effectué, suivi s'il est significatif d'une comparaison multiple de Holm-Sidak (normalité non assumée). Les résultats sont exprimés en moyenne ± SEM ; * pour $p \leq 0.05$; ** pour $p \leq 0.01$; *** pour $p \leq 0.001$, **** pour $p \leq 0.0001$.

4 RESULTATS

4.1 Production et caractérisation des exosomes de cellules NCI-H295R

Notre premier objectif était d'isoler et de caractériser les exosomes secrétés par les cellules NCI-H295R dans le milieu de culture. Les milieux de culture ont été traités par centrifugation différentielle suivie d'une ultracentrifugation. Chaque préparation a été analysée avec le système Nanosight NS-300 afin de vérifier qu'elle contient des nanoparticules qui répondent aux critères de taille des exosomes (comprise entre 30 et 150nm). La détermination de la quantité de particules a été effectuée dans le milieu de culture avant et après ultracentrifugation.
Le but ultime de l'isolation des exosomes est de réaliser des tests fonctionnels avec les HUVEC, les exosomes devaient donc répondre aux critères qui leurs sont spécifiques.

4.1.1 Caractéristiques des nanoparticules dans le milieu de culture initial et dans les fractions enrichies par ultracentrifugation

4.1.1.1 Mesure de l'homogénéité et de la taille des nanoparticules

La qualité des préparations a été estimée par le dispositif « Nanoparticle Tracking Analysis » qui renseigne sur la concentration des nanoparticules, leur taille, et permet d'évaluer l'homogénéité des préparations. La mesure de la taille des particules dans des préparations indépendantes nous a permis de déterminer si les exosomes obtenus ont une taille correspondant à celle définie pour ce type de nanoparticules (entre 30 et 150 nm)[128] et de vérifier si cette taille est homogène pour les différentes préparations. Notons que les milieux de culture ainsi que la préparation d'exosomes sont nécessairement congelés pour pouvoir analyser plusieurs expériences simultanément.

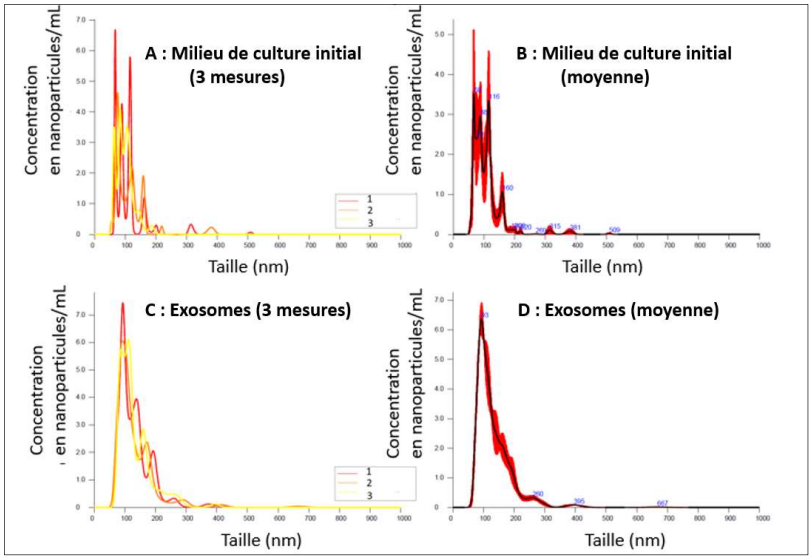


Figure 25 : Distribution de la taille des nanoparticules dans le milieu de culture initial (A,B) et dans les préparations d'exosomes (C,D). A et C : l'appareil effectue trois mesures de concentrations en particules par rapport à la taille pour chaque échantillon. B et D représentent les moyennes de 3 mesures (respectivement de A et C) ± SD.
Pour le milieu en (B), la concentration moyenne est de 1.95 x 10^9 ±1.07 x 10^8 particules/ml. Pour les exosomes en (D), la concentration moyenne est de 4.65 x 10^{11} ± 5.48 x 10^9 particules/ml et la taille est de 132.4 ± 0.2 nm.

L'analyse du milieu de culture conditionné initial (Figure 25, A et B) montre plusieurs pics correspondant à des populations de nanoparticules de tailles différentes comprises entre 50 et 200nm. Ce résultat indique l'hétérogénéité des nanoparticules dans le milieu. Un pic majeur centré sur une taille de 93nm est en revanche détecté dans la préparation d'exosomes obtenue par ultracentrifugation (Figure 25, C et D) et suggère l'homogénéité de la préparation et une taille correspondant à celle attendue pour les exosomes.

La Figure 26 montre que la taille des nanoparticules est relativement homogène dans 3 préparations indépendantes. Cependant, de façon inattendue, la taille moyenne des exosomes mesurée est supérieure à la taille moyenne des milieux (130nm versus 110nm). Cette différence, probablement liée à l'agrégation des nanoparticules par la congélation, a été rapportée dans la littérature[129]. Toutefois, la congélation est incontournable car il n'est pas possible de conserver les exosomes à long terme à 4°C[130].

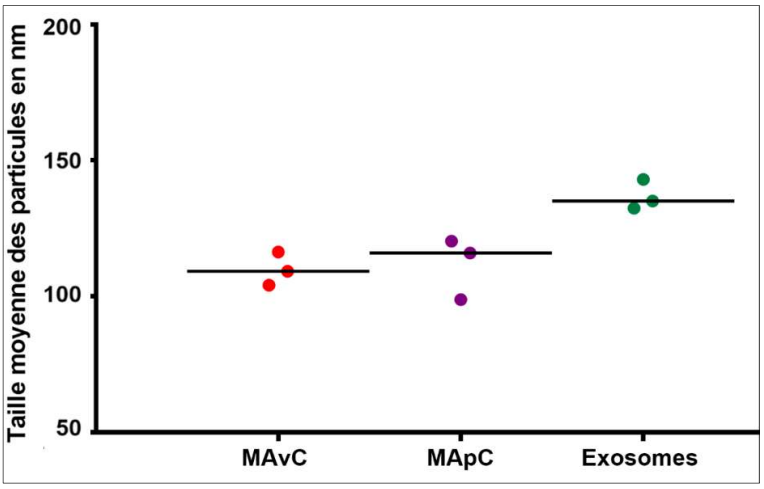


Figure 26 : Taille moyenne des exosomes obtenus en nm. La taille moyenne des nanoparticules du milieu avant ultracentrifugation (MAvC) est de 104.1nm ± 3.5 nm, celle des nanoparticules du milieu après ultracentrifugation (MApC) est de 111.7nm ± 6.5nm et celle des exosomes est de 136.8nm ± 5.5 nm, n=3. Les barres horizontales représentent les tailles moyennes des nanoparticules. Il n'y a pas de différences statsitiques entre le MAvC, le MApC et les exosomes (test de de Kruskal-Wallis).

4.1.1.2 Mesure de la concentration en nanoparticules des échantillons

Le dispositif Nanosight permet également de déterminer la concentration en nanoparticules dans l'échantillon. La Figure 27 montre que les trois préparations d'exosomes indépendantes ont des concentrations très proches en nanoparticules, plus élevées que dans les milieux avant ultracentrifugation (MAvC) et après ultracentrifugation (MApC).
Comme il n'y pas de différence statistique entre les concentrations des MAvC et MApC (Figure 27), cela suggère que peu de nanoparticules en suspension ont été précipitées dans le culot qui contient les exosomes.

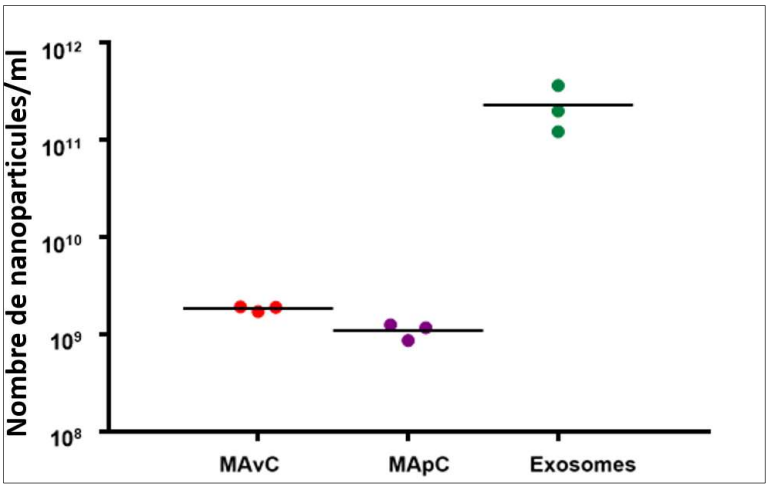


Figure 27 : Concentration des échantillons en nanoparticules. La concentration en nanoparticules toutes tailles confondues, a été déterminée dans le milieu de culture initial des cellules NCI-H295R, puis dans la suspension d'exosomes obtenue (300µl) à partir de 600ml de milieu. Les barres horizontales représentent les concentrations moyennes dans le MAvC : $1.87 \times 10^9 \pm 6.56 \times 10^7$, le MApC : $1.11 \times 10^9 \pm 1.19 \times 10^8$ et dans la suspension d'exosomes : $2.30 \times 10^{11} \pm 7.2 \times 10^{10}$. Les barres horizontales représentent les moyennes. Il n'y a pas de différences statsitiques entre le MAvC et le MApC (test de Kruskal-Wallis). Les préparations d'exosomes concentrent les nanoparticules environ 800 fois par rapport au MAvC. Le nombre de nanoparticules dans l'échantillon exosomes dépend du volume de resuspension choisi (ici ce volume est de 300µl, la valeur du nombre de nanoparticules/ml des exosomes ne correspond pas à une donnée physiologique mais expérimentale).

4.1.1.3 Rendement d'extraction des nanoparticules

Le nombre de nanoparticules récupérées dans le culot d'exosomes étant faible comparé au nombre de nanoparticules présentes dans le milieu de culture initial avant ultracentrifugation, nous avons déterminé le rendement de la procédure selon le calcul suivant :

Nombre total de nanoparticules dans les échantillons d'exosomes x100/nombre total de nanoparticules dans le MAvC. Le rendement moyen est de 9.43 ± 2.88%, ce qui signifie que nous récupérons environ 9.43 % des exosomes présents dans le milieu de départ.

Tableau 3: Pourcentage du rendement d'extraction des nanoparticules.

Nombre total de nanoparticules pour chaque préparation: fraction exosomes	Nombre total de nanoparticules pour chaque préparation : fraction MAvC	Rendement en %	Moyenne du rendement en %	SEM
1.77×10^{11}	1.17×10^{12}	15.10	9.43	2.88
8.64×10^{10}	1.15×10^{12}	7.50		
5.93×10^{10}	1.04×10^{12}	5.68		

4.1.1.4 Nombres de nanoparticules produites par les cellules

Afin de déterminer la quantité d'exosomes produite par un nombre défini de cellules en culture, le nombre total de cellules a été compté à la fin de chaque campagne. Le nombre de cellules initial est le même, mais chaque campagne dure 10 jours. Nous tenons ainsi compte des variabilités de croissance cellulaire dans chaque échantillon. Le calcul du nombre de nanoparticules pour 10^6 cellules (Figure 28) montre qu'il y en a environ 10 fois moins dans la fraction d'exosomes, par rapport à la fraction de milieu de culture de départ. Cela confirme que tous les exosomes ne sont pas récupérés par ultracentrifugation.

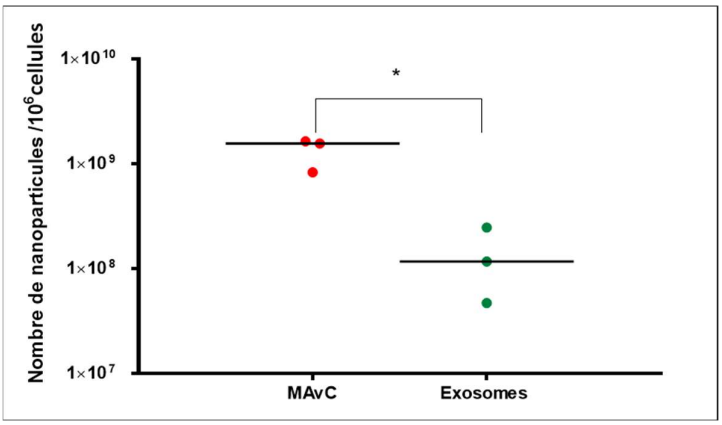


Figure 28 : Nombre de nanoparticules produites par million de cellules. La quantification du nombre de nanoparticules a été réalisée pour 3 préparations. Les barres horizontales représentent le nombre de nanoparticules moyen/10^6 cellules dans le MavC : $1.34 \times 10^9 \pm 2.5 \times 10^8$ et dans les exosomes : $1.37 \times 10^8 \pm 5.8 \times 10^7$. Un test de Mann et Whitney a été effectué, *$p<0.05$ pour MAvC vs Exosomes**.**

4.2 Répartition des microARN et des ARN longs dans les différents échantillons

Les exosomes ont été décrits comme des vecteurs de microARN dans les fluides biologiques. Nous avons donc analysé l'expression des miRs dans les exosomes dérivés des cellules NCI-H295R. La quantification des microARN et des ARN longs permet de déterminer les proportions de ces 2 formes d'ARN dans chaque échantillon (lysat cellulaire, milieu de culture, exosomes). La Figure 29 montre que les miRs sont proportionnellement plus représentés dans la fraction enrichie en exosomes par rapport au lysat cellulaire.

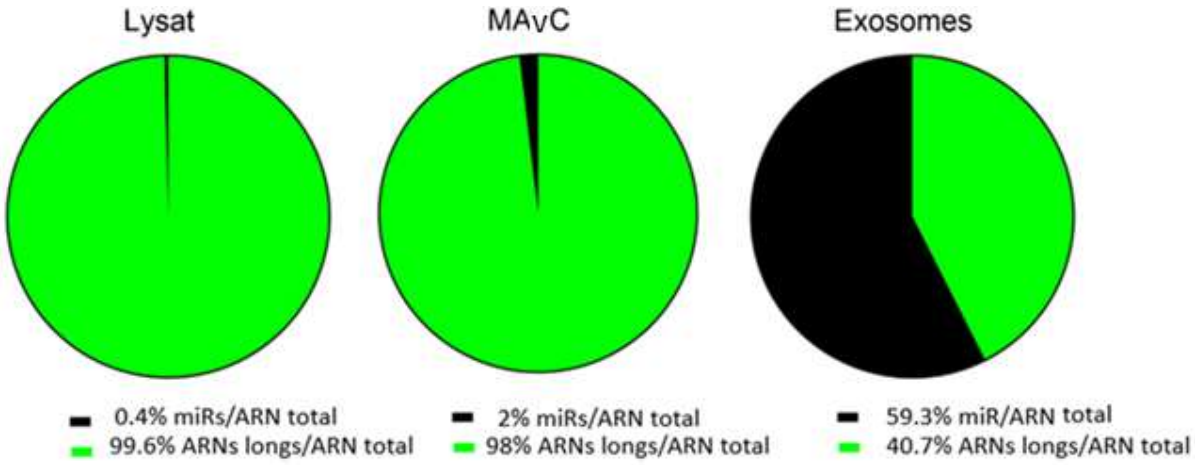


Figure 29 : Répartition des miRs et ARNs longs dans le lysat celulaire, le MAvC et les exosomes de cellules NCI-H295R. Les ARN longs sont les ARN messagers, les ARN ribosomaux et les ARN longs non-codants. L'extraction d'ARN se fait à partir de 50µg de protéines de lysat, de 50µg de protéines d'exosomes, et de 1 ml de milieu. Les résultats sont des moyennes de 3 expériences indépendantes. Après un test non-paramétrique de Kruskal-Wallis suivi d'une comparaison multiple de Dunn's, il n'y a pas de différences statistiques significatives entre le lysat et le MAvC et les exosomes pour leur contenu en miRs et en ARN longs ($p>0.05$), mais une différence significative est observée entre le lysat et les exosomes pour leur contenu en miRs et en ARN longs (*$p<0.05$).

De façon intéressante, ces résultats indiquent que les cellules NCI-H295R secrètent de l'ARN dans le milieu extracellulaire, sous forme d'ARN longs et de miRs. Les concentrations calculées sont reportées dans le tableau 4.

Tableau 4: Concentration en ARN des lysats cellulaires, du MAvC, et des exosomes (ng/10^6 cellules, 3 expériences indépendantes (moyenne ± SEM).

Lysat	MAvC	Exosomes
3177± 673.5	17.5 ± 4.5	0.36 ± 0.075

4.3 Expression de microARN sélectionnés dans les cellules NCI-H295R et les exosomes

Nous nous sommes concentrés sur miR-139-5p et miR-483-5p que nous avons identifiés précédemment comme des biomarqueurs diagnostiques et pronostiques dans des cohortes de patients atteints de CCS[131]. MiR-483-5p et miR-483-3p sont deux miRs introniques du gène IGF2 qui proviennent de la transcription du même précurseur pri-miR-483. La mesure de la concentration de ces miRs nous permettra de déterminer s'ils sont régulés différemment en terme d'export dans le milieu extracellulaire des NCI-H295R. Comme décrit dans l'introduction de ce manuscrit, certains miRs détectés dans le milieu extracellulaire ont été impliqués dans le remodelage du microenvironnement tumoral, voire l'apparition de métastases.

4.3.1 Expression de miR-139-5p, miR-483-5p et miR-483-3p dans les cellules NCI-H295R et les exosomes

Le nombre de copies de miRs pour 10^6 cellules a été déterminé par RT-qPCR. La Figure 30 montre que ce nombre est plus élevé pour le lysat cellulaire comparé au milieu de culture et aux exosomes. MiR-139-5p et miR-483-3p sont exprimés dans le même ordre de grandeur dans les cellules. En revanche, miR-483-5p est environ 4 fois moins abondant que miR-483-3p dans les cellules bien que provenant du même précurseur. De façon intéressante, miR-483-5p est majoritaire dans les exosomes comparés au lysat cellulaire. Ces résultats indiquent que les miRs d'intérêt sont majoritairement localisés dans la cellule et que certains d'entre eux sont préférentiellement exportés.

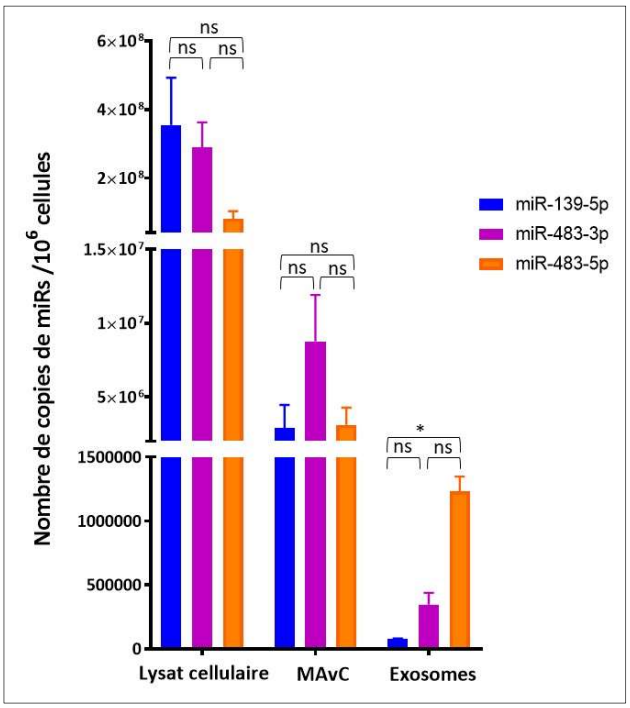


Figure 30 : Nombre de copies de miR-139-5p, miR-483-5p et miR-483-3p par million de cellules. L'extraction des ARN a été effectuée à partir de 50µg de protéines de lysat, 50 µg de protéines d'exosomes et de 1 ml de milieu. Chaque barre représente la moyenne des nombres de copies ± SEM (n=3 analyses indépendantes). Un test non-paramétrique de Kruskal-Wallis suivi du test de comparaison multiple de Dunn's montre qu'il y a une différence statistique significative entre le nombre de copies de miR-139-5p et de miR-483-5p dans les exosomes (*$p<0.05$).

4.3.2 Abondance de miR-139-5p, miR-483-5p et miR-483-3p dans la population de microARN endogènes

Nous avons ensuite déterminé l'abondance de chaque miR dans la population totale de miRs. La Figure 31 montre que le nombre de copies/ng de miRs de miR-139-5p est significativement plus élevé que celui de miR-483-5p dans le lysat cellulaire (*p<0.05). Le nombre de copies de miR-483-3p/ng de miRs est équivalent dans le lysat et dans le milieu de culture et est minoritaire dans les exosomes. Le nombre de copies de miR-483-5p/ng de miRs est similaire dans le lysat, le milieu et les exosomes. Cependant, miR-483-5p est plus représenté dans la population de miRs des exosomes comparé aux 2 autre miRs. Ces résultats confirment que miR-483-5p est sélectivement exporté dans les exosomes tandis que miR-139-5p est un miR préférentiellement localisé dans les cellules.

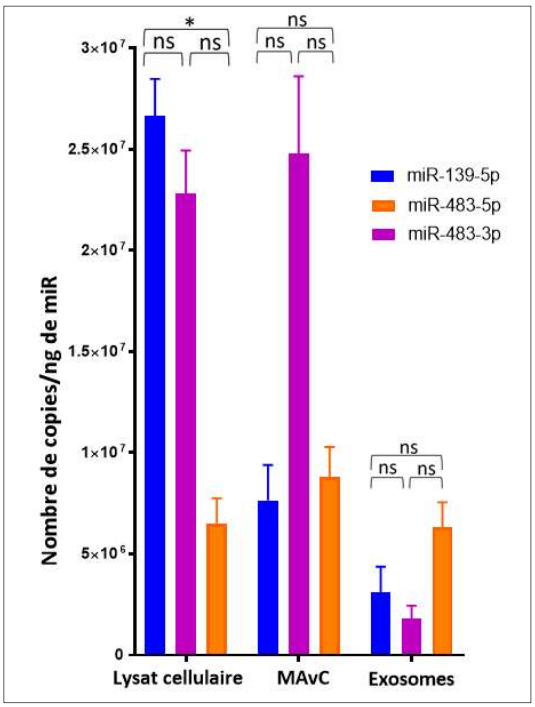


Figure 31 : Nombre de copies de miR-139-5p, miR-483-3p et miR-483-5p/ng de miR. Le nombre de copies a été déterminé par RT-qPCR. Chaque barre représente une moyenne ± SEM avec n=3 analyses indépendantes. Un test non-paramétrique de Kruskal-Walis suivi de tests de comparaison multiple de Dunn's ont été effectués. MiR-139-5p est significativement plus abondant dans la population de miRs du lysat cellulaire que miR-483-5p (*p<0.05). Pour miR-483-5p, il n'y a pas de différence significative du nombre de copies /ng de miRs dans le lysat comparé aux exosomes.

4.4 Contenu en protéines des cellules NCI-H295R et de leurs exosomes.

Plusieurs études ont rapporté que les exosomes joueraient un rôle important dans la progression tumorale par le biais des microARN qu'ils véhiculent, mais aussi par l'intermédiaire de certaines protéines exosomales. Il nous a donc paru pertinent d'identifier les protéines qui pourraient être enrichies dans les exosomes par rapport à leurs cellules parentales. Un total de 2669 protéines a été identifié par la méthode LC/MS/MS (Liquid Chromatography coupled to tandem Mass Spectrometry) dans les exosomes et leurs cellules parentales.

Le tableau 5 présente un extrait des données globales pour les protéines que nous avons trouvées enrichies d'un facteur >10 dans les exosomes par rapport aux cellules de carcinome corticosurrénalien pour 3 préparations indépendantes. Le rôle de ces protéines dans la tumorigenèse est présenté dans la discussion du manuscrit.

Tableau 5 : Protéines enrichies dans les exosomes de carcinome corticosurrénalien par rapport aux cellules parentales

exo1/cell1	exo2/cell2	exo3/cell3	moyenne	sem	protéine
NA	1160.48	1776.97	1468.73	435.93	Lactadherin (MFGM)
80.66	1307.56	139.37	723.47	489.34	Hemopexin (HEMO)
964.63	976.79	214.07	595.43	308.93	Basement membrane-specific heparan sulfate proteoglycan core protein (PGBM)
1624.20	35.26	795.24	415.25	561.95	Alpha-2-macroglobulin (A2MG)
47.54	57.02	174.16	115.59	49.87	Galectin-3-binding protein (LG3BP)
69.66	79.37	77.42	78.40	3.63	Laminin subunit alpha-2 (LAMA2)
47.39	105.96	45.64	75.80	24.28	Laminin subunit gamma 1 (LAMC1)
NA	37.70	75.46	56.58	26.70	CD81
42.50	87.11	12.41	49.76	26.57	Integrin alpha-9 (ITGA9)
44.48	35.07	37.42	36.24	3.47	Serotransferrin (TRFE)
116.72	59.56	12.65	36.11	36.85	Prostaglandin F2 receptor negative regulator (FPRP)
NA	53.31	11.51	32.41	29.56	Immunoglobulin gamma 1 chain C (IGHG1)
24.32	32.81	24.80	28.80	3.37	Laminin subunit beta-1 (LAMB1)
17.23	12.69	23.34	18.02	3.78	Major vault protein (MVP)
NA	25.59	10.08	17.84	10.96	Isoform 4 of latent-transforming growth factor beta binding protein (LTBP1)
25.30	20.89	14.13	17.51	3.98	Tetraspanin-7(TSPAN7)
21.94	19.54	10.91	15.23	4.10	isoform 3 of immunoglobulin superfamiliy member 8 (IGSF8)
NA	10.28	11.38	10.83	0.78	RAS-related proteinRap-2a (RAP2A)

Exo : exosomes ; Cell : cellule ; 1, 2, 3 : trois préparations indépendantes

4.5

4.6 Comparaison des méthodes de préparation des exosomes : ultracentrifugation et kits commerciaux Exo-Spin et ExoQuick

Etant donné les quantités importantes de cellules et de milieu de culture nécessaires pour préparer des exosomes par la méthode d'ultracentrifugation, nous avons décidé d'explorer d'autres méthodes de préparation moins consommatrices de matériel et de temps. Nous avons testé les kits commerciaux Exo-Spin et ExoQuick comme décrit dans la section « Matériel et Méthodes ».
Nous avons montré que les exosomes isolés par la méthode d'ultracentrifugation ont une taille moyenne de 136.8nm ± 5.5 (Figure 26).

