



HAL
open science

Impact de l'activation de AhR sur les processus moléculaires au niveau des cellules épithéliales thymiques

Bastien Ducreux

► **To cite this version:**

Bastien Ducreux. Impact de l'activation de AhR sur les processus moléculaires au niveau des cellules épithéliales thymiques. Sciences du Vivant [q-bio]. 2019. dumas-02364967

HAL Id: dumas-02364967

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-02364967>

Submitted on 15 Nov 2019

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.

CFR Angers

CFR Rennes

Année universitaire : 2018-2019 Spécialité : Biologie Moléculaire et Cellulaire (BMC) Spécialisation (et option éventuelle) : Génétique, Génomique, Biochimie (G2B)	Mémoire de fin d'études <input checked="" type="checkbox"/> d'Ingénieur de l'Institut Supérieur des Sciences agronomiques, agroalimentaires, horticoles et du paysage <input type="checkbox"/> de Master de l'Institut Supérieur des Sciences agronomiques, agroalimentaires, horticoles et du paysage <input type="checkbox"/> d'un autre établissement (étudiant arrivé en M2)
---	--

Impact de l'activation de AhR sur les processus moléculaires au niveau des cellules épithéliales thymiques

Par : Bastien DUCREUX

Soutenu à Rennes

le 11/06/2019

Devant le jury composé de :

Lecerf Frédéric

Piquet-Pellorce Claire

Tassan Jean-Pierre

Les analyses et les conclusions de ce travail d'étudiant n'engagent que la responsabilité de son auteur et non celle d'AGROCAMPUS OUEST

Remerciements

Je tiens à remercier Rozen Le Panse qui m'a fait confiance en m'acceptant dans son équipe et m'a proposé de contribuer à ce projet auquel j'ai pris beaucoup de plaisir.

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance à Nadine Dragin, mon encadrante durant ces 5 mois pour sa générosité, sa disponibilité et l'attention qu'elle a portée à mes recherches. Je te souhaite le meilleur dans la poursuite de ce projet.

Merci à Judith Merrheim et José Villegas qui m'ont aidé et initié aux techniques de culture cellulaire et de biologie moléculaire et ont permis à mes travaux d'avancer sans relâche. Merci également à Frédérique Truffault pour son aide avisée pour les extractions d'acides nucléiques.

Merci à tous les autres membres de cette formidable équipe qui auront toujours le petit mot pour faire du labo un lieu convivial : Cloé Payet, Odessa-Maud Fayet, Alexandra Bayer, Julien Verdier, Scott Thomas, Jean-Thomas Vilquin.

Un dernier remerciement pour Sonia Berrih-Aknin pour ses remarques constructives sur mes travaux.

Résumé long

Autoimmune diseases are a group of 80 pathologies arising from dysfunctional immune central tolerance mechanism. A majority of them displays a huge feminine prevalence and their incidence is increasing in industrialized countries. These recent observations have raised questions and concerns about environmental exposure to xenoestrogens, a group of molecules described as endocrine disruptors, which could play a leading role in the development of autoimmune pathologies.

Effects of these chemical composites is mediated through their nuclear receptor Aryl Hydrocarbon Receptor (AhR). This transcription factor is able to bind DNA via direct fixation or by involving cofactors such as the Estrogen Receptor α . AhR is known to participate in specific immune pathways by targeting regions of autoimmunity key genes, such as IL-10, IL-21 and IL-22. Indirectly, AhR regulates DNA methyltransferases expression and can modify the methylation status of genes involved in the stability of immune processes.

Thymic epithelial cells (TECs) play a central role in lymphocyte T education and differentiation. Paradoxically, very few studies have investigated the sensibility of TECs to endocrine disruptors. We aimed at identifying whether molecular effects of xenoestrogen exposures in thymic epithelial cells can lead to deregulations related to autoimmune disease. Here, we take myasthenia gravis (MG) as a disease model, a pathology characterized by muscle fatigability caused by autoantibodies against components of the neuromuscular junction.

According to previous recommendations for studies about the impact of AhR in autoimmunity, we chose to focus on one cellular type, thymic epithelial cells in the context of autoimmune myasthenia gravis. From former thymic transcriptome analysis in MG patients, we retrieve genes that are *in situ* identified as AhR binding targets. A ChIP-seq analysis was performed in order to select genes that are likely to be AhR binding targets. The deregulation of these genes was verified by RT-PCR on more thymic samples from control and MG donors. Next, we exposed control cultured human thymic epithelial cells to different AhR ligands: 6-formylindolo[3,2-b]carbazole (FICZ), benzo[a]pyrene (BaP) and 2,3,7,8-tetrachlorodibenzodioxin (TCDD). We performed gene expression analyses by RT-PCR and we observed that DIDO1 was similarly deregulated in MG thymic epithelial cells and control thymic epithelial cells exposed to AhR ligand. Other genes revealed opposite or no difference of expression trends. We also demonstrated the sensibility of AhR to its ligands raising the question of the complexity of cellular actions in response to environmental exposure to endocrine disruptors mediated via AhR in thymic epithelial cells.

This study is also the first to attempt to identify alterations of global DNA methylation status in thymic epithelial cells upon exposure to TCDD. Analysis of DNA methyltransferases expression in a context of exposure to TCDD, FICZ and BaP revealed a higher activity of DNMT1 and DNMT3b when cells were exposed to FICZ and TCDD, suggesting a potential alteration of methylation through the genome. We analysed the methylation status of more than 5.5 million of CpGs from thymic epithelial cells exposed to TCDD by performing Methylation sequencing. 15 Differentially Methylated Regions (DMR) stepped out, 4 of them covered promoter regions from 4 different genes (GNAS, MEST, KRT5 and RCC2P7). In parallel, we identified 1544 DMRs in MG patients revealing that 3 of them are in the promoter of GNAS, MEST and RCC2P7, suggesting potential synergic effects of dioxin exposure on autoimmunity triggering. Particularly, mutations in GNAS have been revealed in patients with thymus hyperplasia, a symptom found in patients with myasthenia gravis. Hypomethylation found in the vicinity of KRT5, a marker of thymic epithelial cells differentiation, suggests implication of AhR activation in the alteration of lymphocyte education.

This study remains a preliminary study. However, these results may encourage studies to focus on thymic epithelial cells in order to understand the relevance of environmental factors in eliciting autoimmune reaction.

Table des matières

Listes des Figures	
Abréviations.....	
Introduction	1
Matériel et méthodes	4
A. Echantillons	4
B. Culture cellulaire	4
C. Extraction des acides nucléiques.....	5
D. RT- PCR quantitative	5
E. Methyl-seq.....	6
F. Recherche de site de fixation du facteur de transcription AhR.....	6
G. Sélection des gènes par type cellulaire.....	7
H. Tests statistiques.....	7
Résultats	8
A. Identification de XRE dans les gènes dérégulés dans le thymus myasthénique	8
1. Identification de gènes cibles de AhR.....	8
2. Gene Ontology.....	8
3. Sélection de « gènes cibles » de AhR exprimés dans les CET.....	9
4. Expression des gènes dans les thymi myasthéniques	9
5. Effets des ligands de AhR sur l'expression des gènes dans les cellules épithéliales thymiques.....	11
B. Identification de modifications épigénétiques induites par les ligands de AhR ..	12
1. Expression des DNMT dans les populations cellulaires de thymus myasthéniques	13
2. Modulation de l'expression des DNMT par les ligands de AhR dans les cellules épithéliales thymiques.....	14
3. Recherche de régions différentiellement méthylées dans des CET humaines	14
Discussion-Conclusions	16
Bibliographie.....	19

LISTES DES FIGURES

Figure 1 : Mécanisme d'action intracellulaire de AhR (Rothhammer et Quintana, 2019)	2
Figure 2 : Sélection de gènes potentiellement cibles directes ou indirectes de AhR	8
Figure 3 : Catégories biologiques surreprésentées pour les gènes surexprimés dans le thymus MG « cibles » de AhR	9
Figure 4 : Expression de gènes « cibles de AhR » dans les populations cellulaires thymiques humaines.....	10
Figure 5 : Effet des ligands de AhR sur l'expression de gènes dans des cultures primaires de CET.....	11
Figure 6 : Expression des DNMT dans les populations cellulaires thymiques humaines	13
Figure 7 : Modulation de l'expression des DNMT par des ligands de AhR dans les CET humaines.....	14
Figure 8 : Région différenciellement méthylées observées dans les promoteurs des gènes <i>MEST</i> , <i>GNAS</i> , <i>KRT5</i> et <i>RCC2P7</i>	15
Tableau 1 : Liste des amorces de PCR utilisées	6
Tableau 2 : Bilan récapitulatif des résultats de RT-PCR.....	12

ABRÉVIATIONS

AhR : Aryl hydrocarbon Receptor
ARNT : Aryl hydrocarbon Receptor Nuclear Translocator
BaP : benzo[a]pyrène
CET : Cellule épithéliale thymique
CTRL : Contrôle
DMR : Differentially Methylated Region
DNMT : ADN Méthyltransférases
DRE : Dioxin Response Element
FDR : False Discovery Rate
FICZ : 6-formylindolo[3,2-b]carbazole
FT : Facteur de Transcription
GO : Gene Ontology
MG : Myasthénie Grave
PE : Perturbateur Endocrinien
RACH : récepteur à l'Acétylcholine
RORG : Retinoic Acid Receptor Gamma
SFFT : Site de Fixation de Facteur de Transcription
TCDD : 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo- <i>p</i> -dioxine
TSS : Transcription Start Site
XRE : Xenobiotic Response Element

INTRODUCTION

Les perturbateurs endocriniens (PE) sont une famille de molécules exogènes, d'origine naturelle ou artificielle, pouvant interférer sur le fonctionnement du système endocrinien (Casals-Casas et Desvergne, 2011). Les organismes y sont exposés dans leur environnement par le biais entre autres de l'alimentation, l'usage de cosmétiques ou encore la pollution environnementale (tabac, pot d'échappement, ...). Depuis les premiers cris d'alerte des débuts des années 1990, l'exposition aux perturbateurs endocriniens est devenue une des principales préoccupations sanitaires (Colborn *et al.*, 1993). En effet, ces substances sont capables de mimer, de modifier la production et ou la biodisponibilité, et d'altérer le métabolisme de certaines hormones. Certains PE favoriseraient ainsi l'apparition de pathologies sévères et chroniques comme les cancers, certaines pathologies métaboliques et les maladies auto-immunes (Idowu *et al.*, 2019; Bansal *et al.*, 2018; Kabir *et al.*, 2015; Rao et Richardson, 1999; Pollard *et al.*, 2010).

