

Signature microARN salivaire pour le diagnostic de l'endométriose

J. Clin. Méd. 2022, 11 (3), 612 ; <https://doi.org/10.3390/jcm11030612>

Signature microARN salivaire pour le diagnostic de l'endométriose

par Sofiane Bendifallah^{1,2,*}, Stéphane Suisse³ORCID, Anne Puchar^{1,2}, Léa

Delbos^{4,5}, Mathieu Poilblanc^{6,7}, Philippe Descamps^{4,5}, François Golfier^{6,7}, Ludmila

Jornea⁸, Delphine Bouteiller⁹, Cyril Touboul^{1,2}ORCID, Yohann Dabi^{1,2}ORCID et Émile

Daraï^{1,2}

J. Clin. Méd. 2022, 11 (3), 612 ; <https://doi.org/10.3390/jcm11030612>

Reçu : 12 novembre 2021 / Révisé : 22 janvier 2022 / Accepté : 24 janvier 2022 / Publié : 26 janvier 2022

(Cet article appartient à la section [Obstétrique & Gynécologie](#))

[Télécharger le PDF](#)

[Parcourir les chiffres](#)

[Rapports d'examen](#) Exportation de citation

Abstrait

Contexte : Le diagnostic de l'endométriose constitue un fardeau économique considérable pour le système de santé avec des outils de diagnostic souvent peu concluants avec une précision insuffisante. Nous avons cherché à analyser le miARNome humain pour définir une signature de miARN diagnostique basée sur la salive pour l'endométriose. Méthodes : Nous avons réalisé une étude prospective ENDO-miARN portant sur 200 échantillons de salive provenant de 200 femmes souffrant de douleurs pelviennes chroniques évocatrices d'endométriose recueillies entre janvier et juin 2021. L'étude comportait deux parties : (i) identification d'un biomarqueur basé sur le génome- profilage d'expression large de miARN par séquençage de petits ARN à l'aide du séquençage de nouvelle génération (NGS) et (ii) développement d'une signature diagnostique de miARN basée sur la salive selon le profilage d'expression et de précision à l'aide d'un algorithme Random Forest. Résultats : Parmi les 200 patients, 76,5 % (n = 153) ont reçu un diagnostic d'endométriose et 23,5 % (n = 47) sans (témoins). Un petit ARN-seq de 200 échantillons de salive a donné environ 4642 millions de lectures de séquençage brutes (de ~13,7 millions à ~39,3 millions de lectures/échantillon). La quantification des lectures filtrées et l'identification des miARN connus ont donné des séquences d'environ 190 M qui ont été cartographiées sur 2561 miARN connus. Sur les 2561 miARN connus, la sélection de caractéristiques avec l'algorithme Random Forest a généré après validation croisée en interne une signature salivaire de l'endométriose composée de 109 miARN. La sensibilité, la spécificité et l'ASC respectives pour la signature miARN diagnostique étaient de 96,7 %, 100 % et 98,3 %. Conclusions : L'étude ENDO-miARN est la première étude prospective à rapporter une signature diagnostique de miARN basée sur la salive pour l'endométriose.

Mots clés : [endométrieuse](#) ; [salive](#) ; [diagnostic](#) ; [signé](#) ; [miARN](#)

1. Introduction

L'endométriose, définie par la présence de tissu de type endomètre à l'extérieur de l'utérus, touche 2 à 10 % de la population féminine, soit environ 190 millions de femmes dans le monde. C'est une maladie hétérogène avec une histoire naturelle mal connue et à ce titre pose de nombreux défis [1 , 2]. Le premier est un diagnostic rapide, principalement parce que les symptômes de l'endométriose ne sont pas spécifiques et que l'examen clinique est souvent négatif ou aboutit à un diagnostic erroné [3 , 4]. Le deuxième défi est que les explorations complémentaires, notamment les biomarqueurs [5 , 6] et les examens d'imagerie [5 , 6 , 7 , 8], sont souvent peu concluantes et ne permettent pas de diagnostiquer suffisamment précisément l'endométriose à un stade précoce ou sont d'une pertinence limitée pour les formes sévères. Par conséquent, les stratégies thérapeutiques et de suivi sont compromises et le taux d'échec des traitements conventionnels est élevé [2 , 4]. Enfin, l'endométriose constitue un fardeau économique considérable pour le système de santé lié non seulement aux coûts directs mais aussi aux coûts indirects de l'absentéisme scolaire et professionnel. Globalement, le coût annuel de l'endométriose était estimé à environ 10 000 euros par patiente en 2012, soit l'équivalent de celui du diabète en France en 2017 [9 , 10 , 11 , 12 , 13].

