

Dicer, enzyme clef de l'interférence ARN :  
intérêt clinique dans les cancers du sein  
implication dans la réponse au stress réplicatif

---

**Soutenance de thèse**

**Gaël Grelier**

## Plan

---

### 1<sup>ère</sup> Partie

pourquoi APC/C peut-il jouer un rôle dans les cancers ?

APC/C marqueur d'agressivité des tumeurs

### 2<sup>ème</sup> Partie

régulation de l'hétérochromatine et interférence ARN

*dicer* au cours du cycle et dans les réponses aux cassures

### 3<sup>ème</sup> Partie

progression tumorale mammaire : hypothèses actuelles

importance de *dicer* dans les cancers du sein

## Introduction partie 1

---

# Pourquoi APC/C peut-il jouer un rôle dans les cancers ?



## Génome des cellules tumorales

---

Quelque soit le type de cancer



génotype caractérisé par une instabilité  
ou les conséquences d'une instabilité

mutations ponctuelles, amplifications, translocations,  
délétions, aneuploïdie...

## Instabilités génétiques

### Types d'instabilités génétiques :

mutation ponctuelle (PIN)

→ taux de mutations élevé

microsatellitaire (MSI)

→ nombre anormal de répétitions microsatellitaires

chromosomiques (CIN)

→ anomalies de structure et de nombre des chromosomes

## Origine des instabilités CIN

Origine possible des instabilités CIN ?

dérégulation des points de contrôle du cycle cellulaire

Point de contrôle du fuseau mitotique (MCP)

alignement des chromosomes

attachement microtubules-kinétochores

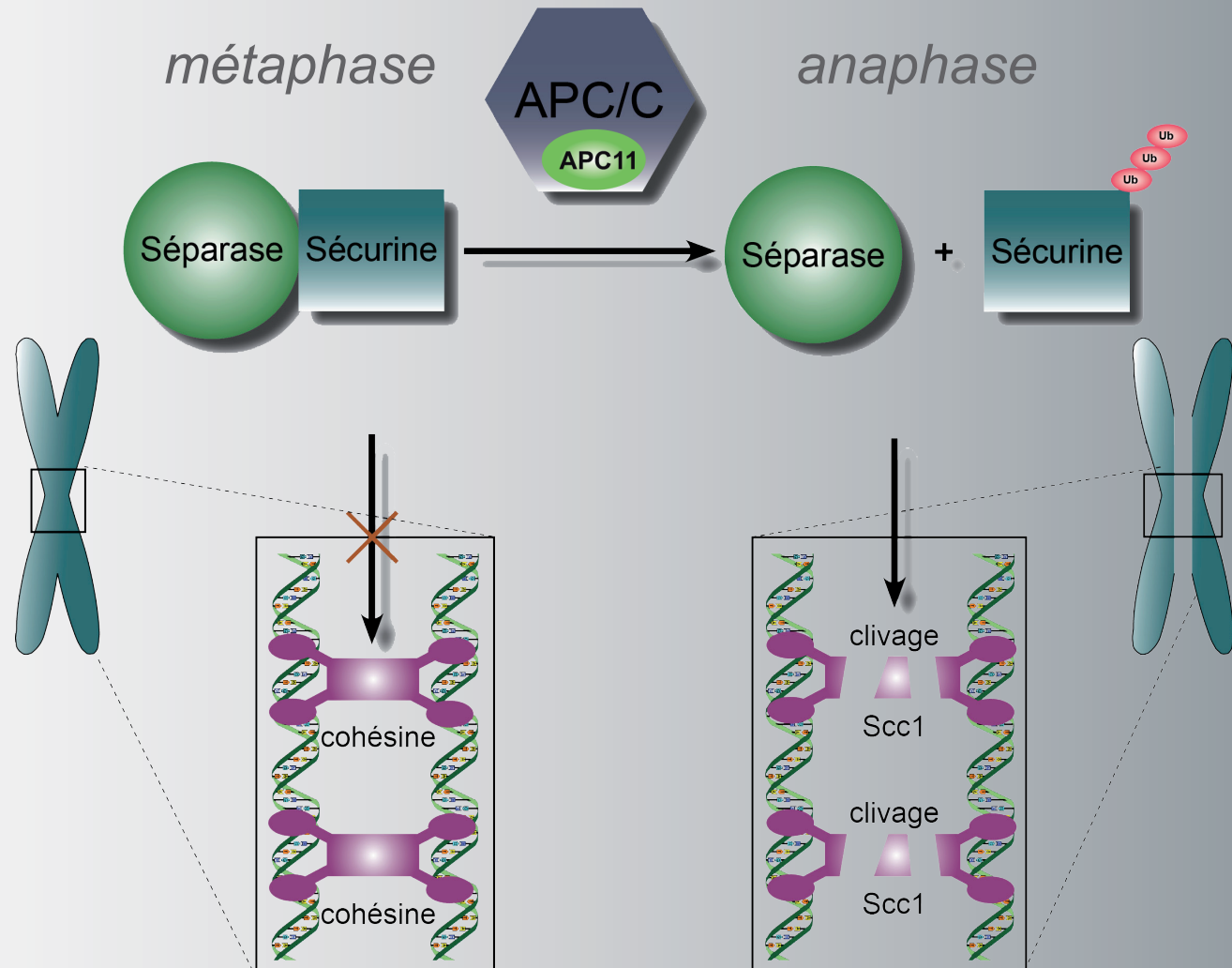
tension du fuseau mitotique

# Point de contrôle MCP (1/2)

## Transition métaphase-anaphase :

rôle primordial du complexe APC/C (Anaphase Promoting Complex / Cyclosome)

et de la structure péricentromérique des chromosomes = de l'hétérochromatine

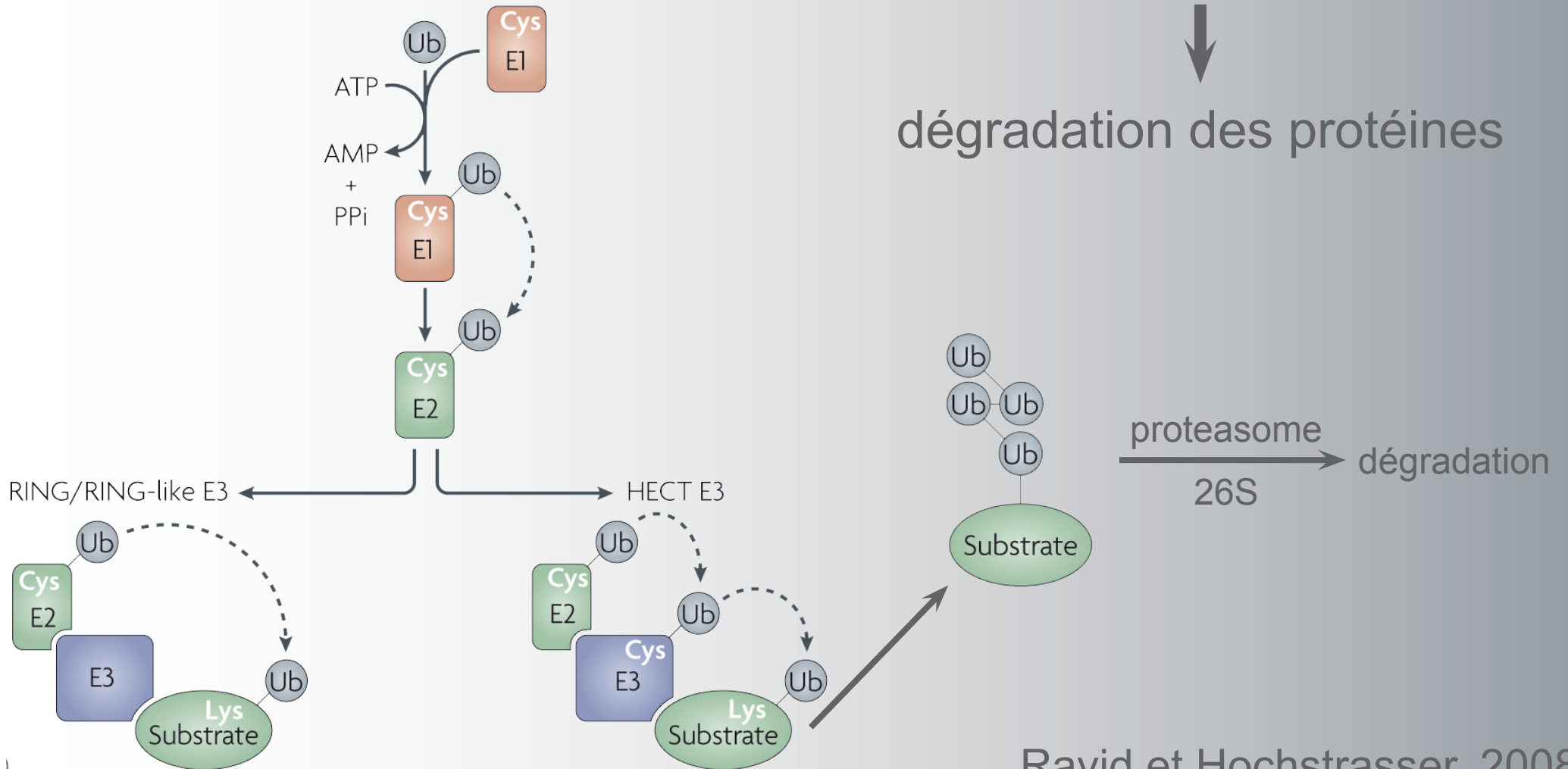


# Le complexe APC/C (1/2)

Fonction du complexe :

APC/C = E3 ubiquitine ligase

dégradation des protéines



Ravid et Hochstrasser, 2008



## Le complexe APC/C <sup>(2/2)</sup>

Structure du complexe :

11 sous-unités et 2 co-activateurs (Cdh1 et Cdc20/Fizzy)

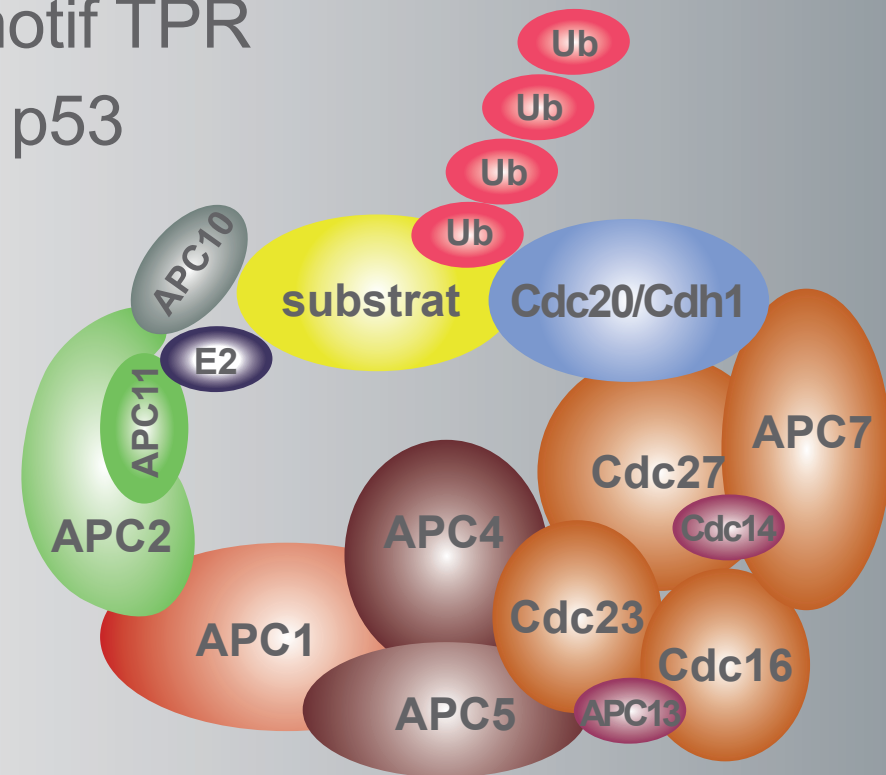
Cdc16, 23 et 27 : sous-unités à motif TPR

APC-5 et 7 : sous-unités régulant p53

APC-11 : sous-unité catalytique

Activités du complexe tout au long du cycle cellulaire

pourtant APC/C est peu étudié dans les cancers





## APC/C et cancers

### Mutations / délétions de Cdc20

- cancers du poumon *Singhal et al., 2003*
- cancers gastriques *Kim et al., 2005*
- cancers du pancréas *Li et al., 2003*

### Mutations de Cdc16 et Cdc23

- cancers du côlon *Wang et al., 2003*

Expression des sous-unités du complexe APC/C dans les cancers ?