Les exosomes isolés par la méthode Exo-Spin ont une taille moyenne semblable à ceux isolés par la méthode d'ultracentrifugation (taille moyenne de 137.0 ± 18.5nm, Figure 32). En revanche, l'échantillon est plus hétérogène car de nombreux pics de nanoparticules sont observés.

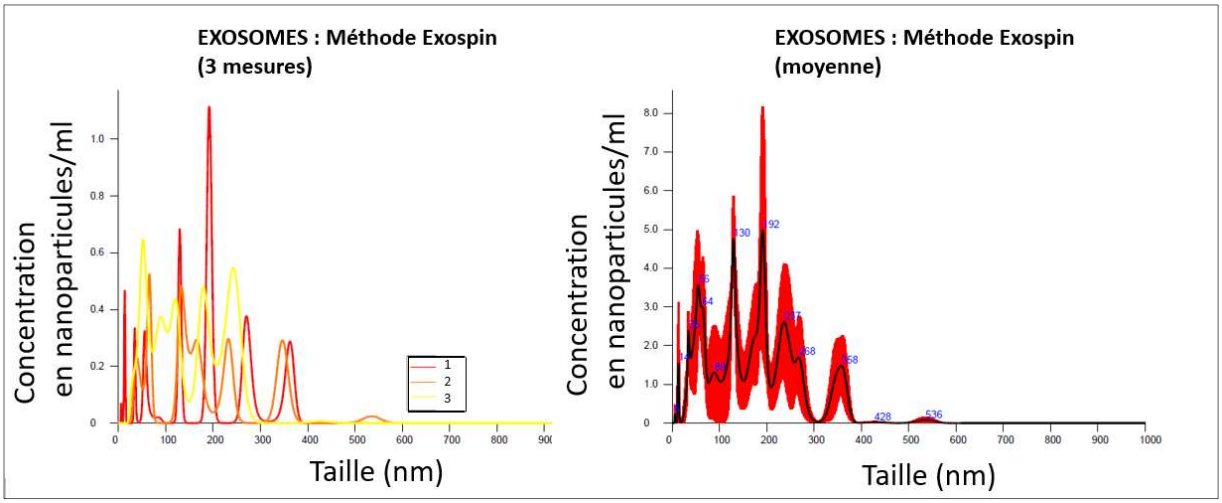


Figure 32 : Exosomes isolés par la méthode Exo-Spin (Intershim). La concentration obtenue par la méthode Exospin est de 8.76e+9 ± 2.33e+9 nanoparticules/ml avec une taille moyenne de 137.0 ± 18.5nm.

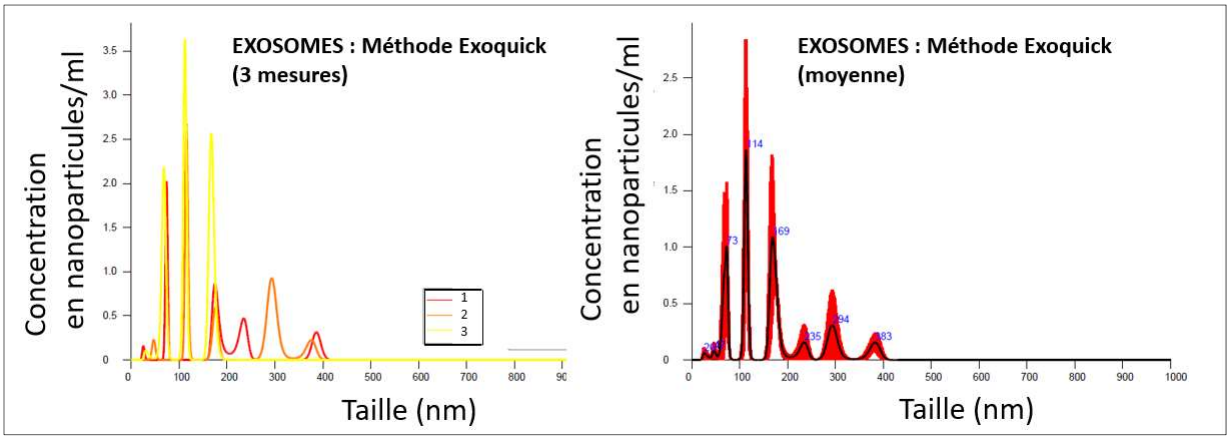


Figure 33 : Exosomes isolés par la méthode ExoQuick (Amsbio). La concentration obtenue par la méthode ExoQuick est de 5.99e+7± 6.16e+6 particules/ml avec une taille moyenne de 177.1 ± 29.0 nm.

Les exosomes isolés par la méthode ExoQuick montrent 3 pics majeurs autour de 73nm, 114nm et 169nm (Figure 33) ainsi que des pics mineurs au-delà de 200nm, une taille supérieure aux critères de taille des exosomes (entre 30 et 150nm). De plus, la concentration en nanoparticules est moindre comparée à celle obtenue avec l'ultracentrifugation.

4.7 Analyse des marqueurs spécifiques des exosomes par western blot

Nous avons réalisé des Western Blot à partir d'une même quantité de protéines dans les cellules parentales et les extraits d'exosomes (Figure 34).

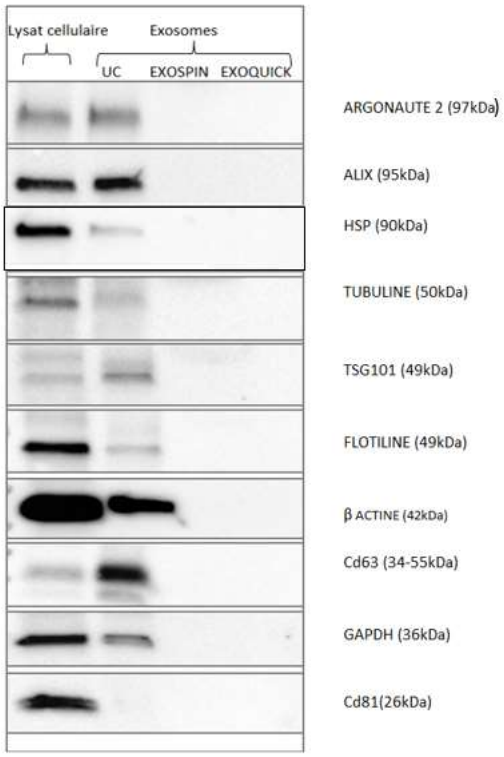


Figure 34 : Analyse par Western Blot de l'expression des marqueurs des exosomes dans le lysat cellulaire et les exosomes obtenus par différentes méthodes. 7 µg de protéines cellulaires ou exosomales ont été déposés sur le gel. UC: ultracentrifugation.

Argonaute 2, indispensable à la fixation des miRs dans le complexe RISC, est mise en évidence dans les exosomes préparés par ultracentrifugation. La tétraspanine CD63, une protéine transmembranaire, a été retrouvée plus abondante dans les exosomes que dans les cellules, en accord avec les données de la littérature. Alix et TSG101, deux protéines nécessaires au complexe ESCRT et à la biogenèse des exosomes sont également plus abondantes dans les exosomes que dans les cellules parentales. CD81 n'a pu être détecté avec la quantité de protéines déposées. Le marqueur du cytosquelette tubuline est indétectable dans les exosomes à la différence de la β-actine. L'enzyme GAPDH, et la flotiline sont également présents à moindre concentration dans les exosomes. Ces résultats montrent que les kits commerciaux utilisés ne sont pas satisfaisants pour la préparation des exosomes puisqu'aucun marqueur n'a été détecté, malgré un dépôt équivalent pour tous les échantillons. D'autres méthodes restent donc à explorer.

4.8 Effet des vésicules extracellulaires (exosomes et microvésicules) sur la migration et la tubulogénèse des cellules HUVEC

4.8.1 Internalisation des vésicules extracellulaires par les HUVEC

4.8.1.1 Cinétique d'incorporation des vésicules extracellulaires de NCI-H295R dans les cellules HUVEC

La cinétique de capture des vésicules extracellulaires par les HUVEC a été effectuée en présence vésicules extracellulaires fluoresentes (exosomes et microvésicules), obtenus à partir de milieu conditionné de NCI H295R (filtré à 0.2µm). Comme il existe des microvésicules CD63 positives et de taille inférieure à 200nm, nous parlerons de VE plutôt que d'exosomes. Des images ont été réalisées en temps réel à l'aide d'un microscope confocal spinning disque. Les cellules NCI-H295R ont été transfectées avec un plasmide codant pour une protéine de fusion CD63 et la Green Fluorescent Protein : CD63-GFP. CD63 est une tétraspanine caractéristique des exosomes et des microvésicules. Le milieu de culture contenant les vésicules extracellulaires fluorescentes (vertes) a été ajouté aux cellules HUVEC. Les cellules HUVEC ont été marquées au fluorophore rouge Alexa. Dès la première demi-heure d'incubation avec les HUVEC, les nanoparticules fluorescentes commencent à s'attacher à la membrane cellulaire (Figure 35).

Après 104 minutes (1h44), ces nanoparticules ont été incorporées dans les cellules et apparaissent dans le cytoplasme. A 120 et 180 minutes, quelques nanoparticules apparaissent également dans le noyau.

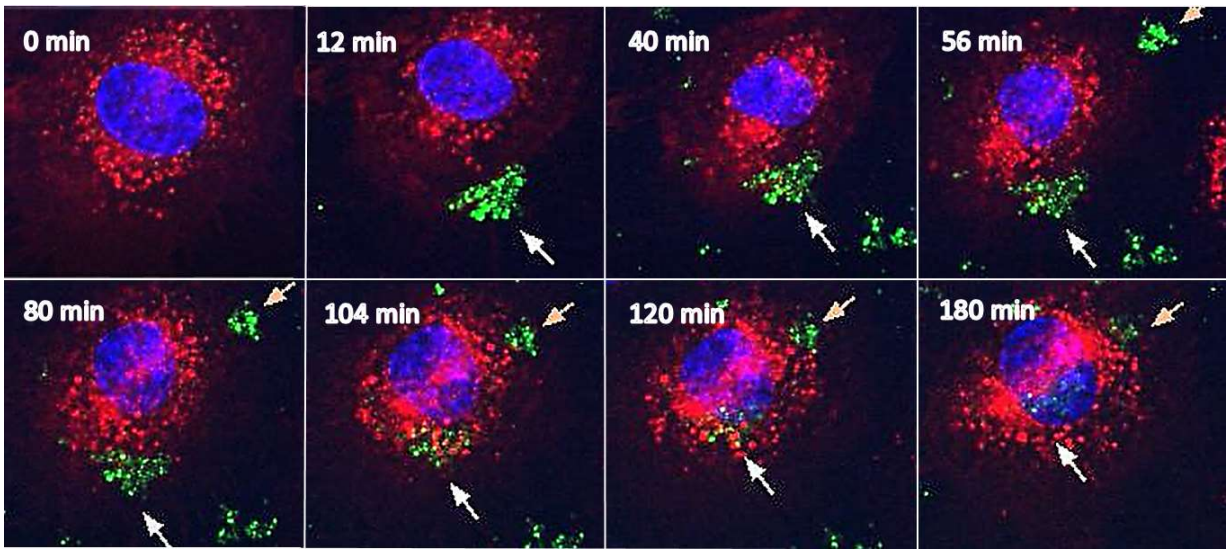


Figure 35 : Cinétique d'incorporation des VE de NCI H295R dans les HUVEC. Les cellules primaires HUVEC ont été colorées avec le fluorophore rouge Alexa Fluor® 594 wheat germ agglutinin (WGA) et les noyaux ont été marqués avec le fluorophore bleu Hoechst 33342. A 12 minutes, un agrégat de VE s'est fixé au niveau de la membrane plasmique. A 40, 56, 80 et 104 minutes, les nanoparticules pénètrent dans le cytoplasme. A 120 minutes et 180 minutes, certaines nanoparticules ont été observées dans le noyau. Les flèches pointent les exosomes.

4.8.1.2 Capture des vésicules extracellulaires par les HUVEC dans des co-culture de NCI-H295R et d'HUVEC

Dans l'expérience réalisée en Figure 35, nous avons ajouté aux HUVEC un milieu de culture provenant des cellules NCI-H295R. Afin de visualiser les échanges entre les deux types cellulaires, nous avons réalisé des expériences de co-culture. Les cellules NCI-H295R ont été transfectées avec un plasmide CD63-GFP et les HUVEC ont été marquées au Cell Tracker orange (Figure 36). Le suivi des co-cultures a été réalisé par vidéomicroscopie (vidéomicroscope IX71 Olympus). Après 24h, une forte expression de la GFP dans le cytoplasme des cellules NCI-H295R a été observée. De plus, les cellules NCI H295R émettent des tubes formant un pont avec d'autres cellules tumorales ou avec les cellules HUVEC (Figure 36, A et B). Enfin, des vésicules extracellulaires vertes (exosomes ou microvésicules), ont été détectés dans les HUVEC (Figure 36, C et D), ce qui suggère d'une part leur sécrétion par les NCI H295R dans le milieu de culture et d'autre part, leur internalisation dans les cellules cibles.

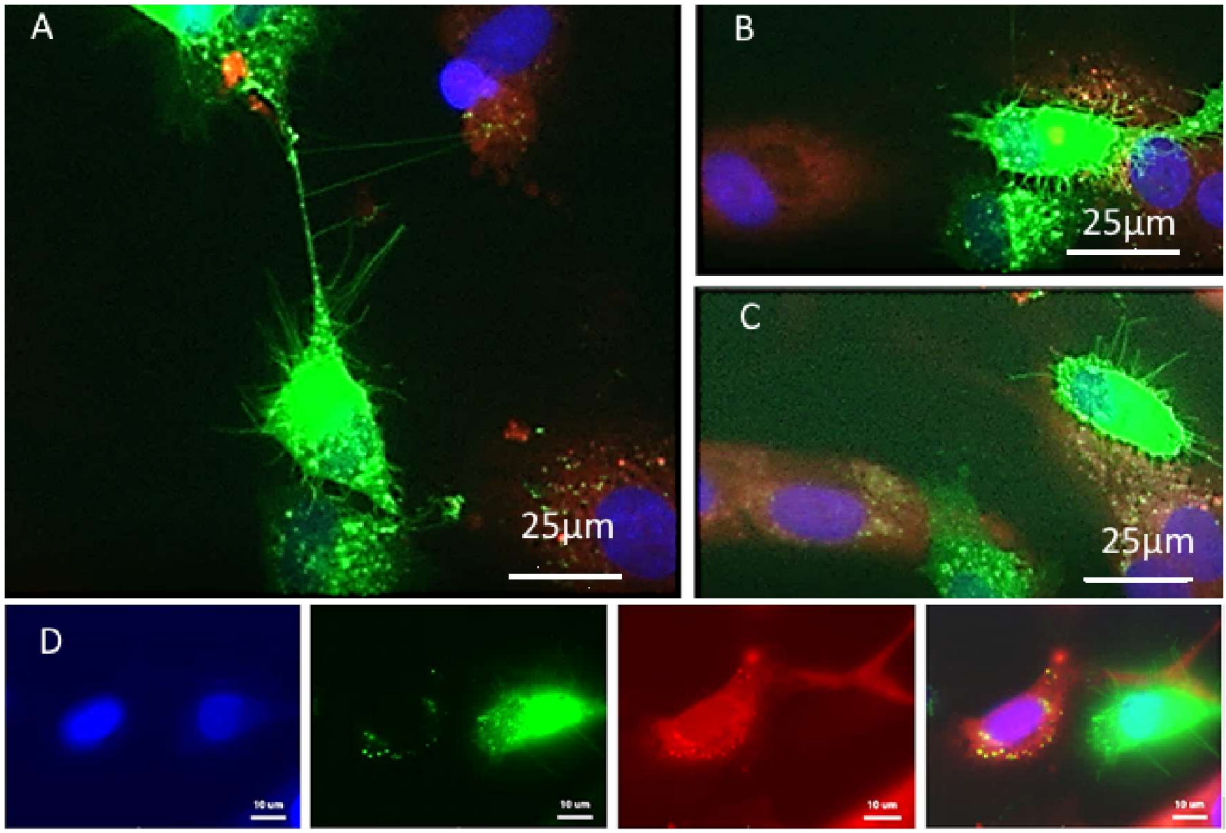


Figure 36 : Visualisation de la capture de VE de NCI H295R par les HUVEC dans des co-cultures des deux types cellulaires. Les NCI H295R exprimant CD63-GFP semblent communiquer entre elles et avec les HUVEC par des extensions tubulaires cytoplasmiques. L'accumulation des exosomes fluorescents dans les HUVEC a été observée pendant 24h.

4.9 Effets des vésicules extracellulaires de NCI H295R sur la migration des HUVEC.

Après avoir mis en évidence l'internalisation des vésicules extracellulaires (VE) de NCI H295R par les HUVEC, nous avons entrepris de déterminer leurs effets sur le phénotype de ces cellules. Nous avons

tout d'abord étudié l'effet global des exosomes puis l'impact de miR-139-5p et miR-483-5p véhiculés par ces microvésicules.

4.9.1 Migration des HUVEC en présence de VE de NCI H295R

Les cellules cancéreuses ont un besoin accru en nutriments et en oxygène[132], ce qui nécessite une néovascularisation de la tumeur croissante et donc une prolifération et une migration des cellules endothéliales. Le test de blessure permet ici d'évaluer les capacités migratoires des cellules HUVEC en présence ou en absence d'exosomes. Les images en Figure 37 et le graphique en Figure 38 montrent que l'addition des VE de NCI-H295R aux cellules HUVEC accélère la fermeture de la blessure et donc augmente la migration des HUVEC.

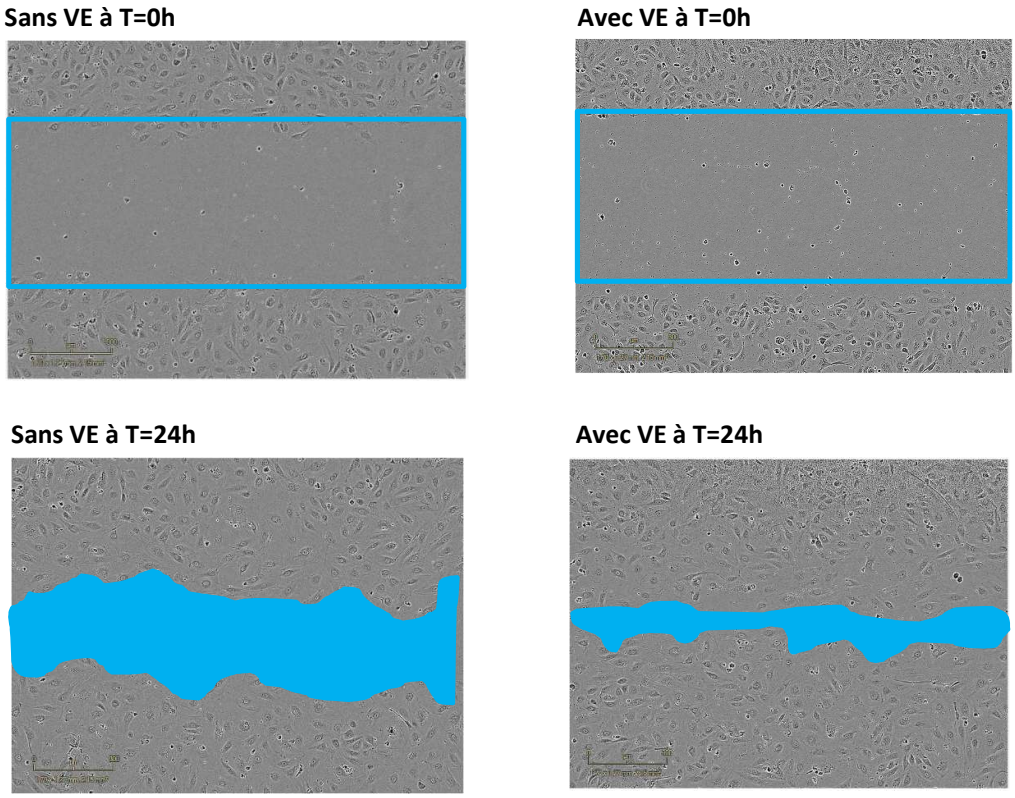


Figure 37 : Test de fermeture de la blessure d'une monocouche de cellules endothéliales avec ou sans VE. Les cellules HUVEC sont cultivées dans des boîtes de Pétri de 60mm, elles sont ensuite ensemencées dans des plaques 96 puits (40000 cellules/puits) avec n=6 par condition. 48h après ensemencement, une blessure est effectuée à l'aide du « Wound Scratch Instrument » de Essen. Après lavage, 100µl de milieu complet contenant 2% de SVF déplété en exosomes d'origine bovine et de la mitomycine (2µg/ml) en présence ou non de VE (0.5µg de protéines) sont ajoutés aux puits. Les images sont enregitrées pendant 24h, à l'aide d'un analyseur d'images Incucyte Zoom. Le pourcentage de fermeture de la blessure, en présence de mitomycine, est proportionnel à la vitesse de migration des cellules.

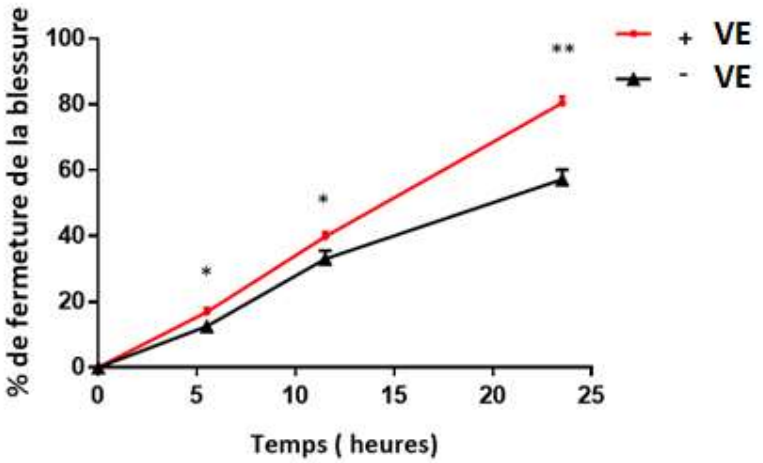


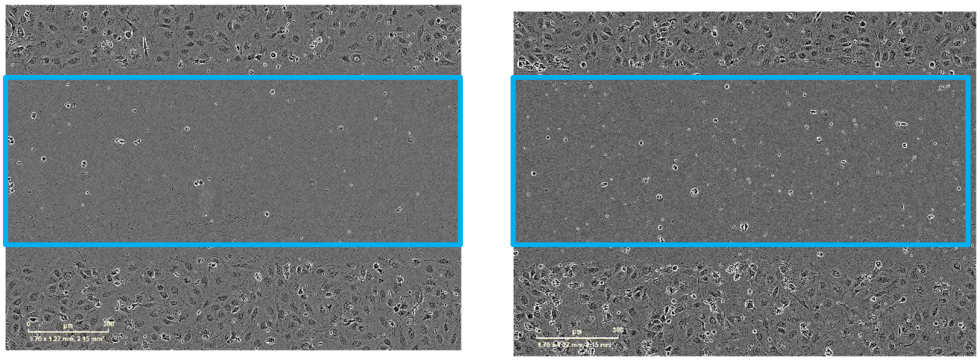
Figure 38 : Quantification de la fermeture de la blessure des HUVEC en absence ou en présence de VE. Le pourcentage de fermeture de la blessure est calculé selon la formule (aire initiale de la blessure-aire au temps t de la blessure) / (aire initiale) *100. Lorsque la blessure est refermée, la migration est alors de 100%. Un test t multiple significatif suivi d'une comparaison multiple de Holm-Sidak donnent *p<0.05 pour la comparaison sans exosomes *versus* avec exosomes à 5.5 et 11.5 h, et **p<0.001 à 24 h.

