



**HAL**  
open science

# Contribution de deux clusters de microARN soumis à empreinte parentale à la progression tumorale et au pronostic des neuroblastomes

Charles-Henry Gattolliat

► **To cite this version:**

Charles-Henry Gattolliat. Contribution de deux clusters de microARN soumis à empreinte parentale à la progression tumorale et au pronostic des neuroblastomes. Médecine humaine et pathologie. Université Paris Sud - Paris XI, 2013. Français. NNT : 2013PA11T051 . tel-00967948

**HAL Id: tel-00967948**

**<https://theses.hal.science/tel-00967948>**

Submitted on 31 Mar 2014

**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.

UNIVERSITE PARIS-SUD

ÉCOLE DOCTORALE DE CANCEROLOGIE  
CNRS UMR 8126 Institut Gustave Roussy

*DISCIPLINE : Oncologie moléculaire*

THÈSE DE DOCTORAT

soutenue le 24 septembre 2013

par

Charles-Henry GATTOLLIAT

Contribution de deux clusters de microARN soumis  
à empreinte parentale à la progression tumorale  
et au pronostic des neuroblastomes

Directeur de thèse : Jean BENARD  
Directeur de thèse : Pierre BUSSON

Chef d'équipe  
DR CNRS

Gustave Roussy, *Villejuif*  
Gustave Roussy, *Villejuif*

**Composition du jury :**

*Rapporteurs :* Luisa DANDOLO  
Jérôme CAVAILLE  
*Examineurs :* Gudrun SCHLEIERMACHER  
François DAUTRY  
Alain PUISIEUX  
*Membre invité :* Sétha DOUC-RASY

DR CNRS  
DR CNRS  
PH  
DR CNRS  
PU-PH  
MCU

Institut Cochin, *Paris*  
LBME-CNRS, *Toulouse*  
Institut Curie, *Paris*  
ENS Cachan, *Cachan*  
CLB-UCBL, *Lyon*  
Gustave Roussy, *Villejuif*







## REMERCIEMENTS

Je tiens tout d'abord à exprimer mes remerciements aux membres du jury qui ont accepté d'évaluer ce travail. Je remercie sincèrement les Docteurs Luisa Dandolo et Jérôme Cavaillé pour le temps qu'ils ont consacré à l'examen de ce manuscrit. Je remercie chaleureusement le Docteur Gudrun Schleiermacher et les Professeurs Alain Puisieux et François Dautry pour leur présence en qualité d'examineurs au sein de ce jury.

Je remercie très sincèrement le Docteur Jean Bénard de m'avoir donné l'opportunité de réaliser une thèse au sein de son équipe. Je vous remercie de m'avoir fait confiance et de m'avoir donné toute la liberté dans mon travail. Un grand merci à vous également de m'avoir initié aux collaborations nationales et internationales.

Je remercie le Docteur Pierre Busson pour ses suggestions et ses conseils.

J'exprime également toute ma reconnaissance au Docteur Sétha Douc-Rasy de m'avoir accueilli en stage lors de mon Master 2. Je vous remercie pour votre soutien indéfectible au cours de ces quatre ans.

Je remercie très chaleureusement le Docteur Evelyne May, pour ses nombreux conseils très enrichissants durant ces trois années de thèse mais également pour le travail de relecture et de correction réalisé sur ce manuscrit.

Je tiens à remercier les membres de mon équipe avec qui j'ai pu travailler au cours de ces années : Anissa Ilias, Laëtitia Thomas, Mickaël Rodier et dernièrement Eugénie Mussard.

J'exprime également toute ma reconnaissance aux Docteurs Joëlle Wiels et Marc Lipinski pour leur soutien et leurs conseils. Merci de m'avoir fait confiance et de m'avoir accueilli dans votre Unité !

Je tiens à remercier également tous les chefs d'équipe pour tous leurs conseils : les Docteurs Svetlana Dokudovskaya, Martine Raphaël, Eric Le Cam, Vasily Ogrysko et Yegor Vassetsky.

Je voudrais également remercier chaleureusement tous les membres de l'unité : Romain Algret, Sonia Baconnais, Clément Barjon, Yara Bou Saada, Emilie Cochet, Carla Dib, Catherine Durieu, Justine Debernardi, Loetitia Favre, François-Régis Ferrand, Aurore



Gelin, Mélanie Gressette, Sarah Issa, Anne-Sophie Jimenez-Pailhès, Alexandra Joubert, Ana-marija Jurisic, Manel Klibi, Claire Lhuillier, Diana Markozaschvili, Andrei Pichugin, Olivier Piètrement, Iryna Pirozhkova, Aude Robert, Licia Silvieri, Ilya Skylar, Luiza Stankevicius et Benjamin Vérillaud.

PS : Des millions de merci pour toi, Chloé ! Merci pour ton aide et pour ta gentillesse ! Merci pour ton amitié indéfectible depuis quatre ans !

Un grand merci à ceux et celles qui partagent notre quotidien et qui sans leur présence, la vie serait (beaucoup) plus compliquée : Muriel Fuchs et Sokhon Phomsoupha.

Je souhaite également remercier les membres des différentes plateformes de *Gustave Roussy*, notamment les plateformes de biologie intégrée et de bioinformatique, ainsi que l'animalerie, qui ont contribué également à la réalisation de certains projets.

Un grand merci notamment à Thomas Robert et Guillaume Meurice pour leur sympathie, leur patience et leurs nombreuses explications sur le monde des statistiques en génomique. Je remercie également Mélanie Polrot pour son aide technique lors des expérimentations animales.

Je voudrais également remercier Gwenaël Le Teuff pour sa contribution aux nombreuses analyses statistiques de ce travail.

Une grande pensée pour Muriel Nicoletti qui a veillé avec gentillesse et dévouement sur tous les doctorants de l'ED de cancérologie. Merci pour ta disponibilité, ta sympathie et ton soutien durant ces années.

Un grand merci à tous les membres passés et actuels de l'Association des Jeunes Chercheurs de Gustave Roussy qui m'ont fait vivre une expérience très enrichissante : Samar Al Safadi, Emilie Bayart, Marie Breton, Christophe Calvet, Mélanie Desbois, Estelle Dubus-Daudigeos, Elodie Grellier, Hélène Malka-Mahieu, Nicolas Martin, Jane Merlevède, Najat Raddi, Clarisse Thiollier et Elsa Vanhecke.





Je remercie également toutes les personnes que j'ai pu croiser à Gustave Roussy et à Roscoff, entre le M2 et la thèse pour leur sympathie, pour les services rendus et les conseils apportés.

Avant de conclure, je ne remercierai jamais assez nos différents partenaires financeurs, notamment la Fédération Enfants, Cancers & Santé et la Société Française des Cancers de l'Enfant, les Comités Oise et Montbéliard de la Ligue contre le Cancer et la Fondation Hubert Gouin.

Pour finir, je tiens à exprimer toute ma reconnaissance et ma gratitude envers ma famille. Je les remercie de tout mon cœur. Merci d'avoir été toujours à mes côtés et d'avoir cru en moi dans toutes les circonstances. Enfin, je remercie infiniment Pouti-Pouta pour m'avoir constamment soutenu, rassuré et encouragé durant cette dernière année. Merci d'être à mes côtés au quotidien !



« Il faut en finir avec la vie de réceptivité exclusive, et produire. Conclure et réaliser, c'est-à-dire produire et spécialiser : cela presse. Tu auras bientôt 27 ans. Ta jeunesse, ta force doivent servir. Si ta vie ne doit pas s'évaporer inutile, il faut te concentrer sans retard. Tu dois t'imposer une œuvre. Une œuvre, que ce soit ta pensée de tous les jours. »

**Henri Frédéric Amiel**, *Journal intime*



## AVANT-PROPOS

La génétique a été le fer de lance de la recherche en oncologie ; elle a initié une dynamique fantastique en biologie moléculaire et cellulaire. La découverte des oncogènes et des gènes suppresseurs de tumeur donna une base moléculaire à la nature multi-étapes du processus cancéreux. Rapidement, il est apparu que le processus mutation-sélection propre à notre évolution est celui qui régit les cancers et que l'instabilité génétique tumorale conduit à la grande hétérogénéité observée ; également, que les signaux tumoraux inducteurs ou suppresseurs de prolifération, d'apoptose, de différenciation et de sénescence miment ceux du développement cellulaire normal. Aujourd'hui, le développement exponentiel des technologies (biologie moléculaire, cytogénétique, bioinformatique) et des connaissances permet aux chercheurs d'explorer l'oncogenèse non plus gène par gène mais de manière pan-génomique. La mise en évidence, toute récente, d'éléments non codant du génome – tels les microARN – capables de réguler l'expression génique, constitue une percée considérable. La connaissance de leur régulation pourrait en effet mener au réseau de signalisations en place dans les tumeurs cancéreuses, et à mieux les traiter.

Le travail de thèse qui m'a été confié concerne l'implication des microARN dans la progression tumorale d'un cancer pédiatrique, le neuroblastome.

Une collection rétrospective de tumeurs neuroblastiques m'a conduit à identifier les microARN dont l'expression corrèle le pronostic des patients. Ces mêmes tumeurs ainsi que des lignées humaines de neuroblastome m'ont permis d'étudier les mécanismes à la base de la dérégulation de ces microARN dans ce cancer du jeune enfant.



# NEUROCYTOMA OR NEUROBLASTOMA, A KIND OF TUMOR NOT GENERALLY RECOGNIZED.<sup>1</sup>

BY JAMES HOMER WRIGHT, M.D., S.D.

*Director of the Pathological Laboratory, Massachusetts General Hospital, and  
Assistant Professor of Pathology, Harvard Medical School, Boston.*

PLATES XLIV-XLVI.

The object of this paper is to call attention to a group of tumors, the nature of which has hitherto escaped general recognition, and to point out their distinguishing characteristics. These tumors are rich in cells which may vary much in size and shape. They may be pervaded by connective tissue by which the cells are arranged in more or less definite alveoli. Blood vessels accompanied by connective tissue are also present. The essential cells of the tumor are considered to be more or less undifferentiated nerve cells or neurocytes or neuroblasts, and hence the names neurocytoma and neuroblastoma. They are considered to be neurocytes or neuroblasts for the following reasons:

1. The cells, at least in places, are associated with delicate fibrils, often of considerable length, which do not stain like neuroglia, collagen or fibroglia fibrils by Mallory's methods, and which are like the fibrils occurring in the "anlage" of the sympathetic nervous system.

2. The cells associated with these fibrils have the same morphology as the cells from which the sympathetic nervous system and the medulla of the adrenal develop, and which are regarded by embryologists as arising from migrated primitive nerve cells. They are generally small, with round nuclei rich in chromatin, and have a relatively small or imperceptible amount of cytoplasm. Some of them may be of piroform shape and their cytoplasm may be prolonged into filamentous processes like the fibrils referred to above.

3. The cells and fibrils are arranged in places in ways more or

<sup>1</sup>Received for publication May 19, 1910.





# SOMMAIRE

<b>Liste des Figures</b>	<b>8</b>
<b>Liste des Tableaux</b>	<b>11</b>
<b><i>Introduction</i></b>	<b>12</b>
<b>1. EPIGENETIQUE</b>	<b>13</b>
1.1. La méthylation de l'ADN	13
1.2. Les modifications post-traductionnelles des histones	15
1.3. Thérapies épigénétiques	16
<b>2. EMPREINTE PARENTALE</b>	<b>17</b>
2.1. Mise en évidence de l'empreinte génomique parentale et de la non-équivalence des génomes parentaux	18
2.1.1. Androgenèse et parthénogenèse expérimentales chez la souris	18
2.1.2. Phénotypes des conceptions uniparentales chez l'Homme	19
2.1.3. Phénotypes des conceptions triploïdes chez l'Homme	20
2.2. Nature et base moléculaire de l'empreinte parentale	20
2.3. Transmission de l'empreinte parentale	21
2.4. Les loci soumis à empreinte parentale	21
2.4.1. Le locus <i>DLK1-DIO3</i> du bras long du chromosome 14	21
2.4.2. Le locus du bras long du chromosome 19	28
2.4.3. Quelques autres gènes et loci soumis à empreinte parentale	30
2.5. Empreinte parentale et pathologies humaines	32
2.6. Disomie uniparentale	33



<b>3. LES MICROARN</b>	<b>34</b>
3.1. Généralités sur les microARN	35
3.2. Biologie et biogenèse des microARN	36
3.3. microARN et oncogenèse	37
3.3.1. microARN et cancer	38
3.3.2. microARN comme agent ou cible thérapeutiques	38
3.3.3. microARN des fluides corporels comme marqueurs diagnostique ou pronostique dans les pathologies	39
3.4. microARN soumis à empreinte parentale	40
3.4.1. Biologie et fonctions des clusters C14MC et C19MC	40
3.4.2. Implication de C14MC et de C19MC dans les cancers	41
3.4.3. Implication de C14MC et C19MC dans d'autres syndromes et maladies	46
<b>4. NEUROBLASTOME</b>	<b>47</b>
4.1. Historique	48
4.2. Epidémiologie	48
4.3. Etiologie	49
4.4. Origine embryonnaire des neuroblastomes	49
4.5. Présentation clinique du neuroblastome	51
4.5.1. Maladies et syndromes rares associés	51
4.5.2. Diagnostic	52
4.5.3. Bilan initial	52
4.5.4. Stade : International Neuroblastoma Staging System	53
4.5.5. Age au diagnostic	54
4.5.6. Histologie	54
4.5.7. Amplification de l'oncogène <i>N-MYC</i>	56
4.6. Âge au diagnostic, stade et amplification de <i>N-MYC</i> : les critères de la stratification standard du risque	56
4.7. Prise en charge thérapeutique	57



<b>5. GENETIQUE DES NEUROBLASTOMES</b>	<b>58</b>
5.1. Predisposition génétique	58
5.2. Anomalies de la ploïdie	59
5.3. Anomalies chromosomiques	59
5.3.1. Locus 2p24 : amplification du gène <i>N-MYC</i>	59
5.3.2. Pertes et gains de bras courts et longs de chromosomes	60
5.3.3. Profils génomiques globaux par CGH-array	61
5.4. Anomalies d'expression des gènes	62
5.4.1. Expression des récepteurs aux neurotrophines	62
5.4.2. Expression de <i>N-MYC</i> et <i>TWIST</i>	63
5.4.3. Expression des gènes <i>GALNT</i>	64
5.4.4. Profil d'expression globale des ARNm	65
5.5. Proposition de classification génétique des neuroblastomes basés sur les anomalies chromosomiques et les variations d'expression géniques	65
5.6. Anomalie d'expression des microARN	66
<b>6. BASES RATIONNELLES, HYPOTHESES ET OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THESE</b>	<b>69</b>

***Première Partie*** : Les microARN des clusters C14MC et C19MC, marqueurs pronostiques du neuroblastome **72**

**1. L'expression du miR-487b et miR-410 du cluster C14MC est un marqueur pronostique du neuroblastome** **74**

**Article 1** **77**

**Gattolliat CH**, Thomas L, Ciafrè SA, Meurice G, Le Teuff G, Job B, Richon C, Combaret V, Dessen P, Valteau-Couanet D, May E, Busson P, Douc-Rasy S, Bénard J. Expression of miR-487b and miR-410 encoded by 14q32.31 locus is a prognostic marker in neuroblastoma. *Br J Cancer*. 2011 Oct; 105(9):1352-61.