Les maladies auto-immunes sont un groupe de plus de 80 pathologies dont une des principales caractéristiques épidémiologiques est une forte prévalence féminine. Ces maladies sont dues à un dysfonctionnement du système immunitaire présentant une altération de tolérance immune aux molécules du soi et la sortie du thymus de lymphocytes T autoréactifs. La sélection négative repose sur des interactions entre les lymphocytes T et les cellules épithéliales thymiques (CET) exprimant les molécules du soi (Derbinski et Kyewski, 2010; Derbinski *et al.*, 2008). Récemment, il a été montré que la forte susceptibilité féminine à ces pathologies pouvait être en partie due à une altération biaisée des mécanismes de tolérance centrale régulés négativement épigénétiquement par les œstrogènes (Dragin *et al.*, 2016). L'incidence globale des maladies auto-immunes, dans les pays industrialisés, serait en augmentation (Lerner *et al.*, 2015). Diverses études s'accordent à démontrer que les maladies auto-immunes sont multifactorielles, dépendantes de facteurs génétiques, hormonaux, de l'âge mais aussi de l'environnement, comme les infections, l'alimentation, l'ensoleillement et de l'exposition aux produits chimiques (Costenbader *et al.*, 2011). Aussi, la forte incidence de certaines maladies auto-immunes dans les pays industrialisés serait potentiellement liée à des facteurs environnementaux.

Dans ce contexte, des études ont montré l'impact de perturbateurs endocriniens dont l'action cellulaire est médiée par le récepteur nucléaire Aryl Hydrocarbon Receptor (AhR) sur le développement de pathologies auto-immunes (Rothhammer et Quintana, 2019; Wheeler *et al.*, 2017). La 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxine (TCDD) et le 6-formylindolo[3,2-

b]carbazole (FICZ) se lie au facteur de transcription AhR, présent sous forme inactive dans le cytoplasme (Denison et Nagy, 2003), ce qui induit l'activation de différentes voies de transduction (**Figure 1**).

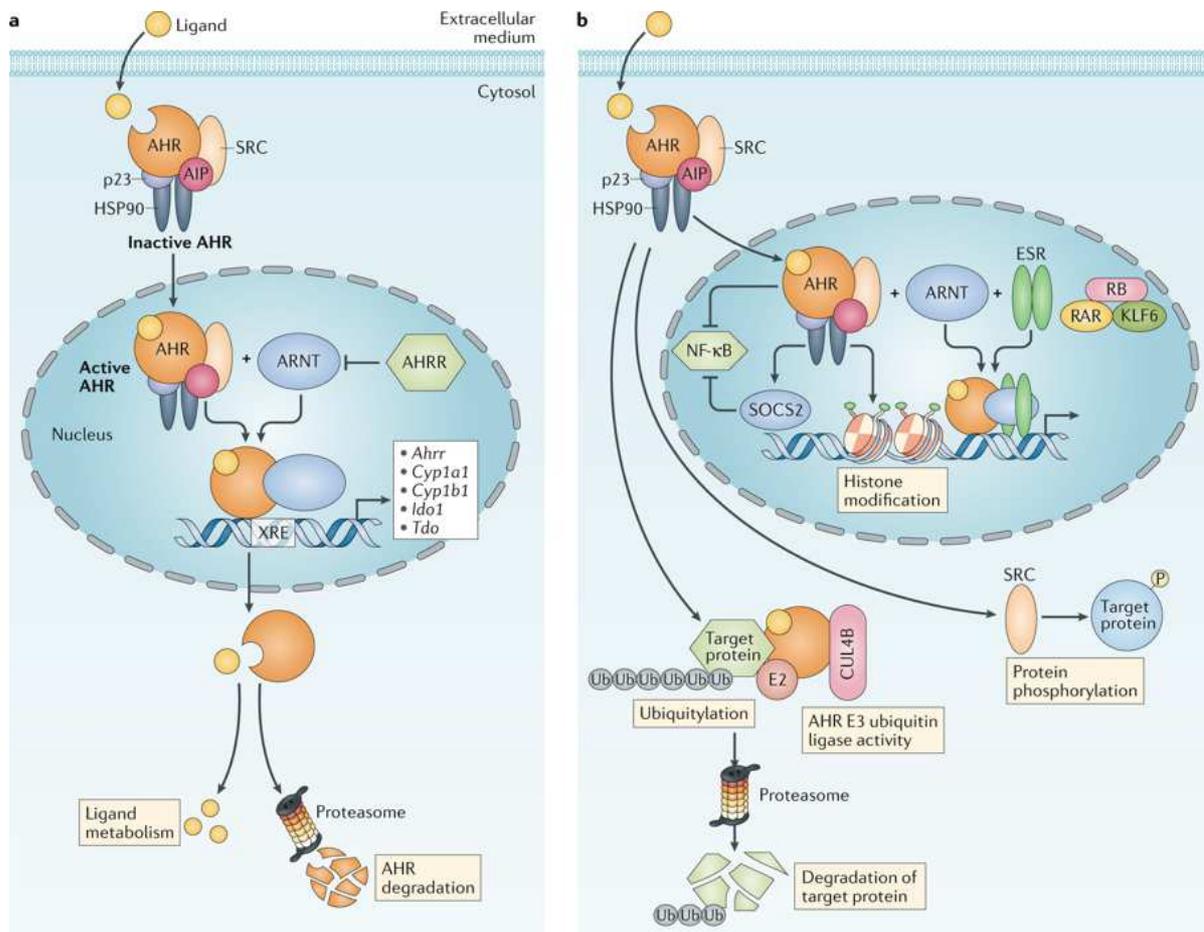


Figure 1 : Mécanisme d'action intracellulaire de AhR (Rothhammer et Quintana, 2019)

Dans le noyau, le complexe AhR/ARNT se fixe sur l'ADN pour induire la transcription des gènes, au niveau de séquences appelées XRE ou DRE (Xenobiotic ou Dioxin Response Element) (Reyes *et al.*, 1992) dont la séquence consensus est 5'-TNGCGTG-3' (**Figure 1a**). Le récepteur AhR est ensuite éliminé par le protéasome (**Figure 1a**). AhR s'associe également au récepteur aux œstrogènes (ER α), soit par fixation directe sur le motif XRE soit par fixation sur le motif ERE (Estrogen Response Element) (Matthews et Gustafsson, 2006). Un mécanisme similaire est rapporté avec le facteur de transcription retinoic acid receptor gamma (ROR γ), gène signature des lymphocytes T pro-inflammatoires 17 (Th17) (Chuang *et al.*, 2018).

Aussi, AhR peut aussi induire des changements épigénétiques (**Figure 1b**), de méthylation sur des gènes cibles de l'immunité, en agissant directement sur l'expression de *DNMT1*, *DNMT3a* et *DNMT3b* (Wu *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2017) chez des embryons de souris et de poisson-zèbre. AhR peut activer les mécanismes d'élimination des protéines par le protéasome (**Figure 1b**).

A ce jour, les études sur les effets de l'activation de AhR suite à une exposition aux perturbateurs endocriniens se sont principalement concentrées sur les lymphocytes T et rarement sur les cellules responsables de leur maturation, les CET. Dans un contexte d'exposition environnementale accrue aux perturbateurs endocriniens, il apparaît donc d'intérêt, d'appréhender les possibles effets d'une exposition aux perturbateurs endocriniens sur les CET.

Nous allons chercher à

- 1) analyser les effets des ligands de AhR sur l'expression de certains gènes au niveau des CET et de la méthylation du génome entier
- 2) voir s'il existe un parallélisme entre les données des effets des ligands de AhR et une pathologie auto-immune en prenant comme modèle pathologique la myasthénie auto-immune (MG).

La myasthénie auto-immune est une maladie neuromusculaire qui se traduit cliniquement par une faiblesse et une fatigabilité des muscles squelettiques et oculomoteurs. La majorité des patients (85%) présentent des auto-anticorps dirigés contre le récepteur à l'acétylcholine (RACH+). Chez ces patients, si l'organe cible de la réaction auto-immune demeure le muscle, l'organe effecteur est le thymus. Le thymus (organe d'éducation des lymphocytes) est hyperplasique chez les sujets jeunes et est souvent de type tumoral chez les personnes de plus de 45 ans. Diverses études ont montré une dérégulation des signaux (cytokines, chimiokines, présentation d'antigènes) fournis par les CET aux lymphocytes (Villegas *et al.*, 2019; Gradolatto *et al.*, 2012; Gradolatto *et al.*, 2014; Cufi *et al.*, 2014) et de l'expression de nombreux gènes (Le Panse *et al.*, 2006).

MATERIEL ET METHODES

A. Echantillons

Des biopsies thymiques issues de patients atteints de myasthénie auto-immune (RACH) (n= 44, âge 12-53 ans) subissant une thymectomie dans le cadre thérapeutique ont été collectées à l'hôpital Marie Lannelongue (Le Plessis-Robinson, 92). Les biopsies de donneurs sains ne présentant pas de pathologies auto-immunes (n=62, âge 2 jours-45 ans) sont obtenues de patients subissant une opération cardiovasculaire au cours de laquelle une exérèse d'une partie du thymus est réalisée pour permettre l'accès au cœur. (Hôpital Marie Lannelongue (Le Plessis-Robinson, 92)). En respect des lois de bioéthique concernant les échantillons et tissus humains, les échantillons utilisés ont été obtenus avec un consentement avisé et signé des patients ou de leur ayant droit. L'usage des échantillons humains dans le cadre de ce projet a été validé par le comité d'éthique d'Île-de-France (CCP Île-de-France Paris 7, France agreement N°C09-36).