4.9.2 Migration des HUVEC déplétées en miR-139-5p et miR-483-5p et exposées aux VE

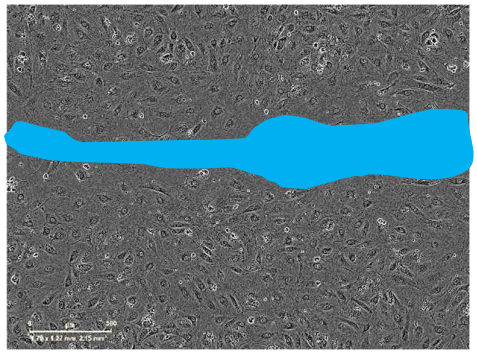
Les VE apportent de nombreuses molécules exogènes aux HUVEC dont des microARN. Afin de supprimer l'action potentielle de miR-139-5p et miR-483-5p provenant des exosomes, les HUVEC ont été traitées avec des antagomiRs avant leur incubation avec les exosomes de NCI-H295R. Il est à noter que les HUVEC expriment une quantité négligeable de miR-483-5p et miR-139-5p comparées aux cellules tumorales (non-montré).

L'effet des VE sur la migration n'est plus statistiquement significatif en présence des antagomiR-139-5p ou antagomiR-483-5p, contrairement à l'effet des exosomes sur les HUVEC non-traitées (Figure 39). Il n'y a également pas de différence entre l'antagomiR contrôle et l'antagomiR contrôle avec exosomes. Ceci suggère un effet non spécifique des antagomiRs sur la migration (Figures 40 et 41). L'effet directe de l'antagonisation des mirs pourrait être obtenu avec des VE déplétées en miR-139-5p et miR-483-5p mais nous n'avons pas réussi à obtenir ces VE en quantité suffisante pour ces expériences.

AntagomiR Contrôle à T=0h sans VE **AntagomiR Contrôle à T=0h avec VE**



AntagomiR Contrôle à T=24h sans VE



AntagomiR Contrôle à T=24h avec VE

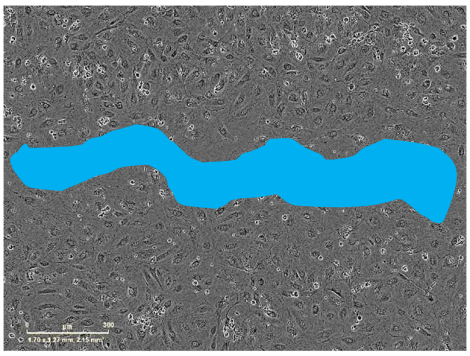
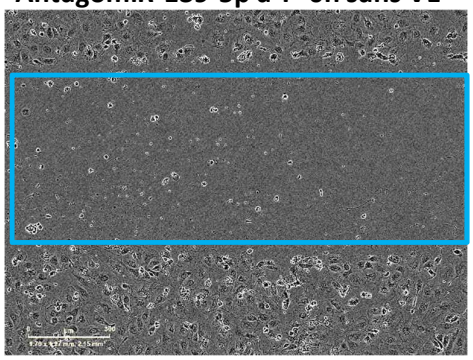
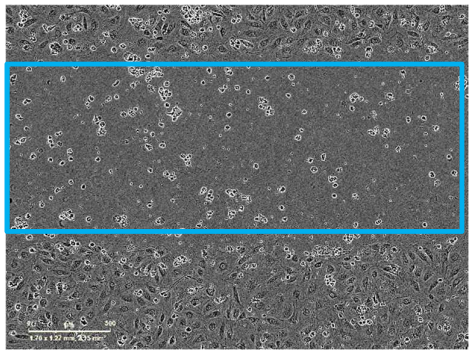


Figure 39 : Test de fermeture de la blessure d'une monocouche de cellules endothéliales avec ou sans VE pour la condition AntagomiR Contrôle (10nM) avec ou sans VE, AntagomiR (même test qu'en figure 37)

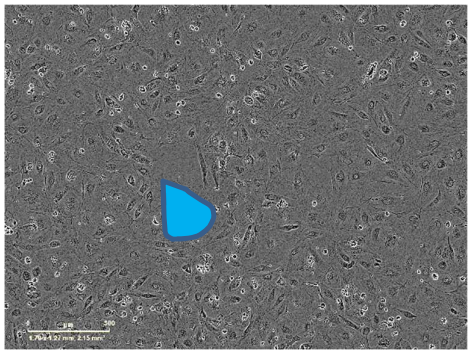
AntagomiR-139-5p à T=0h sans VE



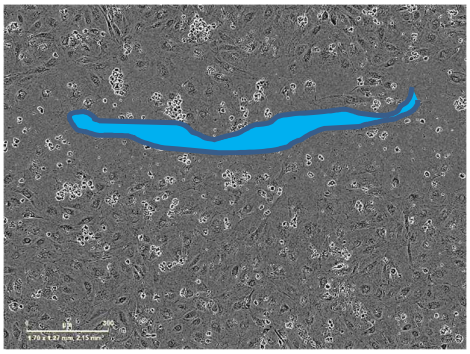
AntagomiR-139-5p à T=24h avec VE



AntagomiR-139-5p à T=24h sans VE



AntagomiR-139-5p à T=24h avec VE



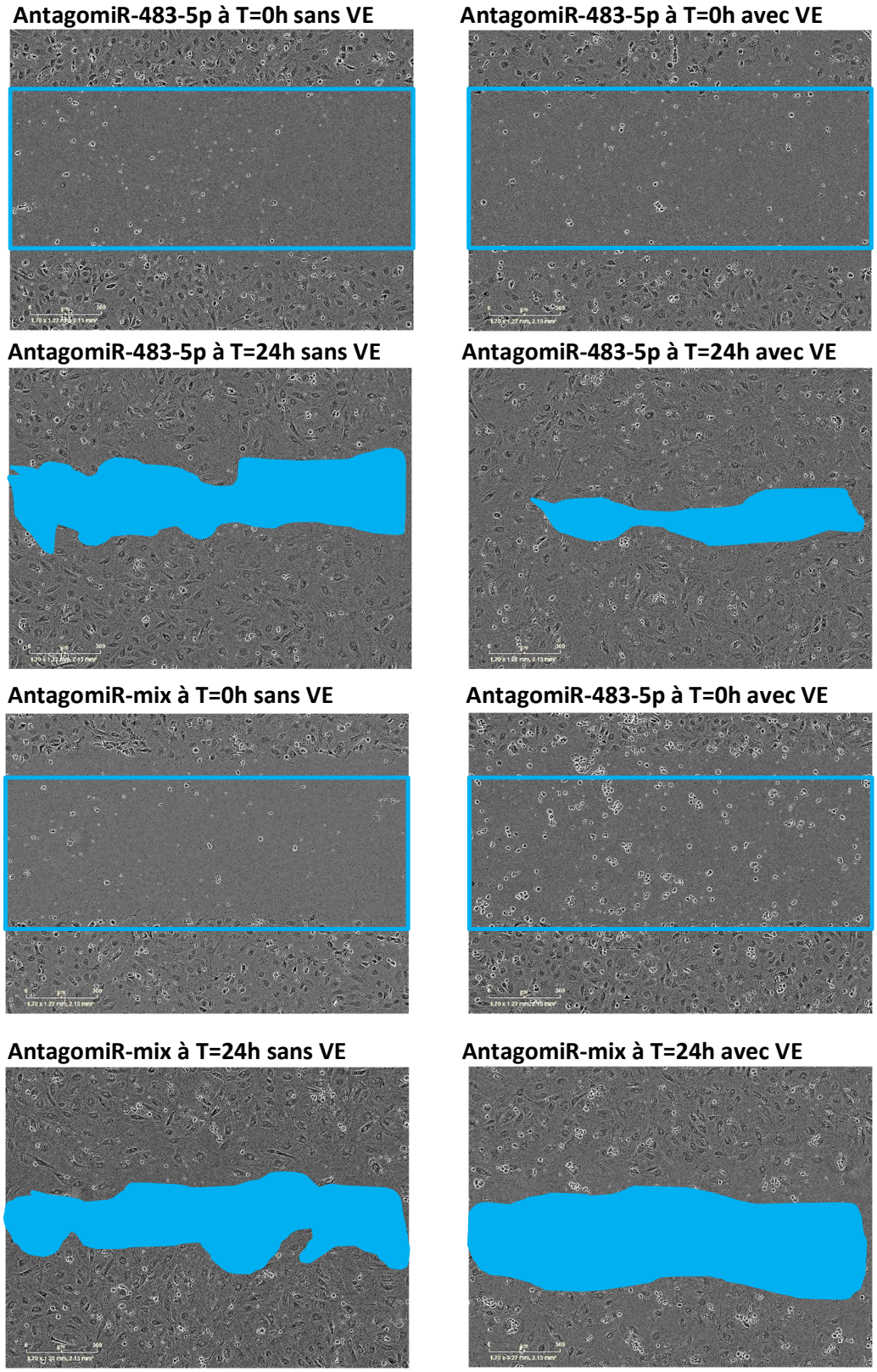


Figure 40 : Test de fermeture de la blessure d'une monocouche de cellules endothéliales avec ou sans VE pour la condition AntagomiR-139-5p, AntagomiR-483-5p 10nM et antagomiR-mix (antagomiR-483-5p (10nM et antagomiR-139-5p10nM), (même test qu'en figure 37).

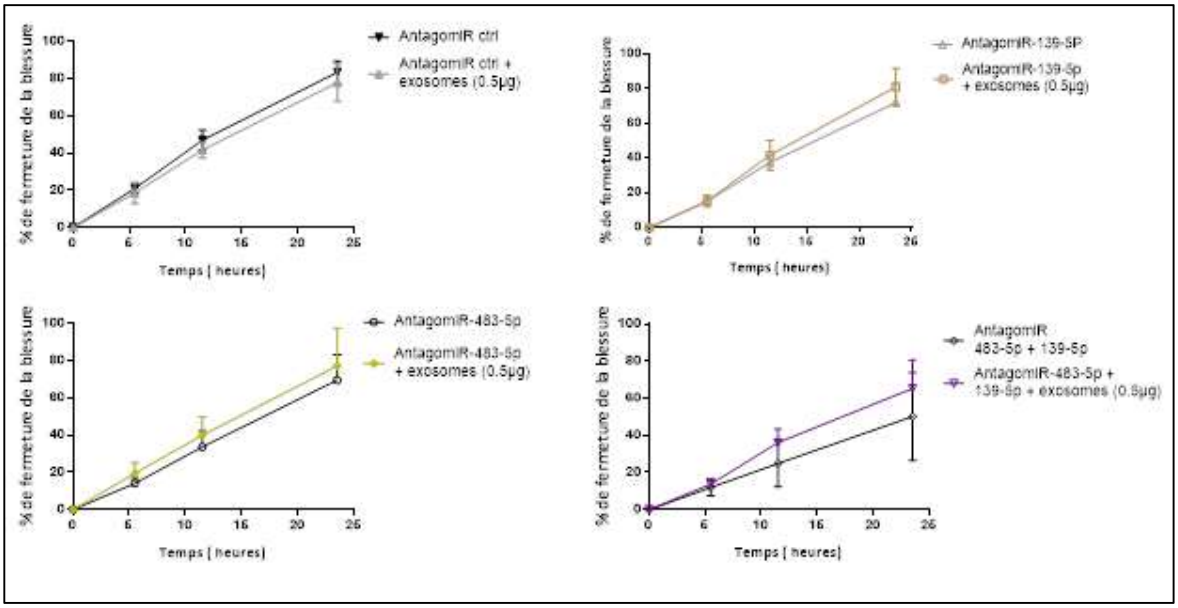


Figure 41 : **Effet des VE sur la migration des HUVEC après antagonisation de miR-139-5p et miR-483-5p intracellulaire.** Les cellules HUVEC ont été transfectées avec des antagomiRs dans des boîtes de Pétri de 60mm. 24h après transfection, elles sont ensemencées dans des plaques 96 puits (40000 cellules/puits, n=6 par condition). 48h après transfection, une blessure est effectuée à l'aide du « Wound Scratch Instrument » de Essen. Après lavage, 100µl de milieu complet avec 2% de SVF déplété en exosomes d'origine bovine et contenant de la mitomycine (2µg/ml) sont ajoutés au puits en absence ou en présence d'exosomes (0.5µg de protéines). L'enregistrement des images est effectué par l'analyseur d'images Incucyte® ZOOM. Un test t multiple n'a pas montré de différence significative entre les différentes conditions antagomiR ± exosomes.

4.10 Effets des VE de NCI H295R sur la tubulogenèse des HUVEC

4.10.1 Paramètres de la tubulogenèse

Le test de tubulogenèse fait partie des tests d'angiogenèse car il permet d'observer la formation de pseudo-tubes par les HUVEC en présence de matrigel. Ce matrigel joue le rôle de membrane basale, il est extrait à partir du sarcome d'Engelbreth-Holm-Swarm de souris. Il s'agit d'une tumeur riche en matrice extracellulaire, contenant des protéines comme la laminine, le collagène IV, du nidogène, de l'héparane sulfate protéoglycane et un grand nombre de facteurs de croissance. Les cellules ensemencées sur le matrigel adhèrent rapidement et commencent à s'organiser au bout de quelques heures (Figure 42). Les images ont été acquises à l'aide du système Incucyte Zoom et ont ensuite été analysées sur image J grâce à une macro mise au point par Gilles Carpentier[133]. Cette macro permet d'évaluer de manière reproductible les différents paramètres de la tubulogénèse.

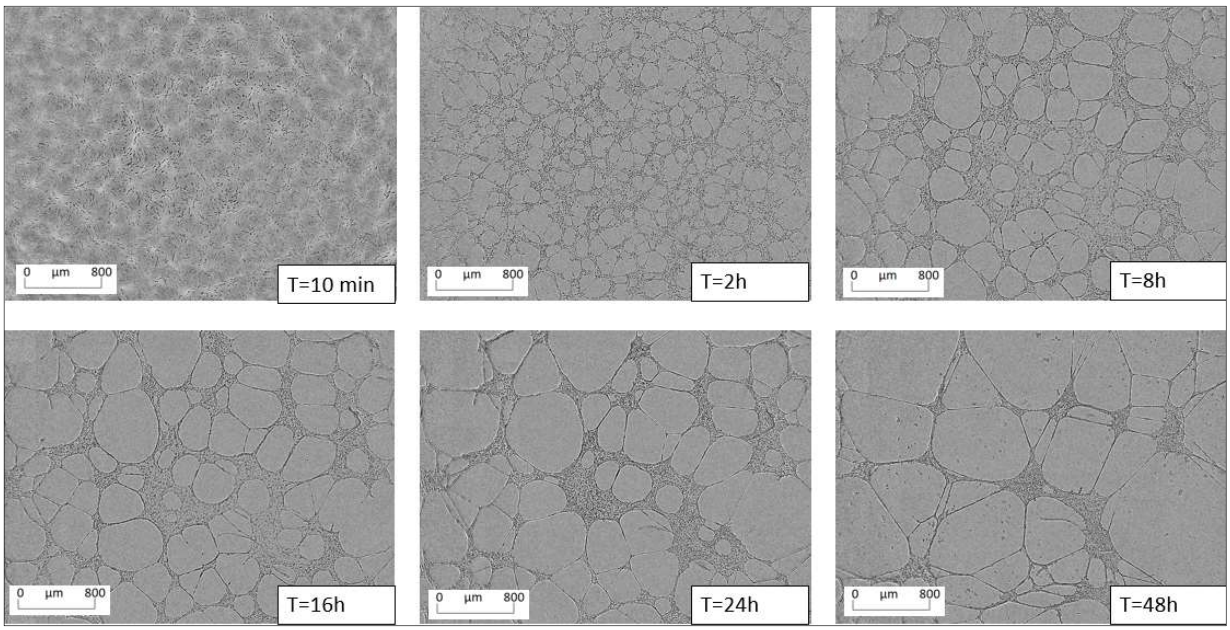


Figure 42 : Cinétique de tubulogenèse (échantillon non traité). Les cellules HUVEC sont ensemencées sur matrigel. Elles adhèrent rapidement (en 10 minutes). Au bout de deux heures, un micro-réseau est visible, ce réseau continue à s'organiser avec des mailles plus grandes (de 8h à 24h). A 48h, le réseau commence à se désagréger.

La macro permet en effet de mesurer un grand nombre de paramètres précisés ci-dessous.

4.10.2 Tubulogenèse des HUVEC en présence de VE

Nous avons ajouté une quantité croissante d'exosomes de cellules NCI H295R aux HUVEC. La Figure 43 montre que les paramètres de la tubulogenèse augmentent de façon dose-dépendante en fonction de la quantité d'exosomes ajoutés dans l'échantillon :

- le nombre de jonctions (nœuds ou fusion de nœuds)
- le nombre de jonctions de grande taille (fusion de jonctions)
- le nombre de segments (portion limité par 2 jonctions).
- le nombre de pièces (c'est la somme des nombres de segments et des extrémités détectées dans l'aire d'analyse).
- l'index des mailles (longueur des grands segments divisée par le nombre de grands segments).

Ces résultats confirment un effet "pro-angiogénique" des exosomes.

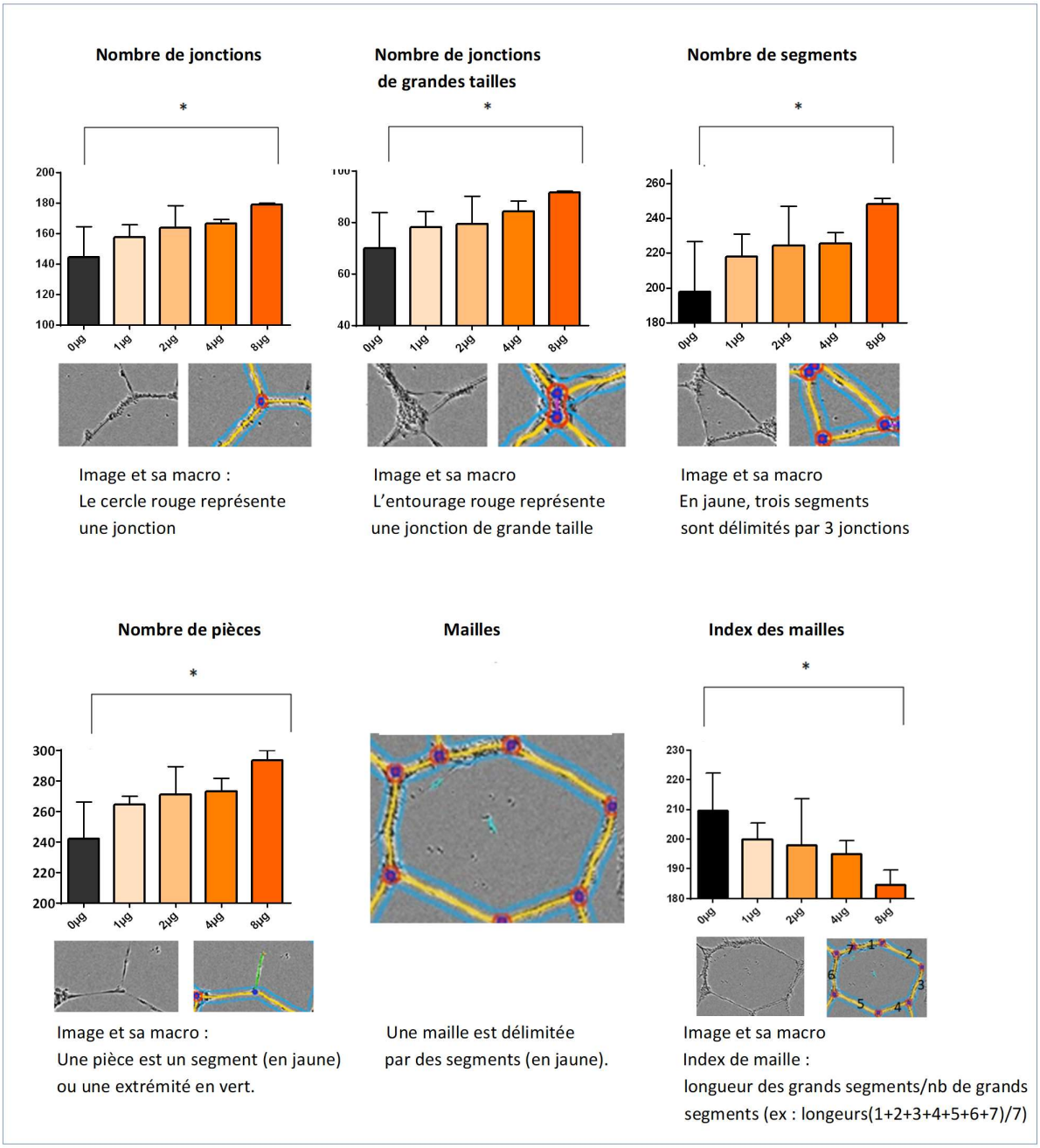


Figure 43 : Test de tubulogenèse en présence de différentes concentrations de VE (0, 1, 2, 4, et 8 µg). Les analyses montrent que l'angiogenèse est favorisée par l'apport croissant de VE. L'augmentation est statistiquement significative en utilisant le test de Kruskal-Wallis avec la comparaison multiple de Dunn's : $p < 0.05$ (*) pour les valeurs sans exosomes *versus* les valeurs à 8µg d'exosomes et cela, pour les paramètres suivants : le nombre de nœuds, le nombre de jonctions, le nombre de jonctions de grandes taille, le nombre de pièces, le nombre de segments, le nombre d'intervalle des branches et l'index des mailles (n=3). Les valeurs représentent la moyenne des mesures ± SEM.

4.11 **Effets des VE de NCI H295R sur la signalisation des HUVEC.**

Les effets pro-migratoires des VE sur les HUVEC nous ont amenés à explorer leur impact sur la voie de signalisation du VEGF, un facteur de croissance clé pour les cellules endothéliales. Ainsi, des thérapies anti-VEGF sont utilisées pour inhiber la croissance tumorale. Cependant, certaines tumeurs sont résistantes à ces thérapies. Il a été suggéré qu'une des causes de cette résistance proviendrait des exosomes tumoraux[134]. Dans ce contexte, nous avons testé la phosphorylation de quelques protéines impliquées dans la voie de signalisation du VEGF en présence de VE, notamment le récepteur VEGFR2, la p38 MAPK, les p42/44 MAPK ainsi que la Kinase AKT. Les phosphorylations sur Tyrosine (Y), Thréonine (Thr) ou Sérine (Ser) testées ont été les suivantes : Phospho-VEGFR2(Y1214), Phospho-VEGFR2(Y951), Phospho-p38(Thr180/Y182), Phospho-p42/p44 MAP Kinase (Thr183 et Y185), Phospho-AKT(Sérine473)**.** Dans nos conditions de culture (absence de sérum et de facteurs de croissance), seule la phosphorylation de AKT augmente avec la concentration en VE (Figure 44).

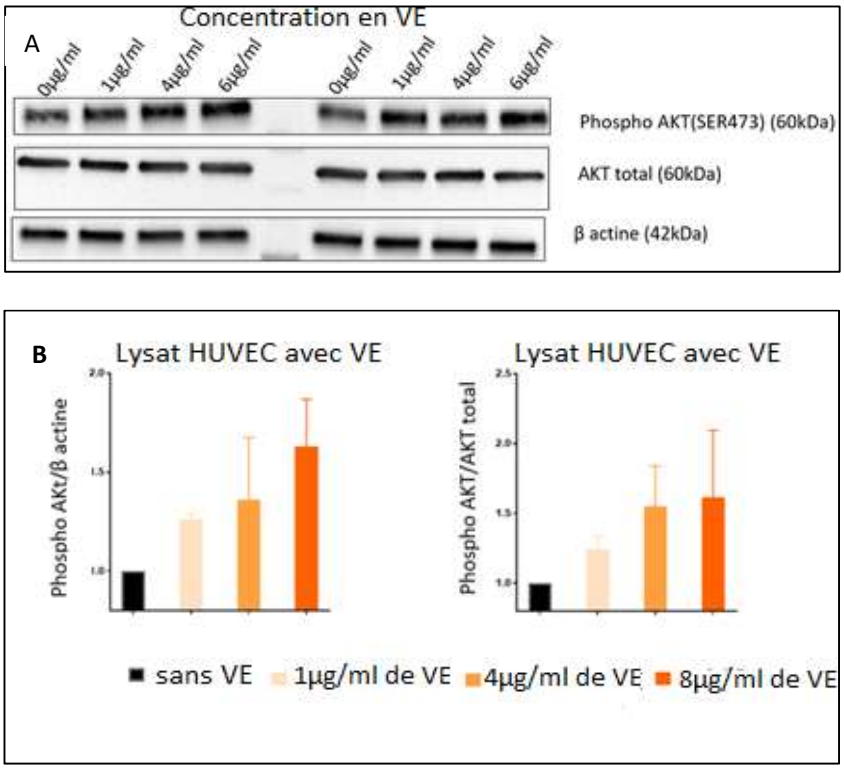


Figure 44 : Effet des VE sur la phosphorylation d'AKT. (A) Western Blot. (B) Quantification de P-AKT dans deux expériences indépendantes**.** Les cellules HUVECs ont été déprivées en sérum et facteurs de croissance pendant trois heures. Des VE ont été ajoutés et les cellules incubées 6 heures de plus dans un milieu déprivé en sérum et facteurs de croissance. Les deux histogrammes montrent une augmentation de la phosphorylation de AKT qui est proportionnelle à la quantité de VE ajoutée (n=2). Les barres des histogrammes représentent des moyennes ± SD. Les 2 normalisations (AKT/βéta actine et Pospho AKT/AKT donnent des résultats similaires : (AKT total n'est pas modifié tout comme l'actine), il n'y a pas synthèse d'AKT mais c'est la phosphorylation d'AKT qui est modifié après 6 h d'incubation avec les VE.