**2. L'expression de deux microARN des clusters C14MC et C19MC soumis à empreinte parentale identifie une nouvelle stratification du risque dans le neuroblastome** **98**

**Manuscrit 2** **101**

**Gattolliat CH, et al.** The expression of two parental imprinted miRNAs identifies a new neuroblastoma risk-stratification. (en soumission *Clinical Cancer Research*)

**DISCUSSION DE LA PREMIERE PARTIE** **131**

***Seconde Partie* : Les microARN des clusters C14MC et C19MC, acteurs de l'oncogenèse du neuroblastome ?** **136**

**1. Origine de la dérégulation des deux microARN, miR-487b et miR-516a-5p et plus largement des deux clusters C14MC et C19MC** **138**

1.1. Extension de l'analyse de l'expression des microARN matures à cinq autres microARN du cluster C14MC **138**

1.2. Statut génomique des miR-487b et miR-516a-5p représentatifs des deux clusters C14MC et C19MC dans les tumeurs **139**

1.3. Analyse de l'expression des transcrits primaires de C14MC et C19MC **140**

1.4. Extension de l'analyse à l'expression des gènes soumis à empreinte parentale des loci 14q32 et 19q13 **142**

1.5. Extension de l'analyse aux gènes soumis à empreinte parentale du génome **145**





<b>2. Modulation de l'expression des microARN par différents agents thérapeutiques</b>	<b>150</b>
2.1. Lignées de neuroblastome : outils d'étude de l'expression des microARN	150
2.2. Traitements des lignées cellulaires neuroblastiques par la 5-aza-2'-déoxycytidine et l'acide phényl-butyrique	151
<b>3. Recherche de gènes cibles des miR-487b et miR-516a-5p</b>	<b>153</b>
3.1. Recherche de gènes cibles <i>in silico</i>	153
3.2. Expression de <i>N-MYC</i> , <i>TWIST1</i> et <i>TWIST2</i> dans les tumeurs neuroblastiques	154
3.3. <i>N-MYC</i> , <i>TWIST1</i> et <i>TWIST2</i> : gènes cibles des miR-487b et miR-516a-5p	157
<b>DISCUSSION DE LA SECONDE PARTIE</b>	<b>159</b>
<b><i>Conclusions &amp; Perspectives</i></b>	<b>163</b>
<b><i>Matériels et méthodes</i></b>	<b>166</b>
<b>1. MATRIELS BIOLOGIQUES : TUMEURS ET LIGNEES CELLULAIRES</b>	<b>167</b>
1.1. Patients, échantillons tumoraux et cryosections	167
1.2. Lignées cellulaires neuroblastiques et conditions de culture	167
<b>2. EXTRACTION DES ACIDES NUCLEIQUES</b>	<b>168</b>
2.1. Extraction des ARN totaux	168
2.2. Extraction des ADN génomiques	168



<b>3. ANALYSES PAR MICRO-ARRAY</b>	<b>169</b>
<b>4. PCR GENOMIQUE QUANTITATIVE</b>	<b>170</b>
<b>5. MESURE D'EXPRESSION DES MICROARN PAR RT-PCR</b>	<b>170</b>
<b>6. MESURE D'EXPRESSION DES GENES PAR RT-PCR</b>	<b>171</b>
<b>7. ANALYSES STATISTIQUES DES DONNEES DE PCR QUANTITATIVE</b>	<b>171</b>
<b>8. BIOLOGIE CELLULAIRE</b>	<b>173</b>
8.1. Transfections des « mimic » ou inhibiteur de microARN	173
8.2. Transfections de plasmide	173
8.3. Traitements des cellules	174

## ***PUBLICATIONS ET COMMUNICATIONS*** **175**

**Publications et communications relatives au travail de thèse** **175**

**Publications et communications non relatives au travail de thèse** **175**

### **Article 3** **176**

Samy M, **Gattolliat CH**, Pendino F, Hillion J, Nguyen E, Bombard S, Douc-Rasy S, Bénard J, Segal-Bendirdjian E. Loss of the malignant phenotype of human neuroblastoma cells by a catalytically inactive dominant-negative hTERT mutant. *Mol Cancer Ther.* 2012 Nov; 11(11):2384-93.



**Article 4****186**

Berois N<sup>#</sup>, **Gattolliat CH<sup>#</sup>**, Barrios E, Capandeguy L, Douc-Rasy S, Valteau-Couanet D, Bénard J, Osinaga E. *GALNT9* gene expression is a novel prognostic marker in neuroblastoma patients. *Clin Chem*. 2013 Jan; 59(1):225-33. <sup>#</sup>equal contribution

**Article 5****195**

Gourzones C, Ferrand FR, Amiel C, Vérillaud B, Barat A, Guérin M, **Gattolliat CH**, Gelin A, Klibi J, Chaaben AB, Schneider V, Guemira F, Guigay J, Lang P, Jimenez-Pailhes AS, Busson P. Consistent high concentration of the viral microRNA BART17 in plasma samples from nasopharyngeal carcinoma patients - evidence of non-exosomal transport. *Virology*. 2013 Apr 16;10(1):119.

**REFERENCES****207**



## LISTE DES FIGURES

- Figure 1.** Méthylation et déméthylation de l'ADN
- Figure 2.** Illustration d'un nucléosome et des modifications post-traductionnelles majeures qui jouent un rôle essentiel dans la régulation de l'expression des gènes
- Figure 3.** Gènes classiques et gènes soumis à empreinte
- Figure 4.** Carte des régions soumises à empreinte parentale montrant la distribution des gènes connus soumis à empreinte parentale et des syndromes cliniques associés à des altérations de ces gènes
- Figure 5.** Expériences de transplantation des pronucléi dans les cellules germinales de souris
- Figure 6.** Le cycle de vie de l'empreinte parentale
- Figure 7.** Reprogrammation de la méthylation dans la lignée germinale et l'embryon
- Figure 8.** Organisation schématique d'un locus de gènes soumis à empreinte parentale
- Figure 9.** Carte du locus 14q32 soumis à empreinte parentale
- Figure 10.** Représentation schématique de la région génomique DLK1-DIO2 sur les chromosomes paternel et maternel
- Figure 11.** Carte schématique du locus 19q13 soumis à empreinte parentale
- Figure 12.** Cartes schématiques de trois régions génomiques soumises à empreinte parentale
- Figure 13.** Le monde ARN
- Figure 14.** Représentation schématique des localisations génomiques potentielles des microARN
- Figure 15.** Schéma simplifié de la biogenèse des microARN
- Figure 16.** microARN : oncomiR et suppresseur de tumeur
- Figure 17.** Répartition des cancers pédiatriques
- Figure 18.** Localisation de la tumeur primitive
- Figure 19.** La classification de l'INSS (« *International Neuroblastoma Staging System* ») distingue six catégories de neuroblastomes en fonction de la taille de la tumeur primaire et de la dissémination métastatique au diagnostic
- Figure 20.** Classification histologique des tumeurs neuroblastiques
- Figure 21.** Âge au diagnostic, stade et amplification de *N-MYC* : les critères de l'algorithme de la stratification du risque des tumeurs neuroblastiques
- Figure 22.** Profils génomiques globaux par CGH-array des tumeurs neuroblastiques
- Figure 23.** Vers un modèle génétique du neuroblastome





- Figure 24.** Carte d'expression des microARN du cluster C14MC dans les tumeurs neuroblastiques (n=13)
- Figure 25.** Analyse statistique des niveaux d'expression de miR-487b, miR-410 et miR-409-3p dans les échantillons tumoraux de neuroblastome
- Figure 26.** Analyse statistique des niveaux d'expression de miR-181a, miR-181b, miR-181c et miR-181d dans les échantillons tumoraux
- Figure 27.** Analyse statistique des niveaux d'expression de miR-516a-5p dans les échantillons tumoraux
- Figure 28.** Courbes Kaplan-Meier de la survie globale et de la survie sans maladie des patients stratifiés selon des niveaux d'expression de miR-516a-5p et miR-487b
- Figure 29.** Courbes Kaplan-Meier de la survie globale (gauche) et de la survie sans maladie (droite) selon les trois groupes définis par la combinaison de miR-516a-5p et miR-487b dans (A) toute la cohorte de patients, (B) les patients de haut risque et (C) de bas risque de la classification standard
- Figure 30.** Modèle hypothétique d'action des microARN des deux clusters soumis à empreinte, C14MC et C19MC, dans l'oncogenèse du neuroblastome
- Figure 31.** Schéma de la localisation des microARN du cluster C14MC sur la région 14q32
- Figure 32.** Analyses statistiques des niveaux d'expression des transcrits primaires pri-miR-380 (Colonne 1), pri-miR-487b (Colonne 2) et pri-miR-516a (Colonne 3) des clusters C14MC et C19MC dans les tumeurs neuroblastiques (n=190)
- Figure 33.** Analyses statistiques des niveaux d'expression de (A) *ZNF331*, (B) *BEGAIN*, (C) *DLK1*, *MEG3* et *DIO3* entre les tumeurs de bas et haut risque classiques d'une part et entre les cinq groupes clinico-biologiques classiques stratifiés selon les critères de la classification standard
- Figure 34.** Courbes Kaplan-Meier de la survie globale (gauche) et de la survie sans maladie (droite) des patients pour l'expression de *MEG3*
- Figure 35.** Analyses statistiques des niveaux d'expression des gènes (A) *ZNF331*, (B) *BEGAIN*, *DIO3*, (C) *DLK1* et *MEG3* entre les quatre groupes de tumeurs classés d'après la combinaison de miR-516a-5p et miR-487b
- Figure 36.** Analyses statistiques des niveaux d'expression des gènes soumis à empreinte *KCNQ1*, *H19*, *IGF2*, *TP73*, *GRB10*, *PLAGL1*, *CDKN1C* et *ANO1* dans les quatre groupes de tumeurs classés d'après la combinaison de miR-516a-5p et miR-487b
- Figure 37.** Expression du miR-516a-5p, du pri-miR-516a et de *ZNF331* dans quatre lignées cellulaires neuroblastiques soumises à différents traitements (5-aza-2'-désoxycytidine – AZA, acide phénylbutyrique – PBA)
- Figure 38.** Expression des huit microARN du cluster C14MC (colonne de gauche), des microARN primaires (colonne du milieu) et des quatre gènes *BEGAIN*, *DLK1*, *MEG3* et *DIO3* (colonne de droite) de la région 14q32 soumise à empreinte parentale dans quatre lignées cellulaires neuroblastiques soumises à



différents traitements (5-aza-2'-désoxycytidine – AZA, acide phénylbutyrique – PBA)

**Figure 39.** Les séquences 3'UTR des gènes *N-MYC*, *TWIST1* et *TWIST2* contiennent des séquences cibles de (A) miR-487b et (B) miR-516a-5p.

**Figure 40.** Analyses statistiques des niveaux d'expression des gènes *N-MYC* (Colonne 1), *TWIST1* (Colonne 2) et *TWIST2* (Colonne 3) dans les tumeurs neuroblastiques (n=190)

**Figure 41.** Expression de (A) miR-487b et des gènes (B) *N-MYC*, (C) *TWIST1* et (D) *TWIST2*, de la lignée IGR-N-91, après inhibition (anti-miR-487b) ou sur-expression de miR-487b (« mimic » miR-487b)

**Figure 42.** Expression de (A) miR-516a-5p et des gènes (B) *N-MYC*, (C) *TWIST1* et (D) *TWIST2*, de la lignée IGR-N-91, après inhibition (anti-miR-516a-5p) ou sur-expression de miR-516a-5p (« mimic » miR-516a-5p)

**Figure 43.** Expression des gènes (A) *N-MYC* et *TWIST2* après sur-expression de *TWIST1* et (B) *N-MYC* et *TWIST1* après sur-expression de *TWIST2*, dans la lignée IGR-N-91

**Figure 44.** Modèle hypothétique des interactions moléculaires entre les miR-487b et miR-516a-5p et les gènes *N-MYC*, *TWIST1* et *TWIST2*.



## LISTE DES TABLEAUX

- Tableau 1.** Liste des microARN potentiellement impliqué dans l'oncogenèse des neuroblastomes d'après la méta-analyse de la littérature
- Tableau 2.** Modèles univariés et multivariés de Cox pour la survie (globale et sans maladie) chez tous les patients (n=226)
- Tableau 3.** Modèles multivariés de Cox pour la survie (globale et sans maladie) dans tous les patients (n=231)
- Tableau 4.** Modèles multivariés de Cox comprenant les huit microARN du cluster C14MC
- Tableau 5.** Coefficients de corrélation entre l'expression des huit microARN du cluster C14MC.
- Tableau 6.** Coefficients de corrélation entre l'expression des transcrits primaires et les microARN matures des clusters C14MC et C19MC.
- Tableau 7.** Coefficients de corrélation entre l'expression des deux transcrits primaires du cluster C14MC.
- Tableau 8.** Résultats du transcriptome pour cinq gènes des régions 14q32 et 19q13 soumises à empreinte parentale
- Tableau 9.** Résultats du transcriptome pour 62 gènes soumis à empreinte parentale du génome humain
- Tableau 10.** Coefficients de corrélation entre l'expression des trois gènes *N-MYC*, *TWIST1*, *TWIST2* entre eux dans (A) la cohorte entière, (B) les cinq groupes clinico-biologiques classiques et (C) les quatre groupes classés selon la combinaison des microARN miR-487b et miR-516a-5p
- Tableau 11.** Coefficients de corrélation entre l'expression des trois gènes *N-MYC*, *TWIST1*, *TWIST2* et l'expression des microARN matures des clusters C14MC et C19MC dans la cohorte entière
- Tableau 12.** Coefficients de corrélation entre l'expression des trois gènes *N-MYC*, *TWIST1*, *TWIST2* et l'expression des microARN primaires des clusters C14MC et C19MC dans la cohorte entière
- Tableau 13.** Caractéristiques des lignées cellulaires neuroblastiques
- Tableau 14.** Références des amorces d'*Applied Biosystems*
- Tableau 15.** Références des « mimics » et inhibiteurs de microARN de *Thermo Scientific*



# ***Introduction***





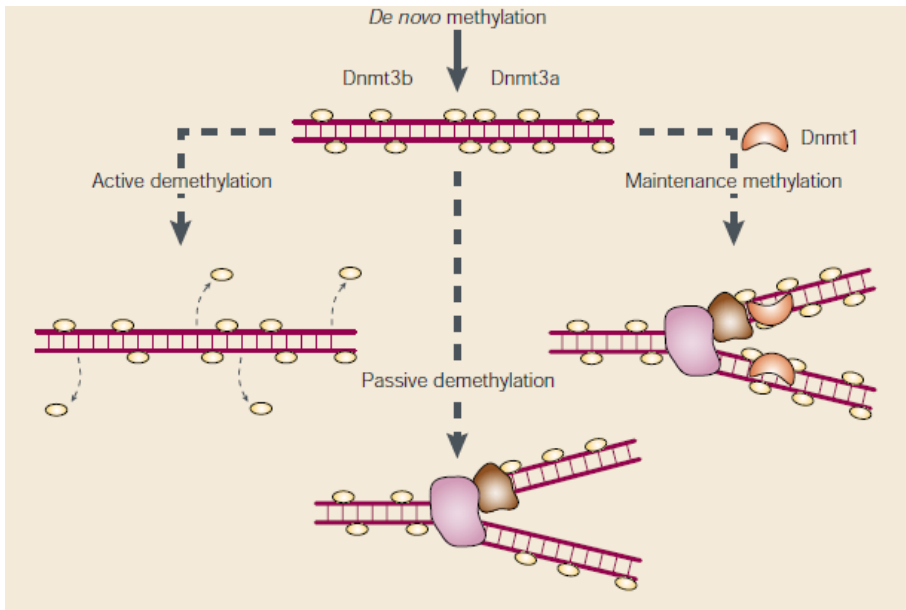
## 1. EPIGENETIQUE

Transmissibles au travers de la mitose et de la méiose, les marques épigénétiques sont néanmoins réversibles. C'est en 1952 que Conrad Waddington a introduit le terme « épigénétique » comme « l'étude des processus par lesquels le génotype, l'ensemble des gènes, engendre le phénotype, les caractéristiques de l'organisme » [WADDINGTON, 1952]. En effet, l'épigénétique désigne l'étude des changements stables de l'expression des gènes qui affectent les cellules sans modification de la séquence nucléotidique du génome cellulaire [Maccani and Marsit, 2009;Wilkins-Haug, 2009]. Cette régulation modifie l'activité transcriptionnelle des gènes de façon stable dans un type cellulaire ou un tissu donné à un moment donné, la régulation épigénétique conditionnant, en premier lieu, le bon déroulement du développement embryonnaire.