B. Culture cellulaire

Des cultures primaires de cellules épithéliales thymiques ont été réalisées. Des biopsies de thymi sont coupées en petits fragments (10mm^2) dans une solution de HBBS et lavées plusieurs fois afin d'éliminer les thymocytes. Les explants sont ensuite transférés dans des flasques de culture et laissés à adhérer 5 minutes sans milieu. 10 mL de milieu de culture sont ajoutés et les flasques sont placées dans l'étuve à 37°C en présence de 5% de CO_2 . Le milieu de culture utilisé est composé de RPMI sans phenol, afin d'éviter les effets xénoestrogéniques, supplémenté de 20% de sérum de cheval (Life Technologies, Carlsbad, USA), 2 mmol/L L-glutamine, 100IU/mL pénicilline, 100ug/mL streptomycine et 5ug/mL fungizone (Life technologies, Carlsbad, USA). Les milieux de culture sont changés tous les 3 jours.

Après 7-10 jours de culture, les cellules sorties des explants sont lavées avec une solution de PBS et récupérées par ajout de trypsine diluée à 0,075% (Life technologies, Carlsbad, USA) avec 0,16% EDTA 10 min à 37°C et 5% de CO_2 . Le contenu de chaque flasque est filtré au Cell Strainer $40\mu\text{m}$ (Dutscher, Brumath, France). Du milieu de culture à 5% de sérum de cheval est ajouté aux cellules récupérées et le nombre de cellules compté au bleu trypan sur lame de Malassez. Les cellules sont réensemencées avec une densité de 2×10^5 et 4×10^5 dans une plaque de 12 puits (Nunc Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA) dans du milieu RPMI sans phenol, supplémenté de 5% de sérum de cheval, 2 mmol/L L-glutamine,

100IU/mL pénicilline, 100ug/mL streptomycine et 5ug/mL fungizone. Les plaques sont placées dans l'étuve pendant 24h pour permettre l'adhérence des cellules avant traitement. Les cellules sont exposées pendant 24h à des ligands de AhR : TCDD (2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxine ; 100nM), FICZ (6-formylindolo[3,2-*b*]carbazole ; 0,5 μ M) et BaP (benzo[*a*]pyrene ; 1 μ M). Les cellules sont lavées deux fois au HBSS préalablement à l'extraction des acides nucléiques (ARN et ADN).

C. Extraction des acides nucléiques

Les ARN totaux sont extraits en utilisant le kit TRIzol RNA isolation en suivant les préconisations du fournisseur (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France). L'ADN génomique est extrait avec le kit QIAamp DNA Mini (Qiagen, Hilden, Germany) en suivant les préconisations du fournisseur. La qualité et la concentration des acides nucléiques sont évaluées au spectrophotomètre NanoDrop ND-1000 (LabTech, Palaiseau, France). Les échantillons présentant respectivement une valeur minimale de 1,9 et 2,0 pour les ratios 260/280 et 260/230 sont retenus et leur qualité est vérifiée par électrophorèse sur FlashGel RNA Cassette 1,2% agarose (Lonza, Rockland, ME) et gel FlashGel DNA Cassette 1,2% agarose (ADN génomique). Une re-précipitation des ARN totaux après extraction est pratiquée (acétate de sodium 3M et éthanol) lorsque les ratios sont en-dessous des valeurs minimales (1,9 et 2,0 respectivement pour les ratios 260/280 et 260/230).

D. RT- PCR quantitative

Les ARNm totaux (0,2 μ g ou 1 μ g suivant les lots) sont inversement transcrits grâce au kit SuperScript II RT (Invitrogen, Cergy-Pontoise, France) selon les instructions du constructeur. Toutes les réactions de PCR sont effectuées avec le kit LightCycler 480 SYBR Green I Master (Roche Diagnostics, Meylan, France) contenant l'enzyme FastStart Taq DNA polymerase et le marqueur SYBR Green I, sur le thermocycleur LightCycler 480 (Roche Diagnostics, Meylan, France). La réaction de PCR est réalisée en respectant les préconisations du fournisseur (Roche Diagnostics, Meylan, France). Les réactions de PCR sont faites en duplicat pour chaque échantillon. Les données sont normalisées avec la GAPDH. Les amorces et conditions de PCR utilisées sont présentées dans le Tableau 1.

Gène	Brin sens	Brin antisens	Taille de l'amplicon	Conditions d'amplification
CDKN2C	CATTCATGATGCGGCCAGAG	TTATGGTCCGATGCCCCAC	189	61°C/12s
DIDO1	GAGCCCAGAACGATCAGG	TGGGGTCGTAACCCACATT	148	62°C/10s
DNMT1	CCTAGCCCAGGATTACAAGG	ACTCATCCGATTTGGCTCTTTC	118	63°C/10s
DNMT3a	TCCAACCCTGTGATGATTGA	GCCCTGCTTATGAGATTG	207	60°C/13s
DNMT3b	AGGGAAGACTCGATCCTCGTC	GTGTGTAGCTTAGCAGACTGG	154	63°C/11s
GAPDH	CGACCACTTTGTCAAGCTCA	AGGGGTCTACATGGCAACTG	228	62°C/14s
MAN1A2	GGACGTAGGATACCCTCTG	CCCAAATCAAAGCGTTTGTGTT	176	61°C/11s
MTMR14	AGTACCGTACAGGTGAGCAAG	CTGAGCGTCCATACAGCTCTC	157	63°C/11s
RAF1	CCGAACAAGCAAAGAACAGTG	ACACGGATAGTGTGCTGTGC	173	60°C/11s
RPS21	AGCAATCGCATCATCGGTG	CCCCGCAGATAGCATAAGTTTITA	115	61°C/11s
SMARCC1	AGCTGTTTATCGACGGAAGGA	GCATCCGCATGAACATACTTCTT	129	62°C/10s
SPOP	GCCCCGTAGCTGAGAGTTG	ACTCGCAAACACATTTTCAGT	166	63°C/11s
TGIF1	CTGTCTCTAAGCCGTCATCC	TTTTGGCCGCTATCTGCTGTA	154	60°C/11s
TRIM22	AATGTGCTGGATAACCTGGCA	TCTACTGACGATCCCCTCAAC	110	62°C/10s

Tableau 1 : Liste des amorces de PCR utilisées

E. Methyl-seq

Un séquençage de méthylation de l'ADN a été réalisé sur chaque échantillon d'ADNg grâce au séquenceur NovaSeq 6000 (Illumina, San Diego, USA) afin d'obtenir le niveau de méthylation de plus de 5,5 millions de CpG ciblés au moyen de la technique SeqCap® Epi CpGiant Probes (Roche, Pleasanton, USA). Les données issues du séquençage ont été chargées sur la plateforme Galaxy sur un serveur public usegalaxy.org afin d'être analysées (Afgan *et al.*, 2016). Après contrôle de la qualité des échantillons, les fichiers « fastq » directement générés par le séquenceur ont été modifiés afin d'éliminer les paires de bases biaisées et les adaptateurs en utilisant Trim Galore (Krueger, 2015). L'alignement sur le génome GRCh38 (Déc. 2013) a été réalisé avec bwa-meth (Pedersen *et al.*, 2014) et les ratios de méthylation ont été extraits avec MethylDackel (<https://github.com/dpryan79/MethylDackel>). Les régions différentiellement méthylées (DMR) ont été identifiées avec metilene (Jühling *et al.*, 2016). Enfin, les DMR ont été annotées grâce au package AnnotationHub sous R.

F. Recherche de site de fixation du facteur de transcription AhR

Nous utilisons la liste des gènes identifiés comme dérégulés dans le thymus de patients myasthéniques (accession *E-MEXP-518* sur www.ebi.ac.uk/arrayexpress) (Le Panse *et al.*, 2006). Les gènes présentant au moins une fixation de AhR dans leur promoteur (au maximum 5kb avant le TSS) dans la base de données expérimentales de ChIP-seq « Gene Transcription Regulatory Database » (GTRD, <http://gtrd.biouml.org>) (Yevshin *et al.*, 2016) ont été sélectionnés comme cibles probables de AhR. Les séquences ChIP-seq de fixation de AhR ont été récupérées afin d'y rechercher le motif XRE 5'-GCGTG-3' ou son complémentaire 5'-CACGC-3'.

G. Sélection des gènes par type cellulaire

L'interface BioGPS (<http://biogps.org>) et son outil « Gene expression activity chart » ont été utilisés pour identifier les gènes préférentiellement exprimés dans des cellules épithéliales. La banque de données référence est le GeneAtlas U133A. Les gènes affichant une forte expression (supérieure à la médiane de tous les tissus de référence) à la fois dans le thymus, la peau et l'intestin (tissus principalement composés de cellules épithéliales) sont retenus.

H. Tests statistiques

Les comparaisons entre groupes ont été effectuées par test de Kruskal-Wallis suivi d'un test de Mann-Whitney pour comparer les échantillons contrôles aux autres groupes. Des tests de Mann-Whitney non paramétriques ont été réalisés pour les comparaisons entre 2 groupes. Les p-values $P < 0.05$ ont été considérées significatives. L'environnement R et le logiciel RStudio ont été utilisés pour toutes les analyses statistiques.

RESULTATS

A. Identification de XRE dans les gènes dérégulés dans le thymus myasthénique

1. Identification de gènes cibles de AhR

Les analyses ont été effectuées en utilisant la liste des gènes dérégulés issue de l'étude de Le Panse et coll. (Le Panse *et al.*, 2006). L'analyse des annotations des pics de ChIP-seq montre que AhR peut potentiellement se fixer sur le promoteur de 44 des 116 gènes ciblés pour l'étude (**Figure 2B**). 35 gènes sur 44 ne présentent pas le motif XRE, ce qui suggère une fixation indirecte de AhR impliquant un autre facteur de transcription. L'analyse des séquences de fixation de ChIP-seq valide que seuls 9 gènes présentent le motif XRE 5'-GCGTG-3' (**Figure 2C**).