4.12 Mesure de miR-483-5p et de miR-139-5p dans les HUVEC après internalisation des VE

4.12.1 Dosage des miRs dans les VE de NCI-H295R et dans les HUVEC

Les VE de cellules NCI-H295R étant internalisés par les HUVEC, nous avons examiné les variations de miR-483-5p, miR-483-3p et miR-139-5p engendrées par ce processus dans ces cellules. Dans un premier temps, nous avons mesuré le niveau d'expression de ces trois miRs dans les HUVEC et les VE.

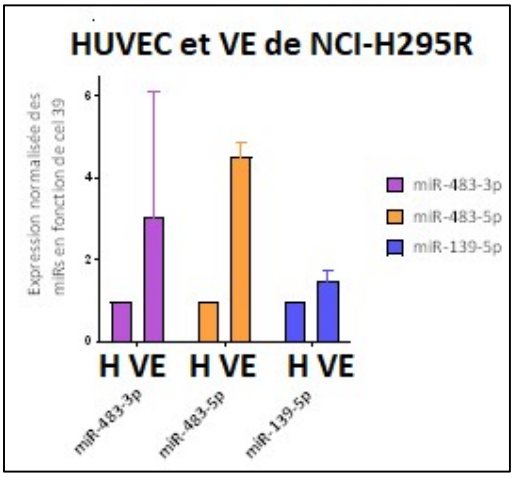


Figure 45 : Expression des miRs dans les HUVEC et les VE. L'expression des miRs a été déterminée par RT-qPCR à partir de 10ng d'ARN total. Les miR-483-3p et miR-483-5p sont respectivement 3 et 4,5 fois plus abondants dans les VE que dans les HUVEC; miR-139-5p est 1,8 fois plus abondant dans les VE comparés aux HUVEC (n=2). La barre horizontale indique la moyenne ± SD.

Ces résultats (Figure 45) montrent que les miRs provenant des VE de NCI-H295R contiennent davantage de miRs-483-5p, 483-3p et 139-5p que les cellules HUVEC pour une même quantité d'ARN total.

4.12.2 Dosage des miRs dans les HUVEC en présence de VE

Nous avons déterminé l'enrichissement en miR-139-5p, miR-483-3p et miR-483-5p dans les HUVEC après ajout de VE.

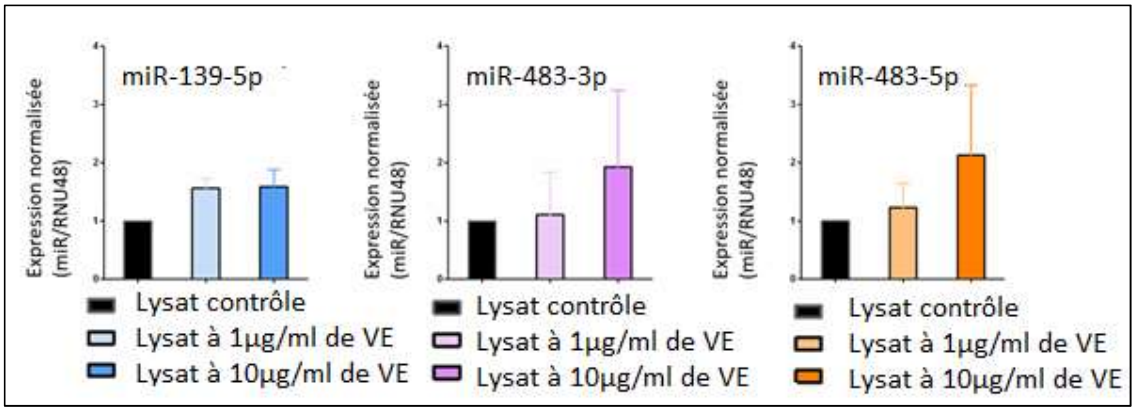


Figure 46 : Dosage de miRs après ajout de VE dans les HUVEC. Les barres représentent les moyennes ± SD avec n=2. Les lysats ont été recueillis 24h après l'ajout de VE.

La Figure 46 montre que les niveaux d'expression de miR-139-5p, miR-483-3p et miR-483-5p augmente, ce qui suggère que ces miRs sont internalisés par les cellules réceptrices. Nous avons vu précédement que miR-139-5p était un miR qui se trouvait en plus grande quantité dans les cellules NCI H295R comparées à leurs exosomes ; cela pourrait expliquer la différence de concentration de ce miR par rapport à miR-483-3p et miR-483-5p dans les HUVEC après ajout des exosomes.

4.13 Rôle de miR-483-5p et miR-139-5p dans les HUVEC

Afin de définir plus précisément le rôle de miR-483-5p et miR-139-5p dans les HUVEC en s'affranchissant de la complexité moléculaire des vésisules extracellulaires, nous avons transfecté directement ces cellules avec des miRs mimétiques (mimics) et observé leurs effets.

4.13.1 Recherche de gènes cibles des miRs dans les HUVEC.

Deux gènes cibles de miR-483-5p et miR-139-5p dans les cellules tumorales NCI H295R ont été identifiés par notre équipe : il s'agit des gènes codant pour les protéines NDRG2 et NDRG4[131]. Nous avons recherché si NDRG2 et NDRG4 sont également régulés par ces miRs dans les cellules endothéliales. Nos résultats préliminaires en Figure 47 semble indiquer que miR-483-5p et miR-139-5p diminuent l'expression de NDRG2 et NDRG4, respectivement. Ces résultats suggèrent un effet comparable des 2 miRs dans les cellules cancéreuses et les cellules endothéliales sur ces gènes. Cependant, il reste à déterminer si cet effet s'exerce sur la stabilité des ARNm ou sur la traduction des ARNm en protéines.

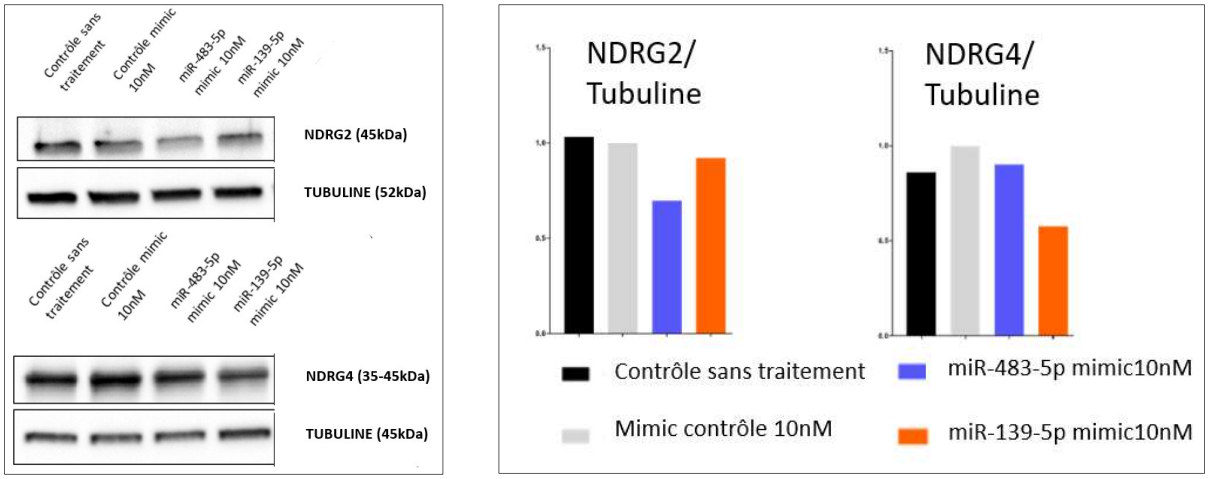


Figure 47 : Effet de miR-483-5p et miR-139-5p sur l'expression de leurs gènes cibles NDRG2 et NDRG4 dans les HUVEC. Les protéines ont été analysées par western blot après transfection des HUVEC avec 10nM de miR-139-5p ou 10nM de miR-483-5p. La tubuline est utilisée comme témoin de charge (n=1). Les graphes de droite sont une quantification des westerns présentés à gauche.

4.13.2 Effets de miR-483-5p et de miR-139-5p exogènes (10 nM) sur la migration et la tubulogenèse.

Dans les analyses précédentes, nous avons observé que l'internalisation des exosomes dans les HUVEC induit une augmentation modeste de miR-483-5p et de miR-139-5p intracellulaires (1.5 à 2 fois).

Afin de mimer cette augmentation, nous avons transfecté les HUVEC par différentes doses de miRs mimics exogènes. La dose de 10nM de miRs mimics est celle utilisée classiquement pour les cellules tumorales dans la littérature. Elle a été utilisée pour les premières expérimentations dans les HUVEC. Sachant que les expériences de migration et de tubulogenèse sont arrêtées 6 jours post-tansfection (voir Matériel et Méthodes), nous avons déterminé le niveau intracellulaire des miRs exogènes pendant cette période de temps.

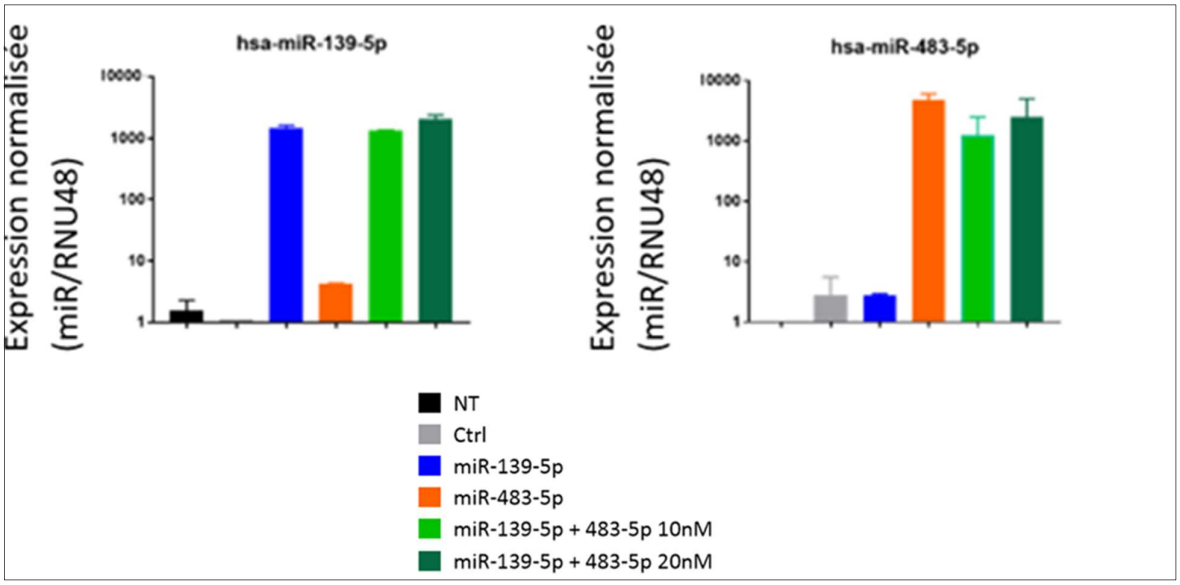


Figure 48 : Dosage de miRs après 6 jours de transfection des HUVEC. Les graphes représentent l'expression de miR-139-5p (gauche) et miR-483-5p (droite) dans différentes conditions de transfection (légende en couleur. NT=Non Traité, Ctrl = mimic Contrôle 10nM, miR-139-5p=miR-139-5p 10nM, miR-483-5p=miR-483-5p 10nM, mix miR-483-5p+miR-139-5p 10nM = miR-139-5p 5nM + miR-483-5p 5nM, miR-139-5p+483-5p 20nM=mix miR-483-5p 10 nM + miR-139-5p 10nM Les miR-139-5p et miR-483-5p sont surexprimés d'un facteur 1000 par rapport à leur expression basale après transfection de 10nM de mimics. Les barres horizontales indiquent les moyennes ± SD (n=2).

Après 6 jours de transfection de 10 nM de miRs mimics, nous avons observé une augmentation de 1000 fois du niveau de miR-139-5p et de plus de 5000 fois de miR-483-5p (Figure 48), ce qui est très largement supérieur aux niveaux de miRs détectés dans les HUVEC après internalisation des exosomes. Nous avons néanmoins testé cette concentration en miRs sur la migration et la tubulogenèse des HUVEC.

4.13.2.1 Migration des HUVEC transfectées par 10 nM de miRs mimics

La Figure 49 montre que, de façon inattendue, miR-483-5p transfecté à 10 nM prévient la fermeture de la blessure d'une monocouche d'HUVEC et donc inhibe leur migration.

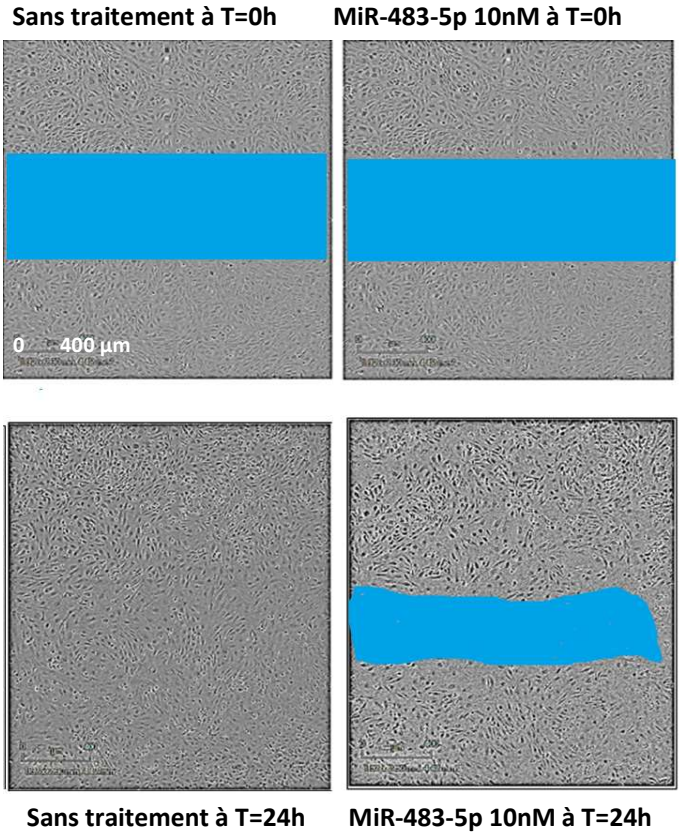


Figure 49 : Test de blessure après transfection des HUVEC par des miRs mimics contrôle ou miR-483-5p. Le test montre que la blessure se referme plus vite pour l'échantillon sans traitement que pour l'échantillon mi-483-5p à 10nM après 24h d'incubation. La zone en bleue permet de visualiser l'aire de la blessure.

La quantification de plusieurs expériences a révélé que la migration des HUVEC est principalement inhibée après la transfection de miR-483-5p à 10nM et celle du mélange (mix) de miR-483-5p et miR-139-5p 10nM (Figure 50).

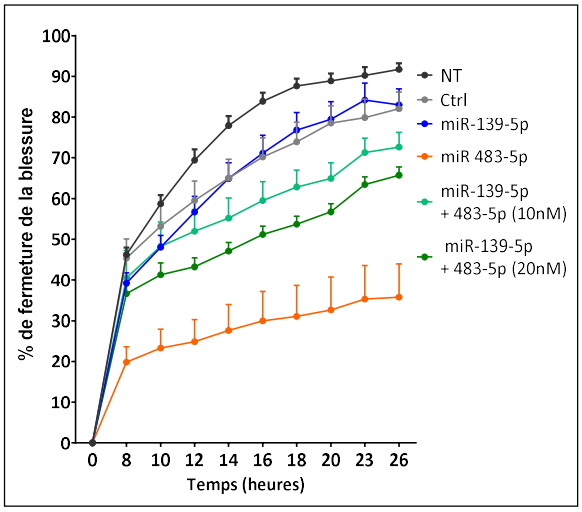


Figure 50 : Effets de miR-483-5p et de miR-139-5p transfectés à une concentration de 10 nM sur la migration des HUVEC. NT=Non Traité, Ctrl = mimic Contrôle 10nM, miR-139-5p=miR-139-5p 10nM, miR-483-5p=miR-483-5p 10nM, mix miR-483-5p/miR-139-5p (10nM) =miR-139-5p 5nM + miR-483-5p 5nM, miR-139-5p+483-5p (20nM) =mix miR-483-5p 10 nM + miR-139-5p 10nM. Ici, 15 échantillons ont été analysés dans deux expériences indépendantes. Les résultats sont comparés pour un même temps. La normalité est vérifiée avec le test Shapiro-Wilk. Un test "two-Way ANOVA" significatif suivi d'un test de comparaison multiple de Tukey a été effectué. Des différences statistiques significatives ont été obtenues pour les groupes suivants : à 8h, Ctrl vs mix miR-483-5p 10nM (***p<0.001) ; de 10h à 26h en tous points: (Ctrl) vs mix miR-483-5p 10nM (****p<0.0001); à 12h, miR-139-5p 10nM vs mix miR-483-5p et miR-139-5p 10nM-10nM (*p<0.05); à 14h et 16h, miR-139-5p 10nM vs mix miR-483-5p et miR-139-5p 10nM-10nM (**p<0.01); à 18h et 20h, miR-139-5p 10nM vs mix miR-483-5p et miR-139-5p 10nM-10nM (**p<0.01) ; à 23h et 26h, miR-139-5p mimic 10nM vs mix miR-483-5p et miR-139-5p 10nM-10nM (*p<0.005). Les valeurs représentent la moyenne ± SEM.

4.13.2.2 Viabilité cellulaire des HUVEC transfectées par les miRs mimics à 10nM

L'inhibition de la migration des HUVEC par miR-483-5p pourrait être liée à une altération de leur viabilité. Nous avons réalisé un test au PrestoBlue afin de mesurer l'activité des mitochondries (conversion de la résazurine en résofurine et émission de fluorescence). L'activité des mitochondries est le reflet de la viabilité cellulaire. La transfection de miR-483-5p à 10nM diminue significativement la viabilité des HUVEC (Figure 51).

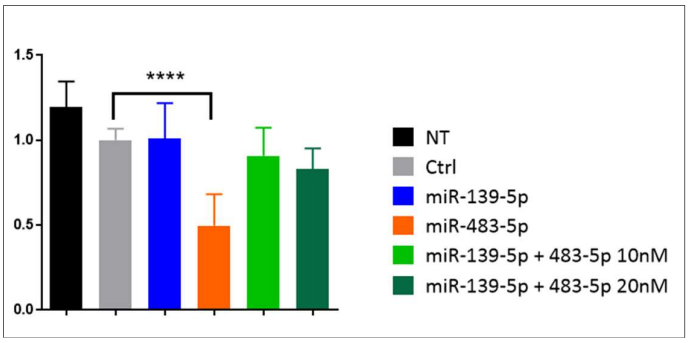


Figure 51 : **Test de viabilité après transfection de miRs mimics à 10nM.** Les abréviations sont identiques à celles décrites dans la Figure 48. Ces résultats ont été obtenus par analyse de 15 échantillons différents dans deux expérimentations indépendantes. Après un test de normalité, un ANOVA significatif et un test de comparaison multiple de Tukey, les différences sont significatives pour le groupe Contrôle (Ctrl) vs le groupe miR-483-5p mimic 10nM (****p<0.0001).

4.13.2.3 Test de tubulogenèse

Les images de la Figure 50 montrent que l'organisation des HUVEC en présence de miR-139-5p et de miR-483-5p à 10nM est clairement différente. MiR-139-5p à 10nM inhibe la formation de tubes tandis que miR-483-5p entraîne une désorganisation du réseau. La quantification des paramètres de tubulogenèse (impossible pour miR-139-5p) montre que le processus de tubulogenèse est inhibé par miR-483-5p à forte dose (Figure 52 et 53).

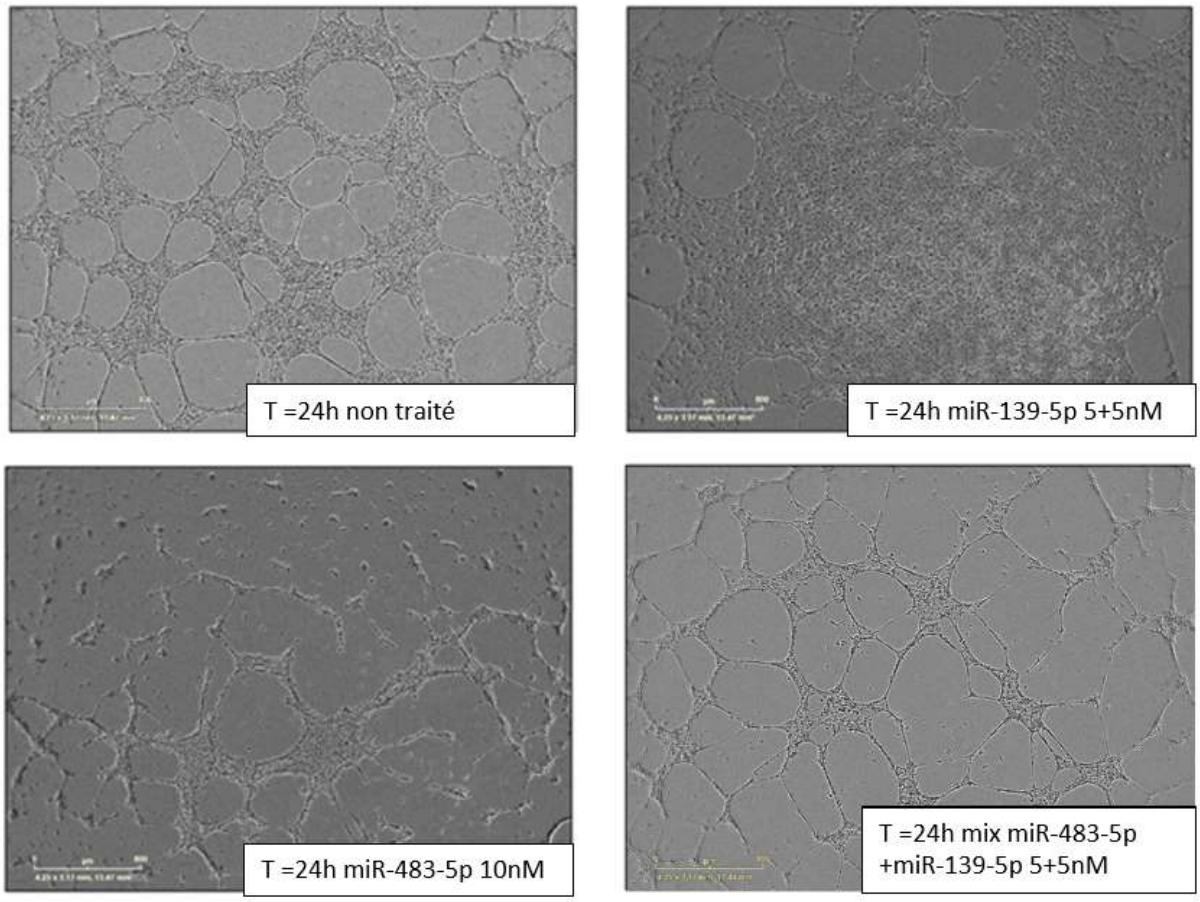


Figure 52 : Tubulogenèse des HUVEC après transfection des miRs à 10 nM. La tubulogenèse est inhibée de façon différente pour miR-139-5p et miR-483-5p.

La juxtaposition de l'image avec la macro permet de voir que la macro miR-139-5p est fausse et n'est pas interprétable (Figure 53).

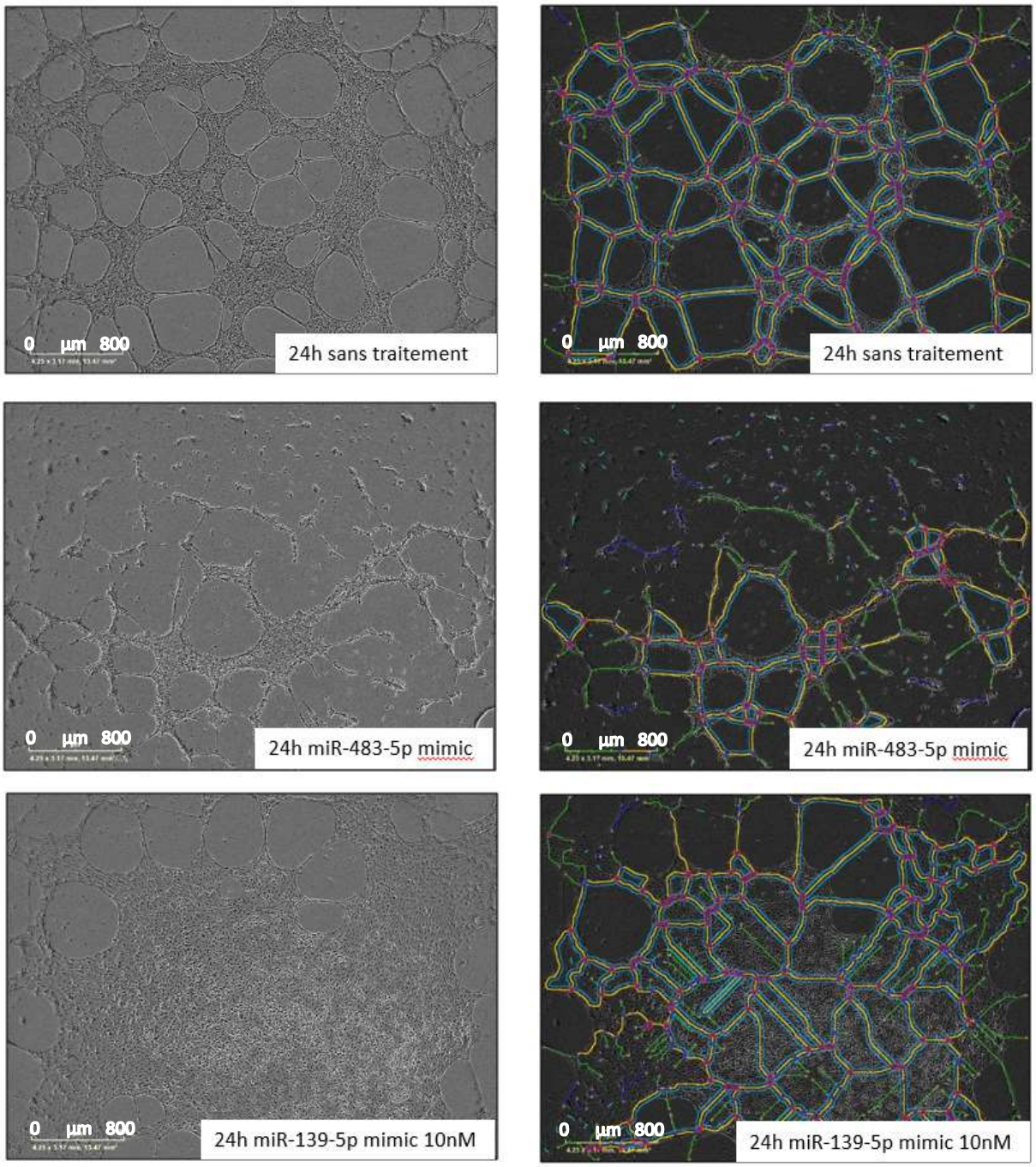


Figure 53 : Utilisation de la macro pour quantifier la tubulogenèse des HUVEC après transfection des miRs à 10 nM . La macro ne permet pas d'évaluer la tubulogenèse pour miR-139-5p. La représentation graphique ci-dessous exclue cette condition. Chaque image montrée ici est représentative des trois images acquises pour chaque condition.