Aujourd'hui, la méthylation de l'ADN (section 1.1) et les modifications post-traductionnelles des histones (section 1.2), considérées comme les bases moléculaires principales de l'épigénétique, sont à l'origine de plusieurs phénomènes biologiques tels que l'inactivation du chromosome X ou l'empreinte parentale (section 2).

### 1.1. La méthylation de l'ADN

La mise en évidence des premiers événements épigénétiques a d'abord concerné l'ADN. Chez les mammifères, une méthylation des résidus cytosine dans les îlots CpG a été retrouvée dans 70% des promoteurs des gènes [Baylin and Jones, 2011]. Les effecteurs de la méthylation de l'ADN sont les enzymes DNA methyl-transferase (Dnmt). Il s'agit d'une famille de protéines très hétérogène, dont le donneur de la méthylation est la S-adenosyl-méthionine (SAM). Chez les mammifères, il existe trois Dnmt, deux de méthylation *de novo* (Dnmt3a et Dnmt3b) et une de maintien de la méthylation (Dnmt1). Les résidus méthyl de l'ADN sont « lus » par des protéines à motif MBD (methyl CpG binding domain) et répriment la transcription des gènes par perte d'affinité de fixation à l'ADN de certains facteurs de transcription. Le groupement méthyl prend place dans le grand sillon de l'ADN sans perturber les liaisons Watson-Crick. Les protéines à motif MBD répriment la transcription également de façon directe via le recrutement de complexes



**Figure 1. Méthylation et déméthylation de l'ADN**

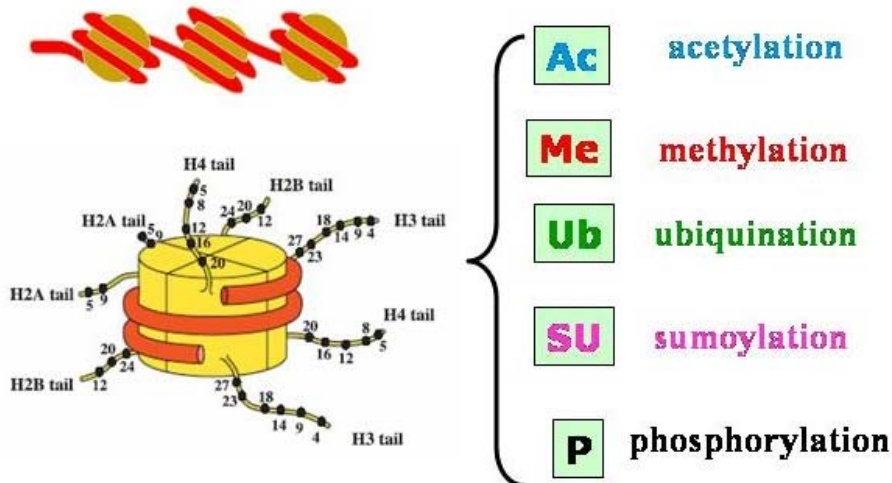
(d'après Reik et Walter, *Nature Genetic Reviews*, 2001)

La méthylation de l'ADN chez les mammifères s'effectue sur les dinucléotides CpG. Les groupes méthyl peuvent être introduits sur de l'ADN non méthyli par des enzymes de méthylation *de novo*, notamment Dnmt3a et Dnmt3b. Quand l'ADN est répliqué, le groupe méthyl sur le brin matrice est reconnu et un nouveau est introduit sur le brin néosynthétisé par Dnmt1 qui peut être associé à la machinerie de réplication. En présence de Dnmt1, l'ADN hémi-méthylé devient totalement méthyli, et les profils de méthylation de l'ADN sont maintenus (« maintenance methylation »). La déméthylation peut avoir lieu en absence de Dnmt1 lors de la réplication (« passive demethylation ») comme elle peut être active sans réplication de l'ADN faisant intervenir notamment des déméthylases (« active demethylation »).

enzymatiques tels que les HMTases (histone methyltransferases) et les HDAC (histone déacétylases) qui modifient les histones (section 1.2). Comme le nom générique des protéines lectrices l'indique, les méthylations de l'ADN sont regroupées au niveau d'îlots CpG qui correspondent à des régions riches en duplex cytosine-guanine (CG), chevauchant les régions promotrices et le premier exon de nombreux gènes. Ces îlots CpG constituent donc des régions de contrôle de la transcription des gènes associés. Lors de la réplication de l'ADN, la méthylation est semi-conservée. Grâce à Dnmt1, la méthylation des deux brins est conservée de génération en génération par une action post-réplivative. D'une autre utilité également, la méthylation permet, lors de la réplication, la reconnaissance par les mécanismes de réparation de l'ADN du brin néosynthétisé non encore méthylé par rapport au brin matrice qui est méthylé [Reik and Walter, 2001].

Des phénomènes de déméthylation peuvent survenir et contribuer à l'émergence de dysfonctionnements cellulaires par levée de l'inhibition d'expression de gènes normalement silencieux, ces dysfonctionnements étant eux-mêmes à l'origine de maladies, telle que le cancer. On peut distinguer deux types de déméthylation selon qu'elle est passive ou active. Dans le cas d'une déméthylation passive, Dnmt1 n'est plus active et l'ADN méthylé se dilue au cours des divisions successives jusqu'à disparaître totalement de la population cellulaire. Dans le cas d'une déméthylation active, on peut décrire différents mécanismes faisant intervenir des déméthylases, des glycosylases, ou encore des nucléases (Figure 1) [Reik and Walter, 2001]. A l'inverse, dans différentes variétés de tumeurs, malgré une hypométhylation globale du génome tumoral, des cartes de méthylation ont confirmé que 5 à 10% des promoteurs normalement non-méthylés le sont dans les génomes tumoraux. De manière originale, la méthylation concernerait des gènes non codants dont certains ont un rôle reconnu dans la tumorigenèse.

La découverte de résidus 5-hydroxyméthylcytosine (résidus oxydables en 5-formylcytosine et 5-carboxycytosine) et d'enzymes de type 5-hydroxyméthylase a ajouté un niveau de complexité à l'étude de la méthylation de l'ADN et de son influence sur la régulation transcriptionnelle des gènes. De plus, la présence d'îlots CpG hyperméthylés dans de larges régions hypométhylées où les gènes sont exprimés jette une apparente contradiction sur les données acquises jusqu'alors. Malgré plusieurs propositions d'explications, il reste encore à préciser en quoi ces régions hyperméthylées sont



**Figure 2.** Illustration d'un nucléosome et des modifications post-traductionnelles majeures qui jouent un rôle essentiel dans la régulation de l'expression des gènes

([http://www.integratedhealthcare.eu/1/en/histones\\_and\\_chromatin/1497](http://www.integratedhealthcare.eu/1/en/histones_and_chromatin/1497))

L'unité de base de la chromatine est le nucléosome, composé de l'ADN et de petites protéines très conservées, les histones. Un nucléosome est un octamère composé de quatre histones, H2A, H2B, H3 et H4, autour duquel s'enroule l'ADN. Les histones subissent de nombreuses modifications post-traductionnelles qui sont à la base de tous les phénomènes régulateurs de la transcription des gènes. On décrit le plus fréquemment des acétylations sur les lysines, des méthylations sur les lysines et thréonines, des phosphorylations sur les sérines et tyrosines. On observe également entre autres, des ubiquitinations et sumoylations sur les lysines.

impliquées dans l'activation de l'expression de ces gènes [Song et al., 2011; Song et al., 2012].

## 1.2. Les modifications post-traductionnelles des histones

L'unité de base de la chromatine est le nucléosome, composé de l'ADN et de petites protéines très conservées, les histones. Un nucléosome est un octamère composé de quatre histones, H2A, H2B, H3 et H4, autour duquel s'enroule l'ADN (Figure 2). Postulées dès 1964 par Allfrey et coll., les histones subissent de nombreuses modifications post-traductionnelles qui sont à la base de tous les phénomènes régulateurs de la transcription génique [ALLFREY et al., 1964]. La complexité des modifications qui jouent tout à la fois sur l'activation ou sur la répression de l'expression et les combinaisons multiples résultant de cette complexité rendent l'étude des modifications post-traductionnelles des histones très complexe. Il est à noter que ces modifications ne sont pas statiques ; en effet, elles évoluent selon des dynamiques spatio-temporelles. De plus, la signification fonctionnelle de la plupart des modifications identifiées n'est pas encore établie.

On décrit le plus fréquemment des acétylations sur les lysines, des méthylations sur les lysines et thréonines, des phosphorylations sur les sérines et tyrosines. On observe également des ubiquitylations et sumoylations sur les lysines, ainsi que des ADP-ribosylations, des glycosylations, des biotinylation, des carbonylations, etc (Figure 2). Dans certains cas, il y a l'existence de variants d'histones dans la composition de base des nucléosomes.

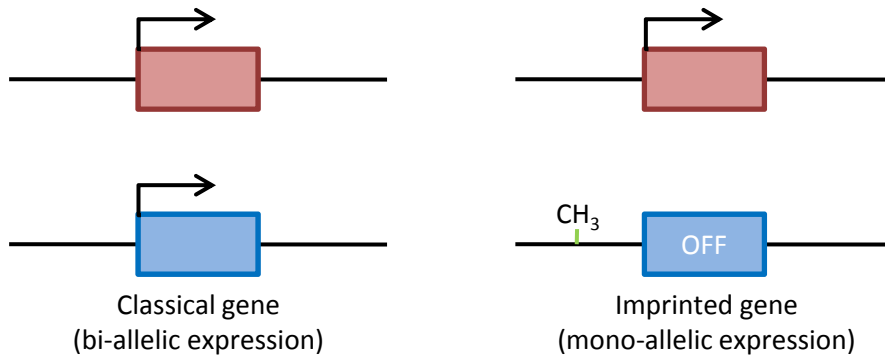
Les marques épigénétiques sont complexes et non encore totalement élucidées. En effet, la marque épigénétique, quelque'elle soit, est apposée sur un résidu spécifique des histones par les enzymes adéquates (Histone Méthyl-Transférase pour les méthylations par exemple). Ces marques, une fois déposées, sont lues de manière spécifique par des protéines chromatiniennes et modifient l'expression des gènes (activation ou répression de la transcription) selon le résidu et le type de modification apposé. Par exemple, la triméthylation de la lysine 4 de l'histone H3 active la transcription tandis que la triméthylation de la lysine 27 de l'histone H3 la réprime [Zhang and Reinberg, 2001; Li et al., 2007].



### 1.3. Thérapies épigénétiques

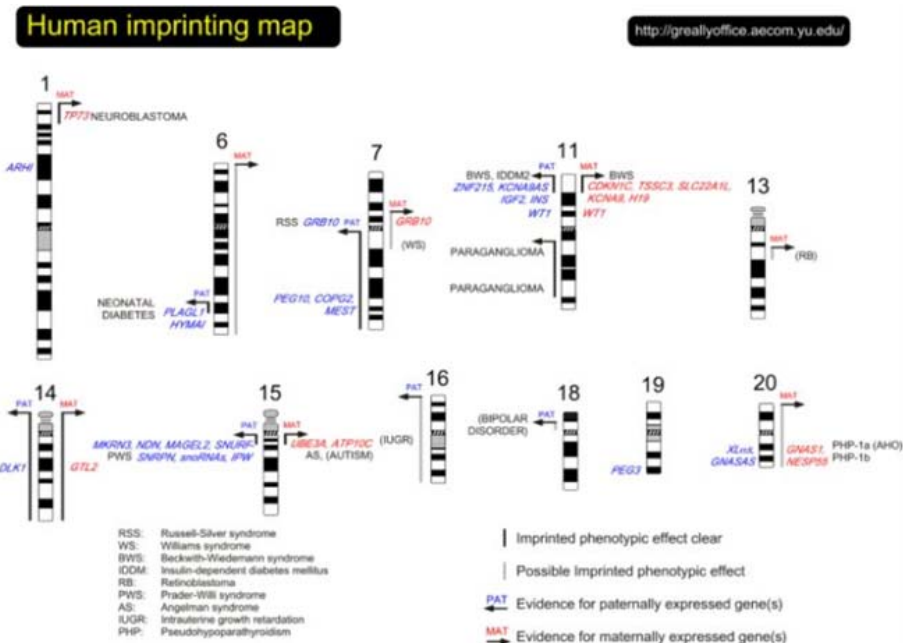
Les marques épigénétiques sont réversibles et sont donc potentiellement modifiables par des thérapies adaptées, notamment par des inhibiteurs des DNA méthyltransférases (5-azacytidine ; 5-aza-2'désoxycytidine...) dont l'activité thérapeutique est encourageante dans le cas des leucémies. L'utilisation d'inhibiteurs des histones déacétylases comme le butyrate, la trichostatine A, ou encore la trapoxine conduit à des rémissions des leucémies promyélocytaires aiguës. La recherche clinique se dirige vers une utilisation conjointe des deux types d'inhibiteurs en complément des thérapies classiques, la première étape consistant à résoudre les problèmes de spécificité et de toxicité.