Au cours de la dernière décennie, de nouveaux outils de diagnostic ont été étudiés pour détecter ce trouble invalidant le plus tôt possible [5 , 14 , 15 , 16 , 17 , 18]. Parmi celles-ci, l'analyse des microARN (miARN) apparaît comme une option prometteuse soutenue par un nombre croissant de preuves issues d'études sur le cancer et les troubles dégénératifs [19 , 20 , 21 , 22 , 23]. Les miARN humains sont des ARN monocaténaux hautement conservés et non codants composés de 21 à 25 nucléotides. Une liaison partielle à leur ARN messager complémentaire (ARNm) peut réguler la dégradation et la traduction des gènes. On estime qu'environ 60 % des gènes sont régulés par les miARN [24]. D'un point de vue biologique, les miARN sont principalement transcrits à partir de gènes dans les régions introniques des transcrits codants ou non codants [24 , 25 , 26]. Les miARN sont transcrits dans le noyau sous des centaines de miARN primaires duplex longs de nucléotides (pri-miARN) ensuite clivés pour générer des miARN précurseurs (pré-miARN). Ces pré-miARN sont ensuite transportés du noyau vers le cytoplasme, où les duplex sont clivés pour former des miARN matures, qui sont incorporés dans des complexes de silençage d'ARN (RISC) qui régulent les modifications post-traductionnelles en se liant à l'ARNm cible [24 , 25 , 26]. Enfin, les miARN sont libérés des cellules dans la circulation à l'aide de divers transporteurs, tels que l'Argonaute, la nucléophosmine 1, les lipoprotéines de haute densité ou les vésicules extracellulaires (exosomes), qui confèrent une stabilité remarquable contre les ARNs endogènes. Les miARN peuvent ensuite être détectés dans les fluides humains [24 , 25 , 26].

Dans le cadre spécifique de l'endométriose, plusieurs auteurs ont évalué la pertinence d'une signature sanguine miARN, mais les résultats sont discordants en raison de problèmes méthodologiques et de groupe témoin [19 , 20 , 22 , 23 , 27 , 28]. En effet, dans les études précédentes, les groupes témoins étaient composés de patientes asymptomatiques et/ou de patientes subissant une ligature des trompes et/ou une maladie inflammatoire pelvienne et/ou des troubles gynécologiques mais sans connaissance des symptômes [19 , 20 , 22 , 23].

De même, l'analyse des miARNomes salivaires a été étudiée par plusieurs équipes explorant des biomarqueurs pour de nombreuses affections bénignes et malignes mais jamais dans le contexte de l'endométriose [29 , 30 , 31 , 32].

Par conséquent, l'objectif de l'étude prospective ENDO-miARN était d'analyser le miRNome humain pour différencier les patientes avec et sans endométriose, afin de définir une signature diagnostique de miARN basée sur la salive pour l'endométriose avec une validation croisée interne.

2. Matériel et méthodes

2.1. Déclaration d'éthique

Les données et la salive utilisées pour l'analyse ont été recueillies à partir de l'étude prospective ENDO-miRNA (Identifiant [ClinicalTrials.gov](https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT04728152) : NCT04728152) sous le protocole de recherche ID RCB : 2020-A03297-32. Le consentement éclairé a été obtenu de tous les participants. L'étude et l'analyse des données ont suivi les directives de déclaration des normes de déclaration de l'exactitude diagnostique (STARD) [33] ([annexe S1](#)). L'étude comportait deux parties : (i) identification d'un biomarqueur basé sur le profilage de l'expression de miARN à l'échelle du génome par séquençage de petits ARN à l'aide du séquençage de nouvelle génération (NGS) et (ii) développement d'une signature diagnostique de miARN basée sur la salive en fonction de l'expression et profilage de précision à l'aide d'un algorithme ML [17 , 21 , 34 , 35 , 36 , 37 , 38 , 39 , 40 , 41 , 42].

2.2. Population étudiée

L'étude prospective ENDO-miARN comprenait 200 échantillons de salive prélevés sur des femmes souffrant de douleurs pelviennes chroniques évocatrices d'endométriose. Tous les échantillons de salive ont été prélevés entre janvier et juin 2021. Tous les patients ont bénéficié soit d'une procédure laparoscopique (coelioscopie thérapeutique ou diagnostique) et/ou d'une imagerie

IRM [5 , 6 , 7 , 8]. Les procédures laparoscopiques ont été systématiquement filmées puis analysées par deux opérateurs (CT, YD), en aveugle des symptômes et des résultats d'imagerie, pour confirmer la présence ou l'absence d'endométriose. Pour les patients qui ont subi une laparoscopie, le diagnostic a été confirmé par l'histologie. Pour les patients diagnostiqués avec une endométriose sans évaluation laparoscopique, tous avaient une IRM avec des caractéristiques d'endométriose profonde avec atteinte colorectale et/ou des endométriomes confirmés par deux radiologues experts. Les miARN ont été analysés en aveugle aux résultats chirurgicaux et d'imagerie. Après exploration par laparoscopie ou IRM, les femmes ont été classées en deux groupes : un groupe d'endométriose et un groupe témoin de femmes atteintes de diverses pathologies bénignes autres que l'endométriose ou présentant des symptômes évocateurs d'endométriose mais sans signes cliniques ou IRM et sans lésions d'endométriose retrouvées lors de l'examen laparoscopique (patiente complexe). L'organigramme de l'étude est présenté dans [Figure 1](#) . Les patientes atteintes d'endométriose ont été stratifiées selon la classification révisée de l'American Society of Reproductive Medicine (rASRM) [43] .