## Résultats partie 1

---

# APC/C marqueur d'agressivité des tumeurs



## Objectifs de l'étude

Déterminer la pertinence de l'analyse de l'expression des gènes du complexe APC/C dans un but clinique

association entre expression et des caractéristiques biologiques ou clinicopathologiques ?

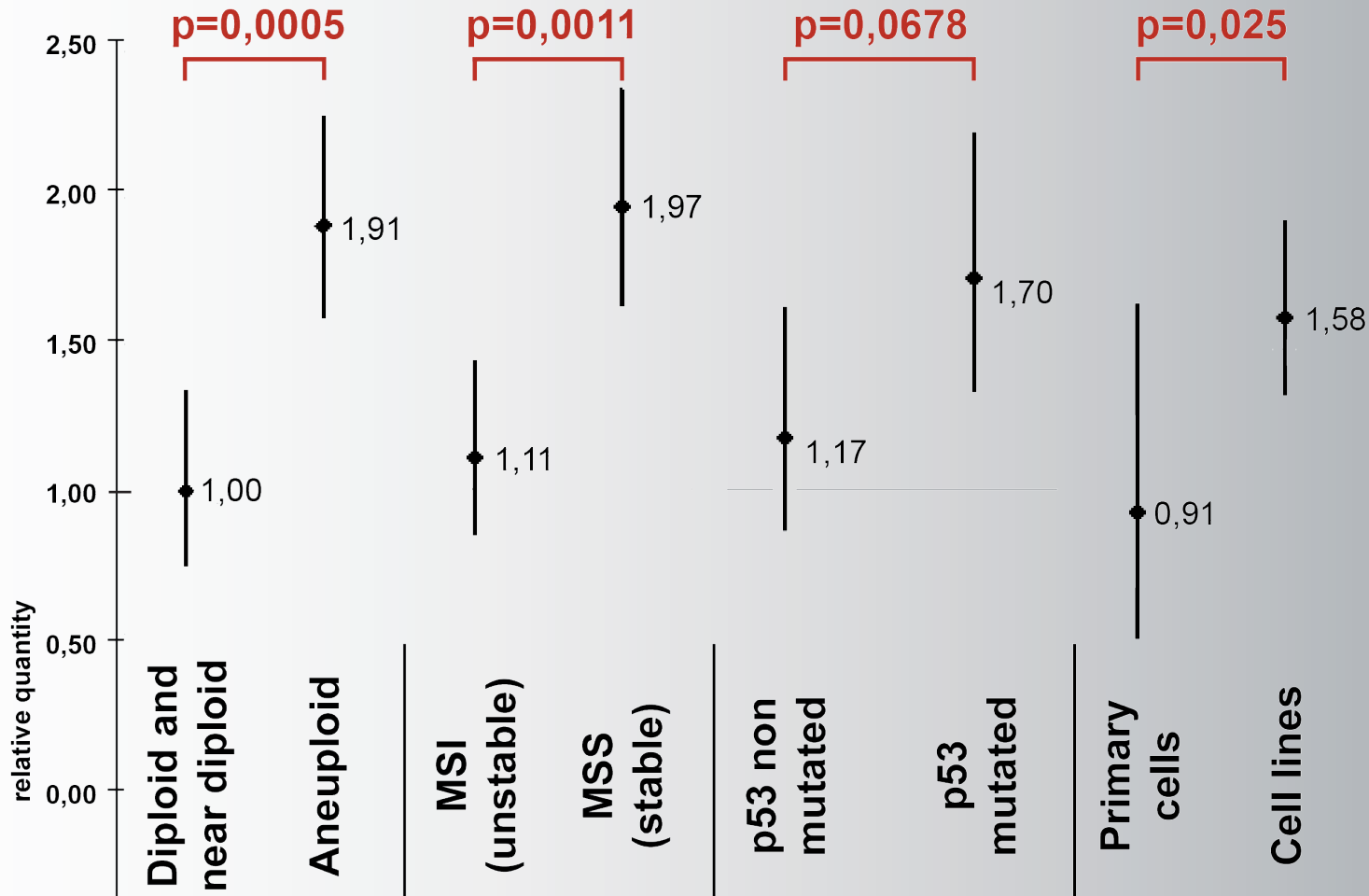
étude sur du matériel tumoral (lignées et biopsies) mammaire et colorectal

analyse de l'expression des gènes APC-5, APC-7, APC-11, Cdc16, Cdc23 et Cdc27



## Résultats lignées colorectales

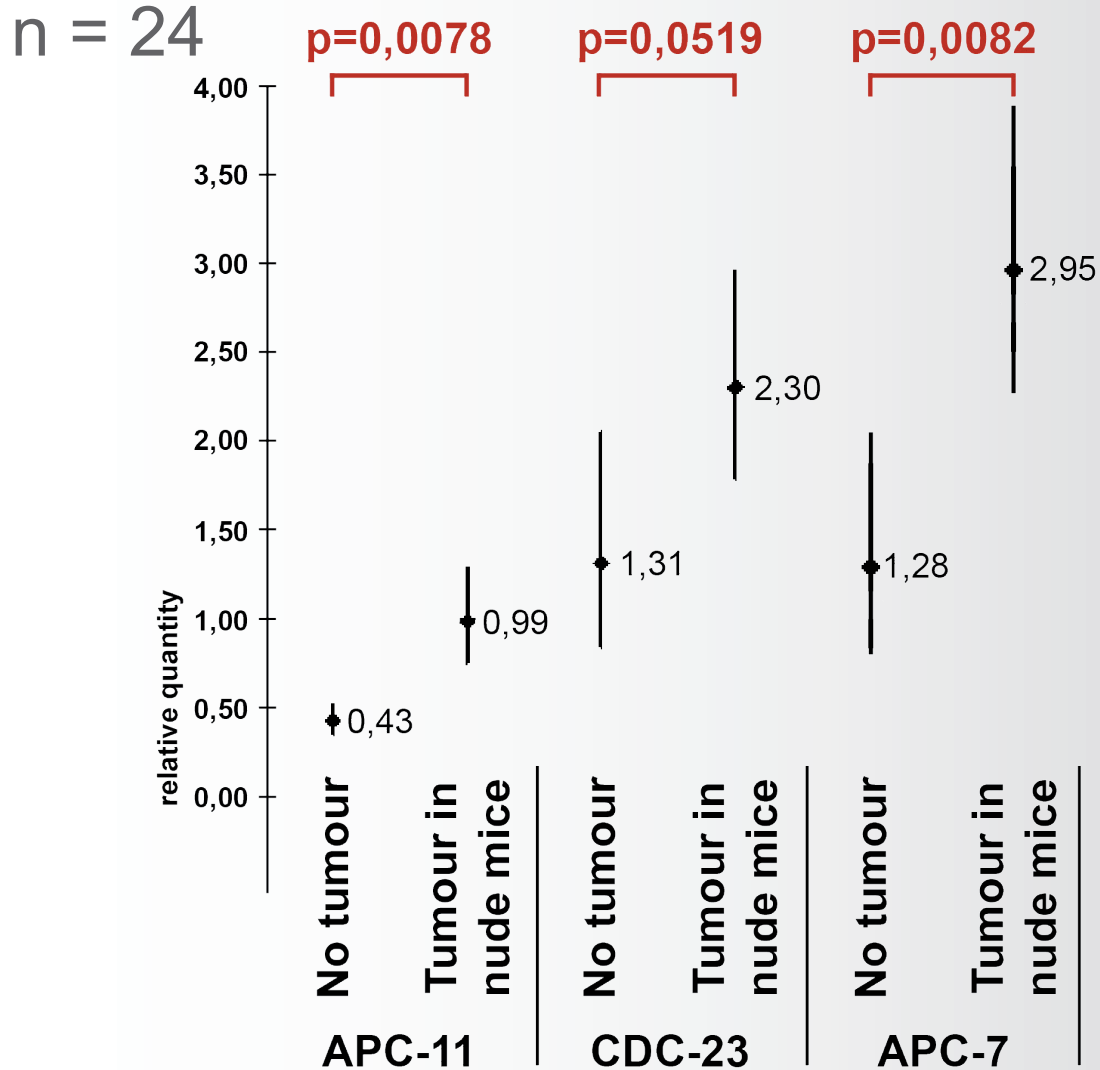
n = 21



surexpression de *APC-11* associée à l'agressivité des lignées, en particulier à l'aneuploidie

Grelier *et al.*, en prépa

# Résultats lignées mammaires

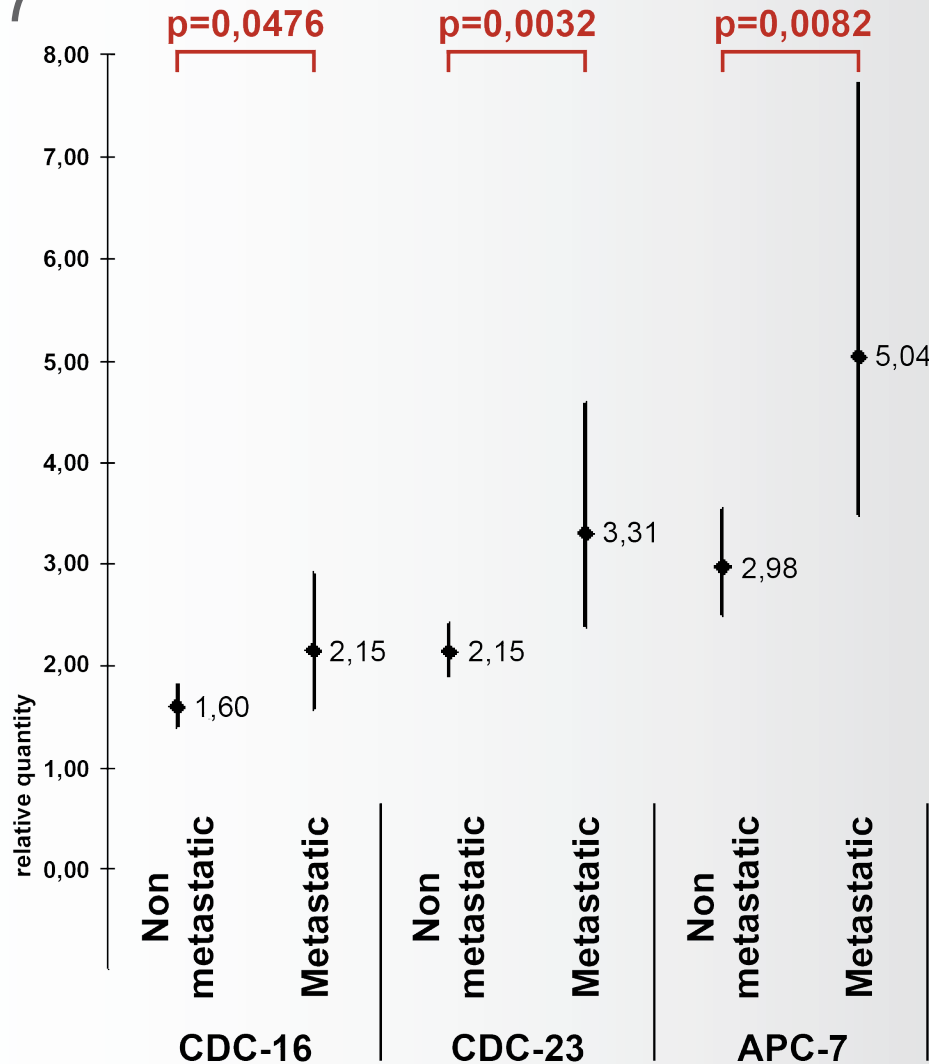


surexpression des gènes associée à la tumorigénicité des lignées

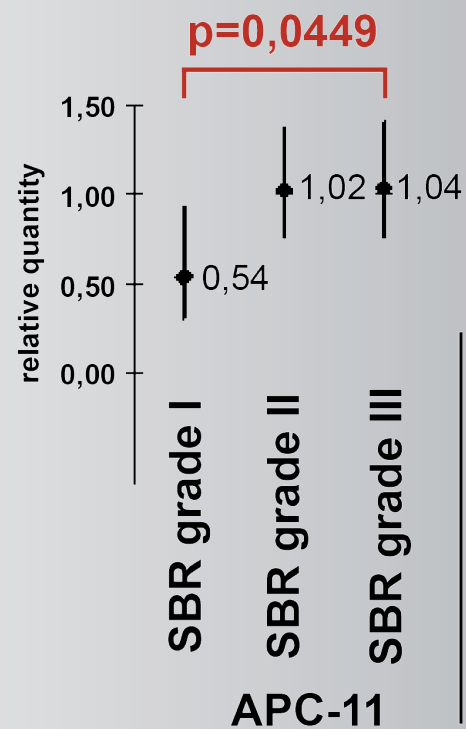
Grelier *et al.*, en prépa

# Résultats tumeurs mammaires

n = 117



surexpression de *Cdc16*, *Cdc23* et *APC-7* associée à la présence de métastases



surexpression de *APC-11* associée aux grades III

Grelier *et al.*, en préparation



## Conclusion / perspectives I

---

Surexpression des sous-unités du complexe APC/C associée à l'agressivité tumorale *in vitro* et *in vivo*

Prépondérance de la surexpression de *APC-11*

valeur pronostique de *APC-11* ?

ciblage thérapeutique ?