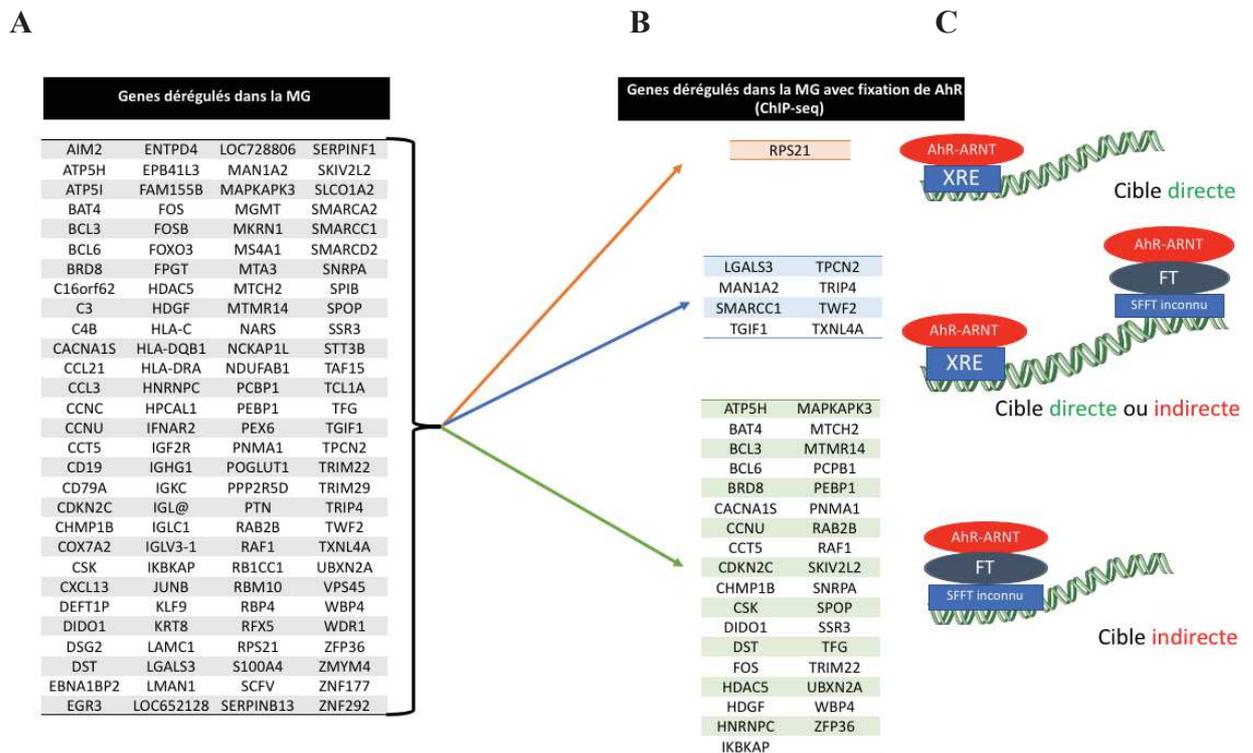


Figure 2 : Sélection de gènes potentiellement cibles directes ou indirectes de AhR (A. Gènes connus comme dérégulés dans la MG (Le Panse *et al.*, 2006) ; B. Gènes présentant une fixation de AhR sur leur promoteur selon GTRD ; C. Représentation des types de fixation de AhR dans les promoteurs de gènes identifiés.

2. Gene Ontology

L'analyse par Gene Ontology (**Figure 3**) avec l'annotation PANTHER, montre que les 44 gènes dérégulés dans la MG et potentiellement cibles de AhR sont impliqués dans des

processus biologiques métaboliques et de réponses aux substances organiques. Ceci est cohérent avec les fonctions connues de AhR qui est impliqué dans les réponses aux xénobiotiques et dans la régulation des voies métaboliques de la synthèse lipidique (Wang *et al.*, 2018).

GO	Count	FDR
Response to glucocorticoid	4	0,0473
Response to corticosteroid	4	0,0481
Response to lipid	8	0,0257
Response to organic substance	13	0,0217
Cellular response to organic substance	11	0,0477
Regulation of macromolecule metabolic process	18	0,0190
Regulation of metabolic process	19	0,0385
Regulation of nitrogen compound metabolic process	17	0,0462

Figure 3 : Catégories biologiques représentées pour les gènes sous-exprimés dans le thymus MG « cibles » de AhR.

3. Sélection de « gènes cibles » de AhR exprimés dans les CET

Les données de micro-arrays ont été acquises avec une analyse thymique globale. Le thymus est un tissu composé de deux populations majeures, les thymocytes et les cellules stromales (principalement des CET). Notre objectif étant d'analyser l'impact de l'activation de AhR sur les cellules responsables de la différenciation et maturation des lymphocytes, les cellules épithéliales thymiques, nous utilisons la base de données BioGPS pour identifier parmi nos 44 gènes ceux dont l'expression est préférentiellement retrouvée dans l'intestin (tissu riche en cellules épithéliales) et le thymus. Huit gènes préférentiellement exprimés dans les cellules épithéliales (*CDKN2C*, *DIDO1*, *MTMR14*, *RAF1*, *SMARCC1*, *SPOP*, *TGIF1* et *TRIM22*) et deux gènes CET compatibles (*MANIA2*, *RPS21*) sont sélectionnés, afin de valider expérimentalement la fonctionnalité des XRE ou autres éléments de réponses activés par AhR. Tous ont été précédemment identifiés comme sous-exprimés chez des patients myasthéniques, excepté *MTMR14*, par l'approche transcriptomique.

4. Expression des gènes dans les thymi myasthéniques

Nous avons vérifié l'expression des gènes sélectionnés dans des thymi de patients myasthéniques par RT-PCR quantitative (**Figures 4A- 4J**). Les données montrent, chez les thymi MG, une tendance à l'augmentation de l'expression de *DIDO1* (**Figure 4B**) et des différences significatives d'expression pour les gènes *MTMR14* (**Figure 4D**), *SPOP* (**Figure 4H**) et *TRIM22* (**Figure 4J**). Nos résultats de RT-PCR quantitative vont dans le même sens que les données acquises en micro-array pour les gènes *TRIM22* et *MTMR14*.

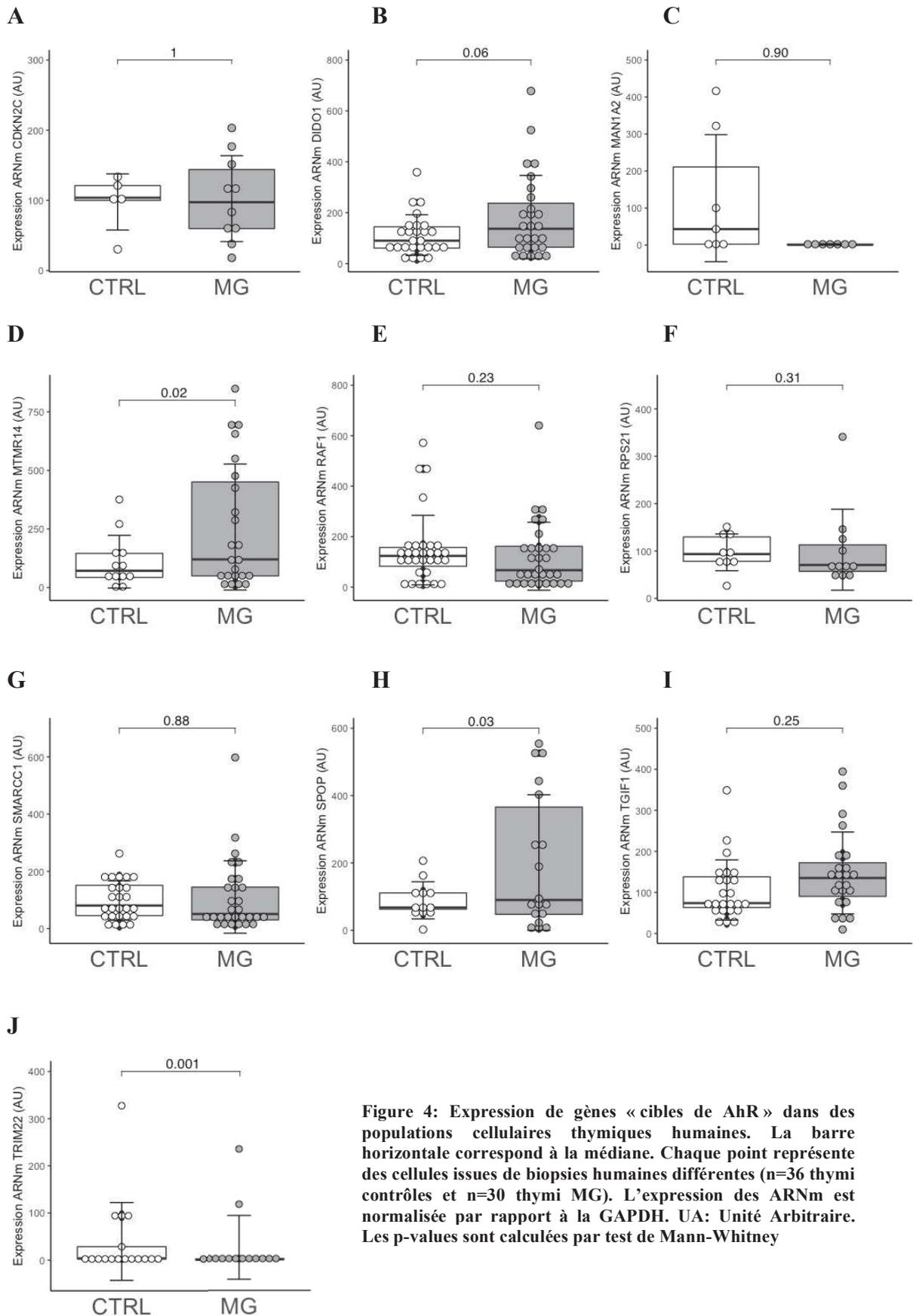


Figure 4: Expression de gènes « cibles de AhR » dans des populations cellulaires thymiques humaines. La barre horizontale correspond à la médiane. Chaque point représente des cellules issues de biopsies humaines différentes (n=36 thymi CTRL et n=30 thymi MG). L'expression des ARNm est normalisée par rapport à la GAPDH. UA: Unité Arbitraire. Les p-values sont calculées par test de Mann-Whitney

5. Effets des ligands de AhR sur l'expression des gènes dans les cellules épithéliales thymiques

Nous avons choisi de poursuivre nos analyses avec les 4 gènes identifiés par RT-PCR comme présentant une dérégulation d'expression entre les thymi de patients myasthéniques et les thymi contrôles (*MTMR14*, *DIDO1*, *SPOP* et *TRIM22*).