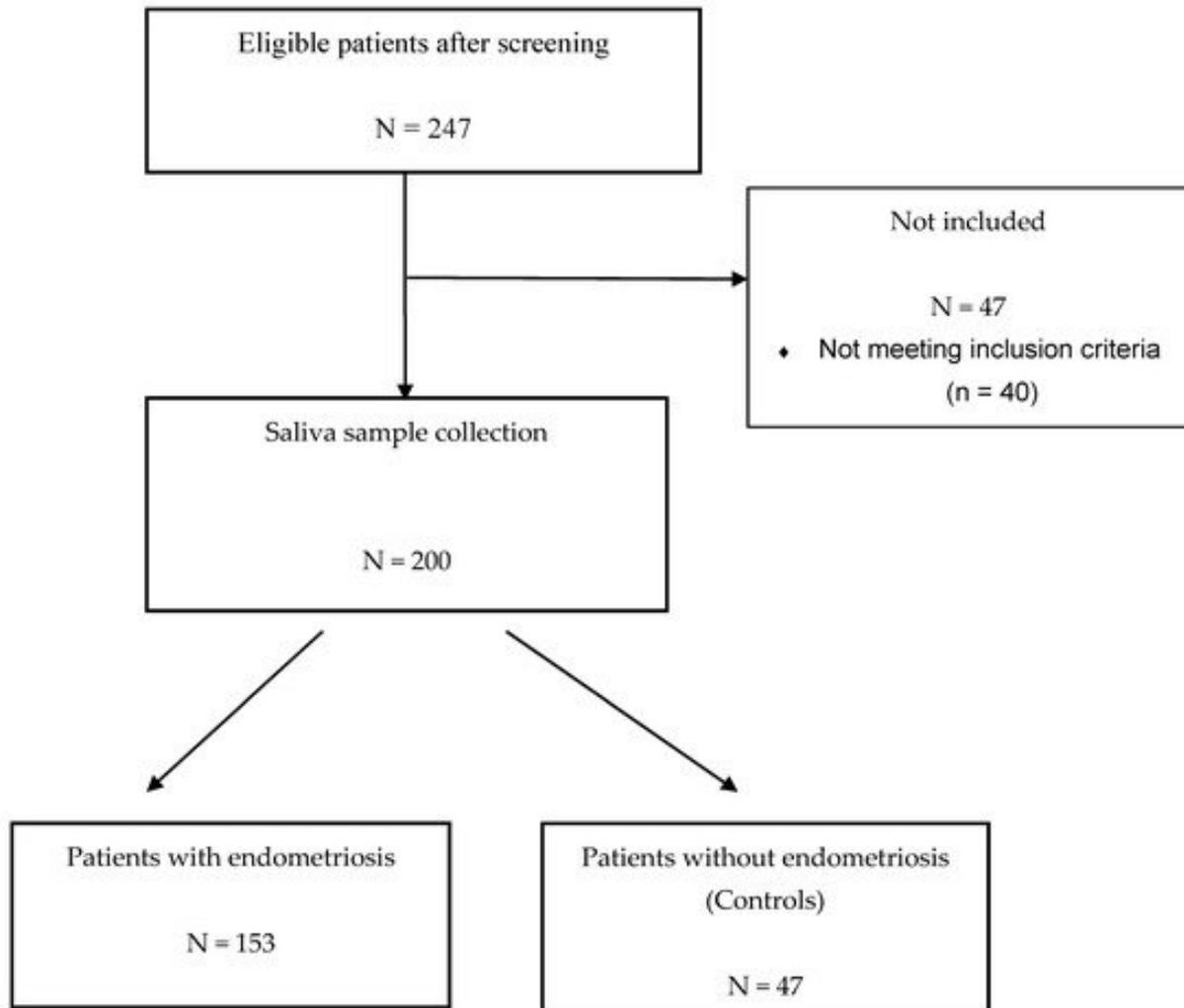


Figure 1. Organigramme de l'étude ENDO-miARN.

2.3. Prélèvement d'échantillons de salive

Les échantillons de salive (2 mL) ont été recueillis dans un système tout-en-un comprenant une solution de stabilisation d'acide nucléique pour la collecte, la stabilisation et le transport (RE-100, DNA Genotek Inc., 2 Beaverbrook Road, Ottawa, ON, Canada) à l'aide d'un kit à domicile (<https://www.dnagenotek.com/us/products/collection-infectious-disease/OME-505.html>, consulté le 1er décembre 2021). Tous les échantillons ont été conservés à température ambiante avant expédition.