## Introduction partie 2

---

# Régulation de l'hétérochromatine et interférence ARN

## Structure chromosomique

Hétérochromatine constitutive :

télomérique

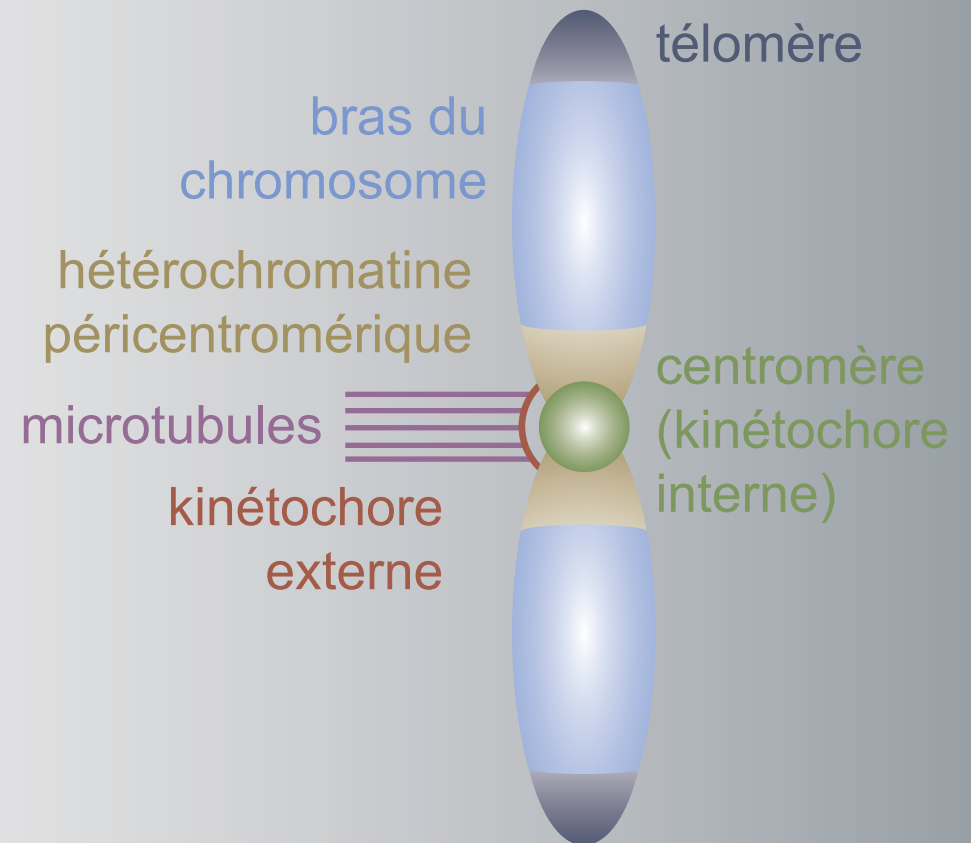
centromérique

péricentromérique

→ séquences satellites

→ histone H2A.X

→ méthylation



Dérégulation :

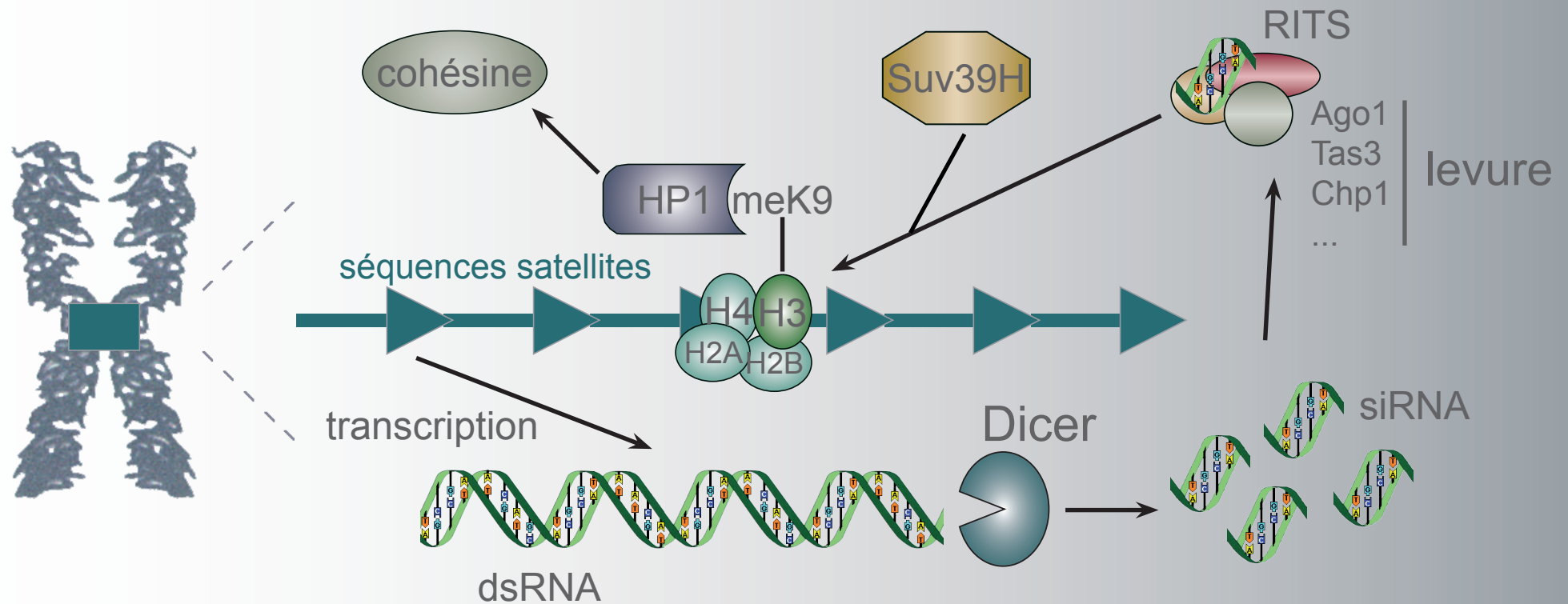
mitoses anormales

implication dans la cancérogenèse

# Hétérochromatine et iARN

Mise en place de l'hétérochromatine :

implication récente du mécanisme d'interférence ARN



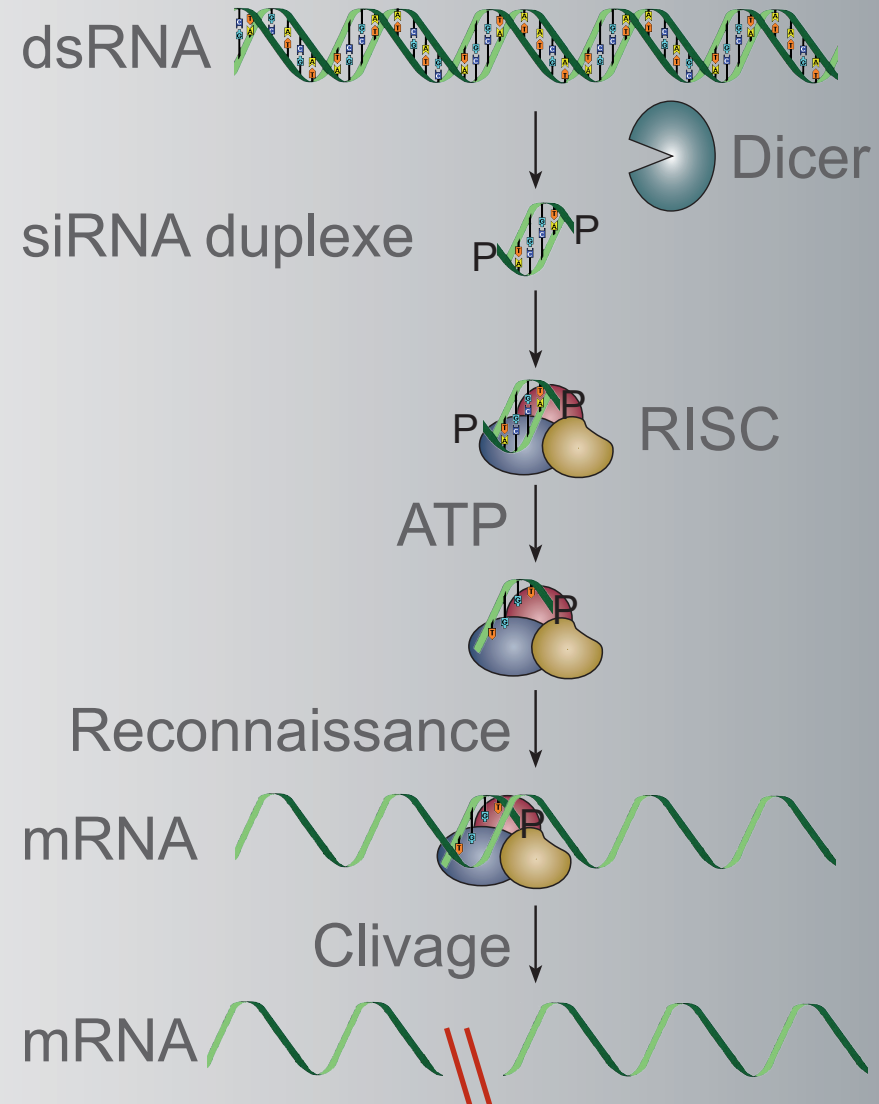
Allshire et al., 2003

# L'interférence ARN

voie des siRNA :