**Figure 3. Gènes classiques et gènes soumis à empreinte**

Chez les organismes diploïdes, chaque individu reçoit deux copies de chaque gène, l’une héritée de la mère, l’autre du père. D’après le schéma de la génétique classique, on admettait que les deux copies s’exprimaient de manière équivalente. Cela reste vrai pour la plupart des gènes, cependant, pour un petit nombre, une seule des deux copies est exprimée, l’autre étant réprimée selon son origine parentale. Les gènes qui conservent la mémoire de leur origine parentale sont dits à « empreinte parentale ». Une marque épigénétique notamment la méthylation, atteste de leur origine parentale.



**Figure 4. Carte des régions soumises à empreinte parentale montrant la distribution des gènes connus soumis à empreinte parentale et des syndromes cliniques associés à des altérations de ces gènes (<http://greallyoffice.aecom.yu.edu>)**

## 2. EMPREINTE PARENTALE

Chez les organismes diploïdes, chaque individu reçoit deux copies de chaque gène, l'une héritée de la mère, l'autre du père. Jusqu'au début des années 1980, d'après le schéma de la génétique Mendélienne, on admettait que les deux copies s'expriment de manière équivalente. Cela reste vrai pour la plupart des gènes, cependant, pour un petit nombre, une seule des deux copies est exprimée, l'autre étant réprimée selon son origine parentale. Les gènes qui conservent la mémoire de leur origine parentale sont dits à « empreinte parentale ». Une marque épigénétique atteste de leur origine parentale (Figure 3).

L'empreinte parentale semble être spécifique aux mammifères placentaires et aux marsupiaux [Killian et al., 2000; Killian et al., 2001]. Elle a également été observée chez les angiospermes ou plantes à fleurs [Chaudhuri and Messing, 1994; Lund et al., 1995]. Différentes théories ont été avancées pour expliquer l'avantage qui pourrait être conféré par l'expression mono-allélique de certains gènes, alors qu'à priori un tel mécanisme serait défavorable en cas de mutation. L'hypothèse la plus généralement acceptée est la « théorie du conflit parental » [Haig, 2004]. Cette théorie se fonde sur les intérêts biologiques opposés de chacun des parents ; l'intérêt du père étant de transmettre des gènes assurant une croissance rapide même aux dépens de la mère, alors que l'intérêt de la mère serait de transmettre des gènes permettant de ménager ses ressources pour assurer un plus grand nombre de portées. Dans les faits, les gènes à expression paternelle sont le plus souvent des facteurs de croissance inhibés par des gènes à expression maternelle.

Aujourd'hui, on estime à quelques centaines le nombre de gènes soumis directement à l'empreinte ou sous son influence, répartis sur une centaine de loci (Figure 4). La majorité de ces gènes sont impliqués directement dans le développement embryonnaire ou placentaire [Luedi et al., 2005].



## 2.1. Mise en évidence de l’empreinte génomique parentale et de la non-équivalence des génomes parentaux.

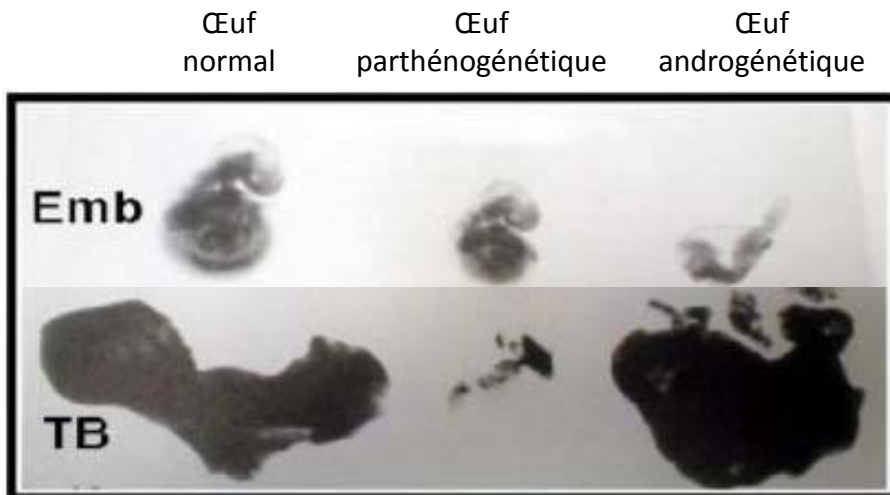
La différence fonctionnelle entre les deux haplogénomes parentaux chez les mammifères était pressentie depuis très longtemps. Ainsi, les éleveurs de bétails ont été les premiers à mettre en évidence la non-équivalence des génomes parentaux suite aux résultats d’accouplements croisés entre un étalon et une ânesse d’une part, et un âne et une jument d’autre part. Dans les deux cas, les hybrides, certes stériles, sont viables, mais présentent des différences phénotypiques. Dans le premier cas, l’ânesse met bas à un bardot, dans le second cas la jument met bas à un mulet. Des différences certes minces sont néanmoins visibles entre les deux progénitures, tant par leur aspect physique que par leur tempérament.

### 2.1.1. Androgenèse et parthénogenèse expérimentales chez la souris

Il a fallu attendre l’année 1984 pour que deux équipes démontrent expérimentalement chez la souris que la contribution des deux génomes parentaux n’était pas équivalente à celui de la descendance.

En appliquant des techniques de transplantation nucléaire chez la souris, dans le cas du transfert d’un pronucleus mâle dans un œuf activé, certains embryons se développent normalement alors qu’aucun n’y parvient lorsque le pronucleus transféré est un pronucleus femelle [Surani et al., 1984].

Par énucléation préalable et transplantation nucléaire, il est possible de générer des œufs comprenant soit 2 pro-noyaux mâles, soit 2 pro-noyaux femelles. Il s’agit dans ces cas d’œufs androgénétiques ou parthénogénétiques, respectivement [McGrath and Solter, 1984]. La technique se détaille comme suit : on prélève des œufs fécondés dans l’oviducte ; on aspire, à l’aide d’une micropipette, soit le pronoyau mâle, soit le pronoyau femelle, se distinguant par le degré de condensation de la chromatine ; on le remplace par un pronoyau de sexe opposé ; on implante les embryons androgénétiques ou parthénogénétiques, au stade blastomères, dans l’utérus d’une femelle hormonalement préparée ou femelle « pseudo-gestante ». Un œuf androgénétique produit du trophoblaste, mais peu de tissu embryonnaire tandis qu’un œuf parthénogénétique



**Figure 5.** Expériences de transplantation des pronucléi dans les cellules germinales de souris

(d'après McGrath et Solter., *Nature*, 1984)

Par énucléation préalable et transplantation nucléaire, il est possible de générer des œufs comprenant soit 2 pro-noyaux mâles (colonne de droite), soit 2 pro-noyaux femelles (colonne du milieu). Il s'agit respectivement d'œufs androgénétiques et parthénogénétiques. Un œuf androgénétique produit du trophoblaste (TB), mais peu de tissu embryonnaire (Emb) tandis qu'un œuf parthénogénétique produit un embryon mais très peu de trophoblaste.

produit un embryon mais très peu de trophoblaste (Figure 5). Aboutissant aux mêmes conclusions, Mann et Lovell-Badge ont transféré dans des œufs énucléés les deux pronoyaux d'embryons parthénogénétiques ou d'embryons issus d'une fécondation. Dans le premier cas, le développement est interrompu à mi-gestation alors que dans le second cas, deux tiers des embryons atteignent la naissance [Mann and Lovell-Badge, 1984].

Les génomes parentaux ne sont donc pas équivalents mais complémentaires dans le développement embryonnaire et placentaire. Les haplogénomes de chaque gamète doivent porter des marques spécifiques, une « empreinte », marques nécessairement réversibles puisque chaque individu doit produire des gamètes spécifiques à son sexe.

## 2.1.2. Phénotypes des conceptions uniparentales chez l'Homme

### 2.1.2.1. Androgenèse et môle hydatiforme complète

L'androgenèse est le processus de développement à partir du seul pro-noyau mâle. Dans l'espèce humaine, ce phénomène conduit à une tumeur trophoblastique sans formation de tissus embryonnaires. Il s'agit d'une môle hydatiforme complète. Le caryotype des cellules tumorales est 46,XX d'origine exclusivement paternelle, selon l'analyse ADN. La môle hydatiforme complète de caryotype 46,XX est le résultat d'un processus d'androgenèse où le pronoyau mâle réplique par deux fois son ADN avant la première division de segmentation.

### 2.1.2.2. Parthénogenèse et tératome ovarien

La parthénogenèse est le processus de développement embryonnaire à partir du noyau de l'ovocyte, sans fécondation préalable. Dans l'espèce humaine ce processus est responsable d'une tumeur ovarienne, le tératome ovarien ou kyste dermoïde. L'ovocyte s'auto-active dans un follicule mûr, puis se segmente, donnant un clone de cellules diploïdes dont tous les chromosomes sont d'origine maternelle. Ces cellules se différencient ensuite pour produire différents tissus.



En résumé, les conceptions androgénétiques se développent comme des môles hydatiformes, composées de villosités placentaires, mais sans embryon. Les conceptions parthénogénétiques donnent des tératomes ovariens, composés de tissus bien différenciés, mais désorganisées, sans structures extra-embryonnaires.

### 2.1.3. Phénotypes des conceptions triploïdes chez l'Homme

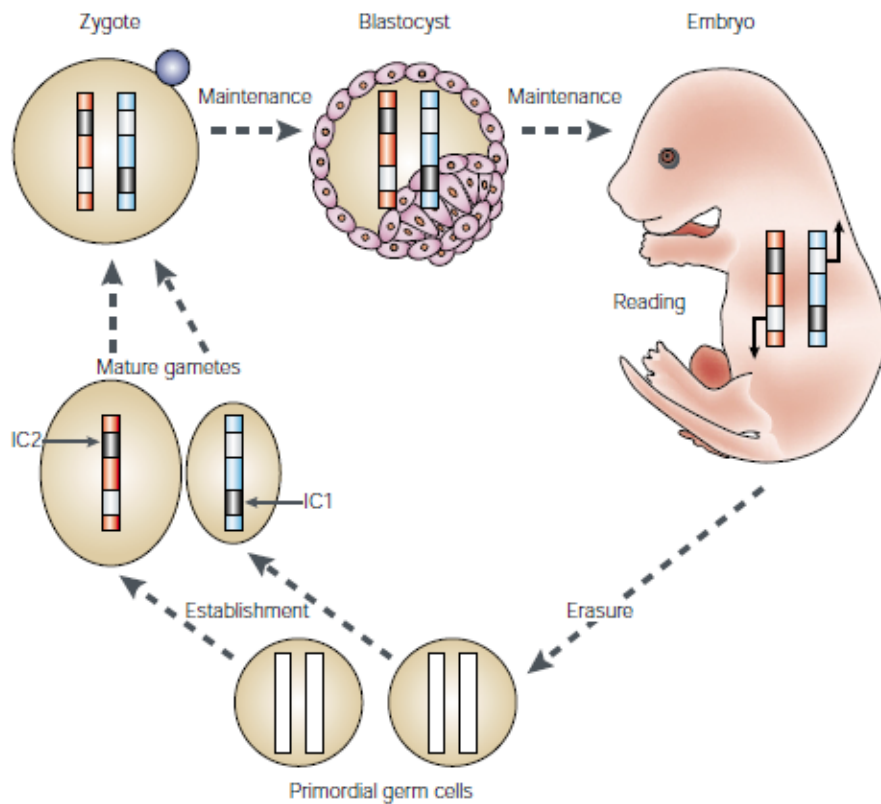
Les embryons triploïdes résultant d'une dyspermie présentent un placenta volumineux avec des villosités kystiques (= môle embryonnée) et ceux résultant d'une dysgynie présentent un placenta anormalement petit et dépourvu de villosités kystiques.

## 2.2. Nature et base moléculaire de l'empreinte parentale : la méthylation de l'ADN

L'empreinte parentale est un mécanisme de répression stable de l'expression des gènes et donc héritable au cours des divisions cellulaires tout au long de la vie de l'individu. Elle repose sur une modification épigénétique de l'ADN, n'impliquant aucun changement de la séquence nucléotidique de l'ADN. La modification épigénétique en rapport avec l'empreinte parentale est la méthylation de l'ADN concernant uniquement des résidus cytosines (C) précédant un résidu guanine (G) : on parle de doublet CpG. Les processus de méthylation sont contrôlés par des ADN méthyltransférases (Dnmt) et aboutissent à une compaction des nucléosomes, empêchant l'accès des facteurs de transcription aux promoteurs des gènes et aboutissant à une répression transcriptionnelle. Par conséquent, les régions soumises à empreinte contiennent des îlots CpG qui sont fortement méthylés si l'allèle est inactif ou faiblement méthylés si la transcription est active.

Les Dnmt catalysent le transfert d'un groupement méthyl sur des résidus cytosines de l'ADN produisant de la 5-méthylcytosine. La méthyltransférase 1 de l'ADN, Dnmt1, recopie sur le brin néo-synthétisé la méthylation lue sur le brin matrice lors de la réplication de l'ADN. Ce mécanisme explique la transmission stable de la méthylation de l'ADN au cours des divisions cellulaires.

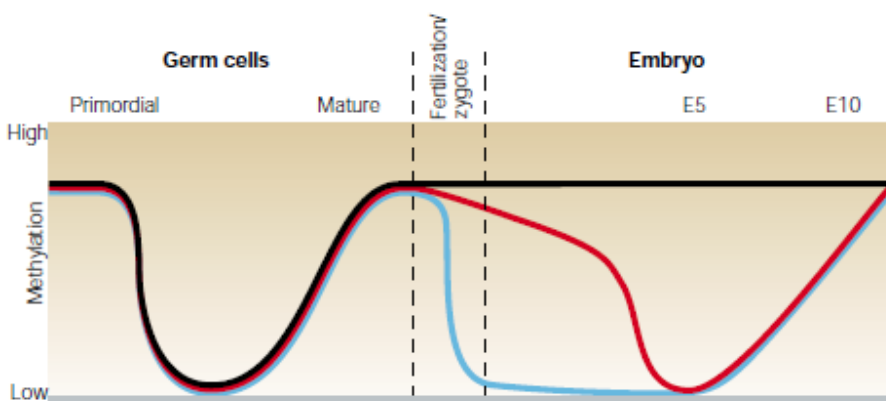




**Figure 6.** Le cycle de vie de l’empreinte parentale

(d’après Reik et Walter, *Nature Genetic Reviews*, 2001)

L’effacement, l’établissement et la maintenance de la méthylation des centres d’empreinte dans les cellules germinales et durant le développement embryonnaire. IC1 et IC2 correspondent à des centres de contrôle de l’empreinte. La couleur grise indique une modification et la couleur blanche aucune modification des allèles. Les chromosomes parentaux sont marqués en accord avec le sexe du parent : bleu pour le mâle et rouge pour la femelle. La lecture, c’est-à-dire l’interprétation transcriptionnelle de l’empreinte primaire, pendant le développement de l’embryon, est indiquée par des flèches.