Nous avons effectué la quantification des paramètres de la tubulogenèse avec la macro angiogenesis (Figure 54)

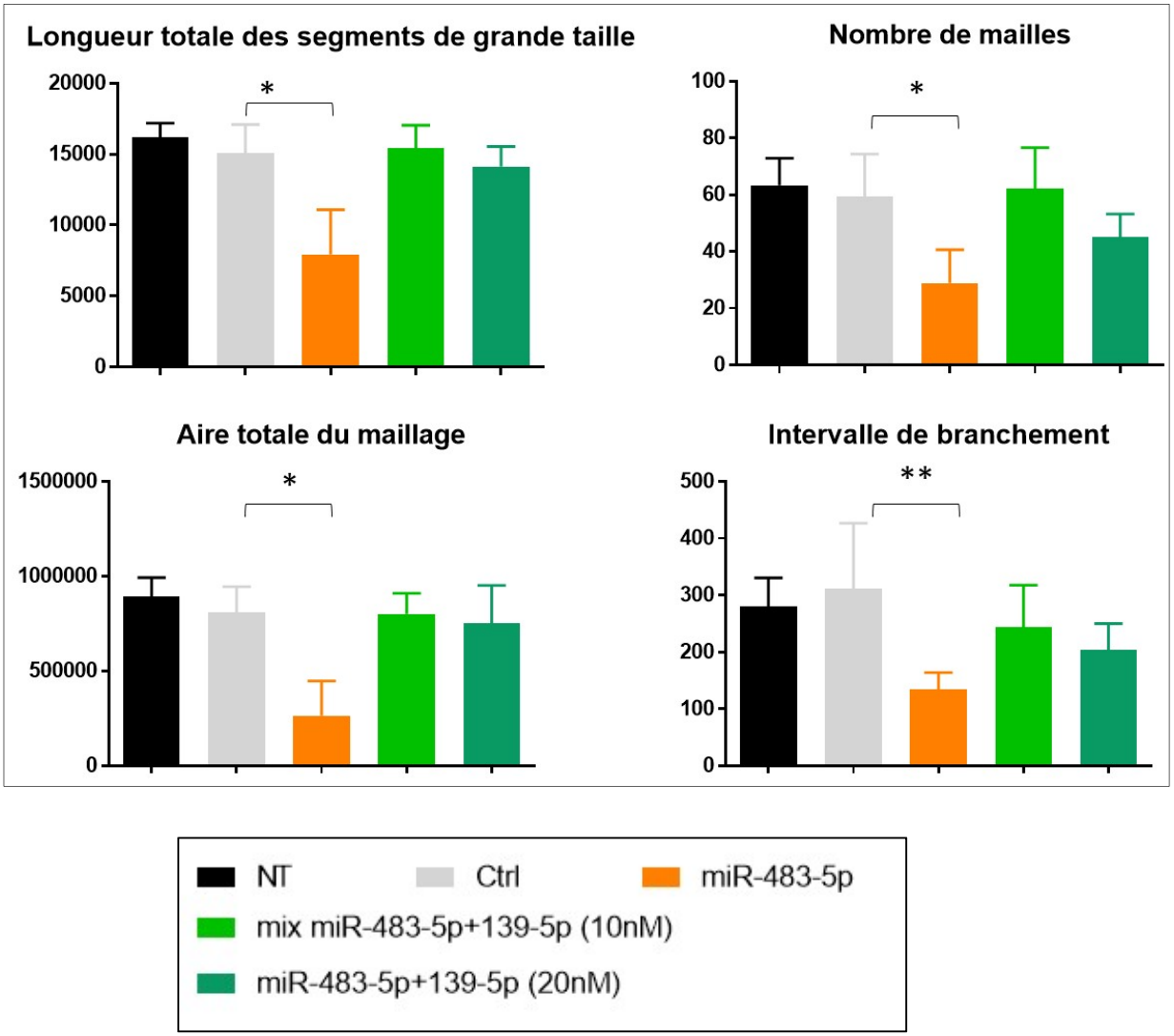


Figure 54 : Quantification de la tubulogénèse après transfection des miRs à 10 nM dans les HUVEC. On observe que tous les paramètres de tubulogenèse sont inhibés pour la condition miR-483-5p à 10nM. miR-139-5p ne permettant pas la formation des tubes à 10nM, il a été exclu de l'analyse. L'intervalle de branchement=longueur totale des segments/nombre d'éléments délimités par une jonction et une extrémité. NT=Non Traité, Ctrl = mimic Contrôle 10nM, miR-139-5p 10nM= miR-139-5p ; miR-483-5p 10nM=miR-483-5p, mix miR-483-5p-139-5p (5nM+5nM) = miR-139-5p+483-5p (10nM), mix miR-483-5p-139-5p (10nM+10nM) = miR-139-5p+483-5p (20nM). Ces analyses proviennent de six échantillons différents issus de deux expériences indépendantes. Après un test de Kruskal-wallis significatif suivi d'une comparaison multiple de Dunn's, les différences sont significatives pour les groupes Ctrl vs miR-483-5p pour la longueur totale des segments de grande taille, le nombre de mailles, l'aire totale du maillage (*$p<0.05$) et pour l'intervalle de branchement (**$p<0.01$).

L'ensemble de ces résultats montrent que l'apport de doses massives de miRs exogènes induit un phénotype des cellules endothéliales à l'opposé de celui que nous avons observé avec les VE (inhibition versus promotion de la migration et de la tubulogenèse). Il était donc nécessaire de diminuer la quantité de miRs apportée aux cellules en transfectant des doses de miRs inférieures à 10nM.

4.13.3 Effets de faibles doses de miR-483-5p et de miR-139-5p exogènes sur la migration et la tubulogenèse.

D'après la Figure 46, le dosage des miRs après internalisation des exosomes dans les HUVEC montre que la concentration en miR-483-5p et miR-139-5p intracellulaire est en moyenne multipliée par 1.5 ou 2 dans les HUVEC. La quantité de ces miRs après transfection de 10nM est plus de 1000 fois celle des échantillons contrôles après 6 jours de transfection, ce qui représente des concentrations "supraphysiologiques". Nous avons donc cherché à déterminer une dose de miRs transfectés qui serait plus proche de l'apport obtenu avec l'addition de VE.

Nous avons effectué des transfections de miR-139-5p et de miR-483-5p à des concentrations allant de 0.01 à 1nM. La dose de 1nM a été abandonnée car elle a montré une concentration encore 32 fois et 600 fois supérieure à la valeur du miR mimic contrôle 1nm pour miR-139-5p et miR-483-5p, respectivement (non montré). Les analyses suivantes ont été réalisées à 0,1nM et 0,01nM après 5, 6 ou 7 jours de transfection.

4.13.3.1 Efficacité de la transfection avec des doses de 0.01nM et 0.1nM de miRs mimics

Les concentrations en miRs intracellulaires après transfection des mimics à 0.1nM restent élevées mais à 0,01 nM, elles commencent à se rapprocher des valeurs qu'on pourrait obtenir avec l'ajout de VE (Figure 55).

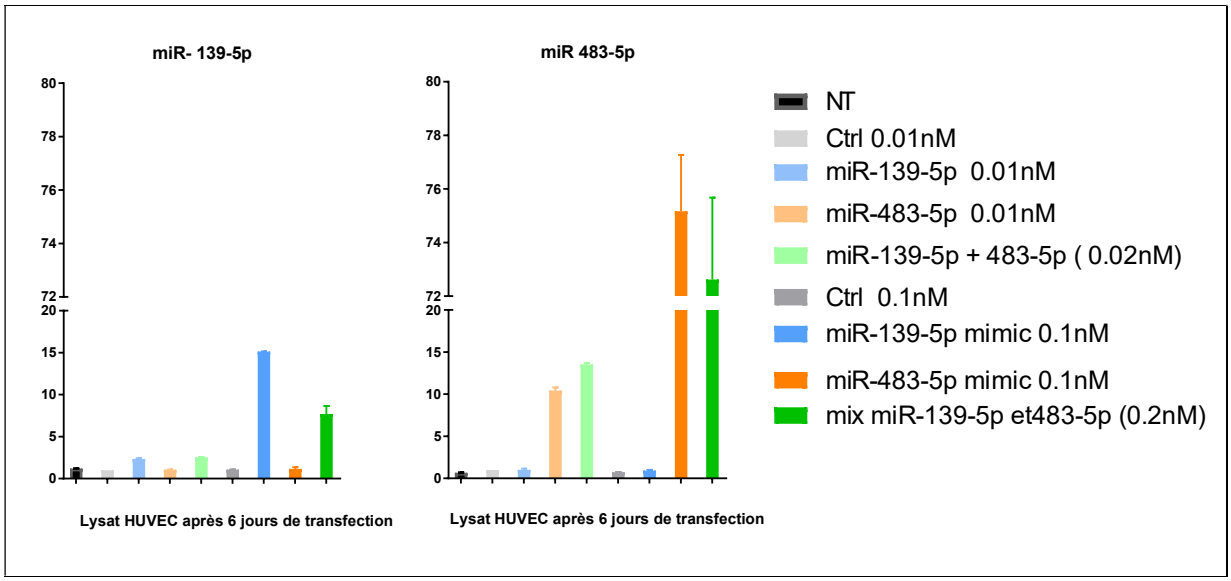


Figure 55 : Expression de miR-139-5p et de miR-483-5p à 0.01nM et 0.1nM à 6 jours post-transfection: 6 jours après la transfection des miRs mimics à 0.01nM, les concentrations en miR-139-5p et miR-483-5p sont supérieures, respectivement, d'environ 3 et 15 fois aux valeurs contrôles. Pour miR-139-5p et miR-483-5p à 0.1nM, elles sont supérieures respectivement d'environ 15 et 80 fois aux valeurs contrôles.

4.13.3.2 Test de viabilité cellulaire au PrestoBlue

Le test de viabilité a été effectué afin de déterminer si elle est affectée par des transfection de miRs en plus faibles doses que précédemment.

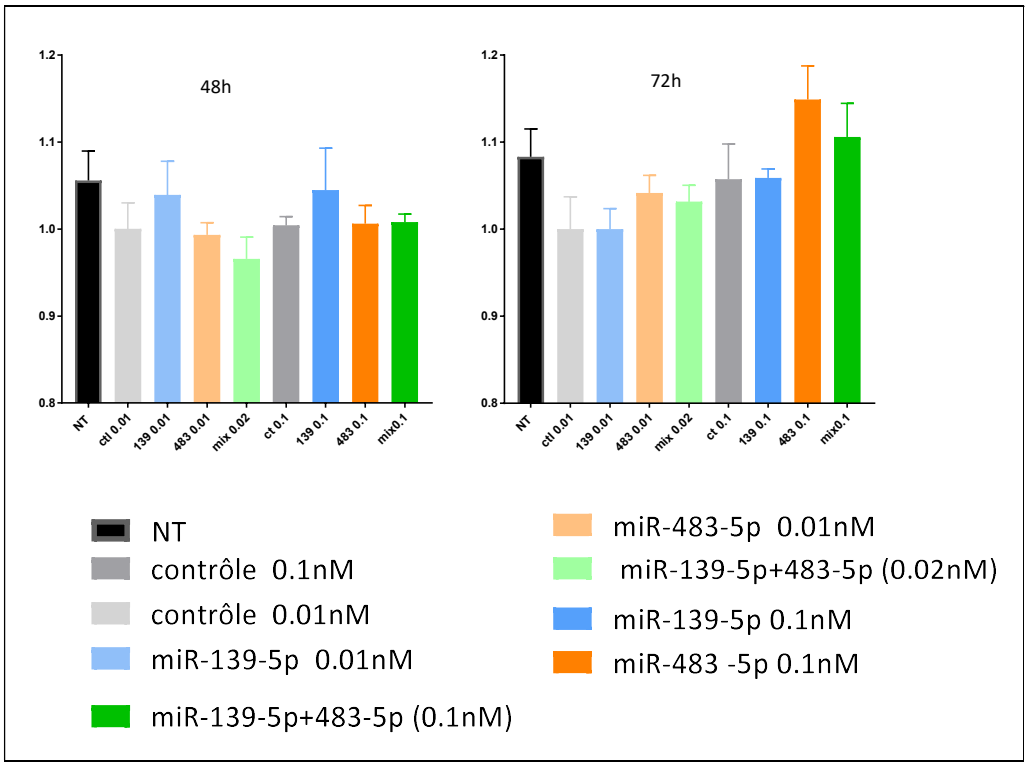


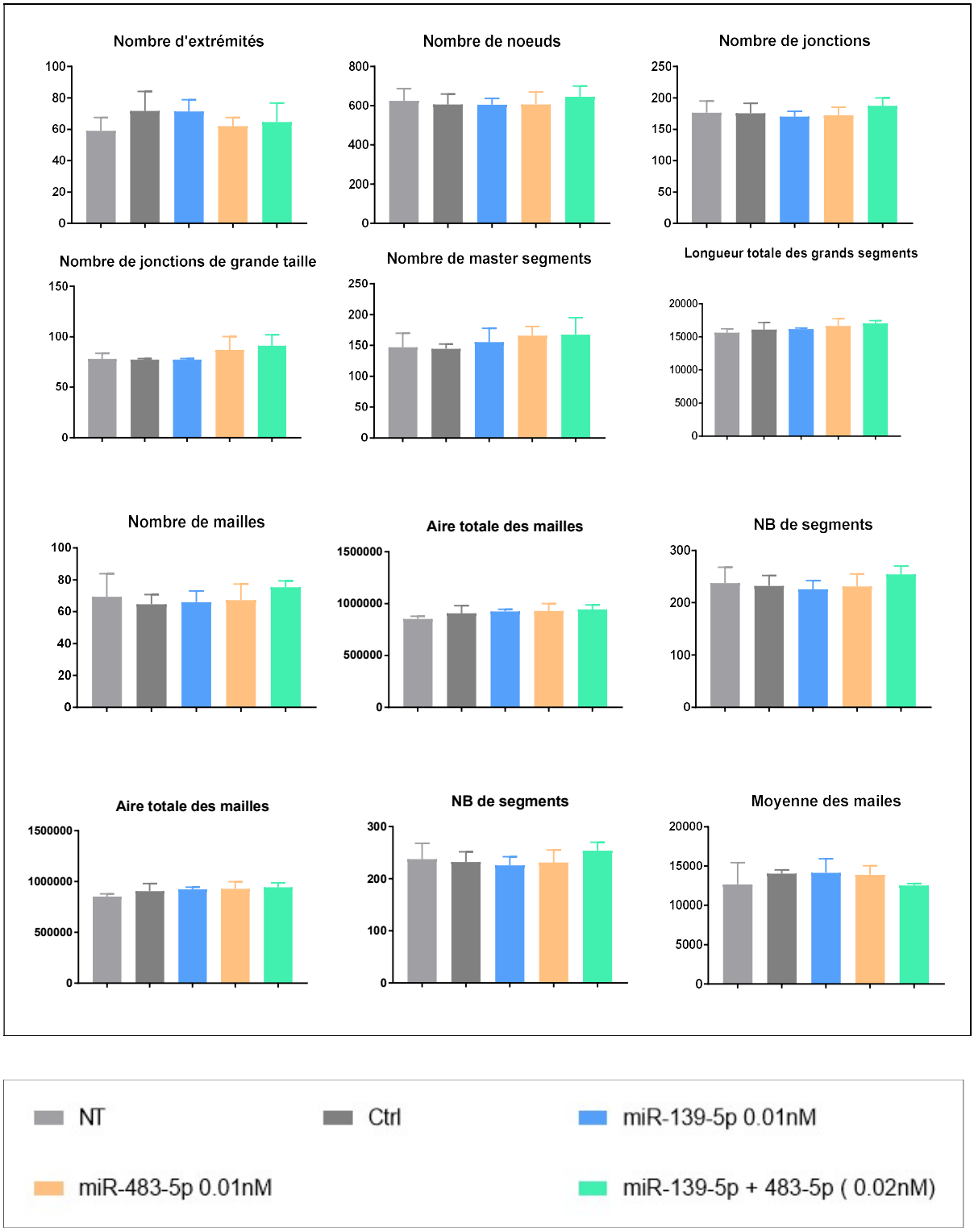
Figure 56 : Test de viabilité cellulaire après transfection de miR-139-5p et miR-483-5p à 0.01nM et 0.1 nM. Un test de viabilité cellulaire au PrestoBlue est effectué à 48 et 72h. Les barres représentent des moyennes ± SEM (n=5). Le test de Kruskal Wallis suivi d'une comparaison multiple ne donne pas de différences significatives entre les échantillons et le miR mimic contrôle de la même concentration à 48 et 72H.

Les concentrations en miRs transfectés à 0.01nM et 0.1nM n'affectent pas la viabilité des HUVEC (Figure 56).

4.13.3.3 Tubulogenèse 0.01nM et 0.1nM

Les résultats ci-dessus nous ont amenés à tester la concentration en miRs mimics de 0.01nM et 0.1 nM sur la tubulogenèse des HUVEC (Figure 57).

- <u>Tubulogenèse 0.01nM</u>



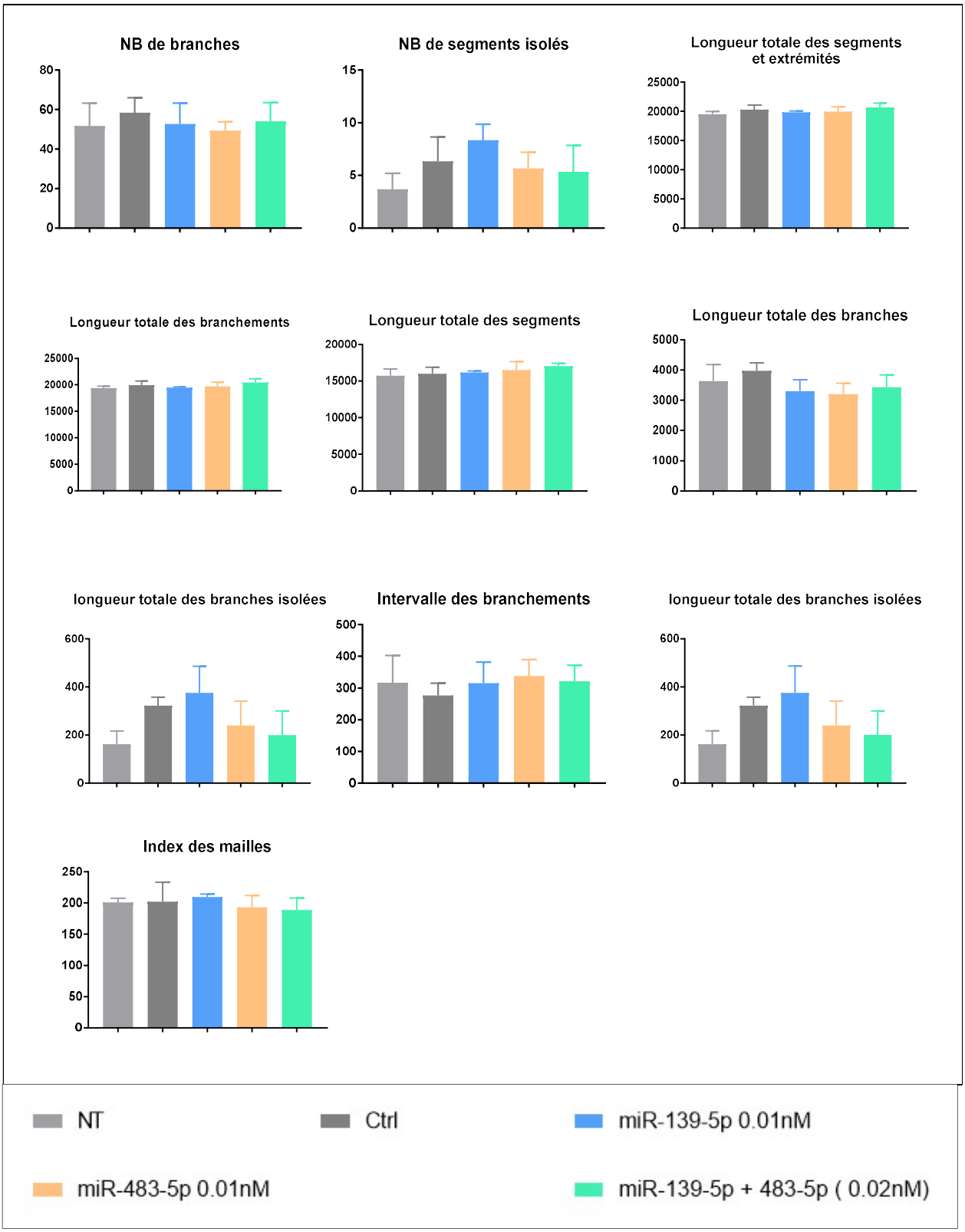


Figure 57 : Tubulogénèse des HUVEC après transfection des miRs mimics à 0.01nM. Un test de Kruskall Wallis a été effectué pour chaque paramètre. Les barres représentent des moyennes ± SEM (n=3). Aucune différence statistiquement significative n'est observée à 0.01nM pour les différentes conditions. NB =nombre.

A des concentrations faibles de miR-139-5p et miR-483-5p transfectés (0.01nM de miRs mimics), compatible avec ce que les exosomes peuvent apporter en miRs aux HUVEC, la tubulogenèse n'est pas affectée par rapport à celle observée dans les contrôles (Figure 57).

- Tubulogenèse à 0.1nM de miRs.

A 0.1nM, la tubulogenèse des HUVEC est encore une fois inhibée (non quantifiable par la macro pour les conditions miR-483-5p et mix-miR-483-5p/miR-139-5p. Les concentrations en miRs apportées sont encore très élevées (plus de 60 fois les valeurs initiales) et dépassent largement celles apportées par l'ajout d'exosomes aux cellules.