Dicer et RISC

dégradation des ARNm homologues



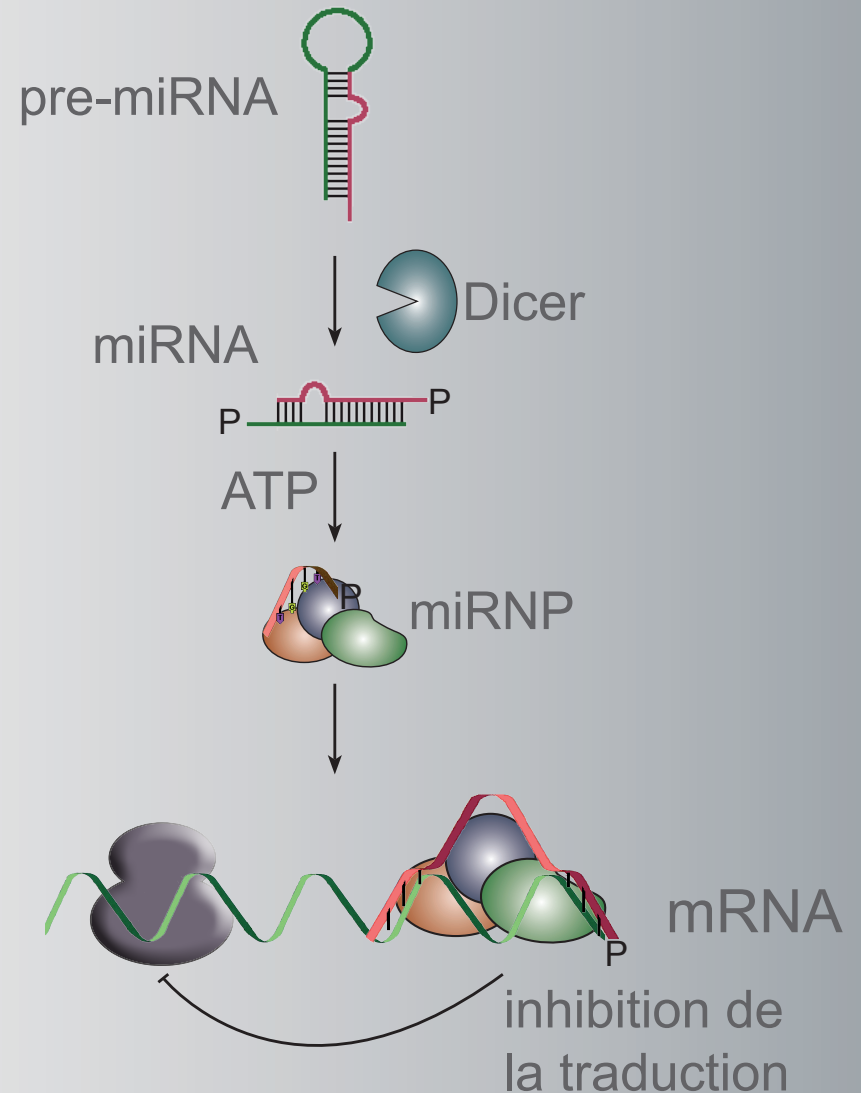
# L'interférence ARN

voie des siARN :

Dicer et RISC  
 dégradation des ARNm  
 homologues

voie des miARN :

Dicer et miRNP  
 inhibition de la traduction



## *dicer* et stabilité chromosomique

inactivation de l'expression de *dicer*

transcription de séquences satellites

→ absence d'hétérochromatine

mitoses anormales

→ séparation précoces des chromatides soeurs

Fukagawa *et al.*, 2004

*dicer* participe au maintien la stabilité chromosomique des cellules au cours du cycle cellulaire

## Résultats partie 2

---

***dicer* au cours du cycle cellulaire  
et dans la réponse aux cassures de l'ADN**



## Objectifs de l'étude

Implication de l'expression de *dicer* dans le déroulement du cycle cellulaire ?

régulation de l'expression au cours du cycle  
effet d'une inactivation

Implication de l'expression de *dicer* dans la réponse au stress répliatif ?

voies de réponse aux cassures de l'ADN lorsque l'expression de *dicer* est inhibée

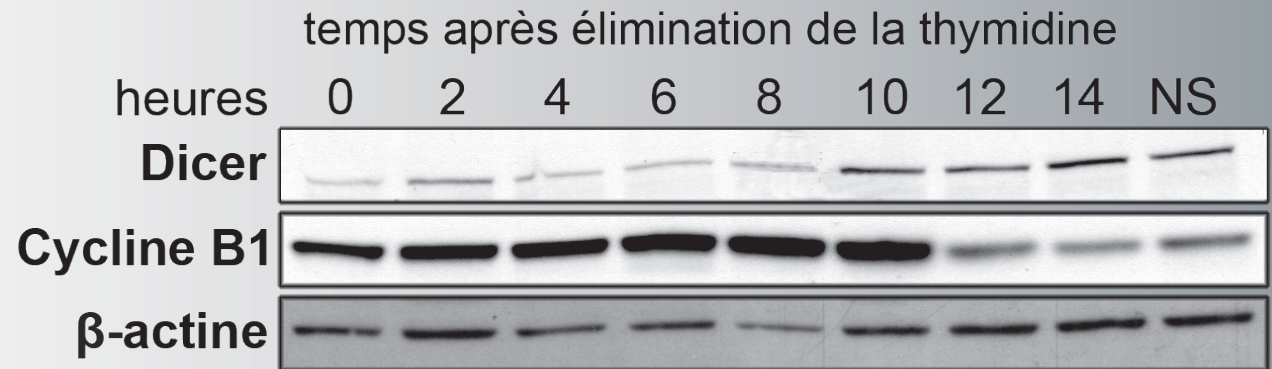




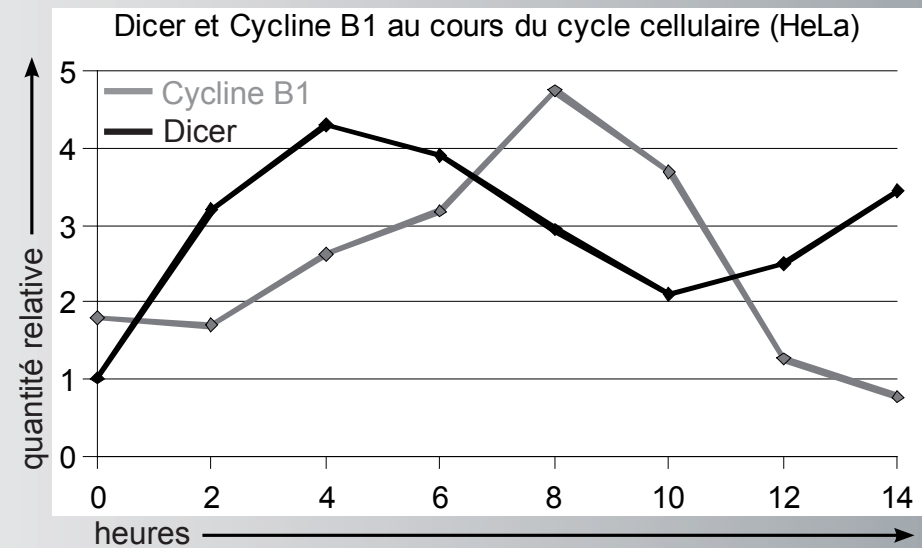
## *dicer* et cycle cellulaire (1/4)

cellules HeLa

synchronisation par  
 double-bloc thymidine



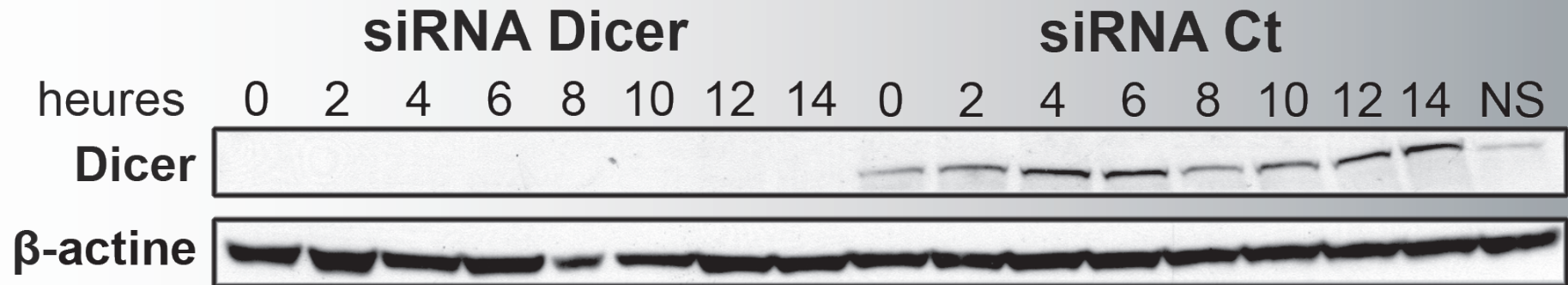
**Pic d'expression de *dicer*  
 au cours de la phase S**



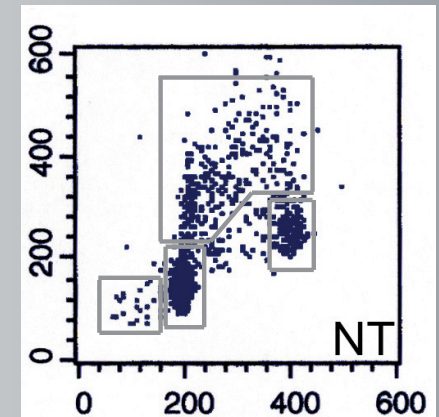


*dicer* et cycle cellulaire (2/4)

Impact de l'inactivation de *dicer* au cours du cycle cellulaire  
 cellules HeLa, synchronisation par double-bloc thymidine  
 inhibition transitoire de *dicer* par siRNA



analyse par cytométrie en flux (IP + BrdU)

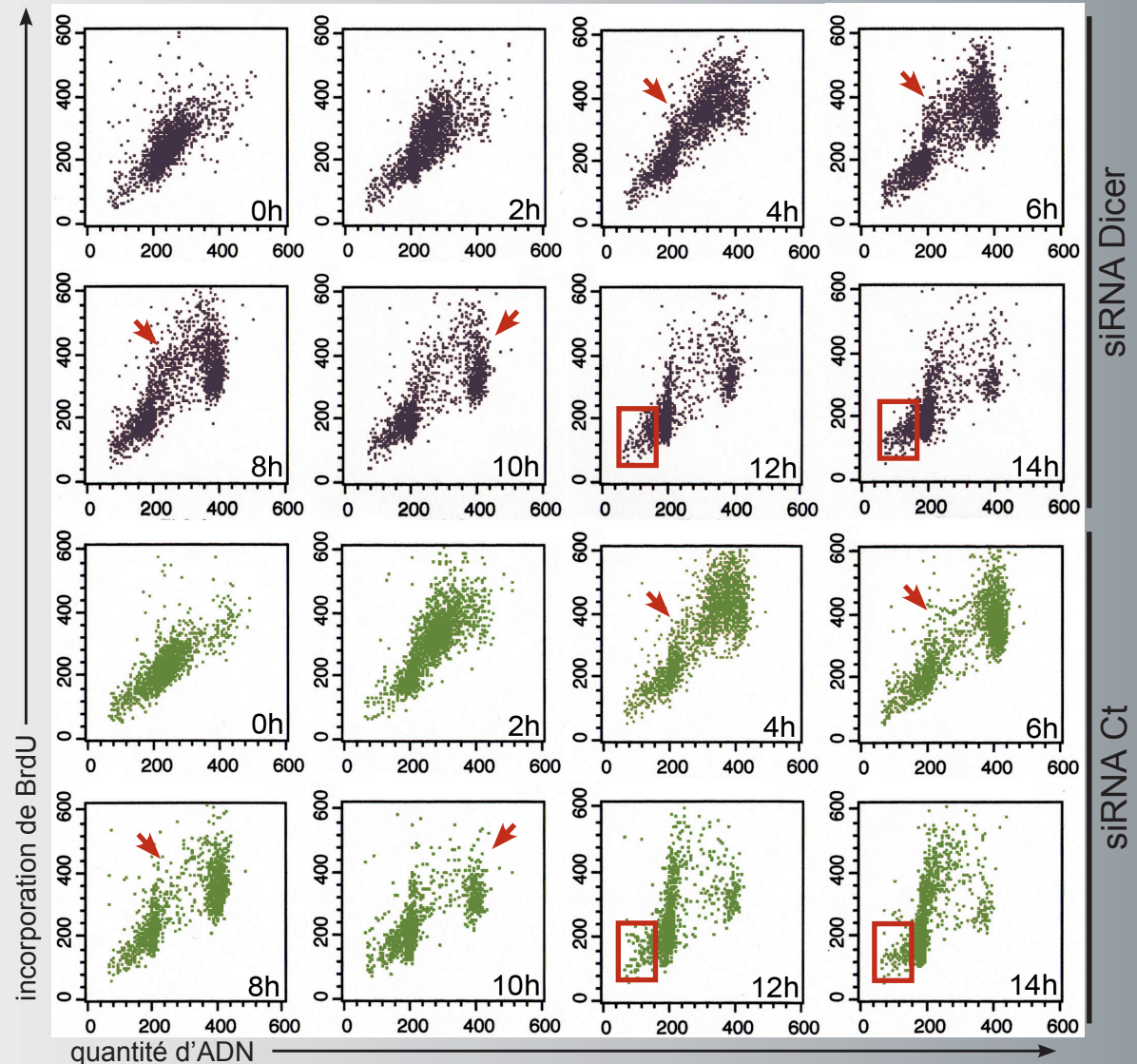




*dicer* et cycle cellulaire (3/4)