2.4. Extraction, préparation et contrôle qualité des échantillons d'ARN

L'ARN a été isolé de chaque échantillon de salive à l'aide du kit miRNeasy (Qiagen, Inc., Germantown, MD, USA) conformément aux instructions du fabricant [29 , 31 , 44 , 45]. La qualité de l'ARN a été évaluée à l'aide du TapeStation 2200 d'Agilent Technologies. Les bibliothèques de séquençage d'ARN ont été préparées à l'aide du kit QIAseq miRNA Library Kit (Qiagen) conformément aux instructions du fabricant. Les échantillons ont été indexés par lots de 96, avec une

profondeur de séquençage ciblée de 17 millions de lectures par échantillon. Le séquençage a été effectué à l'aide de lectures à extrémité unique de 100 bases, à l'aide d'un séquenceur Novaseq6000 (Illumina, San Diego, CA, États-Unis) [46 , 47].

3. Bioinformatique

3.1. Prétraitement des données brutes (lectures brutes, filtrées, alignées) et qualité

Les lectures de séquençage ont été traitées à l'aide du pipeline de traitement des données. Les fichiers FastQ ont été découpés pour supprimer les séquences d'adaptation à l'aide de la version v. 1.18 de Cutadapt et ont été alignés à l'aide de la version 1.1.1 de Bowtie avec les bases de données de transcriptome suivantes : le génome de référence humain disponible auprès du NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/guide/human/> , consulté le 1er décembre 2021) et miRBase21 (miARN) en utilisant le package MirDeep2 v0.1.0. La qualité des données de séquençage brutes a été évaluée à l'aide du logiciel FastQC v0.11.7 [40 , 44 , 46 , 48 , 49 , 50].

3.2. Analyse d'expression différentielle des miARN

L'expression des miARN a été quantifiée par miRDeep2 v0.1.0 [51]. Des tests d'expression différentielle ont ensuite été effectués dans DESeq2 pour les miARN avec un nombre de lectures dans ≥ 1 des échantillons. DESeq2 V1.20 intègre des avancées méthodologiques avec plusieurs nouvelles fonctionnalités pour faciliter une analyse plus quantitative des données comparatives d'ARN-seq à l'aide d'estimateurs de retrait pour la dispersion et le changement de pli [52]. La matrice résultante a été filtrée pour les miARN exprimés [53]. Les miARN ont été considérés comme exprimés de manière différentielle si la valeur absolue du changement de facteur \log_2 était $> 1,5$ (régulé positivement) et $< 0,5$ (régulé négativement). La valeur p ajustée pour les tests multiples était $< 0,05$ [52]. L' [annexe S2](#) résumé et adapté le pipeline d'analyse de séquençage miRNA-nome utilisé à partir des méthodes de Potla et al. [44].

4. Analyse statistique

4.1. Développement et validation du modèle de diagnostic

Random Forest (RF) a été considéré pour concevoir la signature de la salive [34 , 35 , 36 , 37 , 54 , 55 , 56]. Le classificateur Random Forest (RF) est une méthode d'ensemble qui forme plusieurs arbres de décision (DT) en parallèle avec un bootstrap suivi d'une agrégation, communément appelée bagging. L'amorçage indique que plusieurs DT individuels sont entraînés en parallèle sur divers sous-ensembles d'un ensemble de données d'entraînement à l'aide de différents sous-ensembles de fonctionnalités disponibles. L'amorçage garantit que chaque DT individuel dans le RF est unique, ce qui réduit la variance globale du classificateur RF. Pour la décision finale, le classificateur RF agrège les décisions des DT individuels et présente par conséquent une bonne généralisation [54]. Le score F1, la sensibilité, la spécificité et le ROC AUC ont été calculés pour évaluer et comparer les performances diagnostiques de la signature diagnostique [57 , 58].

4.2. Validation de l'exactitude de la signature

L'exactitude et la reproductibilité de la signature ont été testées sur 10 ensembles de données au hasard [41 , 59 , 60] composés de la même proportion de patients témoins et d'endométriose. Chaque ensemble de données a été généré aléatoirement pour conserver le ratio initial d'endométriose et le profil de la patiente témoin. L'analyse a été effectuée à l'aide de Python (Python Software Foundation) avec les packages XGBoost 1.3.3, scikit-learn 0.19.1 et scipy 1.1.

4.3. Autres analyses statistiques

L'analyse statistique était basée sur le test du chi carré, le cas échéant pour les variables catégorielles. Les valeurs de $p < 0,05$ ont été considérées comme dénotant des différences significatives. Les données ont été gérées avec une base de données Excel (Microsoft, Redmond, WA, USA) et analysées à l'aide du logiciel R 2.15, disponible en ligne (<http://cran.r-project.org/> , consulté le 1er décembre 2021).