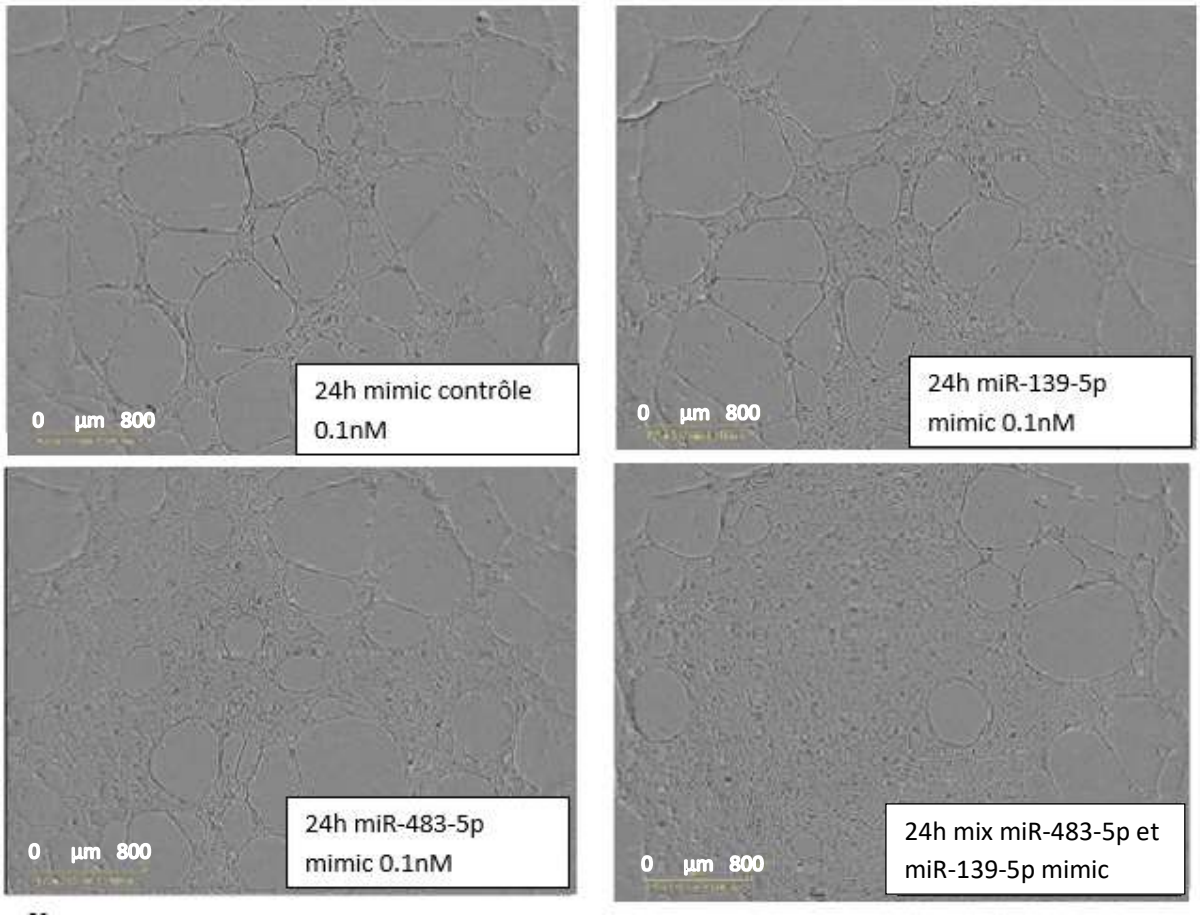


Figure 58 : Tubulogenèse des HUVEC transfectées par 0.1nM de miRs mimics. La tubulogenèse avec des concentrations en miRs mimics de 0.1nM est inhibée par rapport au contrôle pour les trois conditions : miR-139-5p, miR-483-5p, mix de miR-483-5p et miR-139-5p.

4.13.3.4 Migration des HUVEC transfectées par 0.01nM et 0.1nM de miRs mimics

Le test de la blessure a été réalisé dans les mêmes conditions que précédement avec des concentrations différentes en miRs mimics (Figure 59).

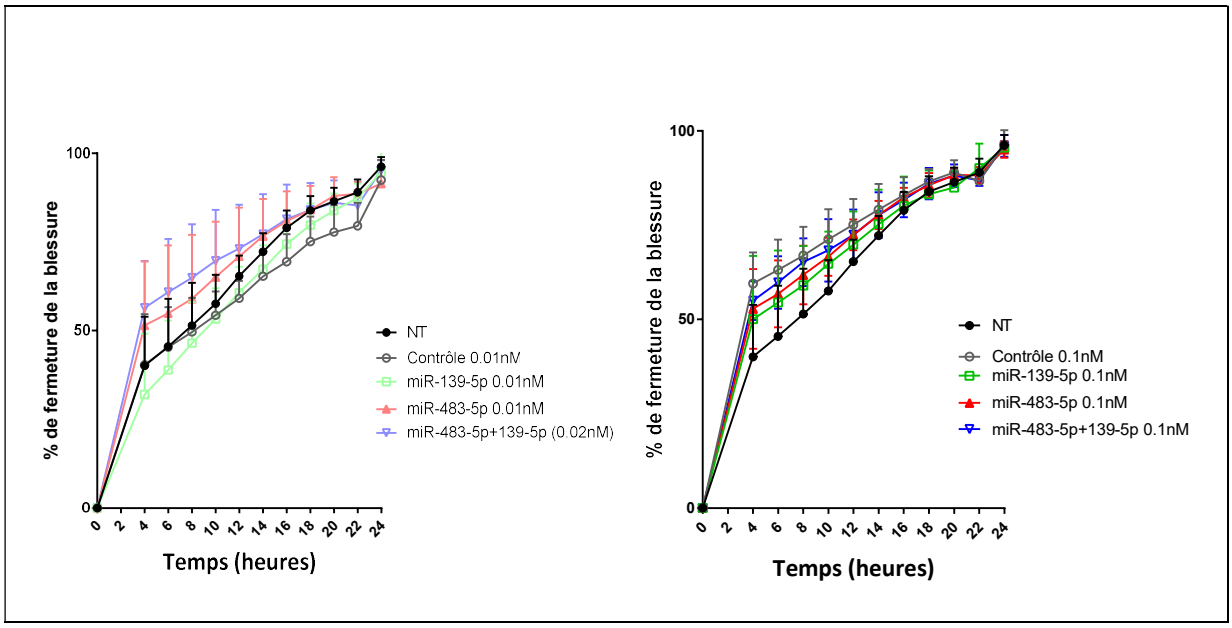


Figure 59 : Migration des HUVEC transfectées par 0.01nM et 0.1nM de miRs mimics. Les résutats représentent des moyennes ± SEM. Pour comparer chaque condition (contrôle mimic 0.01nM versus miR-139-5p, miR-483-5p, miR-483-5p+miR-139-5p à 0.01nm, et contrôle mimic 0.1nM versus miR-139-5p, miR-483-5p, miR-483-5p+miR-139-5p à 0.1nm, des tests t multiples t ont été effectués. Il n'y a pas de différence significative observée pour les différentes conditions.

Dans des concentrations proches en miRs de celles qui sont apportées par les exosomes, la migration cellulaire n'est pas inhibée par les miR-483-5p, miR-139-5p et le mix des deux miRs.

L'ensemble de ces résultats suggère la complexité de mimer l'activité des miRs véhiculés par les exosomes dans les cellules HUVEC par des approches de transfection. Il est donc important de mettre en place la production d'exosomes déplétés en miR-139-5p et miR-483-5p pour clarifier leur rôle dans les HUVEC. Par ailleurs, les effets pro-angiogéniques des exosomes peuvent aussi être associés à l'action d'autres molécules (protéines, ARN longs non-codants, etc).

4.13.3.5 Mise en place de la co-culture de NCI h295R et des HUVEC en 3D (sphéroïdes).

Afin de mimer au plus près les interactions entre cellules NCI H295R et les HUVEC qui seront utilisées dans les expériences ultérieures, nous avons décidé de mettre en place des co-cultures en 3 dimensions (3D) ou sphéroïdes selon le protocole décrit dans Matériel et Méthodes. La génération de sphéroïdes NCI-H295R/HUVEC nécessitant une durée plus longue que les cultures 2D, nous avons marqué les 2 types cellulaires de façon stable par transduction des cellules avec des lentivirus exprimant un fluorophore : GFP pur les NCI H295R et RFP (Red Fluorescent protein) pour les HUVEC.

Les cellules HUVEC ont été transduites avec un lentivirus exprimant le gène FLT1-RFP et le gène de résistance à la néomycine. Des expériences de dose-réponse ont permis de définir que la concentration de néomycine nécessaire à la sélection des cellules transduites est de 500µg/ml. Les cellules NCI-H295R ont été transduites avec un lentivirus exprimant la GFP et un gène de résistance à la puromycine. Le choix de la dose de puromycine pour la sélection des cellules NCI-H295R a été réalisé de la même façon que pour la néomycine par une doctorante de l'équipe. La dose optimale de puromycine pour les NCI-H295R est de 5µg/ml.

La visualisation des sphéroïdes a été effectuée images à l'aide du système Incucyte Zoom (Figure 60).

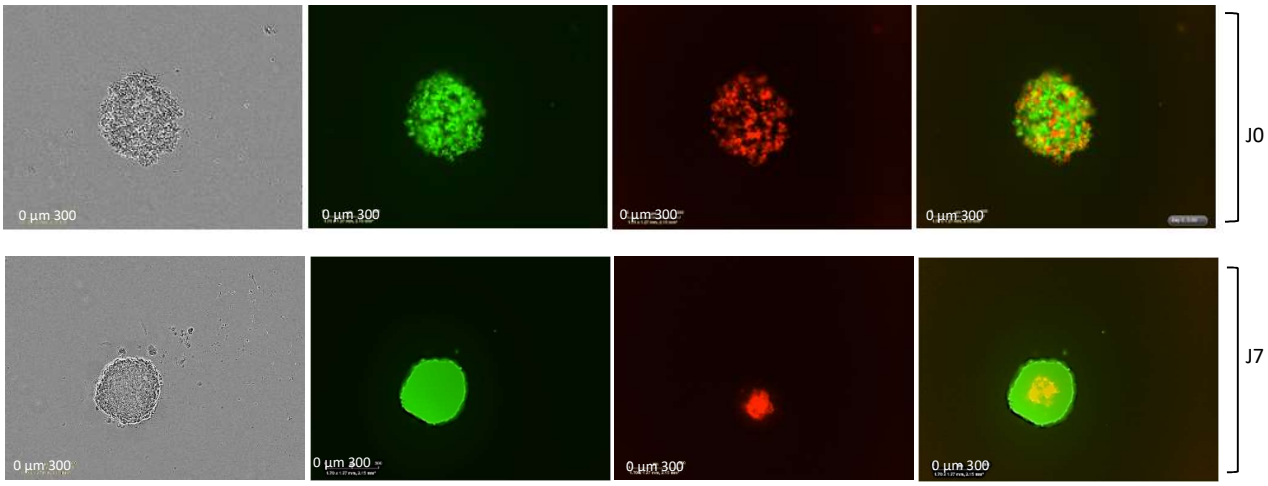


Figure 60 : Images de sphéroïdes HUVEC/NCI-H295R le jour de leur formation (J0) et à J7. Les cellules NCI-H295R fluorescent en vert et les HUVEC en rouge. Chaque sphéroïde est ensemencé à partir de 2000 cellules NCI-H295R et 1000 cellules HUVEC. Le sphéroïde se forme après centrifgation. Celui-ci est plus compact à J7 et les HUVEC sont concentrées en son centre. Les images ont été réalisées avec le système Incucyte zoom. Echelle : 300 µm.

Après fixation et coloration des cellules avec le fluorophore Hoechst pour le noyau, les sphéroïdes ont été aussi analysés au microscope Airyscan LSM880 Fast (Figure 61).

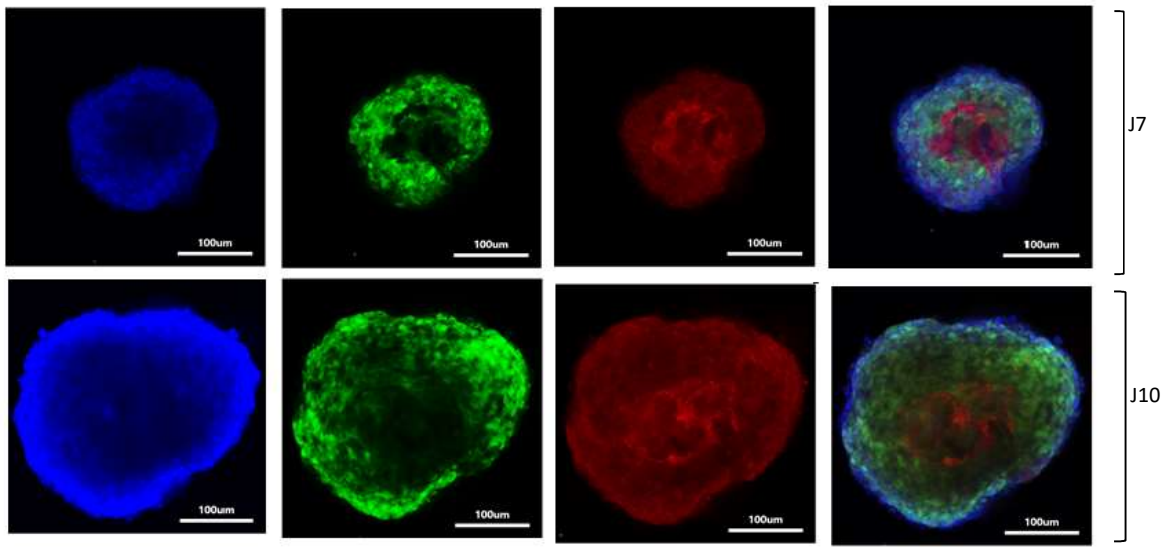


Figure 61 : Image de sphéroïdes HUVEC/NCI-H295R**,** 7 et 10 jours après leur formation, réalisée avec l'Airyscan LSM880 Fast. Chaque sphéroïde est ensemencé à partir de 2000 cellules NCI-H295R et 1000 cellules HUVEC.

Les images obtenues à l'Airyscan (Figure 61) montrent que les sphéroïdes au départ constitués d'un mélange homogène des deux types cellulaires, s'organisent. Après 7 et 10 jours, les HUVEC sont réparties de manière plus dense à l'intérieur du sphéroïde. La taille du sphéroïde augmente de 200µm à 340µm de J7 à J10, ce qui suggère que les cellules prolifèrent. Nous n'avons, cependant pas observé de formation d'un pseudo-réseau vasculaire.

5 DISCUSSION

L'objectif de ce travail était d'explorer la communication potentielle entre les cellules du carcinome corticosurrénalien et les cellules endothéliales via les exosomes et des miRs exosomaux puis d'étudier l'impact de ces microvésicules sur les cellules endothéliales in vitro.

Les modèles utilisés sont les cellules NCI-H295R de carcinome corticosurrénalien et les cellules endothéliales HUVEC. Dans un premier temps, j'ai standardisé la méthode permettant la récolte des exosomes. L'isolation des exosomes à partir de cellules NCI-H295R a été effectuée par la méthode de centrifugation différentielle, suivie d'une filtration à 0.2µm, les deux dernières étapes sont des ultracentrifugations. Nous avons utilisé le terme de vésicules extracellulaires (qui comprend les exosomes et les microvésicules), même si la centrifugation à 10000g et la filtration à 0.2µm permet d'éliminer une grande partie des microvésicules. Les microvésicules se différencient des exosomes de part leur origine : les exosomes sont issus d'un processus endosomial (par invagination du cytoplasme), alors que les microvésicules sont formées par bourgeonnement, notre méthode d'ultracentrifugation utilisée ne permet pas de certifier que la préparation est déplétée en microvésicules, mais elle est cependant enrichie en exosomes. Par extension, le résultat de l'extraction de ces préparations provenant de cette méthode de centrifugation différentielle suivie par deux ultracentrifugations est appelé « exosomes ».

Afin de pouvoir effectuer des tests fonctionnels sur les cellules, tous les stades de la récolte ont été réalisés en milieu stérile. L'étape limitante est la quantité substancielle de milieu de culture des cellules NCI H295R nécessaire. Cette quantité importante de milieu (plusieurs centaines de ml), ne pouvait pas être envisagée lorsque les cellules devaient être traitées par transfection d'antagomiRs ou de miRs mimics (coûts très élevés). Pour cette raison, j'ai testé deux kits d'extraction d'exosomes commerciaux. Cependant, les deux kits testés n'ont pas permis d'obtenir des préparations homogènes. De plus, les marqueurs spécifiques des exosomes n'ont pas pu être détectés dans les préparations, ce qui les disqualifie pour leur utilisation dans les expériences sur les HUVEC. Les exosomes isolés n'ont pas été assez abondants pour pouvoir détecter les protéines caractéristiques des exosomes par Western Blot. Il est à noter que des cellules NCI H295R déplétées de façon inductible en miR-483-5p et miR-139-5p par une approche de transduction lentivirale sont en cours de génération. Ces cellules nous permettrons de nous affranchir des limites de la transfection de miRs synthétiques.

Les exosomes isolés par ultracentrifugation ont permis de mettre en évidence l'effet promoteur des exosomes sur l'angiogenèse : la migration et la tubulogenèse des cellules endothéliales est augmentée lorsqu'on ajoute des exosomes produits par les cellules tumorales aux HUVEC en culture.

Nous avons isolé puis comparé le miRnome et le protéome des exosomes et des extraits cellulaires de NCI-H295R. L'analyse approffondie de ces données par les bioinformaticiens de l'équipe est toujours en cours.

La présence de protéines enrichies dans les préparations d'exosomes par rapport aux cellules parentales a été mise en évidence par une étude de spectrométrie de masse. L'enrichissement significatif en protéines dans les exosomes par rapport aux cellules parentales a été observé pour 18 protéines dont le rôle dans la tumorigenèse est décrit ci-dessous.

- Protéines favorisant l'angiogenèse :

La protéine **lactadhérine** qui est exprimée à la surface des exosomes[135], est concentrée plus de 1400 fois dans les exosomes par rapport aux cellules NCI-H295R. Celle-ci peut être à l'origine de la phosphorylation d'AKT que nous avons observée en présence d'exosomes. En effet, même en absence de VEGF, la lactadhérine, en interagissant directement avec l'intégrine αvβ3 et l'intégrine αvβ5, peut activer la voie de signalisation du VEGF en phosphorylant AKT. L'inhibition par un anticorps spécifique de l'intégrine αvβ3 ou αvβ5 en présence de lactadhérine diminue la phosphorylation d'AKT[136]. Les données protéomiques n'ont pas mis en évidence la présence de VEGF dans les exosomes bien que ce facteur de croissance soit plus exprimé dans le carcinome corticosurrénalien que dans les glandes surrénales normales. Le VEGF est également détecté dans le milieu de culture conditionné des NCI-H295R (données non montrées).

- Protéines impliquées dans le processus métastatique et/ou la prolifération cellulaire

L'**hémopexine** se concentre plus de 80 fois dans les exosomes par rapport aux cellules. C'est une proteine plasmatique qui se lie à l'hème dans le sang[137]. D'autre part, la plupart des matrix métalloprotéases MMP (sauf la MMP7 et la MMP26) ont une structure multi-domaines comprenant le peptide de signal, le domaine pro-peptide zymogène, un domaine catalytique, une région de charnière variable et un domaine d'hémopexine. Ces MMP peuvent dégrader la matrice extracellulaire des parois des vaisseaux[138]. Une surexpression de ce domaine d'hémopexine au niveau des MMP3 de cellules métastatiques LUM1 (cellules murine de carcinome de poumonen) entraîne une augmentation de la prolifération et de la migration de ces cellules[139].

La protéine Heparan Sulfate proteoglycan core protein (HSPG2) aussi appelée perlécan est 500x fois plus concentrée dans les exosomes que dans les cellules NCI-H295R. Les HSPGs sont des constituants de la matrice extracellulaire. Les capacités invasives des cellules cancéreuses ainsi que l'angiogenèse peuvent être augmentés en présence de cette protéine[140]. Un niveau élevé de cette protéine dans le cancer de la prostate serait un indicateur du stade tumoral et des capacités métastatiques et invasives. De plus, des échantillons de moelle osseuse de patients atteints de leucémie myéloïde aïgue présentent un taux de perlécan plus élevé que des sujets sains ($p<0.001$)[141]. L'action métastatique des HSPG2 est liée aux chaînes d'héparane sulfate qui interagissent avec des molécules impliquées dans le processus métastatique[142].

La galectin-3-binding-protéin (Gal-3BP) est également une protéine enrichie dans les exosomes (100x plus que dans les cellules). Dans des expériences utilisant des cellules cancéreuses du sein MDA-MB-231 et des cellules normales mammaires MCF10A, l'ajout de Gal-3BP induit plus d'agrégation entre les cellules cancéreuses que les cellules normales du sein. La Gal-3BP se lie à la

Galectine -1 dans ces cellules et cette agrégation permet aux cellules cancéreuses de mieux survivre dans le flux sanguin pendant le processus de métastastatique[143].

Les laminines, des glycoprotéines composées de sous-unités α, β, et γ, sont enrichies dans les exosomes (plus de 75x pour la sous-unité alpha2 et la sous-unité gamma-1 et plus de 28 fois pour la sous-unité β1). La laminine 2 est composée de sous-unités α1, β2 et γ1[144]. Il existe 16 différentes laminines. Ces protéines de la membrane basale ont été impliquées dans l'invasion et les métastases. Elles ont un rôle dans l'adhérence cellulaire et dans le système immunitaire[145].

La **Latent-transforming growth factor beta-binding protein 1(LTBP1)** est un composant important de la matrice extracellulaire [146] La surexpression de LTBP1 dans le cancer de l'eosophage est associée à la présence de métastases dans les ganglions lymphatiques. LTBP1 favorise l'EMT et la transformation des fibroblastes en Cancer associated fibroblastes (CAF)[146].

CD81 est une tétraspanine qui est enrichie dans les exosomes de cellules NCI-H295R. Son inhibition dans les cellules humaines du cancer de la prostate PC3, DU145, and LNCaP diminue de manière significative la prolifération, la migration et l'invasion des ces cellules[147].

L'intégrine α9 (enrichie dans les exosomes) est une sous-unité qui se combine avec une sous-unité β1 pour former l'intégrine α9β1. Cette intégrine permet l'adhérence cellule-cellule. Elle facilite l'angiogenèse en se liant au VEGF-A et favorise le processus d'EMT[148].

La sérotransferrine permet le transfert du fer. Elle aurait un potentiel diagnostic dans le cancer ovarien. La sérotransferrine se lie aux récepteurs de transferrine I et permet l'assimilation cellulaire du fer. L'excès de fer peut contribuer au développement tumoral[149].

La prostaglandine F2 semble augmenter l'agressivité des tumeurs [150].

L'alpha-2 macroglobuline est concentrée environ 400 fois plus dans les exosomes que dans les cellules parentales NCI H295R. Notre laboratoire a mis en évidence en 1994 la sécrétion de l'alpha-2-macroglobuline par les cellules primaires corticosurrénaliennes bovines dans le milieu de culture. L'analyse par immunohistochimie de coupes de glande surrénale a révélé que cette molécule est uniquement détectée sur les parois des veinules et artérioles à la surface des cellules endothéliales et absente dans les cellules corticosurrénaliennes[151]. Un processus de sécrétion de cette molécule pourrait donc être les exosomes. L'alpha-2-macroglobuline peut se lier avec IGFBP1 ou IGFBP2 qui peuvent entrer en compétition avec les IGF1 ou IGF2[152].

La protéine Immunoglobin G1 heavy chain (IGHG1) est aussi enrichie dans les exosomes. Elle est surexprimée dans le cancer de la prostate. L'inhibition de IGHG1 supprime l'activation de la voie MEK/ERK/c-Myc *in vitro* dans les cellules DU145 de cancer de la prostate et *in vivo* chez des souris auxquelles des cellules DU145 ont été inoculées puis traitées avec un anticorps anti IGHG[153].

La protéine Major Vault Protein (MVP) intervient dans l'export sélectif de certains miRs comme miR-193a dans les cellules murines de carcinome colorectal. Sa répression entraîne une accumulation de ce miR dans les cellules parentales[154].

La tétraspanine 7 (TSPAN7), un membre de la famille des tétraspanines, est une molécule transmembranaire des exosomes. TSPAN7 est fortement surexprimée dans le cancer du poumon

chez les patients et dans les lignées cellulaires de cancer du poumon non à petites cellules (NSCLC ou non-small cell lung cancer) telles que les H1299, H460, H292 et A549, comparées aux cellules du poumon normales (BEAS-2B). La surexpression de TSPAN7 dans les cellules A549 et H1299 augmente leur prolifération et leur migration ainsi que l'expression de protéines impliquées dans l'EMT telles que la vimentine et la N-cadherine, et diminue le taux de E-cadherin. In vivo, l'injection de cellules A549 surexprimant TSPAN7 en sous-cutané chez des souris Nude augmente la taille des tumeurs par rapport à l'injection de cellules A549 type sauvage[155].

La protéine Immunoglobulin Superfamily, member 8 (IGSF8) est également enrichie dans les exosomes de cellules NCI-H295R. Elle s'appelle également EWI-2. C'est une protéine qui forme des complexes stoechiométriques avec CD81 et CD9[156]. EWI-2 est présente dans les exosomes de cellules du cancer de la prostate PC3. Elle participe à la sélection des miRs dans les exosomes. Le knockout de IGSF8 induit une diminution de la concentration en miR-29a, miR-149-3p et miR-3934-5p dans les exosomes[157]. **L'alpha-globuline** enrichie dans les exosomes de NCI-H295R a été détectée également dans les exosomes de cellules hépatiques[158].

Une part importante des protéines décrites ci-dessus et trouvées enrichies dans les exosomes de NCI-H295R font partie de la composition même des exosomes et des matrices extracellulaires. Elles sont souvent impliquées dans des processus favorisant la tumorigenèse.

Nous avons observé que les petits ARN, dont les miRs, représentent presque la moitié des ARN mesurés dans les exosomes de cellules NCI-H295R. Une surexpression de miR-139-5p et de miR-483-5p a été trouvée dans les tumeurs des patients porteurs de carcinome corticosurrénalien, [131]. Ces miRs ont également été identifiés dans les exosomes de NCI-H295R. De façon intéressante, miR-483-5p est plus abondant que miR-483-3p dans les exosomes, ce qui suggère l'export sélectif de miRs provenant d'un même précurseur. D'autre part, pour une même quantité de microARN, l'expression de miR-483-5p est aussi importante dans les cellules que dans les exosomes, tandis que les expressions de miRs-483-3p et de miR-139-5p sont beaucoup plus faibles dans les exosomes. Cela suggère que certains miRs sont plus abondants dans les exosomes que dans la cellule et seraient destinés à l'export vers l'espace extracellulaire. Des protéines comme HNRPA2/B1 et HNRNPA1 participent à cette sélection, notamment à celle de miR-483-5p[159]. Les miRs quantifiables dans le milieu extracellulaire sont protégés de la dégradation. Les exosomes, peuvent jouer ce rôle de protection (dans notre cas, cela pourrait être pour miR-483-5p).