**Figure 7.** Reprogrammation de la méthylation dans la lignée germinale et l’embryon

(d’après Reik et Walter, *Nature Genetic Reviews*, 2001)

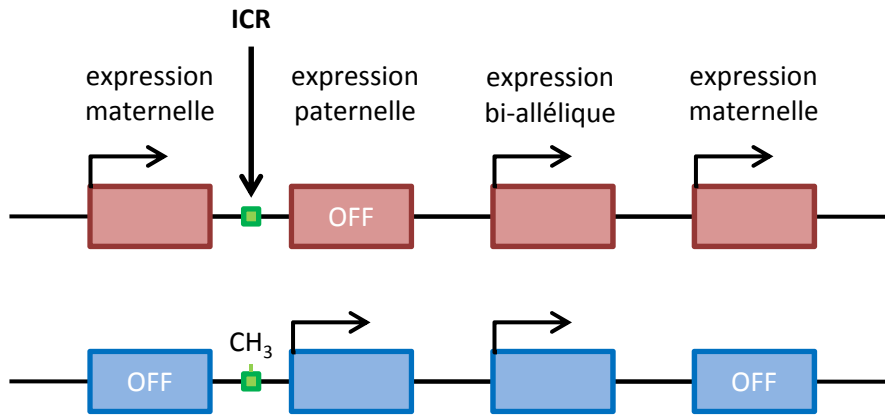
La figure montre le niveau de méthylation des gènes soumis à empreinte méthylés (en noir) et non-méthylés (en gris) et celui des séquences non soumises à l’empreinte (séquences maternelles en rouge et paternelles en bleu) pendant le développement des cellules germinales et de l’embryon. L’axe horizontal représente le temps et l’axe vertical indique les niveaux relatifs de méthylation.

### 2.3. Transmission de l’empreinte parentale : effacement et écriture de l’empreinte pendant la gamétogenèse.

L’embryon, résultant de la fusion des gamètes, possède un allèle transmis par le père avec une empreinte paternelle et un allèle transmis par la mère avec une empreinte maternelle. Dans les cellules somatiques, ces empreintes sont transmises de façon stable au cours des divisions cellulaires tout au long de la vie grâce à l’activité de Dnmt1. Les cellules germinales sont les seules cellules de l’organisme possédant la faculté d’effacer puis de remettre en place l’empreinte pour la transmettre à la génération suivante. Un homme transmet l’allèle qu’il a reçu de sa mère avec une fréquence de 50%. Cet allèle, initialement porteur d’une empreinte maternelle, doit être transmis avec une empreinte de type paternel. Dans les cellules germinales embryonnaires, l’empreinte portée par les deux allèles parentaux est effacée, par perte de méthylation de leur ADN. Quand la gamétogenèse démarre, l’empreinte qui est mise en place correspond au sexe de l’individu. L’acquisition de la méthylation se fait avant l’entrée en méiose des spermatogonies à la puberté chez l’homme et des ovogonies durant la vie fœtale chez la femme. Il existe donc un cycle de l’empreinte au cours des générations successives, caractérisé par des étapes d’effacement dans les cellules germinales primordiales et de réécriture lors de l’entrée en méiose (Figures 6 et 7) [Reik and Walter, 2001].

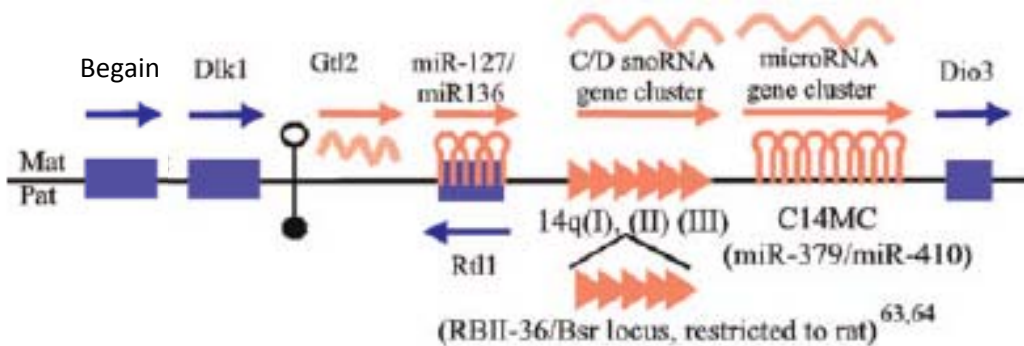
### 2.4. Les loci soumis à empreinte parentale

Aujourd’hui, chez l’homme, soixante-seize gènes et transcrits non-codants sont directement soumis à empreinte parentale (mis à part ceux du chromosome X), pour la plupart également soumis à empreinte chez les autres mammifères [Feil et al., 1998; Hagemann et al., 1998; McLaren and Montgomery, 1999; Kim et al., 2004; Watrin et al., 2005]. L’expression différentielle de certains gènes soumis à l’empreinte peut dépendre du contexte spatio-temporel. La plupart des gènes sont regroupés dans le génome, sur des domaines chromosomiques dont la taille est généralement de l’ordre de 1 Mb, où se côtoient des gènes à expression maternelle, des gènes à expression paternelle et des gènes à expression bi-allélique. Près de 80% des gènes soumis à empreinte appartiennent à de tels loci [Reik and Walter, 2001]. Cette organisation



**Figure 8.** Organisation schématique d'un locus de gènes soumis à empreinte parentale

La plupart des gènes sont regroupés dans le génome, sur des domaines chromosomiques dont la taille est généralement de l'ordre de 1 Mb, où se côtoient des gènes à expression maternelle, des gènes à expression paternelle et des gènes à expression bi-allélique. Cette organisation génomique permet une co-régulation des gènes par des séquences régulatrices qui contrôlent l'empreinte sur le locus entier, appelées régions de contrôle de l'empreinte (ICR pour « Imprinting Control Region »).



**Figure 9.** Carte du locus 14q32 soumis à empreinte parentale

Situés en région sub-télocérique du chromosome 14 humain, plusieurs transcrits exprimés à partir du locus 14q32 sont soumis à empreinte parentale. On distingue quatre gènes à expression paternelle (*BEGAIN*, *DLK1*, *RTL1* et *DIO3*, en bleu), encodant tous des protéines, et des transcrits non codants à expression maternelle (*GTL2*, *RTL1* anti-sens, *snoARN*, *C14MC*, en rouge)

génomique permet une co-régulation des gènes par des séquences régulatrices qui contrôlent l’empreinte sur le locus entier, séquences appelées régions de contrôle de l’empreinte (« ICR » pour « Imprinting Control Region ») (Figure 8).

#### 2.4.1. Le locus *DLK1-DIO3* du bras long du chromosome 14 humain

Situés en région sub-télomérique du chromosome 14 humain, plusieurs transcrits exprimés à partir du locus 14q32 sont soumis à empreinte parentale. On distingue quatre gènes à expression paternelle (*BEGAIN*, *DLK1*, *RTL1* et *DIO3*), encodant tous des protéines, et des transcrits non codants à expression maternelle (*MEG3*, *RTL1* anti-sens, *MEG8*, *C14MC...*) (Figure 9) [Schmidt et al., 2000;Irving et al., 2010].

Le locus 14q32 joue un rôle fondamental dans le développement embryonnaire. En effet, les souris présentant une disomie uniparentale paternelle du chromosome 12, orthologue murin du chromosome 14 humain, ne survivent pas à la gestation et présentent une placentomégalie caractéristique. De la même façon les souris présentant une disomie uniparentale maternelle du chromosome 12, ne survivent pas à la gestation et manifestent un retard de croissance à la fois embryonnaire et placentaire [Georgiades et al., 2000;Georgiades et al., 2001].

L’empreinte parentale de ce locus a été conservée au cours des processus évolutifs grâce à l’acquisition de l’ICR [Edwards et al., 2008]. Trois régions différentiellement méthylées, appelées DMR pour « differentially methylated region », ont été identifiées par séquençage du locus après traitement au bisulfite, elles ont des propriétés fonctionnelles distinctes. La première nommée IG-DMR, pour « Intergenic Germline-derived DMR », est située dans la zone intergénique entre *DLK1* et *GTL2*. Les deux autres nommées *DLK1*-DMR et *MEG3*-DMR sont liées respectivement aux gènes *DLK1* et *GTL2*. Ces trois régions présentent une hyperméthylation sur l’allèle paternel et une hypométhylation sur l’allèle maternel. Seule l’IG-DMR hérite des marques épigénétiques dans les cellules germinales et semble être le premier niveau de la régulation de l’empreinte dans cette région [Takada et al., 2000;Paulsen et al., 2001;Takada et al., 2002;Kagami et al., 2010].

La délétion de l’IG-DMR chez la souris, en cas de transmission maternelle, a pour effet d’annuler tout phénomène d’empreinte génétique sur le locus. Tous les gènes du locus se



présentent alors comme le chromosome paternel, ce qui se traduit par un phénotype comparable aux souris présentant une disomie uniparentale paternelle : ni expression des transcrits non codants, ni doublement de l'expression des transcrits paternels. La transmission paternelle de la délétion de l'IG-DMR n'affecte pas le statut d'empreinte, ce qui implique que chaque chromosome assure la régulation de l'empreinte de façon indépendante l'un de l'autre [Lin et al., 2003]. Une étude sur deux nourrissons, l'un présentant une microdélétion dans l'IG-DMR, l'autre une microdélétion dans le MEG3-DMR, a mis en évidence que la région MEG3-DMR, hypométhylée dans l'embryon, joue un rôle essentiel dans l'établissement de l'empreinte des gènes du locus embryonnaire alors que l'IG-DMR régule les gènes du placenta ; l'IG-DMR ayant néanmoins un rôle régulateur en amont de l'état de méthylation du MEG3-DMR de l'embryon [Kagami et al., 2010].

Peu de données réelles sur la fonction des transcrits de ce locus ont été fournies depuis leur caractérisation. Néanmoins, on sait que :

- *DLK1*, identifié en 1993 dans des fibroblastes murins capables de se différencier en adipocytes [Laborda et al., 1993], est un membre de la voie de la signalisation Notch et, s'exprimant dans un très grand nombre de tissus pendant le développement embryonnaire, ce gène est impliqué dans la différenciation de plusieurs tissus [da Rocha et al., 2008], notamment dans la différenciation des cellules pancréatiques et des cellules nerveuses. Contrairement au stade embryonnaire, il n'est pas ou peu exprimé dans la grande majorité des tissus adultes. Son expression maintiendrait un état indifférencié des cellules [Floridon et al., 2000]. Le statut d'empreinte de *DLK1* montre qu'il s'exprime uniquement depuis l'allèle paternel. La fonction de *DLK1*, certes essentielle au développement embryonnaire, reste encore inconnue.

- *MEG3* (Maternally Expressed Gene 3), également connu chez l'homme sous le nom de *GTL2* (Gene Trap Locus 2), fut découvert initialement chez la souris [Schuster-Gossler et al., 1996]. Les auteurs ont mis en évidence que *MEG3* est exprimé dans la majorité des tissus embryonnaires. En outre, *MEG3* est également exprimé dans tous les muscles striés squelettiques, ainsi que dans les cellules du système nerveux de la souris



adulte. L'expression de *MEG3* est d'origine maternelle sans pour autant que l'empreinte de *MEG3* ne soit retrouvée dans toutes les lignées murines analysées [Schuster-Gossler et al., 1996;Croteau et al., 2003]. Peu de données sont disponibles sur le rôle physiologique de *MEG3* qui, par ailleurs, présente de nombreux transcrits alternatifs de taille différente. *MEG3* n'encode aucune protéine, et agit donc sous la forme d'un ARN non codant. Une souris transgénique, possédant une délétion des exons 1 à 5 de *MEG3*, démontre le rôle capital de ce gène dans le développement normal des souriceaux, puisque cette délétion conduit irrémédiablement à une mort prématurée dans 100% des cas [Takahashi et al., 2009]. De plus, la transcription active de *MEG3* serait nécessaire à la régulation de l'empreinte de l'ensemble du locus [Zhou et al., 2010]. Seul *MEG3* possède un promoteur bien défini de type « TATA box » parmi tous les transcrits maternels du locus. Ces transcrits non codant ayant la même orientation, il est suggéré qu'ils proviennent d'un seul long ARN polycistronique mûri après la transcription en plusieurs ARN distincts [da Rocha et al., 2008]. De plus, il lui a été attribué un rôle dans les processus pathologiques, avec des propriétés de suppresseur de tumeur, notamment en exerçant des fonctions anti-prolifératives au travers d'interactions avec p53 et MDM2, et également en régulant la phosphorylation de la protéine Rb [Benetatos et al., 2011]. *MEG3*, interagissant également avec les voies de signalisation de l'angiogenèse et de la survie cellulaire, s'avère dérégulé dans de nombreux types de cancers [Benetatos et al., 2011]. En effet, il a été démontré que *MEG3* est sous-exprimé dans les cellules de carcinomes hépatocellulaires (HCC) comparé aux hépatocytes normaux. Une hyperméthylation du promoteur de *MEG3* dans les cellules HCC a été identifiée par PCR spécifique au groupement méthyl et l'augmentation de l'expression de *MEG3* est observée en inhibant la méthylation par traitement par un agent déméthylant, 5-aza-2-désoxycytidine, ou par l'utilisation de siRNA dirigés contre *DNMT1* et *DNMT3b* [Benetatos et al., 2011;Braconi et al., 2011].