5. Résultats

5.1. Description de la cohorte ENDO-miARN

Les caractéristiques cliniques des patientes des groupes endométriose et témoin sont présentées dans le [tableau 1](#) . Parmi les 200 patientes, 76,5 % ($n = 153$) ont reçu un diagnostic d'endométriose et 23,5 % ($n = 47$) sans (témoins). Dans le groupe contrôle, 51% (24) des femmes ne présentaient aucune anomalie et étaient définies comme des patientes discordantes ou complexes ([Tableau 1](#)). Il n'y avait pas de différences significatives en termes d'âge ou d'IMC entre les groupes. Le temps moyen (\pm ET) entre l'apparition des symptômes et le diagnostic chez les patientes

atteintes d'endométriose était de 14,8 ans ($\pm 17,88$). Dans les deux groupes, les patientes présentaient des symptômes douloureux évocateurs d'endométriose. Comparativement, pour les patientes avec et sans endométriose à l'aide de l'échelle visuelle analogique (EVA), la dysménorrhée/ de la dysménorrhée (moyenne \pm ET) était de $6 \pm 3,4$ contre $5 \pm 3,2$, $p < 0,001$; la dyspareunie était de $5,28 \pm 3,95$ contre $4,95 \pm 3,52$, $p < 0,001$; et les douleurs urinaires pendant les menstruations (moyenne \pm ET) étaient de $4,35 \pm 3,36$ versus $2,84 \pm 2,76$, $p < 0,001$. Pour les patientes atteintes d'endométriose, 52 % (80) avaient le stade rASRM I-II et 48 % (73) avaient le stade III-IV.

Tableau 1. Caractéristiques démographiques de la population.

5.2. Présentation globale du transcriptome des miARN

Un petit ARN-seq de 200 échantillons de salive a donné environ 4,642 millions de lectures de séquençage brutes (de $\sim 13,7$ millions à $\sim 39,3$ millions de lectures/échantillon). Les étapes de préfiltrage et de filtrage ont conservé 70 % ($\sim 3,205$ M) des lectures brutes initiales. La majorité des lectures filtrées étaient de courte durée. La quantification des lectures filtrées et l'identification des miARN connus ont produit des séquences d'environ 190 M qui ont été cartographiées sur 2561 miARN connus de la miRBase v21. Le nombre de miARN exprimés variait de 1250 (valeur aberrante) à 2561 par échantillon. La distribution des miARN exprimés dans les 200 échantillons de salive et la composition globale des lectures traitées sont illustrées à la [figure 2](#).