MiR-483-3p est aussi abondant dans le milieu de culture que dans les cellules pour une même quantité totale de petits ARN. Cependant, il est moins représenté dans les exosomes. Cela suggère que miR-483-3p est sécrété dans le milieu par un mécanisme différent, possiblement lié à des protéines comme Argonaute 2 (Ago2) ou les Hight Densité Lipoprotéine (HDL). En effet, l'association de certaines protéines aux microARN extracellulaires confèrent également à ces derniers une protection contre la dégradation; les protéines Argonaute et HDL ont été identifiées comme protéines associées aux microARN dans le milieu extracellulaire [160].

Pour étudier l'impact potentiel des exosomes de cellules NCI H295R sur le phénotype des cellules endothéliales, nous avons tout d'abord cherché à visualiser leur capture par celles-ci in vitro. Nous

avons mis en évidence la pénétration des exosomes dans les cellules HUVEC par microscopie confocale de fluorescence en temps réel : les exosomes de NCI-H295R semblent adhérer aux cellules endothéliales au bout d'une dizaine de minutes, puis pénétrer en moins de 2 heures dans le cytoplasme. Quelques vésicules extracellulaires ont été visualisées aussi dans le noyau. Dans les expériences de co-culture de cellules NCI-H295R et de cellules HUVEC, nous avons mis en évidence la pénétration d'exosomes fluorescents de cellules NCI-H295R dans les HUVEC dans des conditions plus "physiologiques". De façon intéressante, nous avons observé un contact physique entre cellules tumorales et cellules endothéliales via des "tubes" qui véhiculent de petites inclusions très fluorescentes, possiblement des exosomes. Les filopodes et les nanotubes de type tunel (TNT), des protubérances émanant des cellules et contenant de l'actine ont été décrites. Les TNT, contrairement aux filopodes, peuvent transporter des vésicules[161], visualisées au microscope électronique. Ainsi, les protubérances visibles que nous avons observées sont potentiellement des TNT qui permettraient aux cellules cancéreuses d'injecter directement les exosomes dans la cellule réceptrice[162] (ici la cellule endothéliale). Ce mécanisme viendrait s'ajouter à l'internalisation des exosomes en suspension dans le milieu environnant.

Dans un deuxième temps, nous avons étudié l'action de miR-483-5p et 139-5p véhiculés par les exosomes ou apportés de façon exogène sur les cellules endothéliales, notamment sur leur capacités migratoires et d'organisation en pseudo-tubes. Une comparaison de l'action de ces deux miRs dans les HUVEC sur des gènes cibles identifiés dans les cellules tumorales a été effectuée.
Nous avons observé que l'expression de NDRG2, une cible de miR-483-5p, est réprimée dans les cellules HUVEC transfectées par ce miR. Cette protéine a un rôle anti-tumoral bien caractérisé. Des souris C57BL6/J invalidées pour NDRG2 (KO) spécifiquement dans l'intestin, présentent une inflammation importante à 18 et 36 semaines. Le déficit en NDRG2 entraîne une rupture de l'intégrité des jonctions adhérentes avec une diminution importante de la E-cadhérine. NDRG2 augmente la liaison avec FBX011 pour induire la dégradation de Snail[163], un facteur de transcription qui réprime l'expression de la E-cadherine et promeut l'EMT. Ainsi, la suppression de Snail via NDRG2 empêche le processus d'EMT qui est important dans la progression tumorale[163].
D'autre part, nous avons montré que l'expression de NDRG4 est réprimée par miR-139-5p dans les HUVEC transfectées par ce miR. Le rôle de NDRG4 est plus controversé dans la progression tumorale. Dans des cellules de méningiomes humains IOMM-Lee et CH-157 transfectées avec des vecteurs lentiviraux shNDRG4, la prolifération cellulaire diminue à 48 et 72h par rapport aux cellules contrôles. Les cellules transfectées ShNDRG4 surexpriment le facteur pro-apototique BAX, les caspases clivées 9 et 3 et sous-expriment le facteur anti-apoptotique BCL2[164]. Les cellules endothéliales murines du cerveau bEnd.3, mises en présence de milieu conditionné provenant de celllules IOMM-Lee et CH-157 MN déplétées en NDRG4, ont des capacités angiogéniques diminuées par rapport aux conditions contrôles. En effet, la tubulogenèse, l'invasion et la prolifération de ces cellules sont diminuées[165].
En revanche, chez des patientes atteintes de cancer du sein, la méthylation du promoteur de NDRG4 empêche la transcription de ce gène, entraîne une diminution de leur survie et augmente le risque de métastase. La déplétion en NDRG4 dans les cellules d'adénocarcinome mammaire MCF-7, entraîne une augmentation de l'adhérence de ces cellules aux ganglions lymphatiques et de leur

migration en présence de vitronectine in vitro. Nous avons montré que la sous-expression de NDRG4 dans le carcinome corticosurrénalien est impliquée dans son agressivité et le mauvais pronostic des patients.

Dans les tests fonctionnels sur les HUVEC, nous avons montré que l'addition d'exosomes de NCI H295R favorisent l'angiogenèse. Des concentrations croissantes en exosomes augmentent de façon dose-dépendante les paramètres caractérisant la tubulogénèse tels que le nombre de nœuds, de jonctions de grandes tailles, le nombre de mailles et le nombre de jonctions. Ces observations sont accompagnées d'une augmentation de la phosphorylation d'AKT dont les mécanismes restent à élucider. Nous avons trouvé que les exosomes contiennent un grand nombre de protéines pro-angiogéniques comme par exemple la lactadhérine. L'activation de AKT peut être liée à la présence de lactadhérine comme mentionné précédemment. De plus, en phosphorylant le facteur de transcription Forkhead box O (FoxO), AKT inhibe ses fonctions et induit la survie, la croissance et la prolifération cellulaires[166].

Pour étudier le rôle de miR-139-5p et miR-483-5p dans les HUVEC, nous avons tout d'abord inhibé leur expression dans ces cellules. Il est à noter que leur expression basale est quasi-négligeable comparée à celle des cellules tumorales NCI H295R. L'antagonisation des 2 miRs endogènes n'a pas d'effet significatif sur la migration des HUVEC. En revanche, l'ajout des exosomes dans ces conditions n'a plus l'effet significatif observé lorsqu'ils sont utilisés seuls sans inhibition des miRs, pour les antagomiRs contrôles, 139-5p et 483-5p, ce qui suggère un effet non spécifique des antagomiRs.

Cependant, il aurait fallu disposer d'exosomes déplétés en miR-139-5p et miR-483-5p afin d'observer un effet spécifique de ces exosomes en les comparant aux effets des exosomes « type sauvage » de NCI H295R.

Les kits d'extraction des exosomes de cellules NCI H295R traitées avec des antagomiRs n'ayant pas abouti à des préparations satisfaisantes, nous avons opté pour un apport de miRs exogènes par transfection de miRs synthétiques (miR mimics) pour tenter de mimer l'apport en miRs des exosomes. Cependant, la transfection d'une concentration de miR mimics de 10nM dans les HUVEC, inspirée de nos protocoles sur les cellules tumorales, s'est avéré supraphysiologique. En effet, l'ajout de 1 à 10µg d'exosomes aux cellules HUVEC augmente plus de deux fois la concentration en miR-139-5p et miR-483-5p, alors que la transfection de 10 nM de miRs augmente de 1000 à 5000 fois leur niveau endogène. Nous avons principalement observé que miR-139-5p et miR-483-5p ont une action anti-angiogénique à ces fortes doses, probablement par une action non-spécifique sur de nombreux gènes. Ces résultats pourraient s'expliquer par l'existance de cibles des microARN très variées. Dans targetscan la région cible est appelée seed et est située au niveau des positions 2-7 du miR mature.

Les sites cibles des miRs qui s'apparient de manière canonique à l'extrémité 3'UTR sont classés par ordre d'efficacité :

-Le site 8mer (Watson-Crick match pour les positions 2-8 avec une Adénosine en position 1) : cela veut dire que l'appariement des bases est total (A-T ; G-C) pour les bases comprises entre la 2ème et la 8ème position du miR mature. L'adénine en position 1 permet une meilleure fixation du miR à sa cible.

-le site 7mer-m8 site (appariement parfait pour les positions 2-7]), avec de l'Adénosine en opposition au miR en position 1.
-deux autres site canoniques sont associés à des laissions plus faibles : ce sont les 6 mer (qui présentent uniquement un appariement des positions (2-8) et les offset-6 mer(appariement des positions 3-8)
En se focalisant sur les protéines qui jouent un rôle important dans l'angiogenèse, on peut observer avec targetscan que NOTCH1 est une cible de miR-139-5p avec un « site type de 8mer ».
Par opposition, la throbospondin1 (TSP1) est une cible de miR-139-5p avec un site 7mer-m8, son inhibition favorise l'angiogenèse. La thromospondin1 est à l'origine de la synthèse de capsase3/7 donc l'apotose dans une culture de follicules est activée en présence de TSP1[167].
D'autre part, DLL4 peut être la cible de miR-483-5p avec un « site type de 7mer-A1 » ce sont donc des liaisons de bonne efficacité.
Le VEGF est à l'origine de la synthèse de DLL4 dans les cellules endothéliales de front(tip cell) et de l'activation de la voie de signalisation impliquant , Notch, dans les cellules de soutien (stalk cell)[168].
En l'absence de DLL4 et NOTCH, ce processus d'angiogenèse est inhibé. Dans nos tests de fonctionalité, l'inhibition de ces 2 cibles pourraient être à l'origine de la diminution de la migration et de la tubulogenèse dans les cellules HUVEC.

D'autres protéines comme la MAPK3 sont aussi une cible avec un « site type de 8mer » pour miR-483-5p. Dans les cellules du cumulus granulosas, 2 protéines ont été identifiées comme cible de miR-483-5p : il s'agit de MAPK3 et NOTCH3. La transfection de plasmide rénilla/ luciférase-3'UTR de Notch3 ou MAPK3 ainsi que de miR-483-5p montrent une diminution de l'activité de la luciférase qui n'est plus visible avec un plasmide muté en 3'UTR[169].

Pour observer l'effet physioloqique de nos miRs d'intérêts (139-5p et 483-5p), nous les avons utilisés à des concentrations plus faibles. La concentration de 0,01 nM induit une augmentation de l'expression des miRs d'environ 3 fois pour miR-139-5p d'environ 10 fois pour miR-483-5p, ce qui est plus acceptable pour mimer l'apport des exosomes. Cependant, à ces concentrations, nous n'avons pas observé de promotion de la tubulogenèse.
L'ensemble de ces résultats met en lumière la complexité des mécanismes mis en jeu par les miRs extracellulaires. Notre hypothèse actuelle est que l'action pro-angiogène des exosomes associe l'action de miRs et de protéines véhiculés par les exosomes. Pour clarifier nos observations, nous avons initié la production de cellules NCI H295R déplétées en miR-139-5p et miR-483-5p par une procédure de transduction lentivirale (travaux d'une doctorante de l'équipe). Des "miR-sponges" inductibles, dont la propriété est de séquestrer les miRs endogènes, sont en phase de test.

6 PERSPECTIVES

La recherche sur les exosomes présente un intérêt scientifique croissant. En effet, le nombre de publications dans ce domaine ne cesse de s'accroître : dans Pubmed, il est passé de moins de 10 publications en 1992 pour atteindre plus de 20 000 en 2021. Environ la moitié des publications sur les exosomes porte sur le cancer. La limite à ce domaine de recherche est la méthode d'extraction des exosomes. Une première perspective serait de trouver une méthode moins contraignante que l'ultracentrifugation pour les isoler. Comparer les techniques existantes, concentrer les échantillons avant traitement ou utiliser des techniques novatrices comme la microfluidique[170] pourraient rendre cette recherche moins fastidieuse. Pour mener à bien ces travaux, il faudrait combiner des connaissances biologiques à des connaissances en physique des nanoparticules et en chimie.

Nous avons travaillé sur des exosomes de carcinome corticosurrénalien afin de comprendre comment ces exosomes sont impliqués dans la progression tumorale. Il faudrait pouvoir également isoler des exosomes de cellules corticosurrénaliennes normales afin de les comparer à ceux des cellules cancéreuses. Ces cellules ne sont pas disponibles commercialement. La mise en culture de ces cellules pourrait étre réalisée à partir de glande surrénale prélevée en même temps que le rein lors d'une greffe de rein.

Nous avons étudié les interactions entre les exosomes produits par des cellules de carcinome corticosurrénalien et les cellules endothélilales. Cependant, le micro-environnement tumoral (tumor microenvironnement ou TEM) est constitué de la matrice extracellulaire (extracellular matrix ou ECM), des cellules stromales comme les fibroblastes (cancer associated fibroblastes ou CAFs) et les cellules mésenchymateuses stromales MSC, des péricytes, parfois des adipocytes, d'un réseau vasculaire sanguin et lymphatique et de cellules immunes [171]. Les cellules de cet environnement tumoral peuvent elles-mêmes produire des exosomes qui favorisent la tumorigenèse et la résistance aux traitements anti-cancéreux[97]. Le TEM pour le cancer de la surrénale est constituté principalement de cellules endothéliales, de quelques CAFs et de très peu de cellules immunitaires[172]. En effet, les glucocorticoïdes ont une action immunosuppressive en inhibant l'action des lymphocytes et en activant leur apoptose. Ils peuvent même à forte dose inhiber la production de lymphocytes B et T et modifier la sécrétion des cytokines des lymphocytes. L'étude des effets des exosomes de NCI-H295R sur les fibroblastes, notamment sur leur prolifération et leur transformation en CAF, pourrait être envisagée. En effet, les exosomes d'autres types de cellules cancéreuses produiraient du TGFβ, qui permettrait la transformation des fibroblastes en CAF[173].

Une production d'exosomes modifiés pourraient permettre de traiter des tumeurs et leurs métastases. En effet, les exosomes portent à leur surface des protéines CMHI[174] . Ils peuvent présenter un antigène présent de manière anormale dans la tumeur et stimuler ainsi la réponse immunitaire. Le traitement des cellules par des antagomiR réduit également les miRs ciblés dans les exosomes des cellules traitées. De même, des cellules traitées avec des miRs mimics pourraient produire des exosomes enrichis en miRs spécifiques. Ainsi, produire des exosomes porteurs d'un anticorps contre un antigène surexprimé dans la tumeur et contenant des miRs qui ciblent des

protéines impliquées dans l'immunomodulation ou dans la synthèse des glucocorticoides pourrait ouvrir une nouvelle voie thérapeutique. Il existe déjà des systèmes de production d'exosomes avec CMH I portant un anticorps antitumoral[175].

Par ailleurs, la recherche sur les microARN est également en croissance constante. Dans Pubmed, 5 articles ont été publiés en 2001 pour atteindre 19 131 en 2020. Ces petits ARNs qui régulent l'expression des gènes sont impliqués dans tous les processus physiologiques et dans le cancer[176] Pour le cancer de la surrénale, une étude de notre équipe[65] a montré qu'une surexpression de miR-483-5p dans le carcinome corticosurrénalien (CCS) permet de discriminer ceux-ci par rapport aux adénomes (ACS), des tumeurs bénignes. D'autre part, 2 autres miRs, miR-335 et miR-195 sont sous-exprimés dans les CCS par rapport aux ACS. Leur niveau d'expression dans les exosomes n'a pas encore été étudié. L'ajout de miRs mimics aux cellules NCI-H295R permettrait d'une part de déterminer si ces 2 miRs ont une action anti-tumorale et d'autre part s'ils sont sécrétés dans les exosomes et s'ils affectent l'angiogenèse. Ils pourraient être utilisés comme traitement *in vivo* dans des modèles pré-cliniques de CCS après implantation de cellules NCI-H295R chez des souris immunodéficientes.

L'ensemble de ces perspectives vise à mieux comprendre le rôle des exosomes et des microARN dans dans un contexte physiologique et pathologique avec comme but ultime l'identification de biomarqueurs robustes et la mise en place de thérapies innovantes dans un contexte de médecine personnalisée.

7 BIBLIOGRAPHIE

1. Pignatti, E., Leng, S., Carlone, D. L. & Breault, D. T. Regulation of zonation and homeostasis in the adrenal cortex. *Molecular and Cellular Endocrinology* **441**, 146–155 (2017).
2. Fassnacht, M. *et al.* Management of adrenal incidentalomas: European Society of Endocrinology Clinical Practice Guideline in collaboration with the European Network for the Study of Adrenal Tumors. *Eur J Endocrinol* **175**, G1–G34 (2016).
3. Viëtor, C. L. *et al.* How to Differentiate Benign from Malignant Adrenocortical Tumors? *Cancers (Basel)* **13**, 4383 (2021).
4. Voltan, G., Boscaro, M., Armanini, D., Scaroni, C. & Ceccato, F. A multidisciplinary approach to the management of adrenal incidentaloma. *Expert Review of Endocrinology & Metabolism* **16**, 201–212 (2021).
5. Libé, R. Adrenocortical carcinoma (ACC): diagnosis, prognosis, and treatment. *Front Cell Dev Biol* **3**, (2015).
6. Gaujoux, S., Mihai, R. & the joint working group of ESES and ENSAT. European Society of Endocrine Surgeons (ESES) and European Network for the Study of Adrenal Tumours (ENSAT) recommendations for the surgical management of adrenocortical carcinoma. *Br J Surg* **104**, 358–376 (2017).
7. Dr Eric Baudin Gustave Roussy. Tumeur de la surrénale - corticosurrénalome. *Gustave Roussy* https://www.gustaveroussy.fr/fr/tumeur-surrenale/corticosurrenalome.
8. han Than Aye,1 Phone Myint,2 Kyar Nyo Soe Myint1. Adrenocortical Oncocytoma Presenting with Gynaecomastia.
9. Assié, G. *et al.* Integrated genomic characterization of adrenocortical carcinoma. *Nat Genet* **46**, 607–612 (2014).
10. Zheng, S. *et al.* Comprehensive Pan-Genomic Characterization of Adrenocortical Carcinoma. *Cancer Cell* **29**, 723–736 (2016).
11. Fassnacht, M., Kroiss, M. & Allolio, B. Update in Adrenocortical Carcinoma. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **98**, 4551–4564 (2013).

12. Tissier, F. Tumeurs corticosurrénaliennes sporadiques de l'adulte : aspects génétiques et perspectives pour le pathologiste. *Annales de Pathologie* **28**, 409–416 (2008).

13. Fassnacht, M., Kroiss, M. & Allolio, B. Update in Adrenocortical Carcinoma. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **98**, 4551–4564 (2013).

14. Jiang, X., Charlat, O., Zamponi, R., Yang, Y. & Cong, F. Dishevelled Promotes Wnt Receptor Degradation through Recruitment of ZNRF3/RNF43 E3 Ubiquitin Ligases. *Molecular Cell* **58**, 522–533 (2015).

15. Niehrs, C. The complex world of WNT receptor signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol* **13**, 767–779 (2012).

16. Yao, G. *et al.* Cyclin K interacts with β-catenin to induce Cyclin D1 expression and facilitates tumorigenesis and radioresistance in lung cancer. *Theranostics* **10**, 11144–11158 (2020).

17. Xu, J. *et al.* β-catenin regulates c-Myc and CDKN1A expression in breast cancer cells. *Mol Carcinog* **55**, 431–439 (2016).

18. Borges, K. S. *et al.* Wnt/β-catenin activation cooperates with loss of p53 to cause adrenocortical carcinoma in mice. *Oncogene* **39**, 5282–5291 (2020).

19. Demars, J. *et al.* New insights into the pathogenesis of beckwith–wiedemann and silver–russell syndromes: Contribution of small copy number variations to 11p15 imprinting defects. *Human Mutation* **32**, 1171–1182 (2011).

20. Creemers, S. G. *et al.* Methylation of IGF2 regulatory regions to diagnose adrenocortical carcinomas. *Endocrine-Related Cancer* **23**, 727–737 (2016).

21. Clevers, H., Loh, K. M. & Nusse, R. An integral program for tissue renewal and regeneration: Wnt signaling and stem cell control. *Science* **346**, (2014).

22. Loebel, D. A. F. & Tam, P. P. L. Mice without a father. *Nature* **428**, 809–811 (2004).

23. Pereira, S. S. *et al.* IGF2 role in adrenocortical carcinoma biology. *Endocrine* **66**, 326–337 (2019).

24. Drelon, C. *et al.* Analysis of the Role of Igf2 in Adrenal Tumour Development in Transgenic Mouse Models. *PLoS ONE* **7**, e44171 (2012).

25. Fernandez, A. M. & Torres-Alemán, I. The many faces of insulin-like peptide signalling in the brain. *Nat Rev Neurosci* **13**, 225–239 (2012).

26. Lee, R. C., Feinbaum, R. L. & Ambros, V. The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. *Cell* **75**, 843–854 (1993).

27. Kozomara, A., Birgaoanu, M. & Griffiths-Jones, S. miRBase: from microRNA sequences to function. *Nucleic Acids Research* **47**, D155–D162 (2019).

28. Yamasaki, T. *et al.* Complementarity to an miRNA seed region is sufficient to induce moderate repression of a target transcript in the unicellular green alga Chlamydomonas reinhardtii. *The Plant Journal* **76**, 1045–1056 (2013).

29. Irena Misiewicz-Krzeminska 1,2,3 , Patryk Krzeminski 1,2, Luis A. Corchete 1,2, , & Dalia Quwaider 1,2, Elizabeta A. Rojas 1,2,4, Ana Belén Herrero 1,2 and Norma C. Gutiérrez 1,2,5,6,*. Factors Regulating microRNA Expression and Function in Multiple Myeloma.

30. França, G. S., Vibranovski, M. D. & Galante, P. A. F. Host gene constraints and genomic context impact the expression and evolution of human microRNAs. *Nat Commun* **7**, 11438 (2016).

31. Rodriguez, A., Griffiths-Jones, S., Ashurst, J. L. & Bradley, A. Identification of Mammalian microRNA Host Genes and Transcription Units. *Genome Res* **14**, 1902–1910 (2004).

32. Sun, Q., Song, Y. J. & Prasanth, K. V. One locus with two roles: microRNA-independent functions of microRNA-host-gene locus-encoded long noncoding RNAs. *WIREs RNA* **12**, e1625 (2021).

33. Gebert, L. F. R. & MacRae, I. J. Regulation of microRNA function in animals. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* **20**, 21–37 (2019).

34. Willkomm, S., Zander, A., Gust, A. & Grohmann, D. A Prokaryotic Twist on Argonaute Function. *Life* **5**, 538–553 (2015).

35. Witkos, T. M., Koscianska, E. & Krzyzosiak, W. J. Practical Aspects of microRNA Target Prediction. *Curr Mol Med* **11**, 93–109 (2011).

36. Jonas, S. & Izaurralde, E. Towards a molecular understanding of microRNA-mediated gene silencing. *Nat Rev Genet* **16**, 421–433 (2015).

37. Iliopoulos, D., Malizos, K. N., Oikonomou, P. & Tsezou, A. Integrative MicroRNA and Proteomic Approaches Identify Novel Osteoarthritis Genes and Their Collaborative Metabolic and Inflammatory Networks. *PLoS ONE* **3**, (2008).

38. Zhou, X., Duan, X., Qian, J. & Li, F. Abundant conserved microRNA target sites in the 5'-untranslated region and coding sequence. *Genetica* **137**, 159–164 (2009).

39. Tan, S. M. *et al.* Sequencing of Captive Target Transcripts Identifies the Network of Regulated Genes and Functions of Primate-Specific miR-522. *Cell Reports* **8**, 1225–1239 (2014).

40. Van Roosbroeck, K. & Calin, G. A. Chapter Four - Cancer Hallmarks and MicroRNAs: The Therapeutic Connection. in *Advances in Cancer Research* (eds. Croce, C. M. & Fisher, P. B.) vol. 135 119–149 (Academic Press, 2017).

41. Detassis, S., Grasso, M., Del Vescovo, V. & Denti, M. A. microRNAs Make the Call in Cancer Personalized Medicine. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* **5**, 86 (2017).

42. Dongre, A. & Weinberg, R. A. New insights into the mechanisms of epithelial–mesenchymal transition and implications for cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol* **20**, 69–84 (2019).

43. Musavi Shenas, M. H. *et al.* MicroRNAs and signaling networks involved in epithelial-mesenchymal transition. *J Cell Physiol* **234**, 5775–5785 (2019).

44. Steven C. Eastlack and Suresh K. Alahari *. MicroRNA and Breast Cancer: Understanding Pathogenesis, Improving Management. (2015).

45. Eelen, G., Treps, L., Li, X. & Carmeliet, P. Basic and Therapeutic Aspects of Angiogenesis Updated. *Circulation Research* **127**, 310–329 (2020).

46. Lampropoulou, A. & Ruhrberg, C. Neuropilin regulation of angiogenesis. *Biochemical Society Transactions* **42**, 1623–1628 (2014).

47. Sang, Q. X. Complex role of matrix metalloproteinases in angiogenesis. *Cell Res* **8**, 171–177 (1998).

48. Eelen, G., Treps, L., Li, X. & Carmeliet, P. Basic and Therapeutic Aspects of Angiogenesis Updated. *Circulation Research* **127**, 310–329 (2020).

49. Zhou, Y. *et al.* The Role of the VEGF Family in Coronary Heart Disease. *Frontiers in Cardiovascular Medicine* **8**, 963 (2021).