- Le gène *RTL1*, dépourvu d'intron et possédant des éléments similaires aux domaines POL et GAG, présente une structure qui ressemble à celle des transposons, d'où le nom « rétrotransposon-like 1 ». Contrairement aux rétro-transposons classiques, *RTL1*, ou aussi PEG11 (Paternally Expressed Gene 11), est très conservé chez les mammifères, suggérant un rôle important. La protéine RTL1 est essentielle au développement normal





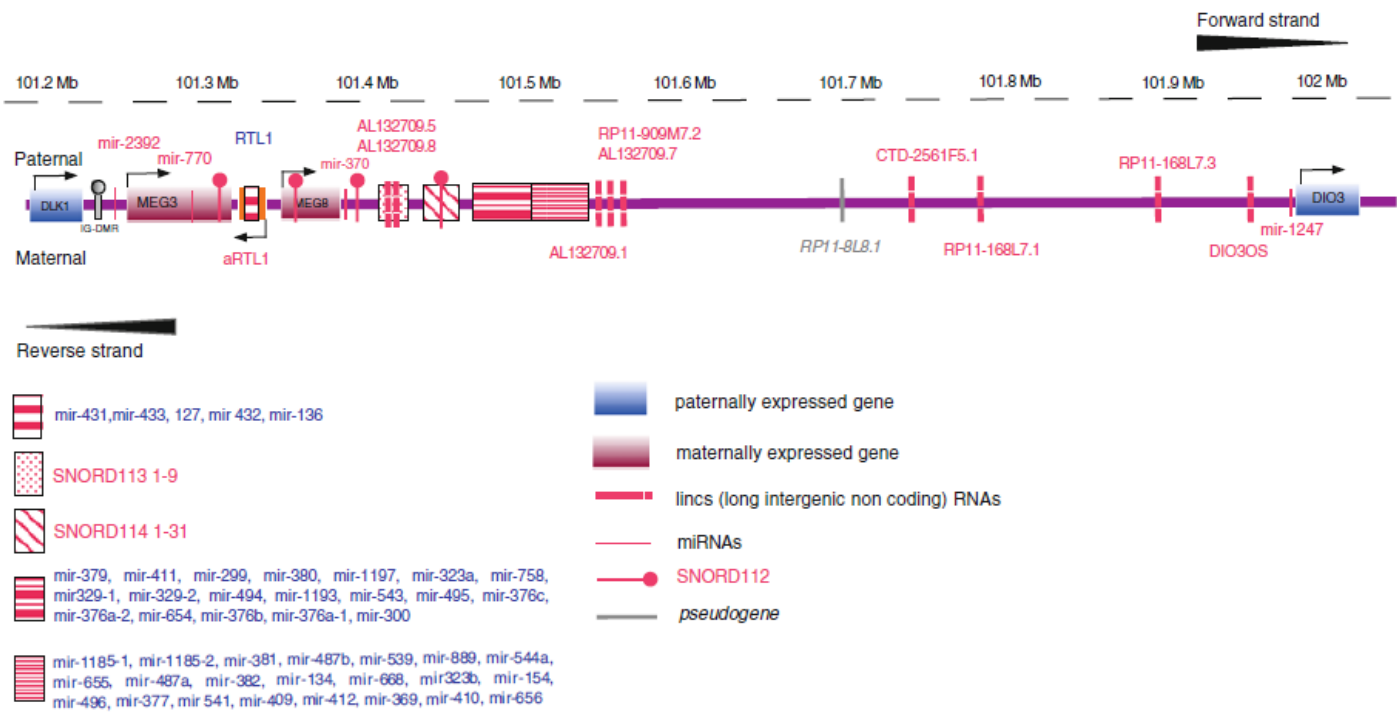
du placenta et des tissus embryonnaires [da Rocha et al., 2008]. Une particularité de *RTL1* est l'existence d'un transcrit anti-sens, nommé *RTL1* anti-sens (*RTL1as*), dont le statut d'empreinte est réciproque. Ainsi, si *RTL1* est exprimé à partir de l'allèle paternel, *RTL1as* est transcrit maternellement. En 2003, Seitz et coll. ont décrit la présence de deux microARN issus du transcrit *RTL1as* : miR-127 et miR-136 [Seitz et al., 2003]. Les régions les plus conservées de *RTL1as* sont les microARN, et pour deux d'entre eux, les régions équivalentes correspondent à un domaine fonctionnel de la protéine codée par *RTL1*, démontrant ainsi une évolution parallèle des deux transcrits en orientation anti-sens, l'un par rapport à l'autre [Byrne et al., 2010]. La délétion de la région portant ces deux transcrits provoque des troubles majeurs dans le développement embryonnaire et placentaire entraînant irrémédiablement le décès de l'ensemble des souriceaux [Sekita et al., 2008].

- *MEG8* (maternally expressed gene 8), également nommé *RIAN* (RNA Imprinted and Accumulated in the Nucleus), a été identifié pour la première fois chez la souris. Localisé en aval de *MEG3* [Hatada et al., 2001], il s'exprime uniquement à partir de l'allèle maternelle. *MEG8*, qui ne contient aucune phase ouverte de lecture, présente plusieurs exons et transcrits alternatifs. Si sa fonction est toujours inconnue, en 2000 et 2001, Cavaille et coll. ont découvert que le transcrit primaire de *MEG8* contenait deux clusters de répétitions organisées en tandem dont les motifs sont caractéristiques des snoARN (small nucleolar ARN) [Cavaille et al., 2000; Cavaille et al., 2001]. Ces clusters, nommés 14q (I) et 14q(II), contiennent respectivement 9 et 31 copies paralogues de snoARN, auxquels s'ajoute 14q(0), un snoARN unique. Localisés dans les introns de *MEG8*, ils possèderaient le même profil d'expression que le transcrit hôte. Les snoARN sont des petits ARN non codants dont la fonction principale est la modification chimique d'autres ARN, ciblés par complémentarité de séquence. Ils assurent notamment la 2'O-ribose-méthylation et la pseudo-uridylation des ARN ribosomiaux et de l'épissage. Cependant, les snoARN du locus, au contraire de tous ceux déjà identifiés, ne montrent aucune complémentarité évidente de séquences avec les ARN ribosomiaux ou les ARN de l'épissage (U1, U2, U3, U4, U5 et U6). Ils sont donc appelés snoARN orphelins. Ainsi, tout comme *MEG8*, leur fonction est encore inconnue. Par la suite, de multiples C/D snoARN répétés en tandem ont été identifiés dans le locus 14q32 [Cavaille et al., 2002].



- Le cluster de microARN du chromosome 14, nommé C14MC (« chromosome 14 microRNA cluster »), a été décrit dans la littérature sous des noms divers : le cluster Mirg, le cluster miR-379/miR-410 ou encore le cluster miR-379/miR-656. Il s'agit du cluster de microARN le plus important décrit à ce jour avec 54 microARN localisés en deux segments voisins étalés sur plus de 40 kb [Seitz et al., 2003;Seitz et al., 2004]. Le transcrit C14MC, dénué de cadre ouvert de lecture, fonctionne comme un ARN non codant. En 2004, Seitz et coll. ont prédit *in silico* l'existence de 29 microARN potentiels localisés dans le transcrit, et confirmé l'expression d'onze d'entre eux dans le cerveau de souris [Seitz et al., 2004]. Tous ces microARN, étant détectables dans les embryons murins présentant une disomie uniparentale maternelle, ne l'étaient pas dans ceux présentant une disomie paternelle, prouvant ainsi leur statut d'empreinte maternelle chez la souris. L'expression des microARN du C14MC est régulée par le statut de méthylation de l'IG-DMR (Intergenic Germline-derived Differentially Methylated Region) [Seitz et al., 2004]. L'analyse de tissus humains normaux révèle que les membres de ce cluster sont exprimés de façon prédominante dans le placenta et les tissus épithéliaux. Préservé sans changement structural significatif, C14MC est uniquement retrouvé chez les mammifères placentaires [Glazov et al., 2008]. L'origine de ce cluster remonterait à une séquence précurseur qui serait apparue il y a 100 millions d'années chez un ancêtre précoce des mammifères après sa séparation des marsupiaux ou des monotrèmes ; ce cluster de microARN aurait facilité l'évolution des mammifères placentaires [Glazov et al., 2008].

- *DIO3* (deiodinase iodothyronine de type III) code pour une sélénoprotéine qui catalyse la dégradation des hormones thyroïdiennes T3 (3,5,3'-triiodothyronine) et T4 (thyroxine) et participe ainsi à leur régulation dans de nombreux tissus fœtaux et dans le placenta [Salvatore et al., 1995;Yevtodiyyenko et al., 2002;Tsai et al., 2009]. Le gène, s'exprimant uniquement depuis l'allèle paternel, fut identifié initialement dans le locus DLK1-GTL2 chez la souris [Hernandez et al., 1998;Hernandez et al., 2002]. En outre, *DIO3* possède un transcrit antisens non codant, *DIO3as*, dont la partie 5' recouvre la séquence promotrice de *DIO3*. Les deux transcrits présentent le même profil d'expression, suggérant un mécanisme commun de régulation. Une souris transgénique déficiente pour *DIO3* a permis de démontrer le rôle crucial de ce gène dans le développement



**Figure 10.** Représentation schématique de la région génomique DLK1-DIO3 sur les chromosomes paternel et maternel

(d'après Benetatos, *Cell Mol Life Sci Review*, 2012)

Les gènes, microARN, snoARN, lincARN et pseudogènes et l'origine allélique de leur expression sont annotés.

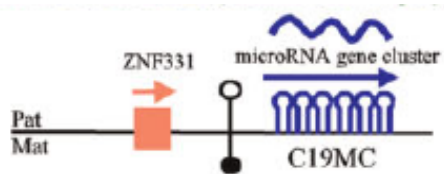
embryonnaire [Hernandez et al., 2006]. En effet, ces souris présentent des troubles majeures de croissance, de viabilité et de fertilité. De plus, son expression est notamment associée à la prolifération et à la différenciation des adipocytes [Hernandez et al., 2007]. Cependant la fonction de ce gène n'est toujours pas élucidée.

- Exprimé dans de nombreux tissus, le gène *BEGAIN* (Brain-enriched guanylate Kinase-associated protein) est très conservé chez les mammifères. Décrit initialement chez le rat comme un gène spécifique du cerveau [Deguchi et al., 1998], *BEGAIN* génère quatre transcrits primaires issus de promoteurs alternatifs. La protéine Begain pourrait avoir un rôle dans la transduction du signal cellulaire, dans l'établissement du cytosquelette et dans le mouvement intracellulaire des récepteurs [Deguchi et al., 1998]. *BEGAIN* est situé en amont du locus DLK1-GTL2 Son expression mono-allélique provient de l'allèle paternel [Smit et al., 2005]. Cependant, son statut d'empreinte n'est pas homogène et semble dépendre à la fois du promoteur et du tissu. Pour exemple, tandis que l'une des formes du gène, *BEGAIN1*, est soumise à l'empreinte dans le cerveau, le cœur et le muscle squelettique, mais est exprimée de façon bi-allélique dans le foie, *BEGAIN2*, exprimé à partir d'un promoteur différent, n'est soumis à l'empreinte dans aucun des tissus analysés. Le gène *BEGAIN* se démarque donc de l'ensemble du locus par un statut d'empreinte très particulier.

Deux remarques sont à rapporter :

Remarque 1 : Deux microARN, miR-370 et miR-1247, sont également retrouvés en aval de *MEG8* et en amont de *DIO3* respectivement. De plus, la région chromosomique DLK1-GTL2 soumise à empreinte parentale comporte, outre le cluster C14MC, deux autres microARN localisés entre l'IG-DMR et *MEG3*. Il s'agit du miR-2392 et miR-770 (Figure 10) [Benetatos et al., 2013].

Remarque 2 : En plus de *MEG3* et *MEG8*, neuf long ARN non codants inter-géniques, un pseudogène et un petit ARN nucléaire du spliceosome sont localisés sur le locus DLK1-DIO3 (Figure 10) [Benetatos et al., 2013].



**Figure 11.** Carte schématique du locus 19q13 soumis à empreinte parentale

Situé au niveau de la région péri-centromérique du bras long du chromosome 19, ce locus présente des gènes soumis à empreinte parentale, dont le gène *ZNF331* à expression maternelle et le cluster de microARN, C19MC, à expression paternelle. Ce locus est le moins étudié des régions soumises à empreinte parentale. L'origine de l'expression d'un autre gène, *DPRX*, localisé entre *ZNF331* et C19MC, n'a pas encore été caractérisée. Une région de contrôle de l'empreinte de ce locus a été identifiée en amont de C19MC, et pour cela, est nommée C19MC-DMR.

#### 2.4.2. Le locus du bras long du chromosome 19

Situé au niveau de la région péri-centromérique du bras long du chromosome 19, ce locus présente des gènes soumis à empreinte parentale, dont le gène *ZNF331* à expression maternelle et le cluster de microARN, C19MC, à expression paternelle. Ce locus est le moins étudié des régions soumises à empreinte parentale. L'origine de l'expression d'un autre gène, *DPRX*, localisé entre *ZNF331* et C19MC, n'a pas encore été précisée. Une région de contrôle de l'empreinte de ce locus a été identifiée en amont de C19MC, et pour cela nommée C19MC-DMR [Noguer-Dance et al., 2010]. Très peu de données sur la fonction des transcrits codés par ce locus sont à disposition depuis leur caractérisation (Figure 11). Néanmoins, on sait que :

- Le gène *ZNF331*, également connu sous le nom *ZNF361*, *ZNF463* et *Rita*, code pour une protéine à doigts de zinc spécifique des « Kruppel box » et se localise sur le chromosome 19q13.4 [Rippe et al., 1999; Wu et al., 2001]. Les fonctions des protéines à doigts de zinc sont extrêmement variées et comprennent entre autres la reconnaissance de l'ADN, le repliement de l'ARN, l'activation ou la répression de la transcription, et la régulation de l'apoptose. Beaucoup de ces protéines fonctionnent par reconnaissance de séquences spécifiques d'ADN. Comme tous les gènes codants pour des protéines en doigt de zinc spécifiques des « Kruppel box » ont été montrés jusqu'alors agir seulement comme répresseurs de la transcription [Margolin et al., 1994; Witzgall et al., 1994; Vissing et al., 1995], *ZNF331* est donc considérée comme un répresseur de la transcription, sans pour autant que sa fonction soit connue.

- Le cluster de microARN du chromosome 19 (C19MC) est le deuxième cluster de microARN, le plus important par sa taille décrit à ce jour. Localisé en 19q13.41, il s'étend sur plus de 100 kb. Il s'agit d'un cluster de microARN spécifique aux primates conservé chez l'homme qui comprend 46 microARN [Bentwich et al., 2005; Bortolin-Cavaille et al., 2009; Lin et al., 2010b]. Les microARN de ce cluster présentent des séquences « seed » communes et sont donc supposés être originaires d'un microARN ancestral commun, qui serait potentiellement un des membres du cluster miR-371-3, localisé en aval de C19MC [Zhang et al., 2008b]. Localisé dans une région soumise à empreinte parentale, C19MC





s'exprime uniquement à partir du chromosome d'origine paternel. Son expression est contrôlée par la méthylation d'une région promotrice riche en CpG en amont de 17,6 kb de C19MC [Noguer-Dance et al., 2010]. De manière intéressante, C19MC est enrichi par des éléments Alu approximativement 10 fois plus que dans les autres régions du génome, suggérant une co-évolution des séquences Alu et des microARN [Zhang et al., 2008b;Lehnert et al., 2009]. Les fonctions de ces séquences répétées et de leur coopération avec les microARN ne sont pas claires. Néanmoins, plusieurs publications suggèrent une implication de ces séquences dans la régulation de la structure du génome et de l'expression des gènes [Zhang et al., 2008b;Lehnert et al., 2009]. De plus, l'expression des microARN semblerait être partiellement régulée par les éléments Alu [Lehnert et al., 2009;Gu et al., 2009]. L'expression de C19MC apparaît être strictement restreinte au système reproducteur et au placenta [Bentwich et al., 2005;Lin et al., 2010b], même si l'expression de miR-498 a été montrée dans le cerveau fœtal [Flor et al., 2012], et que plusieurs membres de ce cluster sont hautement exprimés dans les cellules souches embryonnaires humaines et rapidement sous-régulés lors de la différenciation [Bar et al., 2008;Ren et al., 2009]. Dans les cellules souches embryonnaires de chimpanzés ou d'homme, l'expression de ce cluster est fortement augmenté [Cao et al., 2008]. Aucun homologue de ce cluster n'a été retrouvé chez le rat, ni chez la souris ou le chien, ce qui argumente de sa spécificité aux primates [Zhang et al., 2008b]. A partir de ces observations, C19MC pourrait être fortement impliqué dans l'évolution des primates et le développement embryonnaire [Tsai et al., 2009].