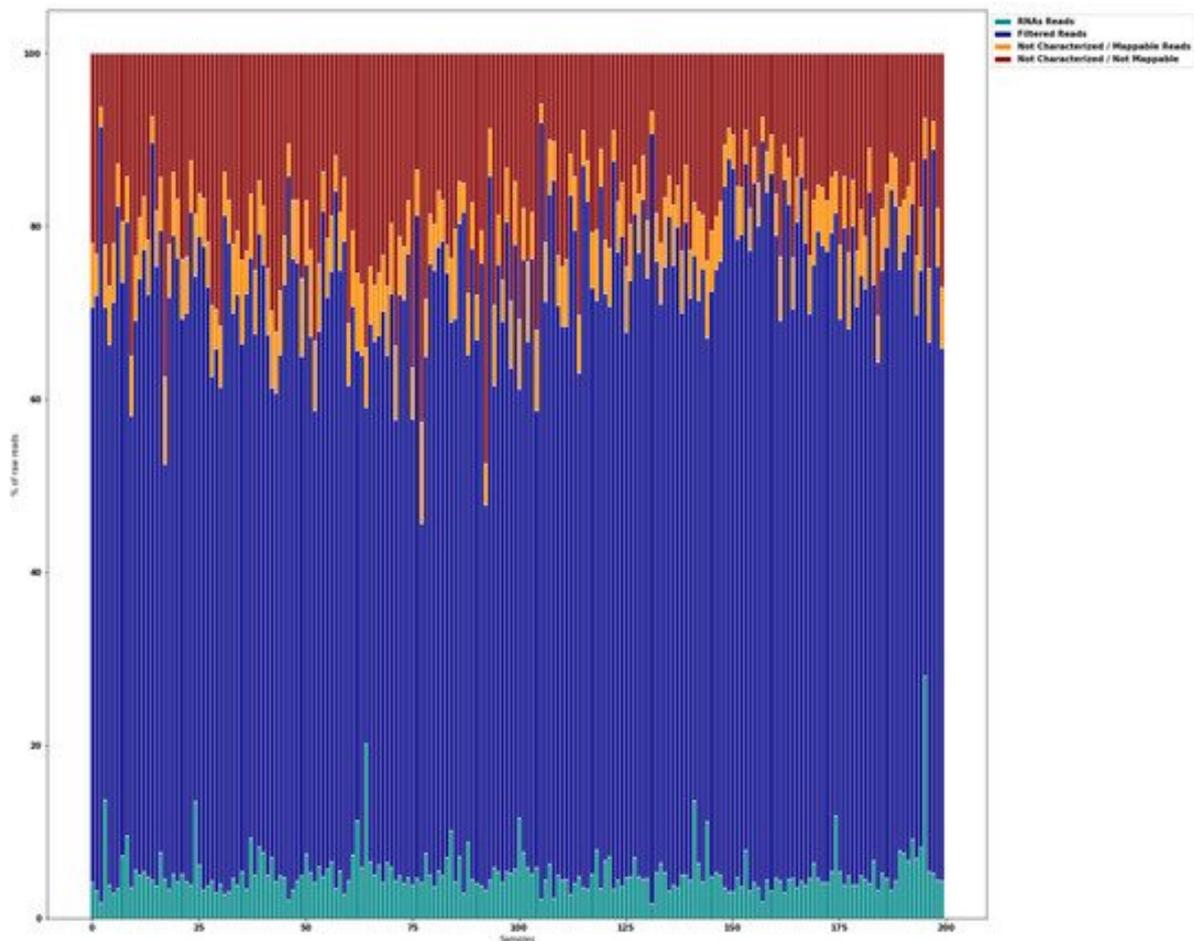


Figure 2. Composition globale des lectures traitées. Lectures d'ARN, miARN + piARN + ARNr + ARNt + ARNm + autres ; Lectures filtrées, lectures sans adaptateurs + lectures avec des bases de mauvaise qualité + lectures trop courtes ; Lectures non caractérisées/mappables, lectures mappées à GRCh38 qui n'ont pas pu être caractérisées comme un type particulier ; Lectures non caractérisées/non mappables, lectures qui n'ont pas pu être mappées.

5.3. Caractéristique Sélection de miARN pertinents pour un diagnostic d'endométriiose

L'expression et la précision des profils de miARN ont été utilisées pour identifier les miARN liés à l'endométriiose. Sur les 2561 miARN connus, la méthode de sélection des caractéristiques a généré un sous-ensemble de 109 miARN. La corrélation et la précision respectives pour diagnostiquer l'endométriiose en fonction du score F1, de la sensibilité, de la spécificité et de l'ASC variaient de 18,9 à 87,7 %, 11,6 à 99,4 %, 8,5 à 97,9 % et 36,9 à 69,2 %, respectivement. Parmi les 109 miARN sélectionnés, 79 % (n = 86) et 21 % (n = 23) avaient une valeur AUC < 60 et ≥ 60 % pour la corrélation et la précision, respectivement ; 83 % (n = 91) et 17 % (n = 18) avaient un score F1 compris entre 0 et 79 % et ≥ 80 %, respectivement ; 83 % (n = 91) et 17 % (n = 18) avaient une sensibilité comprise entre 0 et 79 % et ≥ 80 %, respectivement ; et 83 % (n = 91) et 17 % (n = 18) avaient une spécificité comprise entre 0 et 79 % et ≥ 80 %, respectivement. Finalement, [L' annexe S3](#) résume la précision diagnostique des 109 miARN sélectionnés dans la signature.

5.4. Signature diagnostique basée sur la salive pour l'endométriiose

La performance globale de la signature diagnostique composée de 109 mi ARN (modèle Random Forest) par rapport aux 10 ensembles de données randomisés est rapportée dans le [tableau 2](#) . La sensibilité, la spécificité et l'ASC varient de 80 % à 96,8 %, de 80 % à 100 % et de 79,9 % à 98,4 %, respectivement. La signature, après validation croisée interne sur 10 jeux de données différents, a obtenu sa plus grande précision avec une sensibilité, une spécificité et une AUC respectives de 96,7 %, 100 % et 98,3 % ([Tableau 2](#)).

Tableau 2. Précisions de la forêt aléatoire pour le diagnostic de l'endométriiose.

5.5. Relation entre la physiopathologie de l'endométriiose et l'expression des miARN

Parmi les 109 miARN composant la signature diagnostique de l'endométriiose, 77 % (84) ont été associés à des voies physiopathologiques de troubles bénins et malins ([Annexe S3](#)). Seuls miR-34c-5p et miR-19b-1-5p ont déjà été rapportés dans le domaine de l'endométriiose. Parmi les 109 mi ARN de la signature, 29 (27%) sont associés aux principales voies de signalisation de l'endométriiose : PI3K/Akt, PTEN, Wnt/β-caténine, HIF1α/NF κB, et YAP/TAZ/EGFR ([Annexe S3](#)).

6. Débat

Au meilleur de notre connaissance, l'étude ENDO-miARN est la première étude prospective à rapporter une signature de miARN diagnostique basée sur la salive pour l'endométriiose. Cela pourrait contribuer à améliorer le diagnostic précoce au moyen d'un outil non invasif facilement disponible dans tout système de santé. Son intérêt réside dans la combinaison de la qualité intrinsèque des miARN pour condenser les phénotypes de l'endométriiose (et son hétérogénéité) et du pouvoir de modélisation de l'IA. Sa reproductibilité est basée sur notre approche bioinformatique d'analyse de séquençage de miARN et une approche statistique conçue pour surmonter la complexité et l'hétérogénéité de l'endométriiose.