50. Kerbel, R. S. Tumor Angiogenesis. *N Engl J Med* **358**, 2039–2049 (2008).

51. Folkman, J. Tumor Angiogenesis: Therapeutic Implications. *New England Journal of Medicine* **285**, 1182–1186 (1971).

52. Folkman, J. Angiogenesis: an organizing principle for drug discovery? *Nat Rev Drug Discov* **6**, 273–286 (2007).

53. Caporali, A. & Emanueli, C. MicroRNA regulation in angiogenesis. *Vascular Pharmacology* **55**, 79–86 (2011).

54. Anand, S. *et al.* MicroRNA-132–mediated loss of p120RasGAP activates the endothelium to facilitate pathological angiogenesis. *Nat Med* **16**, 909–914 (2010).

55. Chamorro-Jorganes, A. *et al.* VEGF-Induced Expression of miR-17–92 Cluster in Endothelial Cells Is Mediated by ERK/ELK1 Activation and Regulates Angiogenesis. *Circ Res* **118**, 38–47 (2016).

56. Kir, D., Schnettler, E., Modi, S. & Ramakrishnan, S. Regulation of angiogenesis by microRNAs in cardiovascular diseases. *Angiogenesis* **21**, 699–710 (2018).

57. Fish, J. E. & Srivastava, D. MicroRNAs: Opening a New Vein in Angiogenesis Research. *Sci. Signal.* **2**, pe1–pe1 (2009).

58. Ye, J. *et al.* miRNA-27b targets vascular endothelial growth factor C to inhibit tumor progression and angiogenesis in colorectal cancer. *PLoS One* **8**, e60687 (2013).

59. Kir, D., Schnettler, E., Modi, S. & Ramakrishnan, S. Regulation of angiogenesis by microRNAs in cardiovascular diseases. *Angiogenesis* **21**, 699–710 (2018).

60. Magenta, A. *et al.* miR-200c is upregulated by oxidative stress and induces endothelial cell apoptosis and senescence via ZEB1 inhibition. *Cell Death Differ* **18**, 1628–1639 (2011).

61. Inui, M., Martello, G. & Piccolo, S. MicroRNA control of signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**, 252–263 (2010).

62. Pasmant, E. *et al.* SPRED1, a RAS MAPK pathway inhibitor that causes Legius syndrome, is a tumour suppressor downregulated in paediatric acute myeloblastic leukaemia. *Oncogene* **34**, 631–638 (2015).

63. Vilar, E., Perez-Garcia, J. & Tabernero, J. Pushing the Envelope in the mTOR Pathway: The Second Generation of Inhibitors. *Mol Cancer Ther* **10**, 395–403 (2011).

64. Grundmann, S. *et al.* MicroRNA-100 Regulates Neovascularization by Suppression of Mammalian Target of Rapamycin in Endothelial and Vascular Smooth Muscle Cells. *Circulation* **123**, 999–1009 (2011).

65. Chabre, O. *et al.* Serum miR-483-5p and miR-195 are predictive of recurrence risk in adrenocortical cancer patients. *Endocr. Relat. Cancer* **20**, 579–594 (2013).

66. Özata, D. M. *et al.* The role of microRNA deregulation in the pathogenesis of adrenocortical carcinoma. *Endocrine-Related Cancer* **18**, 643–655 (2011).

67. Agosta, C. *et al.* MiR-483-5p and miR-139-5p promote aggressiveness by targeting N-myc downstream-regulated gene family members in adrenocortical cancer. *International Journal of Cancer* **143**, 944–957 (2018).

68. Oreglia, M. *et al.* Early Postoperative Circulating miR-483-5p Is a Prognosis Marker for Adrenocortical Cancer. *Cancers* **12**, 724 (2020).

69. He, C. *et al.* Young intragenic miRNAs are less coexpressed with host genes than old ones: implications of miRNA–host gene coevolution. *Nucleic Acids Res* **40**, 4002–4012 (2012).

70. Gao, X., Qiao, Y., Han, D., Zhang, Y. & Ma, N. Enemy or partner: Relationship between intronic micrornas and their host genes. *IUBMB Life* **64**, 835–840 (2012).

71. Ma, N. *et al.* Coexpression of an intronic microRNA and its host gene reveals a potential role for miR-483-5p as an IGF2 partner. *Mol. Cell. Endocrinol.* **333**, 96–101 (2011).

72. Hinske, L. C. G., Galante, P. A., Kuo, W. P. & Ohno-Machado, L. A potential role for intragenic miRNAs on their hosts' interactome. *BMC Genomics* **11**, 533 (2010).

73. Liu, M. *et al.* The IGF2 intronic miR-483 selectively enhances transcription from IGF2 fetal promoters and enhances tumorigenesis. *Genes Dev.* **27**, 2543–2548 (2013).

74. Cui, H. *et al.* IGF2 -derived miR-483 mediated oncofunction by suppressing DLC-1 and associated with colorectal cancer. *Oncotarget* **7**, 48456–48466 (2016).

75. Emmerling, V. V. *et al.* miR-483 is a self-regulating microRNA and can activate its own expression via USF1 in HeLa cells. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* **80**, 81–86 (2016).

76. Durand, J., Lampron, A., Mazzuco, T. L., Chapman, A. & Bourdeau, I. Characterization of Differential Gene Expression in Adrenocortical Tumors Harboring β-Catenin (CTNNB1) Mutations. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* **96**, E1206–E1211 (2011).

77. PETER WOLF. The Nature and Significance of Platelet Products in Human Plasma. *Brit. J. Haernat., 1967, 13, 269.*

78. Anderson, H. C. VESICLES ASSOCIATED WITH CALCIFICATION IN THE MATRIX OF EPIPHYSEAL CARTILAGE. *Journal of Cell Biology* **41**, 59–72 (1969).

79. Harding, C., Heuser, J. & Stahl, P. Endocytosis and intracellular processing of transferrin and colloidal gold-transferrin in rat reticulocytes: demonstration of a pathway for receptor shedding. *Eur J Cell Biol* **35**, 256–263 (1984).

80. Raposo, G. *et al.* B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *Journal of Experimental Medicine* **183**, 1161–1172 (1996).

81. Valadi, H. *et al.* Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol* **9**, 654–659 (2007).

82. Yáñez-Mó, M. *et al.* Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *Journal of Extracellular Vesicles* **4**, 27066 (2015).

83. Xu, X., Lai, Y. & Hua, Z.-C. Apoptosis and apoptotic body: disease message and therapeutic target potentials. *Bioscience Reports* **39**, (2019).

84. van Niel, G., D'Angelo, G. & Raposo, G. Shedding light on the cell biology of extracellular vesicles. *Nat Rev Mol Cell Biol* **19**, 213–228 (2018).

85. Li, B., Antonyak, M. A., Zhang, J. & Cerione, R. A. RhoA triggers a specific signaling pathway that generates transforming microvesicles in cancer cells. *Oncogene* **31**, 4740–4749 (2012).

86. Kowal, J., Tkach, M. & Théry, C. Biogenesis and secretion of exosomes. *Current Opinion in Cell Biology* **29**, 116–125 (2014).

87. Catalano, M. & O'Driscoll, L. Inhibiting extracellular vesicles formation and release: a review of EV inhibitors. *Journal of Extracellular Vesicles* **9**, 1703244 (2020).

88. Hurley, J. H. & Odorizzi, G. Get on the exosome bus with ALIX. *Nat Cell Biol* **14**, 654–655 (2012).

89. Trajkovic, K. *et al.* Ceramide Triggers Budding of Exosome Vesicles into Multivesicular Endosomes. *Science* **319**, 1244–1247 (2008).

90. Andreu, Z. & Yáñez-Mó, M. Tetraspanins in Extracellular Vesicle Formation and Function. *Frontiers in Immunology* **5**, 442 (2014).

91. Melo, S. A. *et al.* Cancer Exosomes Perform Cell-Independent MicroRNA Biogenesis and Promote Tumorigenesis. *Cancer Cell* **26**, 707–721 (2014).

92. McKenzie, A. J. *et al.* KRAS-MEK Signaling Controls Ago2 Sorting into Exosomes. *Cell Reports* **15**, 978–987 (2016).

93. Hendrix, A. & De Wever, O. Rab27 GTPases Distribute Extracellular Nanomaps for Invasive Growth and Metastasis: Implications for Prognosis and Treatment. *International Journal of Molecular Sciences* **14**, 9883–9892 (2013).

94. Maji, S. *et al.* Exosomal Annexin II Promotes Angiogenesis and Breast Cancer Metastasis. *Mol Cancer Res* **15**, 93–105 (2017).

95. Yeung, V., Willis, G. R., Taglauer, E., Mitsialis, S. A. & Kourembanas, S. Paving the Road for Mesenchymal Stem Cell-Derived Exosome Therapy in Bronchopulmonary Dysplasia and Pulmonary Hypertension. in *Stem Cell-Based Therapy for Lung Disease* (eds. Burgess, J. K. & Heijink, I. H.) 131–152 (Springer International Publishing, 2019). doi:10.1007/978-3-030-29403-8_8.

96. Regimbeau, M. *et al.* Heat shock proteins and exosomes in cancer theranostics. *Seminars in Cancer Biology* (2021) doi:10.1016/j.semcancer.2021.07.014.

97. Dai, J. *et al.* Exosomes: key players in cancer and potential therapeutic strategy. *Sig Transduct Target Ther* **5**, 1–10 (2020).

98. Villarroya-Beltri, C. *et al.* Sumoylated hnRNPA2B1 controls the sorting of miRNAs into exosomes through binding to specific motifs. *Nat Commun* **4**, 2980 (2013).

99. Villarroya-Beltri, C., Baixauli, F., Gutiérrez-Vázquez, C., Sánchez-Madrid, F. & Mittelbrunn, M. Sorting it out: Regulation of exosome loading. *Seminars in Cancer Biology* **28**, 3–13 (2014).

100. Liu, D. *et al.* HNRNPA1-mediated exosomal sorting of miR-483-5p out of renal tubular epithelial cells promotes the progression of diabetic nephropathy-induced renal interstitial fibrosis. *Cell Death Dis* **12**, 255 (2021).

101. Shurtleff, M. J., Temoche-Diaz, M. M., Karfilis, K. V., Ri, S. & Schekman, R. Y-box protein 1 is required to sort microRNAs into exosomes in cells and in a cell-free reaction. *eLife* **5**, e19276.

102. Groot, M. & Lee, H. Sorting Mechanisms for MicroRNAs into Extracellular Vesicles and Their Associated Diseases. *Cells* **9**, 1044 (2020).

103. Leiss, M., Beckmann, K., Girós, A., Costell, M. & Fässler, R. The role of integrin binding sites in fibronectin matrix assembly in vivo. *Current Opinion in Cell Biology* **20**, 502–507 (2008).

104. Hoshino, A. *et al.* Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis. *Nature* **527**, 329–335 (2015).

105. Denzer, K. *et al.* Follicular Dendritic Cells Carry MHC Class II-Expressing Microvesicles at Their Surface. *J Immunol* **165**, 1259–1265 (2000).

106. Tian, T., Wang, Y., Wang, H., Zhu, Z. & Xiao, Z. Visualizing of the cellular uptake and intracellular trafficking of exosomes by live-cell microscopy. *Journal of Cellular Biochemistry* **111**, 488–496 (2010).

107. Liu, Y. *et al.* Delivery of miR-224-5p by Exosomes from Cancer-Associated Fibroblasts Potentiates Progression of Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *Comput Math Methods Med* **2021**, 5517747 (2021).

108. Raghu Kalluri* and Valerie S. LeBleu. The biology, function, and biomedical applications of exosomes.

109. Riches, A., Campbell, E., Borger, E. & Powis, S. Regulation of exosome release from mammary epithelial and breast cancer cells - a new regulatory pathway. *Eur. J. Cancer* **50**, 1025–1034 (2014).

110. Savina, A., Fader, C. M., Damiani, M. T. & Colombo, M. I. Rab11 promotes docking and fusion of multivesicular bodies in a calcium-dependent manner. *Traffic* **6**, 131–143 (2005).

111. Montecalvo, A. *et al.* Mechanism of transfer of functional microRNAs between mouse dendritic cells via exosomes. *Blood* **119**, 756–766 (2012).

112. Parolini, I. *et al.* Microenvironmental pH is a key factor for exosome traffic in tumor cells. *J Biol Chem* **284**, 34211–34222 (2009).

113. Shao, C. *et al.* Role of hypoxia-induced exosomes in tumor biology. *Mol Cancer* **17**, 120 (2018).

114. Xiao, D. *et al.* Identifying mRNA, MicroRNA and Protein Profiles of Melanoma Exosomes. *PLOS ONE* **7**, e46874 (2012).

115. Zhang, Z., Xing, T., Chen, Y. & Xiao, J. Exosome-mediated miR-200b promotes colorectal cancer proliferation upon TGF-β1 exposure. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **106**, 1135–1143 (2018).

116. Zeng, Z. *et al.* Cancer-derived exosomal miR-25-3p promotes pre-metastatic niche formation by inducing vascular permeability and angiogenesis. *Nat Commun* **9**, (2018).

117. Nazarenko, I. *et al.* Cell Surface Tetraspanin Tspan8 Contributes to Molecular Pathways of Exosome-Induced Endothelial Cell Activation. *Cancer Res* **70**, 1668–1678 (2010).

118. Yamada, N. *et al.* Colorectal cancer cell-derived microvesicles containing microRNA-1246 promote angiogenesis by activating Smad 1/5/8 signaling elicited by PML down-regulation in endothelial cells. *Biochim Biophys Acta* **1839**, 1256–1272 (2014).

119. Gowda, R. *et al.* The role of exosomes in metastasis and progression of melanoma. *Cancer Treatment Reviews* **85**, 101975 (2020).

120. Heck, D. *et al.* Role of Endocrine Gland-Derived Vascular Endothelial Growth Factor (EG-VEGF) and Its Receptors in Adrenocortical Tumors. *Horm Cancer* **6**, 225–236 (2015).

121. Bidarra, D. *et al.* Circulating MicroRNAs as Biomarkers for Prostate Cancer Detection and Metastasis Development Prediction. *Frontiers in Oncology* **9**, 900 (2019).

122. Tanaka, Y. *et al.* Clinical impact of serum exosomal microRNA-21 as a clinical biomarker in human esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer* **119**, 1159–1167 (2013).

123. Bayraktar, R. & Van Roosbroeck, K. miR-155 in cancer drug resistance and as target for miRNA-based therapeutics. *Cancer Metastasis Rev* **37**, 33–44 (2018).

124. Nedaeinia, R. *et al.* Inhibition of microRNA-21 via locked nucleic acid-anti-miR suppressed metastatic features of colorectal cancer cells through modulation of programmed cell death 4. *Tumour Biol.* **39**, 1010428317692261 (2017).

125. Soheilyfar, S. *et al.* In vivo and in vitro impact of miR-31 and miR-143 on the suppression of metastasis and invasion in breast cancer. *J BUON* **23**, 1290–1296 (2018).

126. Reda El Sayed, S. *et al.* MicroRNA Therapeutics in Cancer: Current Advances and Challenges. *Cancers (Basel)* **13**, 2680 (2021).

127. Cheung, A. L. Isolation and Culture of Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVEC). *Current Protocols in Microbiology* **4**, A.4B.1-A.4B.8 (2007).

128. Hyungsoon Im1,3, Huilin Shao1,3, Yong Il Park1, Vanessa M Peterson1, Cesar M Castro1, Ralph Weissleder1,2 & & Hakho Lee. Effect of pH, temperature and freezing-thawing on quantity changes and cellular uptake of exosomes. *Nature Biotechnologie*.

129. Bosch, S. *et al.* Trehalose prevents aggregation of exosomes and cryodamage. *Sci Rep* **6**, 36162 (2016).

130. Cheng, Y., Zeng, Q., Han, Q. & Xia, W. Effect of pH, temperature and freezing-thawing on quantity changes and cellular uptake of exosomes. *Protein Cell* **10**, 295–299 (2019).

131. Agosta, C. *et al.* MiR-483-5p and miR-139-5p promote aggressiveness by targeting N-myc downstream-regulated gene family members in adrenocortical cancer. *International Journal of Cancer* **143**, 944–957 (2018).

132. Hanahan, D. & Weinberg, R. A. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* **144**, 646–674 (2011).

133. Carpentier, G. *et al.* Angiogenesis Analyzer for ImageJ — A comparative morphometric analysis of “Endothelial Tube Formation Assay” and “Fibrin Bead Assay”. *Sci Rep* **10**, 11568 (2020).

134. Zeng, Y. & Fu, B. M. Resistance Mechanisms of Anti-angiogenic Therapy and Exosomes-Mediated Revascularization in Cancer. *Frontiers in Cell and Developmental Biology* **8**, 1560 (2020).

135. Salunkhe, S., Dheeraj, null, Basak, M., Chitkara, D. & Mittal, A. Surface functionalization of exosomes for target-specific delivery and in vivo imaging & tracking: Strategies and significance. *J Control Release* **326**, 599–614 (2020).

136. Silvestre, J.-S. *et al.* Lactadherin promotes VEGF-dependent neovascularization. *Nat Med* **11**, 499–506 (2005).

137. Tolosano, E. & Altruda, F. Hemopexin: Structure, Function, and Regulation. *DNA and Cell Biology* **21**, 297–306 (2002).

138. Johnson, J. L. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in cardiovascular pathologies: current knowledge and clinical potential. *MNM* **1**, 21–36 (2014).

139. Okusha, Y. *et al.* The intranuclear PEX domain of MMP involves proliferation, migration, and metastasis of aggressive adenocarcinoma cells. *Journal of Cellular Biochemistry* **119**, 7363–7376 (2018).

140. Jiang, X. & Couchman, J. R. Perlecan and Tumor Angiogenesis. *J Histochem Cytochem* **51**, 1393–1410 (2003).

141. Zhou, X. *et al.* HSPG2 overexpression independently predicts poor survival in patients with acute myeloid leukemia. *Cell Death Dis* **11**, 492 (2020).

142. Vicente, C. M. *et al.* Heparan Sulfate Proteoglycans in Human Colorectal Cancer. *Analytical Cellular Pathology* **2018**, e8389595 (2018).

143. Lin, T.-W. *et al.* Galectin-3 Binding Protein and Galectin-1 Interaction in Breast Cancer Cell Aggregation and Metastasis. *J. Am. Chem. Soc.* **137**, 9685–9693 (2015).

144. Colognato, H., MacCarrick, M., O'Rear, J. & Yurchenco, P. The laminin alpha2-chain short arm mediates cell adhesion through both the alpha1beta1 and alpha2beta1 integrins. *The Journal of biological chemistry* **272**, 29330–6 (1997).

145. Simon, T. & Bromberg, J. S. Regulation of the Immune System by Laminins. *Trends in Immunology* **38**, 858–871 (2017).

146. Cai, R. *et al.* LTBP1 promotes esophageal squamous cell carcinoma progression through epithelial-mesenchymal transition and cancer-associated fibroblasts transformation. *Journal of Translational Medicine* **18**, 139 (2020).

147. Zhang, Y., Qian, H., Xu, A. & Yang, G. Increased expression of CD81 is associated with poor prognosis of prostate cancer and increases the progression of prostate cancer cells in vitro. *Exp Ther Med* **19**, 755–761 (2020).

148. Gupta, S. K., Oommen, S., Aubry, M.-C., Williams, B. P. & Vlahakis, N. E. Integrin α9β1 promotes malignant tumor growth and metastasis by potentiating epithelial-mesenchymal transition. *Oncogene* **32**, 141–150 (2013).

149. Torti, S. V. & Torti, F. M. Iron and cancer: more ore to be mined. *Nat Rev Cancer* **13**, 342–355 (2013).

150. Jara-Gutiérrez, Á. & Baladrón, V. The Role of Prostaglandins in Different Types of Cancer. *Cells* **10**, 1487 (2021).

151. α2-Macroglobulin and the Control of Adrenocortical Steroidogenic Functiona - SAVONA - 1994 - Annals of the New York Academy of Sciences - Wiley Online Library. https://nyaspubs.onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1749-6632.1994.tb44326.x?sid=nlm%3Apubmed.

152. Šunderić, M., Malenković, V. & Nedić, O. Complexes between insulin-like growth factor binding proteins and alpha-2-macroglobulin in patients with tumor. *Experimental and Molecular Pathology* **98**, 173–177 (2015).

153. Chu, J. *et al.* IGHG1 Regulates Prostate Cancer Growth via the MEK/ERK/c-Myc Pathway. *Biomed Res Int* **2019**, 7201562 (2019).

154. Teng, Y. *et al.* MVP-mediated exosomal sorting of miR-193a promotes colon cancer progression. *Nat Commun* **8**, 14448 (2017).

155. Wang, X. *et al.* TSPAN7 promotes the migration and proliferation of lung cancer cells via epithelial-to-mesenchymal transition. *OncoTargets and Therapy* **Volume 11**, 8815–8822 (2018).

156. Stipp, C. S., Kolesnikova, T. V. & Hemler, M. E. EWI-2 Is a Major CD9 and CD81 Partner and Member of a Novel Ig Protein Subfamily*. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 40545–40554 (2001).

157. Fu, C. *et al.* EWI-2 controls nucleocytoplasmic shuttling of EGFR signaling molecules and miRNA sorting in exosomes to inhibit prostate cancer cell metastasis. *Molecular Oncology* **15**, 1543–1565 (2021).

158. Nguyen, H.-Q. *et al.* Label-free quantitative proteomic analysis of serum extracellular vesicles differentiating patients of alcoholic and nonalcoholic fatty liver diseases. *Journal of Proteomics* **245**, 104278 (2021).

159. Liu, D. *et al.* HNRNPA1-mediated exosomal sorting of miR-483-5p out of renal tubular epithelial cells promotes the progression of diabetic nephropathy-induced renal interstitial fibrosis. *Cell Death Dis* **12**, 255 (2021).

160. Scott, H. Extracellular microRNAs as messengers in the central and peripheral nervous system. *Neuronal Signal* **1**, NS20170112 (2017).

161. Delage, E. *et al.* Differential identity of Filopodia and Tunneling Nanotubes revealed by the opposite functions of actin regulatory complexes. *Sci Rep* **6**, 39632 (2016).

162. Thayanithy, V. *et al.* Tumor exosomes induce tunneling nanotubes in lipid raft-enriched regions of human mesothelioma cells. *Experimental Cell Research* **323**, 178–188 (2014).

163. Wei, M. *et al.* NDRG2 regulates adherens junction integrity to restrict colitis and tumourigenesis. *EBioMedicine* **61**, 103068 (2020).

164. Kotipatruni, R. P., Ren, X., Thotala, D. & Jaboin, J. J. NDRG4 is a novel oncogenic protein and p53 associated regulator of apoptosis in malignant meningioma cells. *Oncotarget* **6**, 17594–17604 (2015).

165. Kotipatruni, R. P. *et al.* NDRG4, the N-Myc downstream regulated gene, is important for cell survival, tumor invasion and angiogenesis in meningiomas. *Integrative Biology* **4**, 1185–1197 (2012).

166. Zhang, X., Tang, N., Hadden, T. J. & Rishi, A. K. Akt, FoxO and regulation of apoptosis. *Biochim Biophys Acta* **1813**, 1978–1986 (2011).

167. Garside, S. A., Harlow, C. R., Hillier, S. G., Fraser, H. M. & Thomas, F. H. Thrombospondin-1 Inhibits Angiogenesis and Promotes Follicular Atresia in a Novel in Vitro Angiogenesis Assay. *Endocrinology* **151**, 1280–1289 (2010).

168. Thurston, G., Noguera-Troise, I. & Yancopoulos, G. D. The Delta paradox: DLL4 blockade leads to more tumour vessels but less tumour growth. *Nat Rev Cancer* **7**, 327–331 (2007).

169. Xu, B., Zhang, Y.-W., Tong, X.-H. & Liu, Y.-S. Characterization of microRNA profile in human cumulus granulosa cells: Identification of microRNAs that regulate Notch signaling and are associated with PCOS. *Molecular and Cellular Endocrinology* **404**, 26–36 (2015).

170. Contreras-Naranjo, J. C., Wu, H.-J. & Ugaz, V. M. Microfluidics for exosome isolation and analysis: enabling liquid biopsy for personalized medicine. *Lab Chip* **17**, 3558–3577 (2017).

171. Roma-Rodrigues, C., Mendes, R., Baptista, P. V. & Fernandes, A. R. Targeting Tumor Microenvironment for Cancer Therapy. *Int J Mol Sci* **20**, 840 (2019).

172. Cherradi, N. microRNAs as Potential Biomarkers in Adrenocortical Cancer: Progress and Challenges. *Frontiers in Endocrinology* **6**, 195 (2016).

173. Ringuette Goulet, C. *et al.* Exosomes Induce Fibroblast Differentiation into Cancer-Associated Fibroblasts through TGFβ Signaling. *Mol Cancer Res* **16**, 1196–1204 (2018).

174. Lynch, S. *et al.* Novel MHC class I structures on exosomes. *J Immunol* **183**, 1884–1891 (2009).

175. Zhao, Z., McGill, J., Gamero-Kubota, P. & He, M. Microfluidic On-demand Engineering of Exosomes towards Cancer Immunotherapy. *Lab Chip* **19**, 1877–1886 (2019).

176. Lujambio, A. & Lowe, S. W. The microcosmos of cancer. *Nature* **482**, 347–355 (2012).