Retard dans le déroulement du cycle cellulaire (phase S)

Augmentation du sub-G1

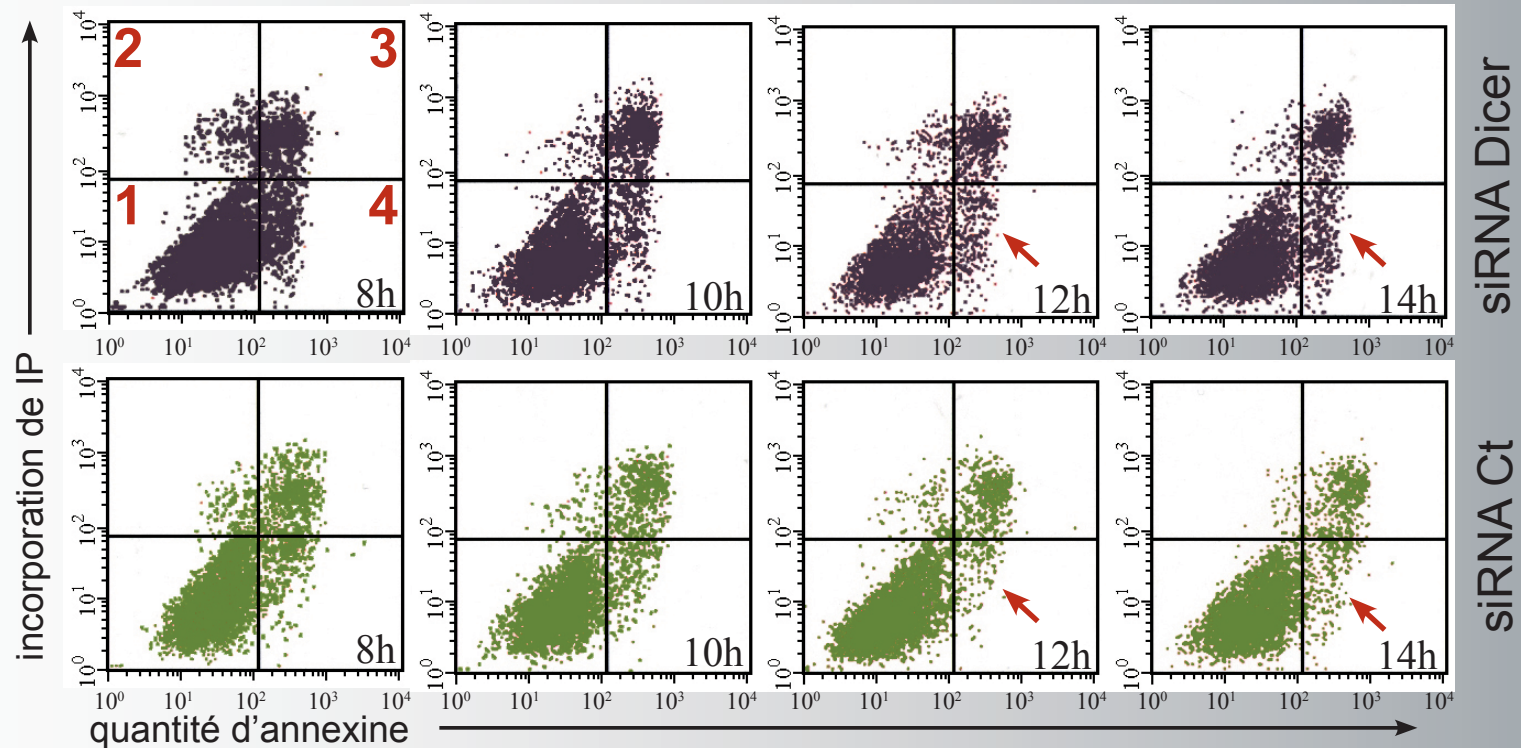




*dicer* et cycle cellulaire (4/4)

Caractérisation du sub-G1 : test annexine V

- 1 vivantes
- 2 nécrose
- 3 apoptose tardive
- 4 apoptose précoce



Augmentation de l'apoptose



## Les dommages à l'ADN

Plusieurs voies de réparation possibles :

selon le type de dommage

selon la phase du cycle cellulaire

Deux voies pour les cassures :

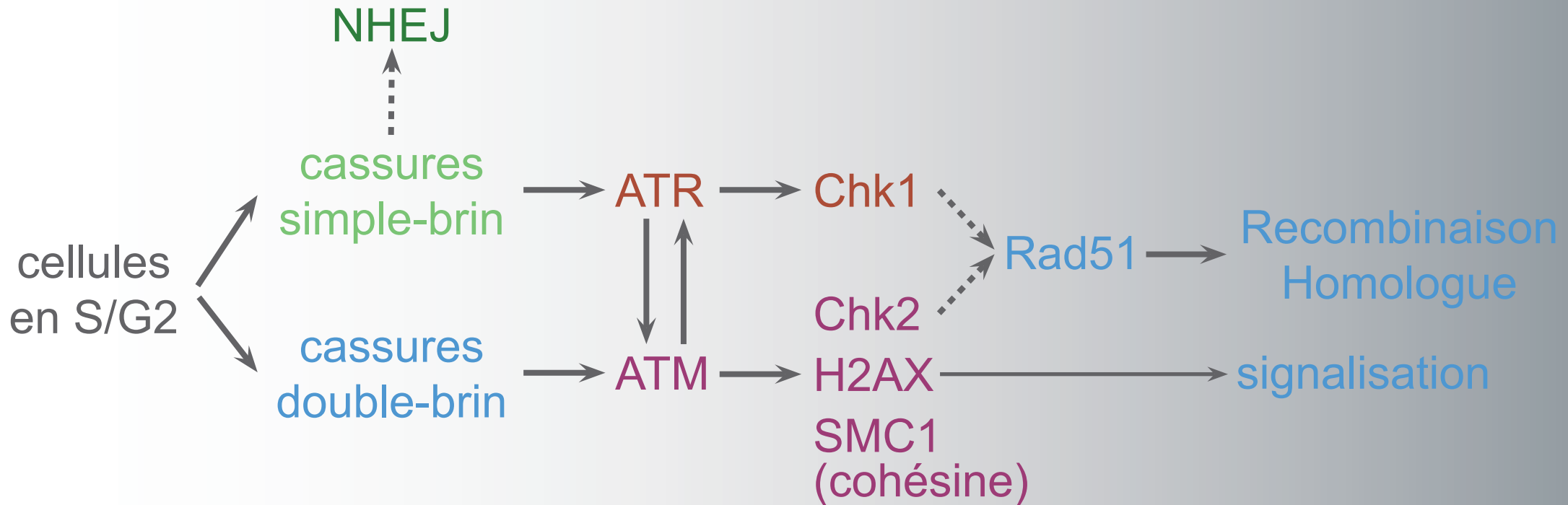
Non Homologous End Joining (NHEJ)  
cassures simple-brin en phase G1 et S

Recombinaison Homologue (HR)  
cassures double-brin en phases S, G2 et M



## Les protéines de la réparation

### Voies ATM et ATR de réponse aux cassures



### Phosphorylation des protéines H2A.X, Chk1 et SMC1

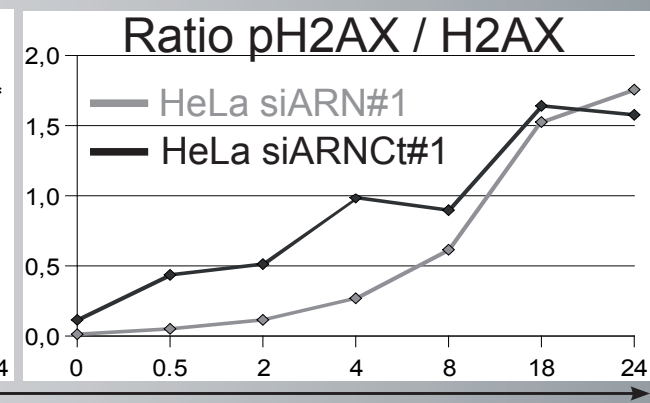
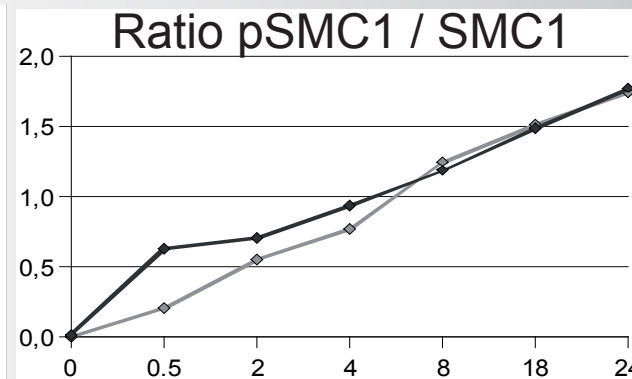
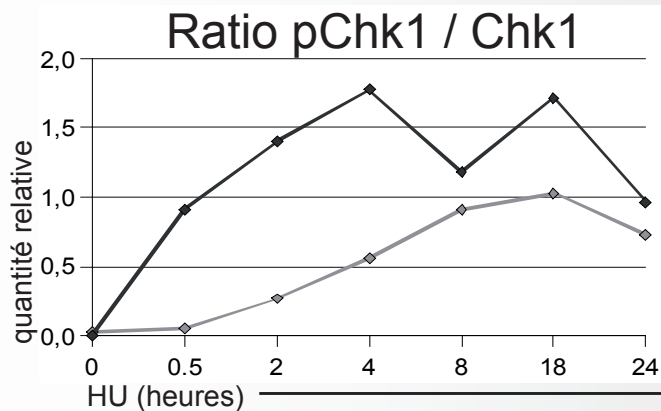
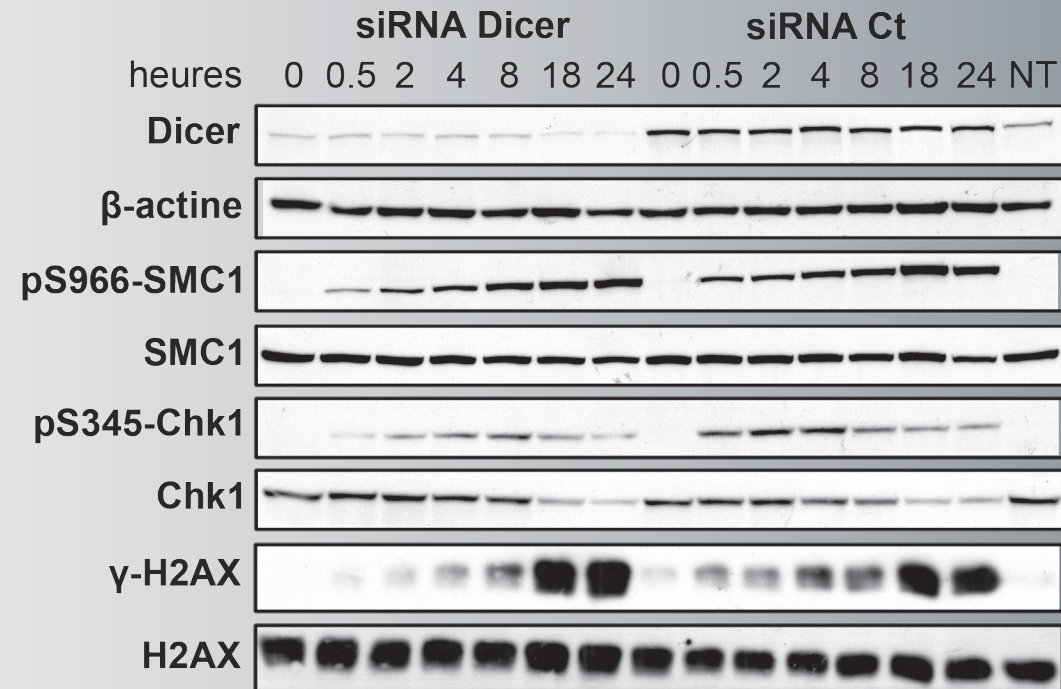


## *dicer* et stress réplcatif (1/3)

Stress réplcatif induit par hydroxyurée (HU)