Remarque : Chez les rongeurs, un cluster similaire mais spécifique des rongeurs, a été identifié, nommé C2MC ou *Sfmbt2* et se localise sur le chromosome 2 murin. Il représente le cluster le plus large décrit chez la souris [Calabrese et al., 2007;Landgraf et al., 2007]. Ce cluster, exprimé préférentiellement à partir de l'allèle paternel, est situé sur l'intron 10 du gène *Sfmbt2* (« Sex comb on midleg (drosophila)-like with four MBT domain 2 »). De façon remarquable, plusieurs microARN du C19MC et C2MC présentent la même séquence « seed », séquence jouant un rôle critique dans le ciblage des ARNm cibles. Du fait de ces identités de séquence et du statut d'empreinte, il est admis que ces deux clusters exerceraient des fonctions similaires à la fois chez les primates et les rongeurs.



### 2.4.3. Quelques autres gènes et loci soumis à empreinte parentale

#### Le gène *TP73*

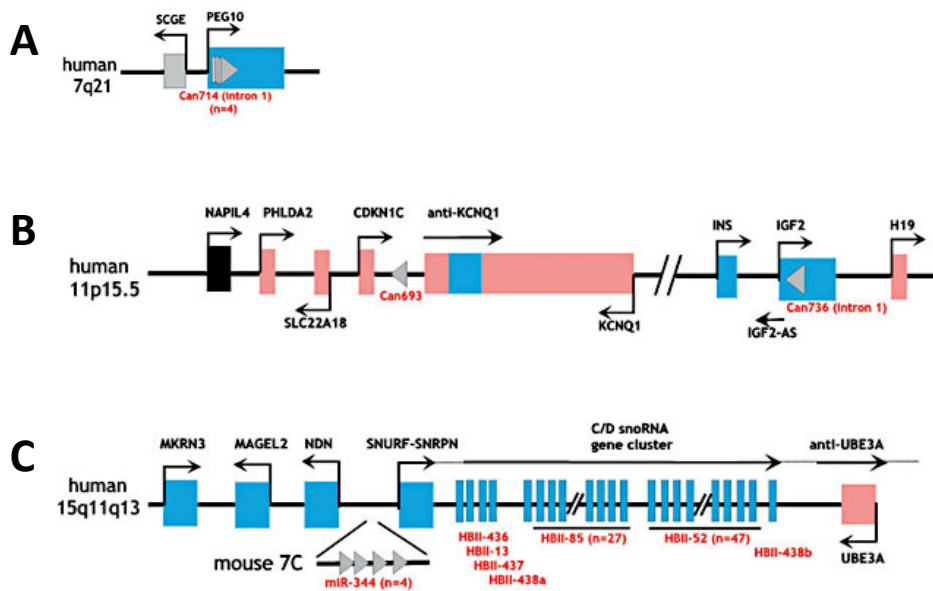
Situé sur la région 1p36, le gène *TP73* (pour « Tumour Protein 73 ») manifeste un statut très varié d'empreinte en fonction du tissu analysé. Son expression est tantôt maternelle ou paternelle, tantôt bi-allélique [Kaghad et al., 1997; Mai et al., 1998; Hu et al., 2000; Cai and Cullen, 2007]. Le gène *TP73* est localisé sur une région qui présente une perte d'hétérozygotie préférentielle dans les neuroblastomes sans amplification de *N-MYC* [Caron, 1995], ce qui suggère le fait que *TP73* est gène suppresseur de tumeur candidat dans le neuroblastome [Douc-Rasy et al., 2002].

#### Le locus 6p24 et les gènes *PLAGL1* et *HYMAI*

Le gène *PLAGL1* est exclusivement exprimé à partir de l'allèle paternel dans la plupart des tissus. Son expression mono-allélique a été observée dans le placenta et dans les tissus fœtaux [Kamiya et al., 2000; Arima et al., 2000; Arima et al., 2001]. En outre, une expression bi-allélique a été relevée dans les leucocytes du sang périphérique [Mackay et al., 2002]. L'empreinte tissu-spécifique dépend du promoteur activé. En effet, ce gène présente un promoteur P1 non soumis à empreinte parentale, et un promoteur P2 soumis à empreinte parentale [Valleley et al., 2007]. Ce gène serait impliqué dans les cas de diabètes néonataux transitoires avec une perte de la méthylation du potentiel centre de contrôle de l'empreinte de l'allèle maternel qui serait localisé au niveau du gène *HYMAI* [Arima et al., 2001]. *HYMAI* (pour « HYdatidiform Mole Associated and Imprinted ») code pour un transcrit non codant qui s'exprime exclusivement à partir du chromosome paternel [Arima et al., 2000; Arima et al., 2001].

#### Le locus 7q21.3 et les gènes *GRB10* et *TFPI2* (Figure 12A)

Les gènes *GRB10* (pour « Growth factor Receptor-Bound protein 10 ») et *TFPI2* (pour « Tissue Factor Pathway Inhibitor 2 »), sont localisés au niveau du locus 7q21.3 ; ils présentent respectivement une expression paternelle et maternelle [Monk et al., 2008].



**Figure 12.** Cartes schématiques de trois régions génomiques soumises à empreinte parentale

(d'après Royo et al., *Cytogenet Genome Res*, 2006)

(A) Le locus 7q21.3 et les gènes *GRB10* et *TFPI2*

(B) Les loci *KCNQ1* et *IGF2/H19*

(C) Le locus PWS/AS

### Le locus *KCNQ1* (Figure 12B)

Neuf gènes codants et non codants se regroupent sur ce locus du chromosome humain 11. Trois sont d'expression paternelle et six sont transcrits à partir de l'allèle maternel. On compte parmi les transcrits maternels les gènes *KCNQ1*, *KCNQ1DN*, *ZNF215*, *CDKN1C*, *PHLDA2* et *SLC22A18* et, parmi les transcrits paternels, les gènes *SLC22A1L*, *TRPM5* et *KCNQ1OT1*.

### Le locus *IGF2/H19* (Figure 12B)

Le plus étudié jusqu'aujourd'hui, ce locus, situé à une centaine de kb du locus *KCNQ1*, présente une région ICR, hyperméthylée dans le spermatozoïde et hypométhylée dans l'ovocyte, située entre les gènes *IGF2*, *transcrit codant* d'origine paternelle et *H19*, *transcrit non-codant* d'origine maternelle [Warnecke et al., 1998]. Comme beaucoup de gènes soumis à empreinte parentale, *IGF2* présente un transcrit anti-sens, *IGF2as* [Okutsu et al., 2000]. Outre *H19*, *IGF2* et *IGF2as*, le gène *INS-2*, en amont d'*IGF2*, est exprimé à partir de l'allèle paternel. Des dérégulations de l'empreinte parentale de cette région sont associées au syndrome de Beckwith-Wiedeman (voir section 2.5). De plus, *H19* est le transcrit hôte d'un microARN, miR-675 [Cai and Cullen, 2007], et le transcrit primaire d'*IGF2* porte, sur l'intron 7, le microARN, miR-483, dont la forme mature est sur-exprimée dans les tumeurs de Wilms et les cancers du sein et du foie [Veronese et al., 2010].

### Le locus *PWS/AS* (Figure 12C)

Situé sur le chromosome 15, ce locus présente de part et d'autre du DMR de nombreux gènes codants et non codants à expression paternelle et maternelle et des ARN C/D. La majorité des gènes de ce locus présente une expression d'origine paternelle. Des dérégulations de l'empreinte de ce locus sont associées à deux syndromes, le syndrome de Prader-Willi (PWS) et le syndrome d'Angelman (AS) (voir section 2.5).

### Le gène *ANO1* sur le bras long du chromosome 11

Le gène *ANO1* (pour ANOctamine 1) possède une expression maternelle non exclusive dans le placenta.



## 2.5. Empreinte parentale et pathologies humaines

Lorsqu'un gène est soumis à empreinte, un seul des deux allèles est normalement actif, l'autre restant silencieux. Les maladies impliquant des gènes soumis à empreinte sont donc la conséquence :

- soit de la perte d'expression de l'unique allèle actif par délétion ou disomie uniparentale, comme pour les syndromes suivants :

Syndrome de Prader-Willi (PWS) : ce syndrome présente une incidence de 1 pour 15 000 naissances. Il est caractérisé par une hyperphagie entraînant une obésité, un hypogonadisme hypogonadotrophe et un retard mental modéré. Ce syndrome résulte de l'inactivation d'un ensemble de gènes de la région PWS (15q11-q12) du chromosome 15 paternel qui est normalement activé. L'anomalie génétique est soit une micro-délétion dans la région PWS du chromosome 15 paternel, soit une disomie uniparentale maternelle du chromosome 15.

Syndrome d'Angelman (AS) : ce syndrome, présentant une incidence de 1 pour 20 000 naissances, se caractérise par un retard mental sévère, une absence de langage, des accès de rires inappropriés, une microcéphalie, une ataxie et des convulsions. L'anomalie génétique est une absence de *UBE3A* (ubiquitine-protéine ligase 3A) entraînant un défaut dans la dégradation de certaines protéines par le protéasome au cours du développement cérébral. Cette absence est due soit à une micro-délétion dans la région AS du chromosome 15 d'origine maternelle qui, normalement, est seule active, soit à une disomie uniparentale paternelle du chromosome 15.

- soit de l'expression de l'allèle normalement silencieux, de ce fait les deux allèles sont actifs ; l'exemple étant ici :

Syndrome de Beckwith-Wiedeman : syndrome poly-malformatif se caractérisant par une croissance excessive du fœtus, une grosse langue (macroglossie), des oreilles malformées, une hypertrophie des organes (viscéromégalie), une omphalocèle, une

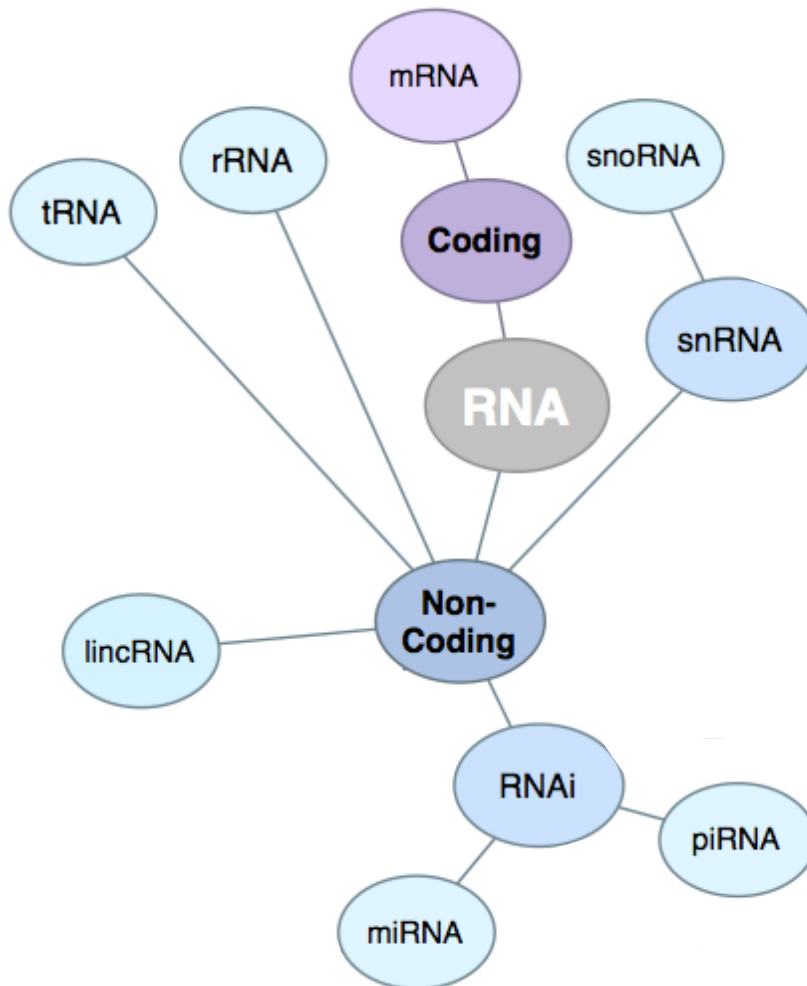




prédisposition à développer certaines tumeurs (surtout tumeurs de Wilms). Dans la majorité des cas, on retrouve une expression bi-allélique du gène *IGF2*. Pour que le développement embryonnaire se déroule normalement un seul allèle d'*IGF2* doit être actif. L'anomalie génétique est le plus souvent une disomie uniparentale paternelle du chromosome 11.

## 2.6. Disomie uniparentale

La disomie uniparentale (DUP) est la situation dans laquelle les deux chromosomes d'une même paire (chromosomes homologues) sont hérités du même parent. Seules certaines DUP sont associées à des manifestations cliniques, résultant d'un déséquilibre d'expression (expression bi-allélique ou absence d'expression) de gènes soumis à empreinte. Le mécanisme conduisant aux disomies uniparentales est le plus souvent lié au « sauvetage » d'une trisomie par élimination du chromosome surnuméraire s'effectuant au hasard : dans 1 cas sur 3, ce sauvetage conduit à une DUP. Les DUP impliquant des régions chromosomiques non soumises à empreinte parentale n'ont pas de retentissement phénotypique.



**Figure 13. Le monde ARN**

Les ARN peuvent être codants ou non codants. Les ARN non codants comptent principalement les ARN ribosomiaux, les ARN de transfert, les lincARN, les snoARN, les piARN et les microARN.

### 3. LES MICROARN

Grâce aux analyses des génomes de mammifères, on sait désormais que l'information génétique sujette à traduction n'excède pas 2% du transcriptome. Les 98% restant sont représentés par des ARN non codants dont la littérature des dernières années a montré la grande diversité. L'ensemble de ces transcrits non codants sont considérés comme des marqueurs de l'évolution des organismes complexes [Shabalina and Spiridonov, 2004]. De plus, de nombreuses publications font l'objet de la grande implication des ARN non codants dans la régulation des gènes et dans les processus cellulaires [Taft et al., 2010]. Les ARN non codants peuvent être générés aussi bien à partir des régions intergéniques que de loci codant pour des protéines [Mattick, 2009]. A côté des petits ARN non codants (<200 nucléotides) comprenant principalement les snoARN (petits ARN nucléolaires), les piARN (piwi-interacting RNA), les ARN de transfert et les microARN (petits ARN interférents), il faut placer les grands ARN non codants dont la taille excède 200 nucléotides comme les ARN ribosomiques, les lncARN, les pseudogènes, les ARN circulaires, etc (Figure 13).