Pour valider les données *in silico* suggérant une modulation par AhR et une expression préférentielle dans les cellules épithéliales, nous avons exposé pendant 24h des CET humaines à trois ligands de AhR: le TCDD, ligand exogène et peu métabolisable, le BaP, ligand exogène et métabolisable et le FICZ, ligand endogène et métabolisable. L'expression des gènes a été mesurée par RT-PCR quantitative (**Figure 5**). Les données montrent que seul le ligand non métabolisable, le TCDD modulerait significativement l'expression des gènes choisis. L'expression de *DIDO1* et *TRIM22* est stimulée (**Figures 5A-5B**) alors que *MTMR14* et *SPOP* ont une expression inhibée (**Figures 5C-5D**).

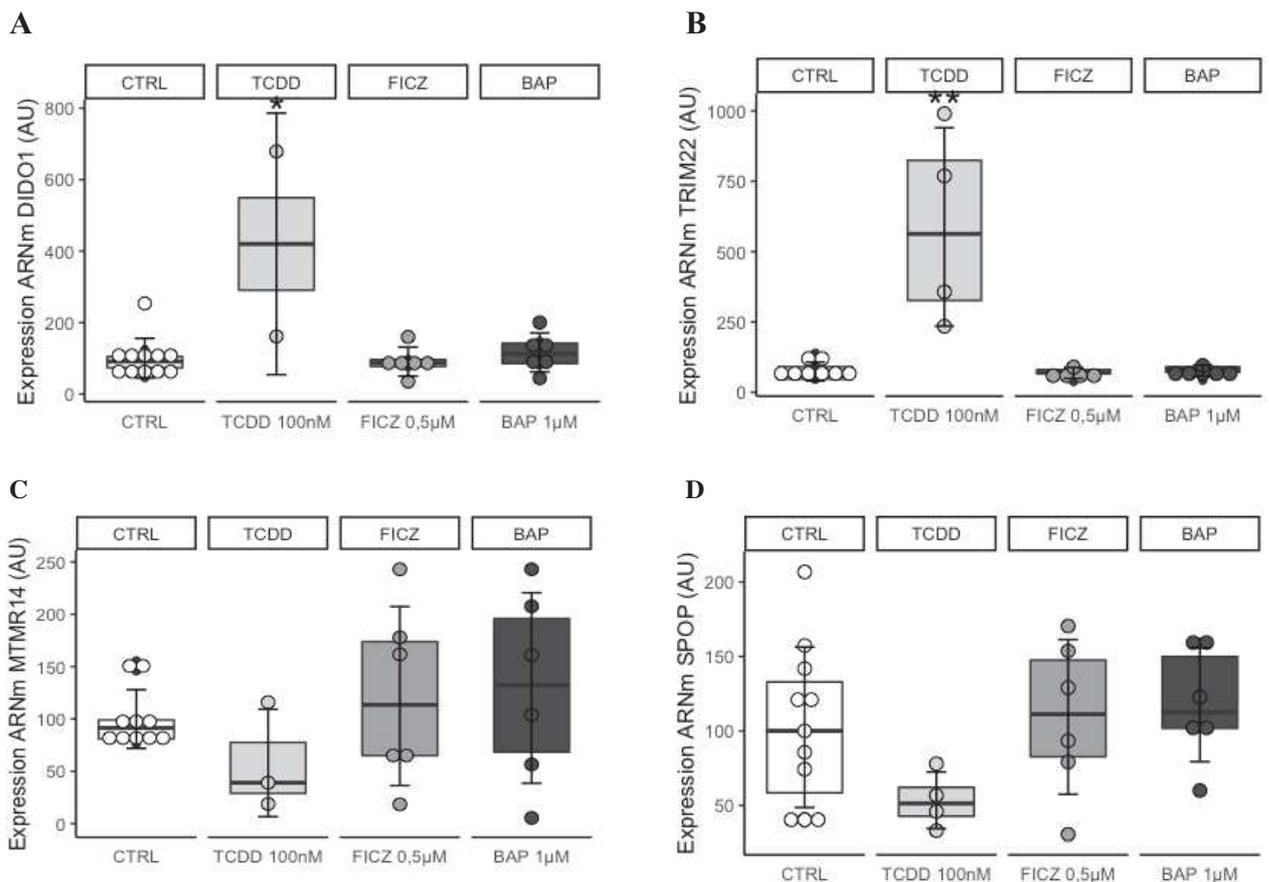


Figure 5: Effet des ligands de AhR sur l'expression de gènes dans des cultures primaires de CET. La barre horizontale correspond à la médiane. Chaque point représente des cellules issues de biopsies humaines différentes (n=6 cultures primaires de CET issues de thymi contrôles différents). L'expression des ARNm est normalisée par rapport à la GAPDH. UA: Unité Arbitraire. Les p-values sont calculées par test de Mann-Whitney (* : P<0.05 ; ** : P<0.01 ; *** ; P<0.001).

Les données expérimentales semblent suggérer une modulation de l'expression des gènes suite à une liaison forte et durable du ligand à AhR. Compte tenu des écarts importants entre les quatre expériences pour DIDO1 et TRIM22, plus de points seraient nécessaires pour confirmer l'observation. Les variations d'expression obtenues dans nos conditions expérimentales diffèrent de celles observées dans les thymi totaux MG. Elles laissent à penser que la modulation de l'expression de ces divers gènes, dans un thymus inflammatoire tel que le thymus de patient MG RCh+, requiert le concours soit de diverses voies de transduction qui soit se synergisent (DIDO1), soit antagonisent (MTMR14, TRIM22) ou prévalent les unes sur les autres. Nos données préliminaires ne permettent pas de conclure à une implication de la voie de transduction génique AhR (par activation d'élément de régulation dans le promoteur des gènes) dans les dérégulations d'expression géniques thymiques observées par micro-arrays (**Table 2**). Divers facteurs comme la période d'exposition (avant (induction) ou pendant la pathologie (physio- pathologie), les effets type cellulaire (thymus total versus CET) ont besoin d'être analysé pour statuer sur la nature de l'implication de AhR.

	Précédente étude	Vérification	Effet ligand		
Gène	Micro-array	Thymus MG	TCDD 100nM	FICZ 0,5 µM	BAP 1µM
DIDO1	↓	↑	↑	-	-
MTMR14	↑	↑	↓	-	-
SPOP	↓	↑	↓	-	-
TRIM22	↓	↓	↑	-	-

Tableau 2: Tableau récapitulatif des résultats issus de données de RT-PCR. En orange, la variation affichée n'est pas significative mais la tendance est marquée.

B. Identification de modifications épigénétiques induites par les ligands de AhR

Nous avons analysé le second mécanisme utilisé par AhR pour moduler les expressions de gènes, les modifications épigénétiques des promoteurs (méthylation). Dans ce contexte, nous avons analysé :

1. l'expression des enzymes impliquées dans ce mécanisme : les DNMT (ADN méthyltransférases). Les DNMT sont responsables de méthylation *de novo* (*DNMT3a* et *DNMT3b*) ou de leur maintenance (*DNMT1*).
2. les régions différenciellement méthylées (DMR) à l'échelle du génome dans les CET humaines

1. Expression des DNMT dans les populations cellulaires de thymus myasthéniques

Nous avons mesuré l'expression de DNMT1, DNMT3a et DNMT3b dans le thymus total et dans les CET primaires humaines. Aucune différence significative des expressions des DNMT n'est observée dans les thymi de patients MG AChR+ comparée aux thymi contrôles (**Figures 6A-6C**). Cependant dans les cellules épithéliales thymiques, *DNMT3a* présente une expression augmentée (**Figures 6D-6E**) chez les patients myasthéniques suggérant de possibles méthylations *de novo* dans les régions promotrices à l'échelle du génome dans ce type cellulaire. De plus, la figure 6 souligne que les données du thymus total et des CET ne sont pas identiques.