Cellules HeLa

Western blot et quantification des acteurs des voies ATR / ATM



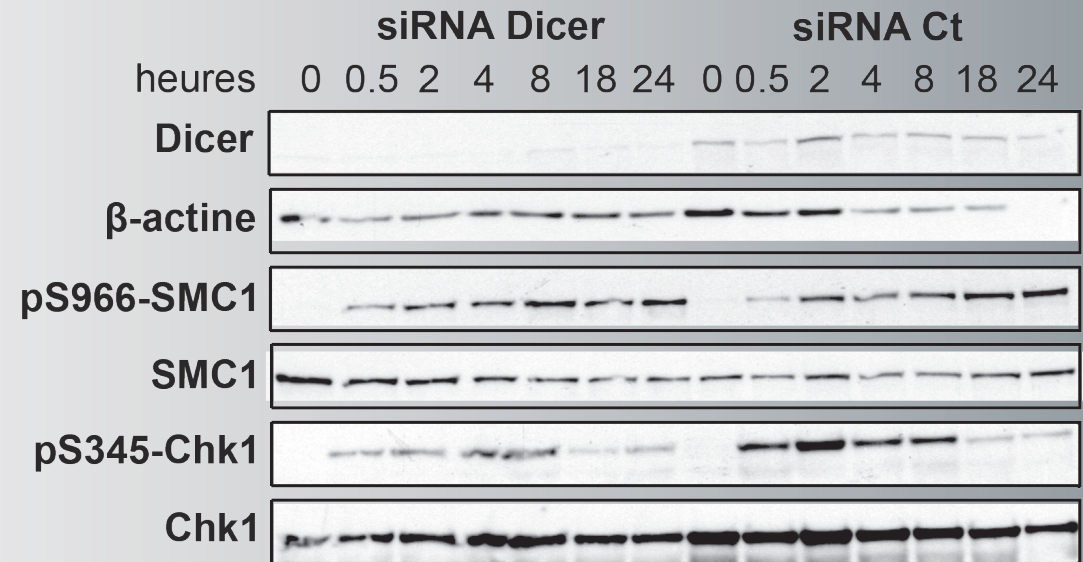


## *dicer* et stress réplcatif (2/3)

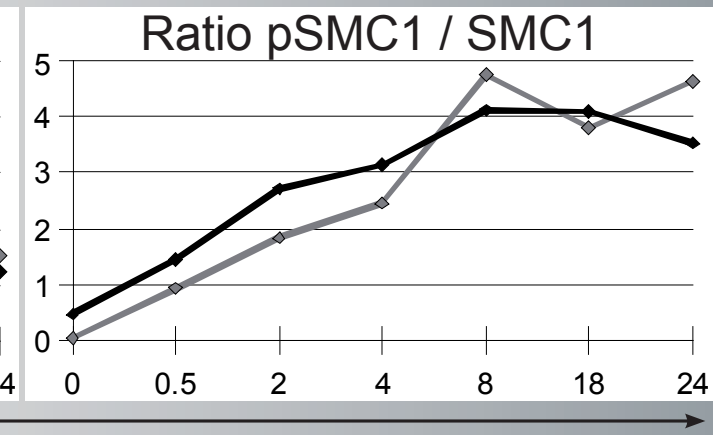
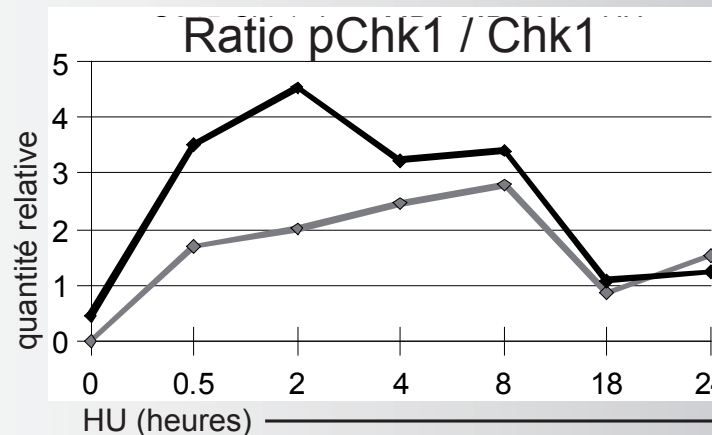
Stress réplcatif induit par hydroxyurée (HU)

Cellules MDA-MB 231

Western blot et quantification des acteurs des voies ATR / ATM



— MDA-MB 231 siARN#3  
 — MDA-MB 231 siARNct#3





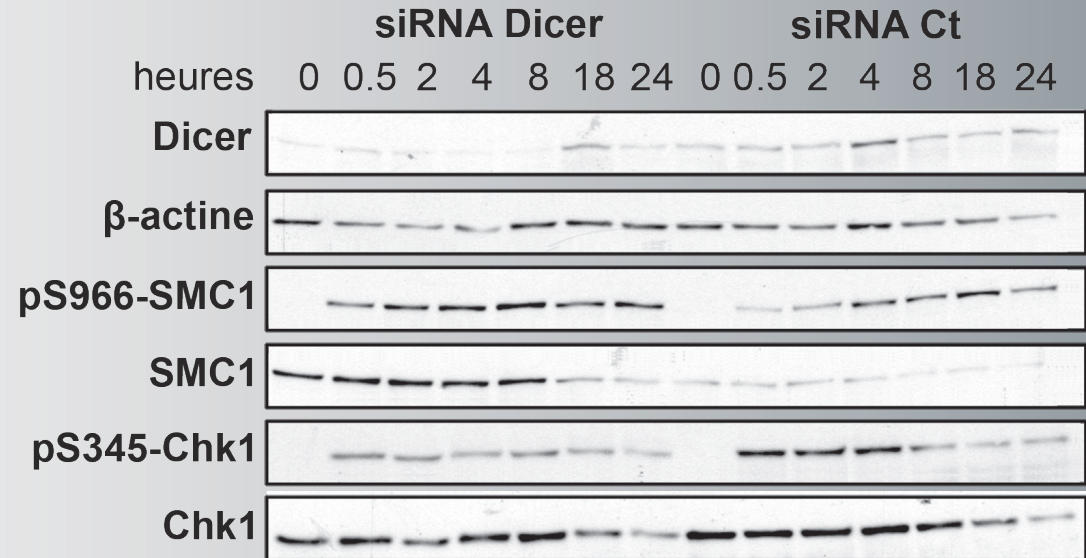


## *dicer* et stress réplcatif (3/3)

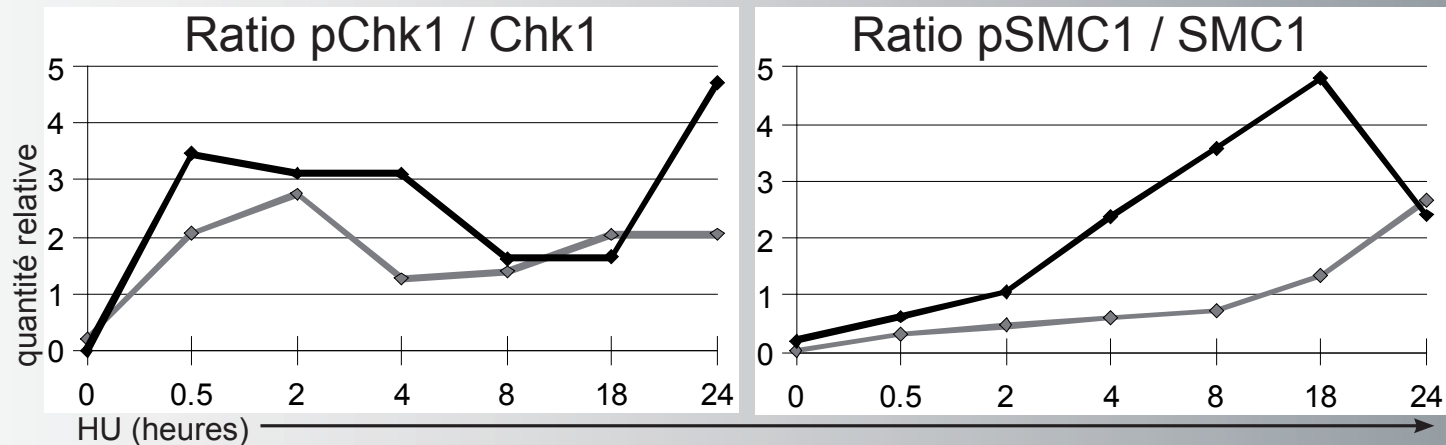
Stress réplcatif induit par hydroxyurée (HU)

Cellules T47D

Western blot et quantification des acteurs des voies ATR / ATM



— T47D siARN#3  
 — T47D siARNct#3





## Conclusion / perspectives II

l'expression de *dicer* est régulé au cours du cycle cellulaire

L'inactivation de l'expression de *dicer* induit un retard dans le déroulement du cycle cellulaire

L'inactivation de l'expression de *dicer* inhibe la phosphorylation de Chk1

impact sur la réparation : comet assay, IF Rad51

effet sur d'autres types de stress (RX, drogues)

Grelier *et al.*, en préparation



## Conclusion / perspectives II

Réaliser les mêmes expériences en inactivant le gène *DGCR8* (voies des miRNA)



des résultats préliminaires semblent montrer des conséquences différentes de l'inactivation de *dicer*

## Introduction partie 3

---

# **progression tumorale mammaire : hypothèses actuelles**



## Étapes du cancer du sein

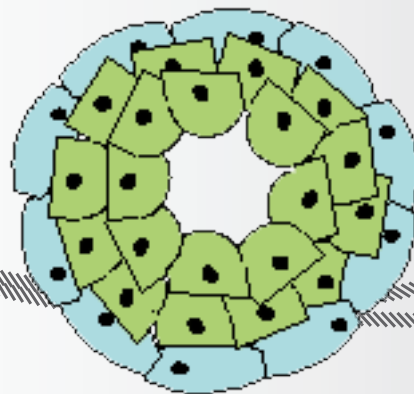
### Principaux stades de la progression tumorale mammaire