Nous avons émis l'hypothèse qu'une signature de miARN basée sur la salive pour l'endométriiose serait une méthode peu coûteuse et évolutive permettant de collecter des échantillons n'importe où par n'importe qui. L'outil serait ainsi disponible pour les populations défavorisées contrairement aux méthodes basées sur les prélèvements sanguins, dépendantes du volume sanguin et de la température, imposant une logistique complexe de prélèvement du sang périphérique et de son acheminement vers un laboratoire pour analyse.

La salive est un fluide corporel de plus en plus attractif dans la recherche de biomarqueurs de maladies [[29](#) , [30](#) , [31](#) , [32](#) , [45](#) , [61](#)]. Les miARN présentent une stabilité remarquable dans des conditions sévères, telles qu'un stockage prolongé [[24](#) , [29](#) , [32](#) , [62](#)]. Zheng et al. ont démontré que la salive n'est pas affectée par la coagulation qui pourrait induire une libération de miARN. Ceci est particulièrement crucial car de nombreuses études évaluant l'expression des miARN dans l'endométriiose ont été réalisées sur du sérum [[23](#) , [61](#)]. Zhang et al. a d'abord développé une technique pour stabiliser la salive et traiter l'analyse de l'ARN. La plage moyenne de teneur en ARN dans 1 L de fluides corporels va de 0,01 mg dans l'urine à 11,2 mg dans la salive [[63](#)]. De plus, le sang, les leucocytes et la salive ont des écarts-types inférieurs dans leur teneur en ARN (<50 % en moyenne) par rapport au sérum et à l'urine. La concentration moyenne des ARN isolés de tous les fluides corporels peut être classée en élevée (> 20 ng/μL) pour le sang, les leucocytes, la salive et la salive acellulaire et faible (< 10 ng/μL) pour le plasma, le sérum, l'urine , et de l'urine acellulaire. Enfin,

plus de 90 % des miARN de la salive sont partagés avec le sang, les leucocytes et le plasma, ce qui renforce encore sa stabilité et sa reproductibilité [63].

Dans le cadre spécifique de l'endométriose, et malgré les différents phénotypes de l'endométriose, nous avons pu construire une signature diagnostique de l'endométriose. La signature la plus précise de notre modèle fournit une sensibilité, une spécificité et une ASC de 96,7 %, 100 % et 98,3 %, respectivement. Ces valeurs témoignent de la grande précision de la signature, confortant sa valeur clinique, et posent la question de réviser la stratégie diagnostique actuelle d'exploration des patientes présentant des symptômes évocateurs d'endométriose, basée sur une laparoscopie diagnostique.

Plusieurs biomarqueurs diagnostiques ont été suggérés comme tests de dépistage et de triage pour diagnostiquer l'endométriose [14 , 15], mais aucun d'entre eux n'est suffisamment précis, c'est-à-dire une sensibilité de 0,94 et une spécificité de 0,79 [5 , 14 , 15]. Conformément au groupe de travail sur les définitions des biomarqueurs de 2011, un biomarqueur est « une caractéristique qui peut être objectivement mesurée et évaluée comme un indicateur de processus biologiques ou pathogènes normaux, ou comme un indicateur de réponse pharmacologique à des interventions thérapeutiques » [64]. La présente étude a été en mesure de quantifier et d'analyser le miRNAome pour (i) des patientes discordantes/complexes (femmes souffrant de douleurs pelviennes chroniques évocatrices d'endométriose et présentant à la fois des résultats d'examen clinique et d'imagerie négatifs), (ii) des femmes atteintes d'un stade précoce (stade I– II rASRM) et endométriose de stade avancé (stade III-IV rASRM), et (iii) les femmes présentant d'autres troubles gynécologiques partageant les symptômes de l'endométriose. Pour souscrire aux critères des biomarqueurs, nous avons émis l'hypothèse de la pertinence de l'évaluation exhaustive de tous les miARN associés à l'endométriose pour 200 échantillons de salive pour déceler la complexité de la maladie et son hétérogénéité. A notre connaissance, il s'agit du premier séquençage exhaustif du miRNAome salivaire humain dans le contexte spécifique de l'endométriose, et nous montrons que 97,3 % de tous les miARN sont détectables dans la salive avec une stabilité homogène des lectures. Notre analyse a abouti à la sélection d'un ensemble de 109 miARN testés de manière robuste.