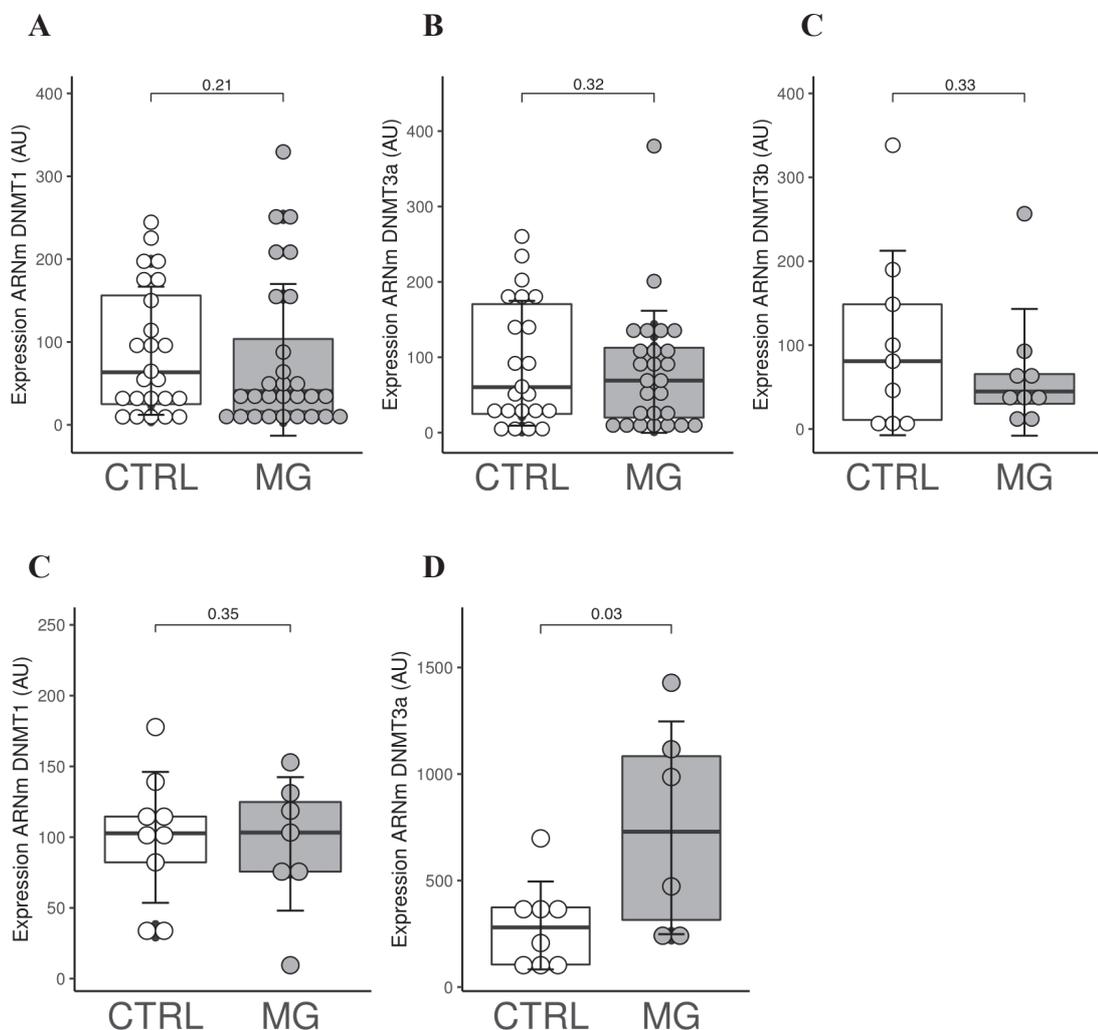


Figure 6: Expression des DNMT dans le thymus (A-C) et dans les cellules épithéliales thymiques humaines (D-E). La barre correspond à la médiane. Chaque point représente une biopsie humaine différente ((n=36 thymi contrôles et n=30 thymi MG ; n=19 cultures primaires de CET issues de thymi différents). L'expression des ARNm est normalisée par rapport à la GAPDH. UA: Unité Arbitraire. Les p-values sont calculées par test de Mann-Whitney (* : P<0.05 ; ** : P<0.01 ; *** : P<0.001).

2. Modulation de l'expression des DNMT par les ligands de AhR dans les cellules épithéliales thymiques

Nous avons analysé l'impact des ligands de AhR sur l'expression des *DNMT1*, *DNMT3a* et *DNMT3b* dans les cellules épithéliales thymiques. Nous observons que les expressions de *DNMT1* et *DNMT3a* sont augmentées par les ligands exogènes et endogènes (**Figure 7**). Ces données suggèrent que l'exposition aux ligands de AhR peut favoriser des modifications épigénétiques par activation ou inhibition des enzymes méthyltransférases.

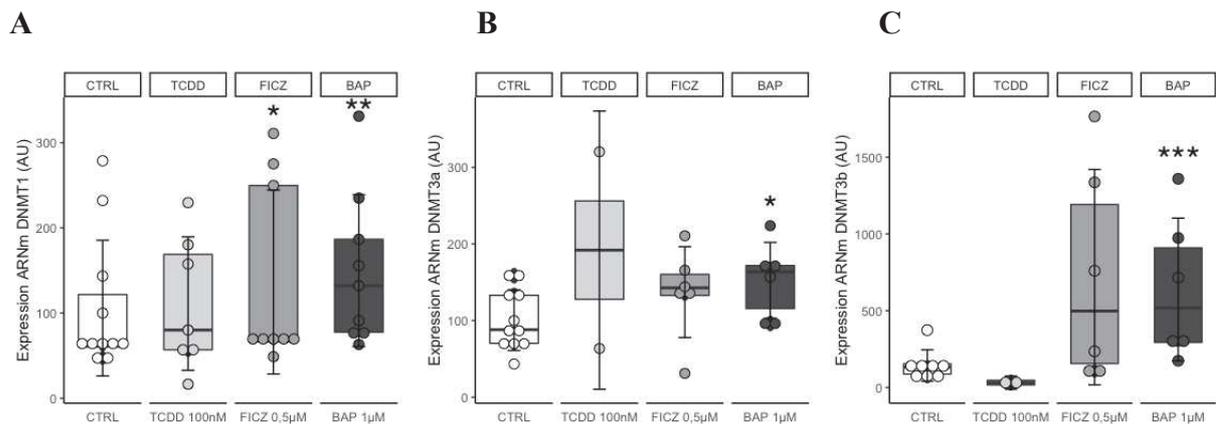


Figure 7: Modulation de l'expression des DNMT par des ligands de AhR dans les CET humaines (A. DNMT1, B. DNMT3a, C. DNMT3b). Chaque point représente des cellules issues de biopsies humaines différentes (n = 6 cultures primaires de CET issues de thymi contrôles différents). L'expression des ARNm est normalisée par rapport à la GAPDH. UA: Unité Arbitraire. Les p-values sont calculées par test de Mann-Whitney (* : P<0.05 ; ** : P<0.01 ; *** : P<0.001).

3. Recherche de régions différentiellement méthylées dans des CET humaines

Nous avons recherché les régions différentiellement méthylées (DMR) à l'échelle du génome entier et plus spécifiquement dans les régions promotrices. Nous avons comparé des CET contrôles à des CET de patients myasthéniques ou à des CET exposées au TCDD (à 50nM durant 24h). Nous identifions 15 DMR entre les CET contrôles et les CET exposées au TCDD ce qui semble peu et pourrait suggérer qu'une analyse sur une période d'exposition plus longue soit plus judicieuse. Cependant, parmi les 15 DMR, 4 sont présentes dans des régions promotrices pour les gènes *KRT5*, *GNAS*, *MEST* et *RCC2P7*. La comparaison entre échantillons contrôles et myasthéniques a révélé 1544 DMR dont certaines sont retrouvées dans des promoteurs de 294 gènes différents. Il est également à noter que les échantillons myasthéniques comportaient une DMR hyperméthylée dans le promoteur du gène *DNMT3a* suggérant une expression diminuée de ce gène dans les CET de patients myasthéniques à l'inverse des résultats obtenus précédemment (**Figure 6E**). En prenant l'intersection des gènes dont le promoteur comporte des DMR dans ces deux analyses différentielles, seuls 3

gènes communs ressortent comme ayant au moins une DMR dans leur promoteur : GNAS, MEST et RCC2P7. Ces DMR se trouvent hyperméthylées dans chaque condition pour chaque gène (**Figure 8**). Cependant si les DMR indépendamment identifiées sont proches pour MEST (2kb de distance) et RCC2P7 (régions chevauchantes), cela n'est pas le cas pour GNAS (plus de 20kb). Pour KRT5, la DMR cartographiée dans sa région promotrice indique une hypométhylation.

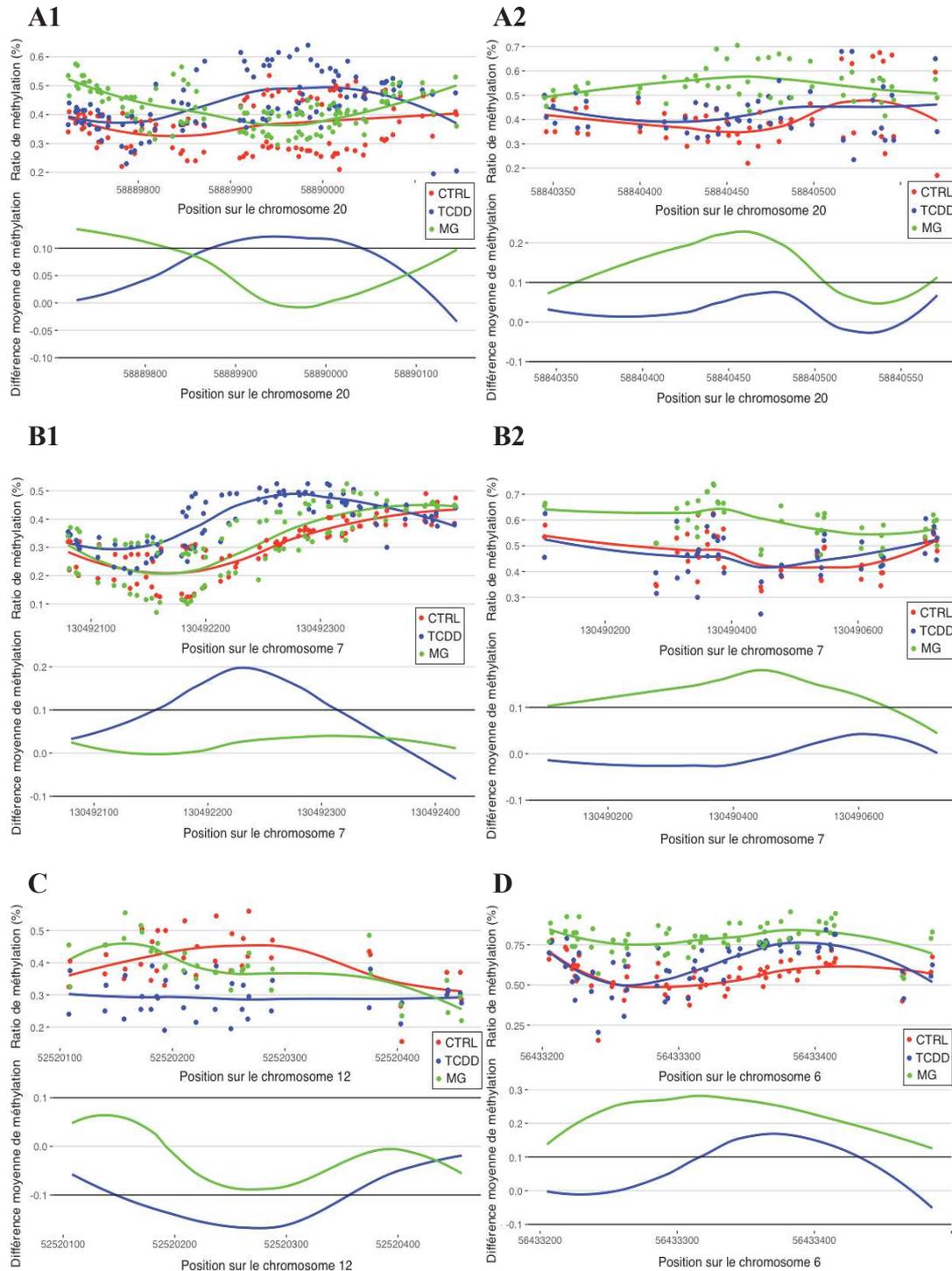


Figure 8: Régions différentiellement méthylées observées dans les promoteurs des gènes (A. GNAS B. MEST C. KRT5 et D. RCC2P7). Les courbes correspondent à des régressions loess afin de mieux visualiser les nuages de points.