myoépithélial

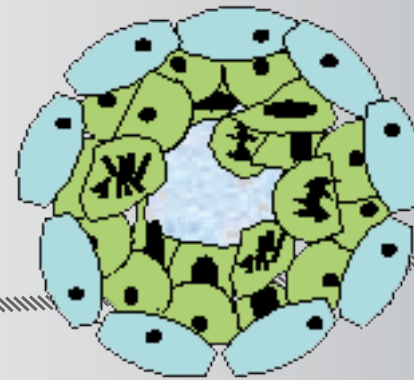


épithélial

normal



hyperplasie



carcinome  
*in situ*

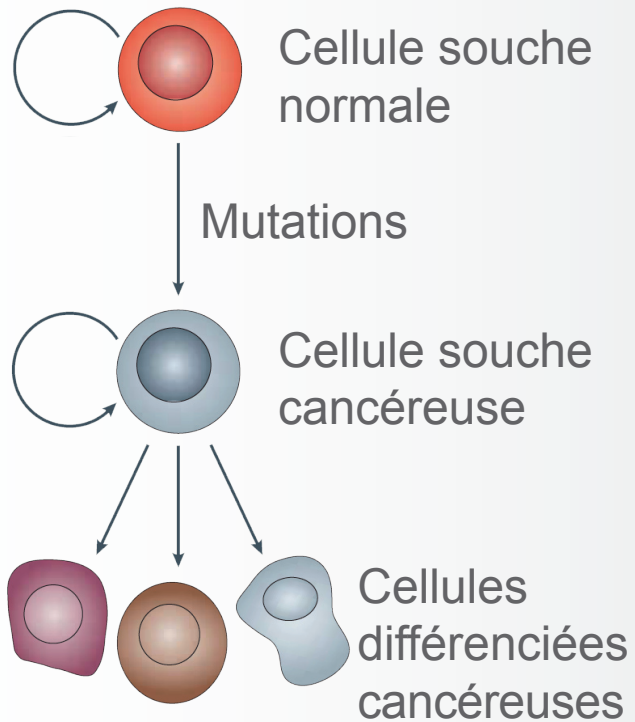


carcinome  
invasif

Deux hypothèses actuelles pour expliquer la progression des tumeurs mammaires

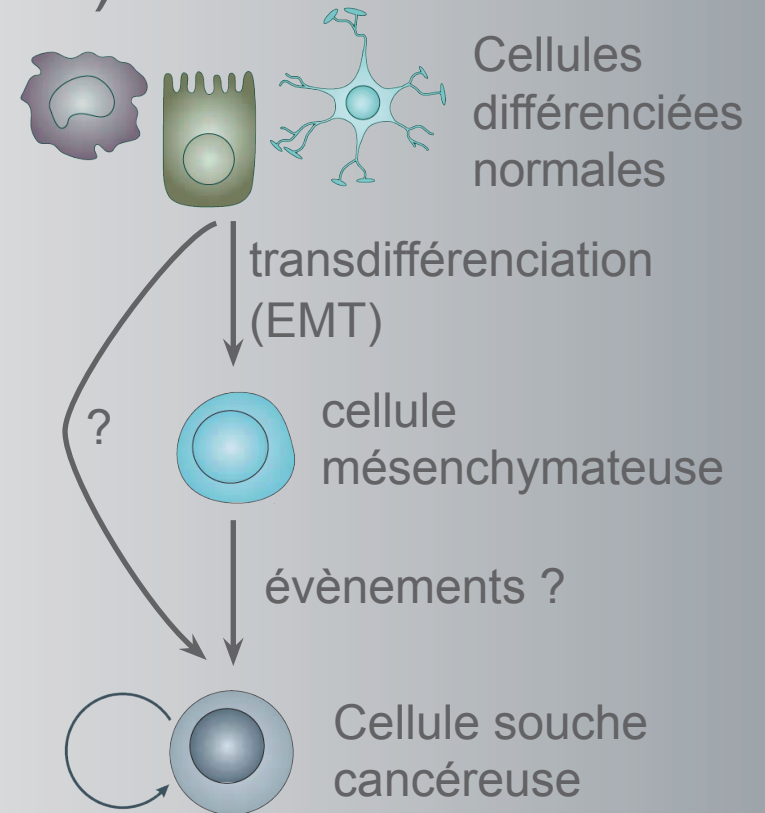
## Progression tumorale mammaire

### Hypothèse des cellules souches cancéreuses



d'après Pardal *et al.*, 2003

### Hypothèse d'une transition épithélio-mésenchymateuse (EMT)



## Résultats partie 3

# Importance de *dicer* dans les cancers du sein



## Objectifs de l'étude

---

Expression de *dicer* dérégulée dans les cancers du sein ?

modèles de progression tumorale mammaire

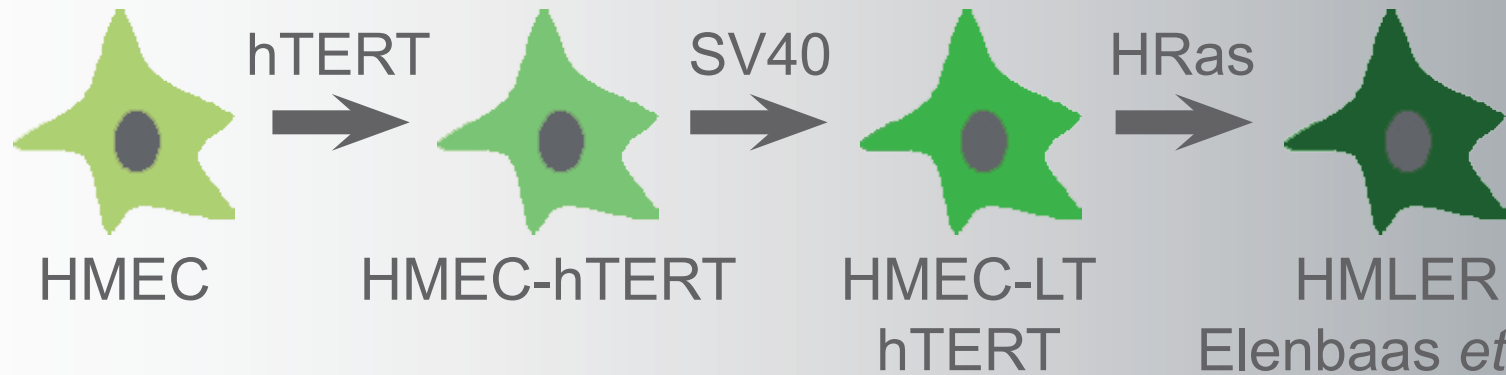
Pertinence de son analyse dans un but clinique ?

association entre expression et des caractéristiques biologiques ou clinicopathologiques ?

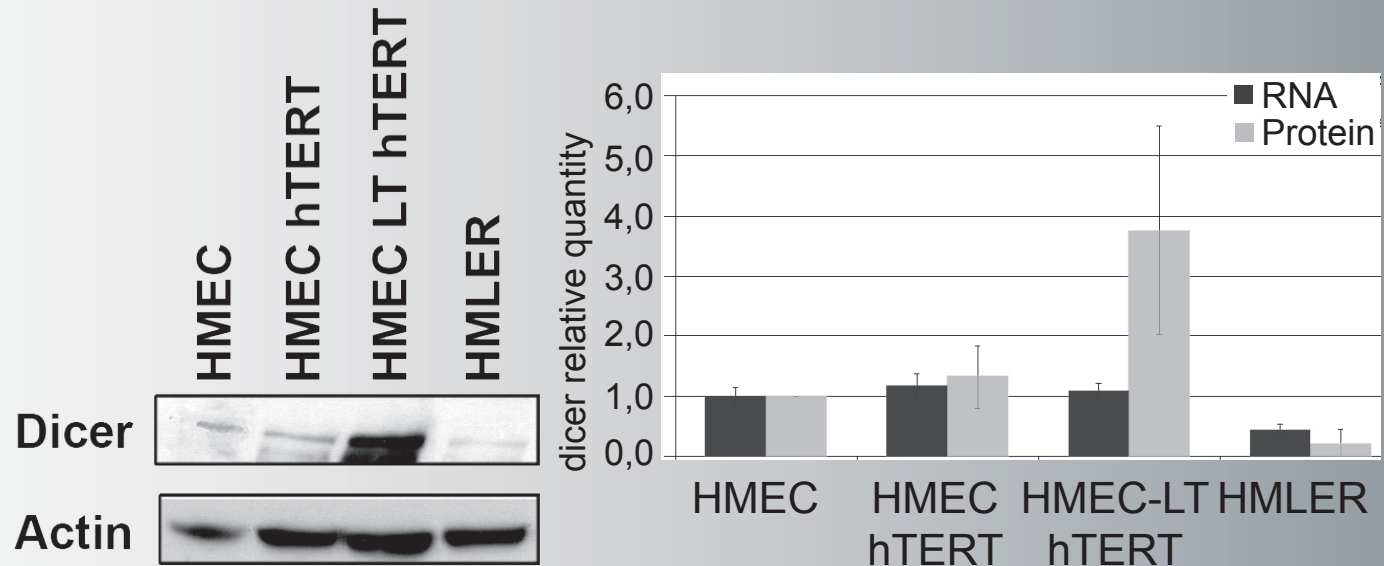


## Modèle de Weinberg

Mime la progression tumorale mammaire



Chute de l'expression de *dicer* dans HMLER

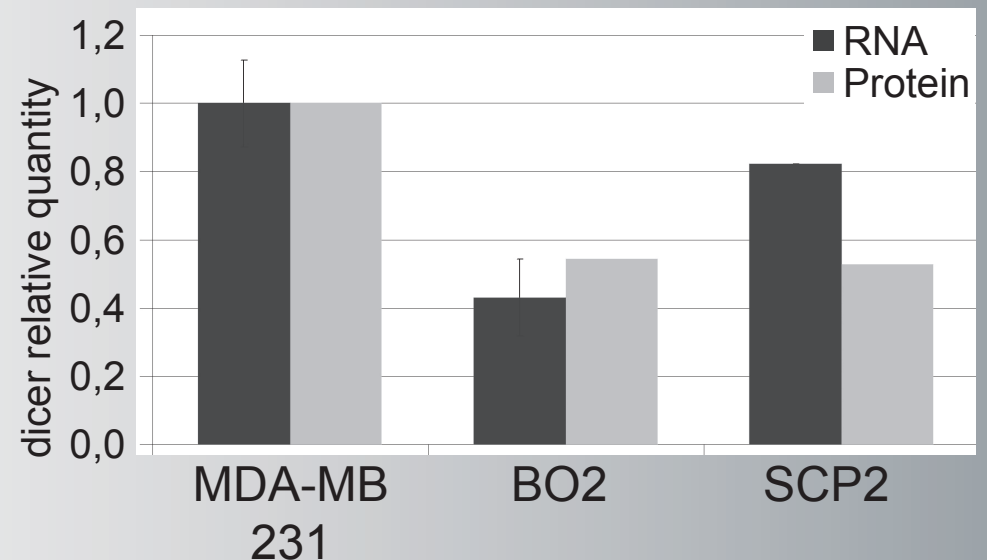
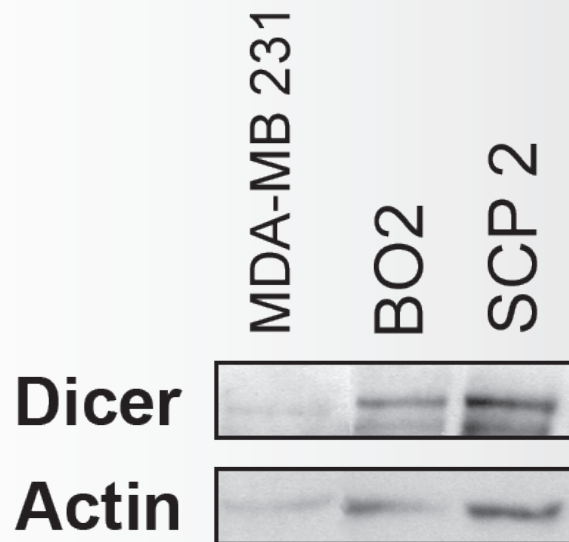




## Modèle MDA-MB 231

Mime l'évolution métastatique osseuse

os = sites métastatiques préférentiels des cancers du sein



**Diminution de l'expression de *dicer* dans BO2 et SCP2**



## Étude statistique <sup>(1/5)</sup>

### Lignées tumorales mammaires

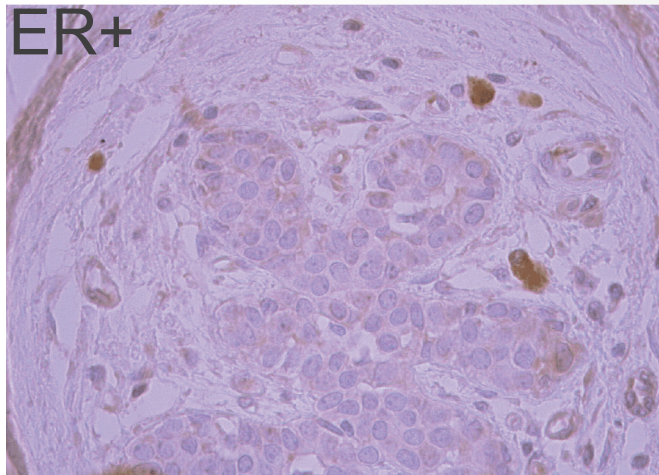
corrélations significatives avec les caractéristiques biologiques et clinicopathologiques (qRT-PCR)

<i>Biological and clinical Characteristics</i>	<i>Cases</i> <i>n=23</i>	<i>Measures</i> <i>111</i>	<i>dicer</i>	
			<i>Mean (IC)</i>	<i>P-value</i>
<b><i>Cell type</i></b>				
epithelial	11	55	4.056 (3.230-5.093)	<b>0.0002</b>
mesenchymal	7	35	1.763 (1.363-2.282)	
<b><i>Cancer type</i></b>				
Immortalized cell	3	15	2.198 (1.577-3.064)	<b>&lt;0.0001</b>
Intraductal carcinoma (DCIS)	4	20	4.107 (3.445-4.895)	
Invasive ductal Carcinoma (IDC)	12	60	1.524 (NA)	
Metastases	1	5	1.369 (1.045-1.794)	