Plusieurs études ont rapporté une expression aberrante des miARN dans les tissus affectés ou des échantillons de sang périphérique de patientes atteintes d'endométriose [20 , 22 , 23 , 62 , 63 , 64]. Il a été démontré que plusieurs miARN sont dérégulés au cours du processus pathogène de l'endométriose [20 , 22 , 23]. Le pouvoir diagnostique de plusieurs miARN a été évalué dans l'endométriose [19 , 20 , 22 , 23 , 65]. Par exemple, Maged et al. ont montré que miR-122 et miR-199a sériques avaient une sensibilité de 95,6 et 100,0 % et une spécificité de 91,4 et 100 %, respectivement, pour le diagnostic de l'état de la maladie chez les femmes. Ainsi, ces miARN sont des biomarqueurs sériques putatifs de l'endométriose [66]. A ce jour, Moustafa et al. [65] est la seule équipe à avoir tenté de construire une signature diagnostique de miARN basée sur le sang pour l'endométriose composée de six miARN basée sur l'analyse Random Forest. En accord avec des études antérieures [40 , 41 , 42], il semblerait illusoire que si peu de miARN puissent refléter la diversité d'un trouble multifactoriel comme l'endométriose, qui implique des voies de signalisation multiples et mal connues. Par conséquent, nous avons émis l'hypothèse de la valeur de (i) l'analyse d'une sélection spécifique de miARN, qui a abouti à une sélection de 109 ; (ii) réduire le nombre de caractéristiques pour améliorer la précision finale ; et enfin, (iii) en utilisant le modèle Random Forest avec une grande précision, ce qui soutient la valeur de la technologie de l'IA. Une telle approche a déjà été validée dans une étude montrant qu'une signature sanguine de 100 miARN était suffisamment stable pour fournir presque la même précision de classification sur différents types de cancers et plates-formes [40 , 41]. Des études antérieures ont démontré que l'analyse de l'expression des miARN dans la salive peut différencier la maladie de Crohn de la colite ulcéreuse et sont utiles dans les cancers de la tête et du cou, des voies pancréatiques-biliaires et de la bouche, mais n'ont pas rapporté de véritable signature diagnostique [29 , 31]. Néanmoins, Rapado-González et al. ont rapporté une signature miARN salivaire composée de 22 miARN chez des patients atteints de cancer colorectal vs des individus sains en phase de découverte [30]. De plus, Cheng et al. ont démontré la pertinence de l'expression salivaire des miARN pour diagnostiquer la déficience en Yang et en Yin avec un panel de 81 et 96 miARN, respectivement [67].

D'un point de vue physiopathologique, après revue systématique, parmi les 109 miARN de notre signature d'endométriose, seuls quatre miARN (miR-34c-5p, miR-19b-1-5p, miR-149-5p et miR-378a-3p) ont déjà été signalés chez des patientes atteintes d'endométriose ; 25 n'ont pas été signalés auparavant, ce qui implique que d'autres études devraient être menées pour confirmer leur implication dans la physiopathologie de l'endométriose ; et les 80 autres sont connus pour être impliqués dans diverses voies de signalisation, telles que PI3K/Akt, PTEN, Wnt/ β -caténine, HIF1 α /NF κ B et YAP/TAZ/EGFR, avec des implications thérapeutiques potentielles.

Certaines limites de la présente étude méritent d'être discutées. Premièrement, bien que 97,3 % des miRNAomes humains aient été détectables et analysés dans les échantillons de salive, nous ne pouvons pas exclure que les 2,7 % de miARN restants ne soient pas impliqués dans

l'endométriose. Deuxièmement, comme pour les prélèvements sanguins, un biais potentiel pourrait être lié à l'utilisation d'un traitement hormonal : certaines patientes du groupe endométriose et du groupe témoin avaient déjà subi un traitement hormonal qui aurait pu affecter l'expression des miARN. Cependant, des études antérieures [19 , 65] ont rapporté qu'aucune modification significative des miARN n'est observée pendant le cycle menstruel ou en réponse aux thérapies hormonales stéroïdes sexuelles [19]. Enfin, comme mentionné précédemment pour la signature sanguine des miARN, un autre biais potentiel pourrait être lié à l'inclusion de patientes atteintes d'endométriose profonde et/ou d'endométriome sans contrôle laparoscopique dans le groupe endométriose. Cependant, des études antérieures ont démontré la grande précision de l'IRM pour diagnostiquer l'endométriome et l'endométriose profonde avec atteinte colorectale, atteignant les critères d'un test de remplacement et de triage SnNout [5 , 7]. Cependant, notre étude prospective est la plus importante disponible sur les miARN et la salive (n = 200) [61], la taille de l'échantillon, notamment concernant le groupe témoin (n = 47), et la validation croisée interne justifient une validation externe. Notre signature présente une plus grande précision chez les patients de plus de 18 ans et notre population n'incluait pas les adolescents. Par conséquent, il n'est pas possible d'extrapoler nos résultats dans cette population spécifique, dans l'attente d'autres études.

7. Conclusions et Perspectives

Malgré certaines limites de l'étude prospective actuelle, nos données soutiennent l'utilisation d'une signature miARN diagnostique basée sur la salive pour l'endométriose dans les parcours de soins diagnostiques après une validation externe pour confirmer ces résultats. Le prélèvement de salive est un processus bon marché et non invasif et peut être répété plusieurs fois, améliorant ainsi potentiellement la prise en charge diagnostique et thérapeutique des patients grâce à une identification précoce et pour toutes les populations. Enfin, au-delà du contexte de l'endométriose, notre méthodologie pourrait être utilisée comme modèle pour étudier d'autres pathologies, bénignes et malignes.