DISCUSSION-CONCLUSIONS

Les maladies auto-immunes se développent et s'entretiennent chez un individu lorsque des facteurs de susceptibilité (génétique, genre, hormones) se confrontent à des inducteurs environnementaux (virus, pollution, alimentation, environnement géographique) (Costenbader *et al.*, 2011). La part de responsabilité dans le développement de pathologies auto-immunes est imputée entre 40 et 70% à des facteurs environnementaux (Selmi *et al.*, 2012). Dans cette étude, nous avons alors analysé les effets des ligands de AhR sur l'expression de certains gènes en lien avec la myasthénie auto-immune, des enzymes de méthylation, et des régions de méthylation dans les cellules épithéliales thymiques, cellules éducatrices des lymphocytes.

Diverses études s'accordent à montrer que les effets de l'activation de AhR dépendent du ligand, de sa disponibilité et de la durée de son exposition (Ahmed, 2000; Shinde et McGaha, 2018). Ainsi, chaque ligand de AhR peut avoir des conséquences variables suivant sa toxicité, et n'obéit pas forcément à des mécanismes physiologiques uniques (Veldhoen *et al.*, 2008; Quintana *et al.*, 2008). Aussi leur disponibilité dans l'environnement cellulaire à la suite d'une exposition induit des réponses physiologiques différentes pour chaque ligand. Un autre niveau de complexité s'ajoute à l'action cellulaire de AhR. Il peut solliciter divers cofacteurs (récepteur aux estrogènes ou autres facteurs de transcription (Matthews et Gustafsson, 2006; Chuang *et al.*, 2018)) de manière ligand et type cellulaire dépendant. Pour pallier l'effet type cellulaire, Rothhammer et Quintana (2019) recommandent d'étudier le rôle de AhR dans l'immunité, en se focalisant sur un seul type cellulaire.

Dans les cellules épithéliales thymiques, nos résultats tendent à montrer qu'un effet ligand, et dose (données non présentées) dans des conditions aiguës (24h), conduit à des profils d'expression variables pour des gènes disposant de l'élément de réponse XRE. Cependant, certains gènes tels que MTMR14, DIDO1 et SPOP présentent une tendance d'expression similaire à celle observée dans les tissus de patients atteints de myasthénie auto-immune. MTMR14 est un gène codant une protéine liée à la myotubularine, à ce jour, seule sa sous-expression est associée à des troubles musculaires (Shen *et al.*, 2009). La surexpression de *DIDO1* est retrouvée précocement lors d'apoptose cellulaire (Garcia-Domingo *et al.*, 2003) et la dérégulation de ce mécanisme peut avoir un rôle dans le développement de l'auto-immunité (Bozic et Rozman, 2006).

De plus, ces gènes ont précédemment été identifiés comme cible de miRNA dérégulés dans le thymus myasthénique (Cron *et al.*, 2018). Nos analyses montrant un effet similaire des ligands de AhR laissent à penser que dans un thymus présentant une activation de AhR

(Dragin *et al.*, en cours de rédaction), une possible modulation cumulative ou synergique de voies de transduction diverses peut participer à la dérégulation de l'expression d'un groupe de gènes dans le thymus MG.

L'entretien d'une pathologie auto-immune repose partiellement sur la perpétuation des mécanismes inflammatoires. Dans diverses maladies auto-immunes, l'activation de AhR contribue à perturber l'équilibre des populations lymphocytaires pro-inflammatoires et anti-inflammatoires de manière ligand dépendante (Rothhammer et Quintana, 2019). L'activation de AhR permet la prolifération des lymphocytes Th17 pro-inflammatoires, parallèlement, AhR régule également la différenciation des lymphocytes T régulateurs, lymphocytes immunosuppresseurs. Précédemment il a été montré que l'activation de AhR par exposition au TCDD peut induire chez des lymphocytes T de souris une hypométhylation dans le promoteur du gène *Foxp3* ainsi qu'une hyperméthylation dans la région promotrice de IL-17, tous les deux gènes majeurs de l'immunité (Singh *et al.*, 2011). Cependant, les ADN méthyltransférases, enzymes régulant la méthylation, sont sujettes à des modulations de leur expression par les ligands de AhR (Wang *et al.*, 2017), associées à des hypo- ou hyperméthylations de promoteurs de gènes cibles de l'immunité des cellules T mais aussi dans les cellules épithéliales (Wu *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2017; Aluru *et al.*, 2015). En analysant le compartiment épithélial, cellules orchestrant la différenciation et la maturation des lymphocytes T, nous mettons la loupe sur un compartiment peu voire pas analysé dans le contexte d'activation de AhR. Dans les cellules épithéliales thymiques, bien que le nombre de nos échantillons demeure faible, nous identifions 4 DMR dans les promoteurs des gènes *GNAS*, *MEST*, *KRT5* et *RCC2P7*. De façon intéressante, des niveaux de méthylation anormaux dans le gène *GNAS* sont associés au développement de pseudohypoparathyroïdie (Poradosu *et al.*, 2016), symptôme retrouvé pour des maladies auto-immunes, et certaines de ses mutations sont associées à de l'hyperplasie thymique (Vasilev *et al.*, 2014). La DMR identifiée dans le promoteur de *KRT5* est intrigante. Ce gène signature des cellules épithéliales thymiques présente des niveaux d'expression variables au cours de la différenciation et la maturation des CET (Danzl *et al.*, 2014). Une altération de l'expression de ce gène conduit à une perturbation du processus de tolérance immune orchestrée par les CET et une altération de la différenciation des lymphocytes T (Dooley *et al.*, 2008).

A notre connaissance, cette étude préliminaire est la première visant à identifier si l'activation de AhR pourrait participer aux changements physiopathologiques observés dans les thymi de patients atteints de myasthénie auto-immune. Nous avons montré que des gènes dérégulés pour cette maladie étaient des cibles de AhR dans les CET. Pour autant, la réponse médiée par son activation affiche beaucoup de variabilité dépendant de la dose/nature du

ligand. Cette étude montre encore une fois l'ambiguïté et la complexité des effets cellulaires de AhR.

BIBLIOGRAPHIE

- Afgan, E., Baker, D., Beek, M. Van Den, Blankenberg, D., Bouvier, D., Chilton, J., ... Goecks, J. (2016). The Galaxy platform for accessible , reproducible and collaborative biomedical analyses: 2016 update. *Nucleic Acids Research*, 44(May), 3–10. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw343>
- Aluru, N., Kuo, E., Helfrich, L. W., Karchner, S. I., Elwood, A., Pais, J. E., ... St, C. (2016). Developmental exposure to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin alters DNA methyltransferase (dnmt) expression in zebrafish (*Danio rerio*). *Toxicol Appl Pharmacol*, 284(2), 142–151. <https://doi.org/10.1016/j.taap.2015.02.016>.Developmental
- Ansar A. (2000). The immune system as a potential target for environmental estrogens (endocrine disrupters): a new emerging field. *Toxicology*, 150, 191–206.
- Bansal, A., Henao-mejia, J., & Simmons, R. A. (2018). Immune System: An Emerging Player in Mediating Effects of Endocrine Disruptors on Metabolic Health. *Endocrinology*, 159(September 2017), 32–45. <https://doi.org/10.1210/en.2017-00882>
- Božič, B., & Rozman, B. (2006). Apoptosis and Autoimmunity. *Clinical Immunology*, 17(3), 69–74.
- Chuang, H., Tsai, C., Hsueh, C., & Tan, T. (2018). GLK-IKK signaling induces dimerization and translocation of the AhR-ROR γ t complex in IL-17A induction and autoimmune disease. *Science Advances*, (September), 1–16.
- Colborn, T., vom Saal, F. S., & Soto, A. M. (1993). Developmental effects of endocrine-disrupting chemicals in wildlife and humans. *Environmental Health Perspectives*, 101(5), 378–384.
- Costenbader, K. H., Gay, S., Alarcón-riquelme, M. E., Iaccarino, L., & Doria, A. (2012). Genes , epigenetic regulation and environmental factors : Which is the most relevant in developing autoimmune diseases? *Autoimmunity Reviews*, 11(8), 604–609. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2011.10.022>
- Cron, M. A., Maillard, S., Delisle, F., Samson, N., Truffault, F., Foti, M., ... Le Panse, R. (2018). Analysis of microRNA expression in the thymus of Myasthenia Gravis patients opens new research avenues. *Autoimmunity Reviews*, 17(6), 588–600. <https://doi.org/10.1016/j.autrev.2018.01.008>
- Cufi, P., Dragin, N., Ruhlmann, N., Weiss, J. M., Fadel, E., Serraf, A., ... Le Panse, R. (2014). Central role of interferon-beta in thymic events leading to myasthenia gravis. *Journal of Autoimmunity*, 52, 44–52. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2013.12.016>
- Danzl, N. M., Jeong, S., Choi, Y., & Alexandropoulos, K. (2014). Identification of Novel Thymic Epithelial Cell Subsets Whose Differentiation Is Regulated by RANKL and Traf6. *PLoS One*, 9(1), e86129. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0086129>
- Derbinski, J., & Kyewski, B. (2010). How thymic antigen presenting cells sample the body's self-antigens. *Current Opinion in Immunology*, 22(5), 592–600. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2010.08.003>
- Derbinski, J., Pinto, S., Ro, S., Hexel, K., & Kyewski, B. (2008). Promiscuous gene expression patterns in single medullary thymic epithelial cells argue for a stochastic mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105, 657–662.
- Dooley, J., Erickson, M., & Farr, A. G. (2008). Alterations of the medullary epithelial compartment in the Aire- deficient thymus: Implications for programs of thymic epithelial differentiation. *J Immunol*, 181(8), 5225–5232.