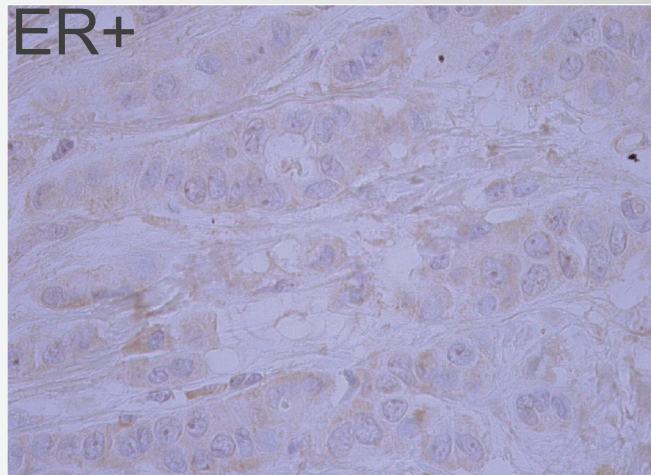
***dicer* sous-exprimé dans les cellules de type mésenchymateux**

## Étude statistique <sup>(2/5)</sup>

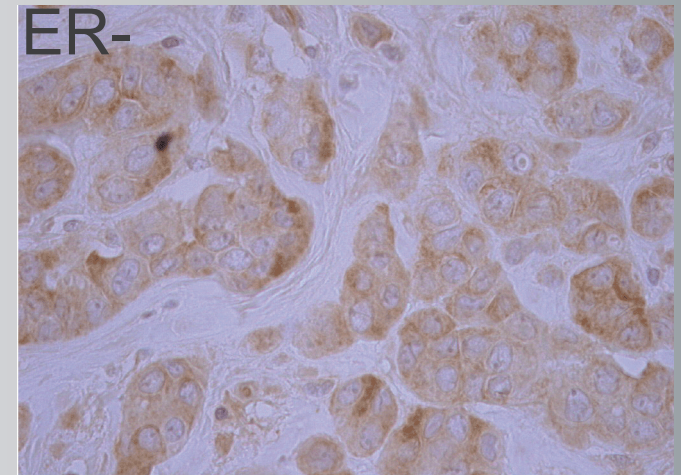
### Analyse par TMA (tissue microarray)



ER+  
tissu normal  
marquage faible  
du cytoplasme des  
cellules luminales



ER+  
tissu tumoral  
marquage faible (>60%)  
du cytoplasme des  
cellules infiltrantes



ER-  
tissu tumoral  
marquage fort (<60%)  
du cytoplasme des  
cellules infiltrantes



**Association avec les récepteurs hormonaux ER/PR ( $p=0,008/p=0,019$ )**



## Étude statistique (3/5)

# Biopsies tumorales mammaires analyse bivariée de l'expression protéique de *dicer*

### Metastatic progression

Subgroups	TMA population	
	Progmeta /N	HR (95%CI) (0/1 vs 2)
Overall	19/86	1.17 (0.38-3.55)
Adjusted effect on age	19/86	1.10 (0.36-3.34)
Adjusted effect on menopause	19/86	1.20 (0.40-3.66)
Adjusted effect on pT	19/86	0.77 (0.25-2.39)
Adjusted effect on "Type canalaire"	19/86	1.18 (0.39-3.59)
Adjusted effect on SBR	19/86	1.49 (0.49-4.59)

### Metastatic progression

Subgroups	TMA population	
	Progmeta /N	HR (95%CI) (0/1 vs 2)
Adjusted effect on N	19/86	1.26 (0.41-3.89)
Adjusted effect on RE(%)	19/86	1.87 (0.56-6.19)
Adjusted effect on RP(%)	19/86	1.83 (0.57-5.90)
Adjusted effect on HER2	19/86	1.04 (0.34-3.24)
Adjusted effect on M	19/86	0.78 (0.24-2.54)

**Taux protéique de *dicer* associé à l'expression ER/PR**



## Étude statistique (4/5)

# Biopsies tumorales mammaires

## analyse bivariée de l'expression ARNm de *dicer*

### Metastatic progression

Subgroups	mRNA population	
	Progmeta /N	HR (95%CI) (<=8 vs >8)
Overall	29/104	3.10 (1.32-7.31)
Adjusted effect on age	29/103	3.17 (1.35-7.47)
Adjusted effect on menopause	29/97	3.21 (1.6-7.60)
Adjusted effect on pT	29/99	3.19 (1.35-7.54)
Adjusted effect on "Type canalaire"	29/101	2.92 (1.24-6.90)
Adjusted effect on SBR	28/95	3.11 (1.32-7.38)

### Metastatic progression

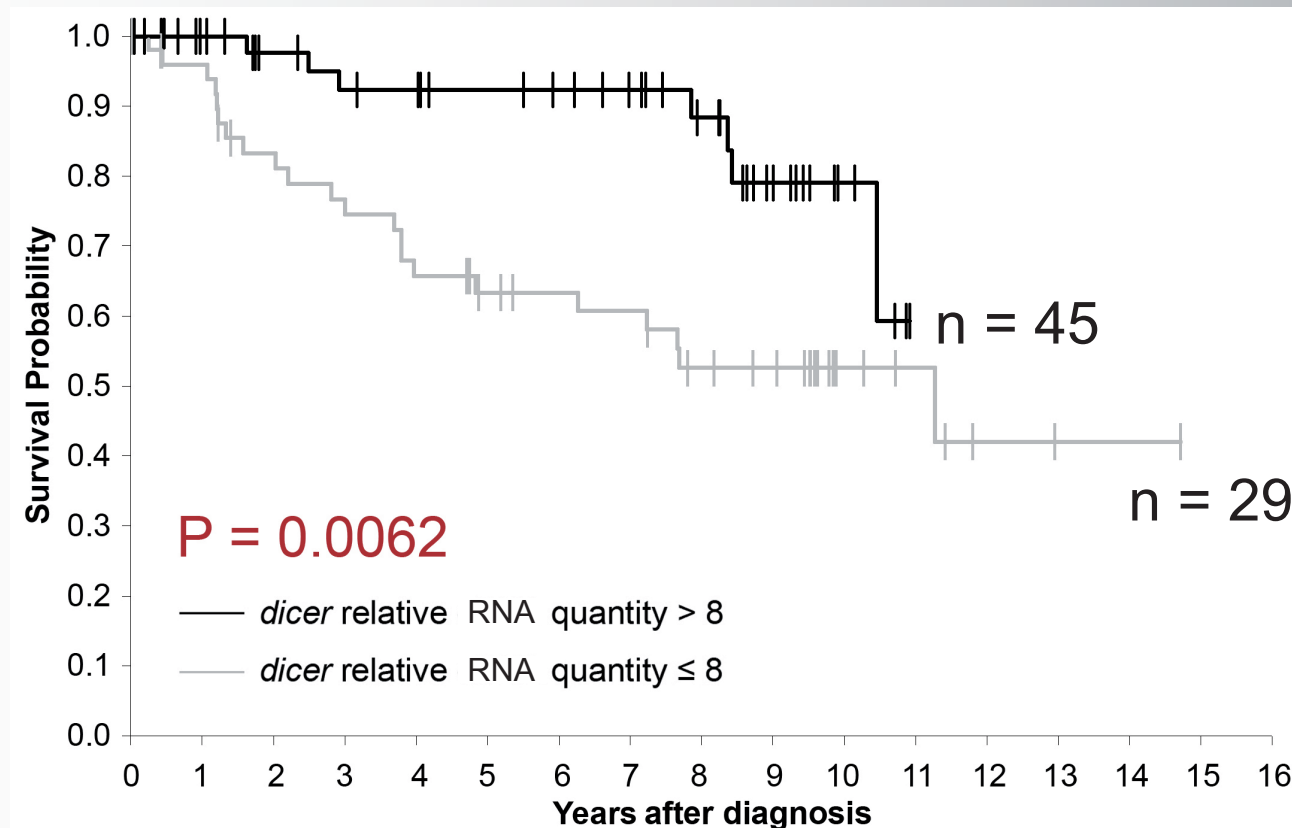
Subgroups	mRNA population	
	Progmeta /N	HR (95%CI) (<=8 vs >8)
Adjusted effect on N	29/104	2.69 (1.14-6.33)
Adjusted effect on RE(%)	28/98	3.08 (1.30-7.33)
Adjusted effect on RP(%)	29/100	3.17 (1.35-7.48)
Adjusted effect on HER2	8/18	3.25 (0.39-27.45)
Adjusted effect on M	29/102	3.26 (1.38-7.67)

**Taux ARNm de *dicer* indépendant des autres caractéristiques**



## Étude statistique (5/5)

### Courbe de survie en fonction de la rechute métastatique



Taux d'ARNm de *dicer* = facteur pronostique indépendant pour la rechute métastatique



## Conclusion / perspectives III

Pertinence de l'analyse de l'expression de *dicer* dans les cancers du sein

*dicer* facteur pronostique indépendant pour les rechutes métastatiques

augmenter l'échantillonnage de biopsies

Grelier *et al.*, en soumission

Souris KO conditionnel

Étude des séquences satellites lorsque l'expression de *dicer* est inhibée

Étude de l'importance des miARN dans les effets observés lorsque l'expression de *dicer* est inhibée





## Remerciements

Pr. Alain Puisieux

Dr. Caroline Moyret-Lalle

Émilie Ruaux

Mélanie Lombardo

Cécile Montgiraud

Janis Vella

Emmanuelle Ruiz

Marie Gouanvic

Charlotte Verfaillie

Pierre Levy

Benjamin Bouchet

Dr. Ruth Rimok  
Anne-Sophie Ay

Nicolas Voirin

Dr. Christine Lasset

Dr. Valérie Bonadona

Sylvie Chabaud

Jean-Damien Combes

Pr. René Ecochard

Dr. Isabelle Treilleux

Sophie Léon-Godard

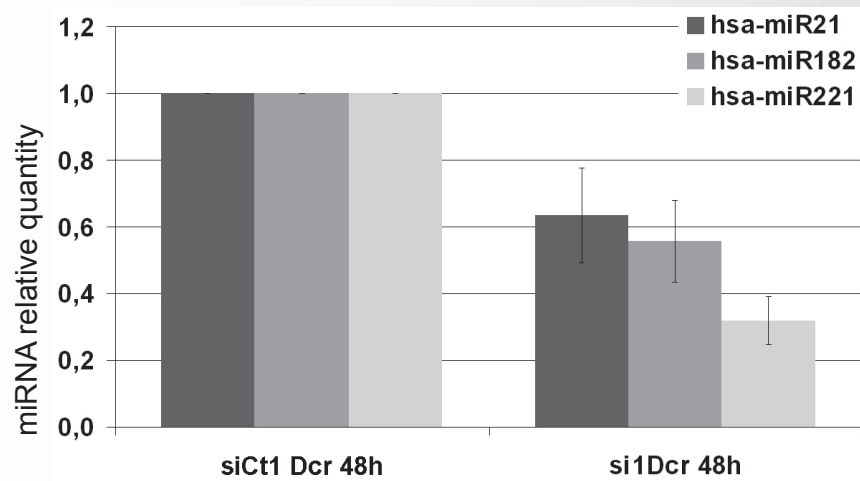
Thérèse Gargi

Dr. Éric Tabone

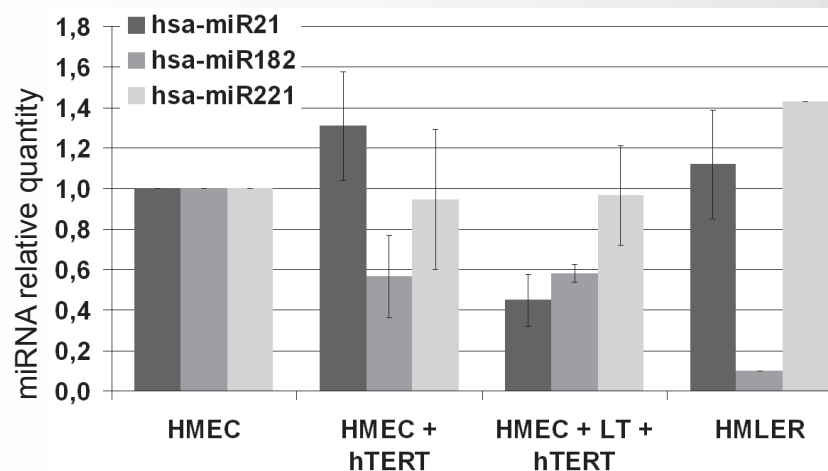


# Étude des miRNA

## Travail en cours :



diminution du taux de miARN lorsque *dicer* est inhibé



variation du taux de miARN dans les modèles cellulaires