- Dragin, N., Bismuth, J., Cizeron-Clairac, G., Biferi, M. G., Berthault, C., Serraf, A., ... Berrih-aknin, S. (2016). Estrogen-mediated downregulation of AIRE influences sexual dimorphism in autoimmune diseases. *The Journal of Clinical Investigation*, *126*(4), 1525–1537. <https://doi.org/10.1172/JCI181894DS1>
- Garcia-Domingo, D., Ramirez, D., Gonzalez de Buitrago, G., & Martinez-A, C. (2003). Death Inducer-Obliterator 1 Triggers Apoptosis after Nuclear Translocation and Caspase Upregulation. *Molecular and Cellular Biology*, *23*(9), 3216–3225. <https://doi.org/10.1128/mcb.23.9.3216-3225.2003>
- Gradolatto, A., Nazzal, D., Foti, M., Bismuth, J., Truffault, F., Panse, R. Le, & Berrih-Aknin, S. (2012). Defects of immunoregulatory mechanisms in myasthenia gravis: Role of IL-17. *Annals of the New York Academy of Sciences*, *1274*(1), 40–47. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2012.06791.x>
- Gradolatto, A., Nazzal, D., Truffault, F., Bismuth, J., Fadel, E., Foti, M., & Berrih-Aknin, S. (2014). Both Treg cells and Tconv cells are defective in the Myasthenia gravis thymus: Roles of IL-17 and TNF- α . *Journal of Autoimmunity*, *52*, 53–63. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2013.12.015>
- Idowu, O., Semple, K. T., Ramadass, K., O'Connor, W., Hansbro, P., & Thavamani, P. (2019). Beyond the obvious: Environmental health implications of polar polycyclic aromatic hydrocarbons. *Environment International*, *123*, 543–557.
- Jühling, F., Kretzmer, H., Bernhart, S. H., Otto, C., Stadler, P. F., & Hoffmann, S. (2016). metilene : fast and sensitive calling of differentially methylated regions from bisulfite sequencing data. *Genome Research*, *26*, 256–262. <https://doi.org/10.1101/gr.196394.115.7>
- Kabir, R. E., Rahman, S. M., & Rahman, I. (2015). A review on endocrine disruptors and their possible impacts on human health. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, *40*(1), 241–258.
- Krueger, F. (2015). Trim Galore! Available at http://www.Bioinformatics.Babraham.Ac.Uk/Projects/Trim_galore/.
- Le Panse, R., Bismuth, J., & Berrih-Aknin, S. (2006). Microarrays Reveal Distinct Gene Signatures in the Thymus of Seropositive and Seronegative Myasthenia Gravis Patients and the Role of CC Chemokine Ligand 21 in Thymic. *The Journal of Immunology*, *177*(11), 7868–7879.
- Lerner, A., Jeremias, P., & Matthias, T. (2015). The World Incidence and Prevalence of Autoimmune Diseases is Increasing. *International Journal of Celiac Disease*, *3*(4), 151–155. <https://doi.org/10.12691/ijcd-3-4-8>
- Matthews, J., & Gustafsson, J.-åke. (2006). Estrogen receptor and aryl hydrocarbon receptor signaling pathways. *Nuclear Receptor Signaling*, *4*. <https://doi.org/10.1621/nrs.04016>
- Pedersen, B. S., Eyring, K., De, S., Yang, I. V, & Schwartz, D. A. (2014). Fast and accurate alignment of long bisulfite-seq reads. *ArXiv.Org*, *1401.1129*(00), 1–2.
- Poradosu, S., Bravenboer, B., Takatani, R., & Jüppner, H. (2016). Pseudohypoparathyroidism type 1B caused by methylation changes at the GNAS complex locus. *BMJ Case Rep*, 1–3. <https://doi.org/10.1136/bcr-2016-214673>
- Rao, T., & Richardson, B. (1999). Environmentally Induced Autoimmune Diseases : Potential Mechanisms Modification of Cellular Gene. *Perspect*, *107*(October), 737–742.
- Reyes, H., Reisz-Porszasz, S., & Hankinson, O. (1992). Identification of the Ah Receptor Nuclear Translocator Protein (Arnt) as a Component of the DNA Binding Form of the Ah Receptor. *Science*, *256*(5060), 1193–1195.

<https://doi.org/10.1126/science.256.5060.1193>

- Rothhammer, V., & Quintana, F. J. (2019). The aryl hydrocarbon receptor : an environmental sensor integrating immune responses in health and disease. *Nature Reviews Immunology*, 19(March). <https://doi.org/10.1038/s41577-019-0125-8>
- Selmi, C., Lu, Q., & Humble, M. C. (2012). Heritability versus the role of the environment in autoimmunity. *Journal of Autoimmunity*, 39(4), 249–252. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2012.07.011>
- Shen, J., Yu, W.-M., Brotto, M., Scherman, J. A., Guo, C., Stoddard, C., ... Qu, C.-K. (2009). Deficiency of MIP phosphatase induces a muscle disorder by disrupting Ca²⁺ homeostasis. *Nat Cell Biol.*, 377(2), 364–377. <https://doi.org/10.1038/ncb1884>.Deficiency
- Singh, N. P., Singh, U. P., Singh, B., Price, R. L., Nagarkatti, M., & Prakash, S. (2011). Activation of Aryl Hydrocarbon Receptor (AhR) Leads to Reciprocal Epigenetic Regulation of FoxP3 and IL-17 Expression and Amelioration of Experimental Colitis. *PLoS One*, 6(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023522>
- Vasilev, V., Daly, A. F., Thiry, A., Petrossians, P., Fina, F., Rostomyan, L., ... Barlier, A. (2014). McCune-Albright Syndrome : A Detailed Pathological and Genetic Analysis of Disease Effects in an Adult Patient. *J Clin Endocrinol Metab*, 99(October), 2029–2038. <https://doi.org/10.1210/jc.2014-1291>
- Veldhoen, M., Hirota, K., Westendorf, A. M., Buer, J., Dumoutier, L., Renauld, J., & Stockinger, B. (2008). The aryl hydrocarbon receptor links T H 17-cell-mediated autoimmunity to environmental toxins. *Nature*, 453(May), 2–6. <https://doi.org/10.1038/nature06881>
- Villegas, J. A., Bayer, A. C., Ider, K., Bismuth, J., Truffault, F., Roussin, R., ... Dragin, N. (2019). Il-23/Th17 cell pathway: A promising target to alleviate thymic inflammation maintenance in myasthenia gravis. *Journal of Autoimmunity*, 98(November 2018), 59–73. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2018.11.005>
- Wang, C., Yuan, X., Liu, C., Zhai, S., Zhang, D., & Fu, Y. (2017). Preliminary research on DNA methylation changes during murine palatogenesis induced by TCDD. *J Craniomaxillofac Surg.*, 45(5), 678–684.
- Wheeler, M. A., Rothhammer, V., & Quintana, F. J. (2017). Control of immune-mediated pathology via the aryl hydrocarbon receptor. *J. Biol. Chem.*, 292, 12383–12389. <https://doi.org/10.1074/jbc.R116.767723>
- Wu, Q., Ohsako, S., Ishimura, R., Suzuki, J. S., & Tohyama, C. (2004). Exposure of Mouse Preimplantation Embryos to 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) Alters the Methylation Status of Imprinted Genes H19 and Igf2. *Biology Of Reproduction*, 70(November 2003), 1790–1797. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.103.025387>
- Yevshin, I., Sharipov, R., Valeev, T., Kel, A., & Kolpakov, F. (2017). GTRD : a database of transcription factor binding sites identified by ChIP-seq experiments. *Nucleic Acids Research*, 45(October 2016), 61–67. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw951>



Diplôme : Ingénieur Agronome/Master 2
Spécialité : Biologie Moléculaire et Cellulaire (BMC)
Spécialisation / option : Génétique, Génomique, Biochimie (G2B)
Enseignant référent : Lecerf Frédéric

Auteur(s) : Ducreux Bastien

Organisme d'accueil : Centre de Recherche en Myologie, UMRS974

Date de naissance : 06/06/1996

Adresse : 105 Boulevard de l'Hôpital, 75013 Paris

Nb pages : 21

Annexe(s) : 0

Maître de stage : Dragin Nadine

Année de soutenance : 2019

Titre français : Impact de l'activation de AhR sur les processus moléculaires au niveau des cellules épithéliales thymiques

Titre anglais : Impact of AhR activation on molecular processes in thymic epithelial cells

Résumé :

Les maladies auto-immunes sont un groupe de 80 pathologies ayant pour origine un dysfonctionnement du mécanisme de tolérance immune centrale. Leur prévalence féminine et leur incidence dans les pays industrialisés ont récemment soulevé la question de l'influence des xénoestrogènes, décrits comme perturbateurs endocriniens, dans le développement de ces maladies. La toxicité de ces molécules passe par le facteur de transcription Aryl Hydrocarbon Receptor (AhR). En se fixant sur l'ADN ou en induisant des modifications épigénétiques, il régule l'expression de gènes cibles de l'auto-immunité et déséquilibre la balance des populations lymphocytaires Th17 et Treg. Dans cette étude, nous avons comparé les profils d'expression de gènes cibles de AhR dérégulés dans la myasthénie auto-immune avec ceux de cellules thymiques exposées à différents ligands de AhR et y avons retrouvé des similarités. Dans un second temps, après avoir montré une surexpression des méthyltransférases suite à une exposition aux ligands de AhR et dans les cellules de patients myasthéniques, nous avons identifié à l'échelle du génome des régions promotrices communes différenciellement méthylées. Deux ont été identifiées dans KRT5 et GNAS, gènes en lien avec l'auto-immunité.

Abstract :

Autoimmune diseases are a group of 80 pathologies arising from dysfunctional immune central tolerance mechanism. Their feminine prevalence as well as their high incidence in industrialized countries have raised questions and concerns about environmental exposure to xenoestrogens, described as endocrine disruptors, which could play a leading role in the development of autoimmune pathologies. Toxicity of these chemicals is mediated through Aryl Hydrocarbon Receptor (AhR). AhR is known to regulate autoimmunity key genes by binding to DNA or inducing epigenetic modifications. Thus, AhR can disrupt the balance between Th17 and Treg proliferation. In this study, we compared expression profiles of AhR target genes deregulated in patients with myasthenia gravis with thymic cells exposed to different AhR ligands, and we found similarities. Secondly, after showing overexpression of DNA methyltransferases by exposure to AhR ligands, we identified common differentially methylated promoter regions. Two of them were located in KRT5 and GNAS, two genes that are linked to autoimmunity.

Mots-clés : Aryl Hydrocarbon Receptor, autoimmunité, méthylation de l'ADN, myasthenia gravis, perturbateurs endocriniens

Key Words: Aryl Hydrocarbon Receptor, autoimmunity, DNA methylation, endocrine disruptors, myasthenia gravis