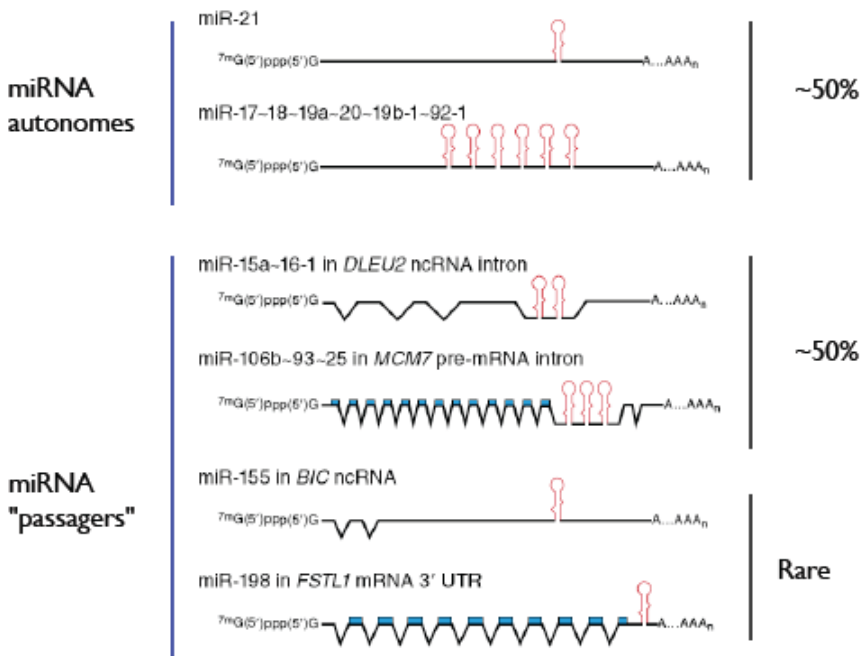
Les snoARN, petits ARN non codants hautement conservés et de tailles intermédiaires (60-300 nucléotides), sont majoritairement retrouvés dans les noyaux des cellules [Tollervey and Kiss, 1997]. A ce jour, ils appartiennent à deux groupes de petits ARN présentant des éléments de séquence hautement conservés mais distincts : le groupe « C/D box » et le groupe « H/ACA box ». Les snoARN sont des composants des snoRNP (complexes ribo-nucléo-protéiques nucléolaires) et sont impliqués dans la modification post-transcriptionnelle des ARN ribosomiques et des ARN splicéosomiaux [Kiss, 2002]. Tandis que les petits ARN non codants sont, de manière générale, dévolus à la régulation de la biosynthèse des protéines, à l'épissage alternatif, la synthèse des télomères, le contrôle transcriptionnel et la régulation post-transcriptionnelle des gènes [Rother and Meister, 2011], les longs ARN non codants sont impliqués dans la régulation de la machinerie épigénétique par le recrutement des ADN méthyltransférases, des enzymes modifiant les histones, et des complexes de modelage de la chromatine à leurs sites d'action dans les cellules à des stades de différenciation spécifique. De plus, les longs ARN non codants concernent aussi les mécanismes de l'empreinte parentale [Koerner et al., 2009].



### 3.1. Généralités sur les microARN

Les microARN sont des petits acides ribonucléiques endogènes non-codants de 18 à 25 nucléotides, conservés dans l'évolution, qui fonctionnent comme des régulateurs négatifs de l'expression des gènes via une complémentarité anti-sens avec des ARNm spécifiques conduisant à une dégradation directe des ARN messagers ou à une inhibition de leur traduction en protéines. Leur abondance permettrait de réguler l'expression de plus de 60% des gènes. Via leurs gènes cibles, ils régulent un très grand nombre de fonctions biologiques. De ce fait, leur expression est hautement corrélée à de nombreuses maladies humaines comme le cancer (voir section 3.3.1), voire d'autres maladies liées à l'âge. Transcrits soit à partir de la séquence intronique de gènes ou d'ARN non codants, soit sous le contrôle de leur propre promoteur, les microARN vont entraîner, à l'issue de deux étapes de maturation successives, le silence de gènes soit par la déstabilisation de son ARNm, soit par l'inhibition de sa traduction. Ce mécanisme de répression de l'expression des gènes, spécifique et efficace, généralise celui d'ARN interférence. Les microARN jouent un rôle fondamental dans l'ensemble des processus biologiques et pathologiques, c'est-à-dire, la prolifération cellulaire, la différenciation, l'apoptose, le développement embryonnaire, la carcinogenèse, les maladies cardiovasculaires, les désordres musculaires primaires, etc [Bushati and Cohen, 2007; Eisenberg et al., 2007]. Les études de l'expression des microARN révèlent qu'elle est tissu-spécifique et que certains microARN sont abondamment exprimés dans le placenta [Barad et al., 2004; Lim et al., 2005]. A ce jour, plus de 2 000 microARN ont été identifiés chez les mammifères [Bentwich et al., 2005]. Ils agissent très probablement en réseau dans le but d'affiner les régulations géniques. Certains pourraient occasionnellement activer directement la traduction de gènes cibles ; c'est le cas du miR-369-3p [Vasudevan et al., 2007].

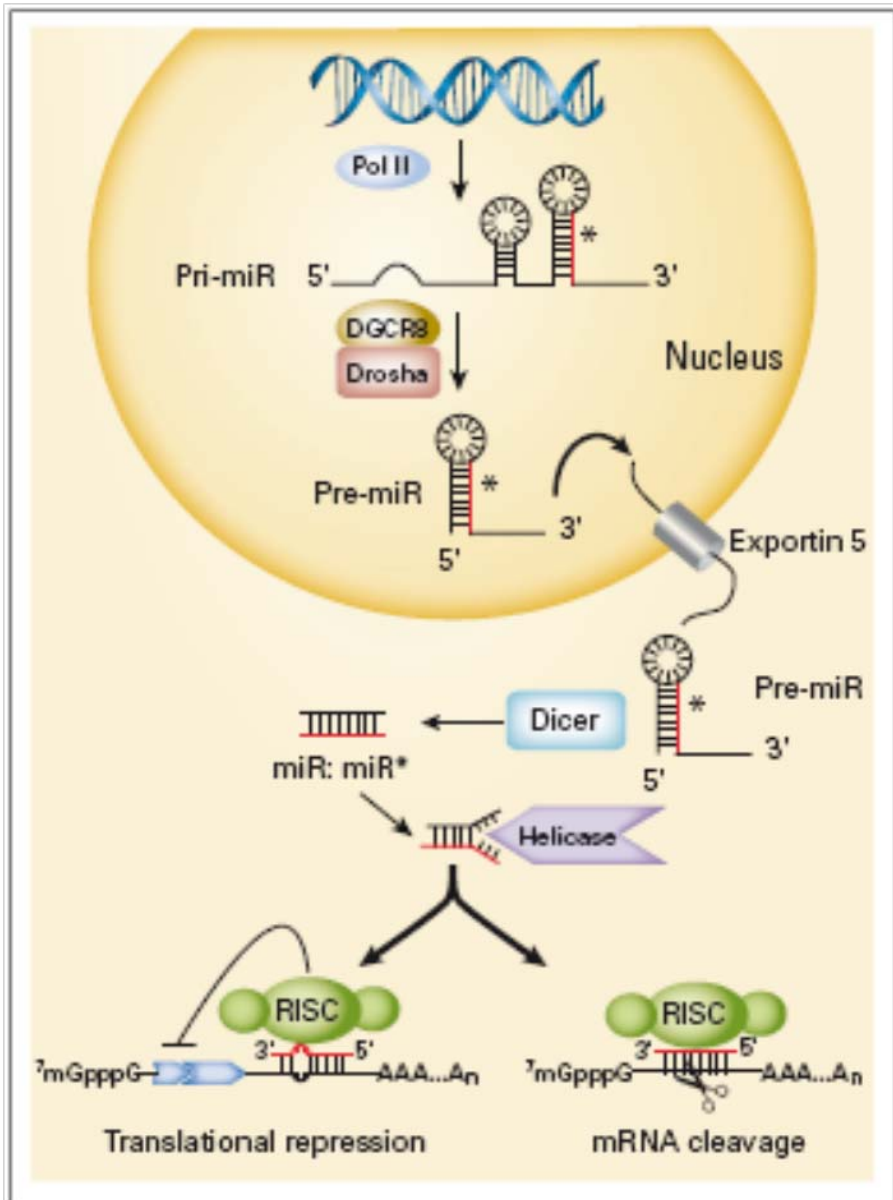
En 1993 puis 2000, les premiers microARN identifiés furent les produits des gènes *lin-4* et *let-7* de *C. elegans*, lors du décryptage des mécanismes moléculaires régissant le développement de cet organisme modèle. Ils se sont avérés avoir un rôle capital dans le contrôle du développement de la larve : leur inactivation provoquant la non-différenciation programmée de certaines cellules conduit à une prolifération incontrôlée.



**Figure 14.** Représentation schématique des localisations génomiques potentielles des microARN

(d'après Iorio & al., JCO, 2009)

Les microARN (en rouge) se localisent dans le génome soit isolés, soit regroupés en cluster avec une transcription simultanée de l'ensemble des membres du cluster. Les microARN sont majoritairement retrouvés dans des régions intergéniques et introniques du génome.



**Figure 15.** Schéma simplifié de la biogenèse des microARN

(d'après Iorio & al., JCO, 2009)

La biogenèse des microARN est un processus multi-étapes impliquant un circuit complexe de protéines telles que DROSHA, DGCR8 et DICER, même si des voies alternatives de maturation ont été récemment décrites.

Ces gènes codent pour deux petits ARN non codants de 22 et 21 nucléotides respectivement qui sont capables d'interagir par hybridation sur plusieurs sites de la région 3' non codante (3'UTR) des ARN messagers codants pour les protéines LIN-14 et LIN-28 pour le premier, LIN-41 et LIN-42 pour le second [Lee et al., 1993;Reinhart et al., 2000]. Il est à noter que les microARN sont des molécules ubiquitaires retrouvées à la fois chez les plantes et les métazoaires [Reinhart et al., 2000].

### 3.2. Biologie et biogenèse des microARN

Les microARN se localisent dans le génome soit isolés, soit regroupés en cluster avec une transcription simultanée de l'ensemble des membres du cluster (Figure 14) [Carthew and Sontheimer, 2009]. L'organisation génomique des microARN en cluster est le plus souvent hautement conservée d'un point de vue évolutif, ce qui leur suggère un rôle clé dans la régulation coordonnée du fonctionnement cellulaire. Même si les microARN sont majoritairement retrouvés dans des régions intergéniques et introniques du génome, une étude publiée en 2004 décrit des microARN encodés dans des exons codants des protéines (Figure 14) [Bartel, 2004]. La biogenèse des microARN est un processus multi-étapes impliquant un circuit complexe de protéines telles que DROSHA, DGCR8 et DICER, même si des voies alternatives de maturation ont été récemment décrites (Figure 15) ([Berezikov et al., 2007;Cheloufi et al., 2010].

Les microARN sont transcrits sous forme de longs transcrits primaires pouvant atteindre plusieurs milliers de nucléotides, appelés microARN primaires (pri-microARN). Ces précurseurs sont clivés dans le noyau par un complexe nommé microprocesseur, formé par les enzymes Drosha (endonuclease RNase III) et Dgcr8 (Di George Critical Region 8 ou Pasha), en un produit intermédiaire appelé microARN précurseur (pré-microARN). Celui-ci est long d'environ 70 nucléotides, replié en une structure tige-boucle par complémentarité imparfaite des bases entre la première moitié et la seconde moitié de sa séquence. Ce pré-microARN est transporté du noyau au cytoplasme par un transporteur actif GTP-dépendant, l'exportine 5. Une fois dans le cytoplasme, le pré-miR est ensuite clivé par une enzyme de type endonucléase RNase III de la famille Dicer qui permet l'hydrolyse de la structure boucle, pour libérer un petit ARN double-brin appelé miARN double-brin d'environ 22 paires de bases. Ce dernier interagit alors avec une



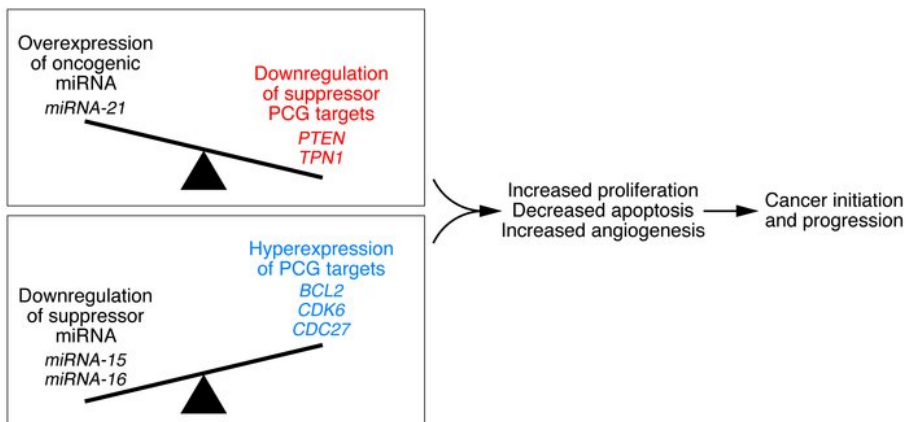


protéine de la famille Argonaute (Ago1 ou Ago2) pour former le complexe RISC (« RNA Induced Silencing Complex »). Ce complexe d'environ 160 kDa a été décrit comme étant suffisant à l'activité de « silencing » des gènes par les microARN. Au cours de la formation de ce complexe, il y a passage du microARN double brin à un microARN simple brin par l'action concomitante d'hélicases, p68-p72. Le brin relargué est appelé microARN\*. L'ARNm cible est alors chargé au sein du complexe RISC. Deux voies de « silencing » sont possibles : soit la dégradation de l'ARNm cible si le complexe comprend la protéine Ago2, soit la répression de la traduction de ce dernier si le complexe contient la protéine Ago1 [Kim, 2005; Iorio and Croce, 2009]. Dans le premier cas, l'appariement du microARN avec sa séquence cible est parfait. Fixés aux ARNm, les microARN influent sur la stabilité et le mécanisme de traduction des ARNm. On estime que les microARN présents chez l'Homme réguleraient environ un tiers des gènes, d'où cette implication multiple dans les différents processus cellulaires (Figure 15) [Bentwich et al., 2005].

Bien que les fonctions des microARN soient encore mal connues, elles concerneraient un grand nombre de fonctions physiologiques essentielles, telles que le développement, la croissance cellulaire, l'apoptose, le métabolisme, la différenciation, etc., via la régulation des voies complexes de signalisation cellulaire [Ichimura et al., 2011]. Des dérégulations de l'expression des microARN sont couramment observées dans les différentes maladies humaines y compris les cancers [He et al., 2005; Medina et al., 2010].

### 3.3. microARN et oncogénèse

Dans le cadre des néoplasies humaines, une sous-régulation générale des microARN est généralement observée ce qui sous-tend une fonction suppresseur de tumeur [Melo and Esteller, 2011]. De plus, de nombreux microARN se localisent au niveau de régions d'instabilité chromosomique qui sont fréquemment altérées dans les cancers, leur suggérant des rôles potentiels dans l'initiation et la progression du cancer [Calin et al., 2004; Esquela-Kerscher and Slack, 2006]. Dès 2005, trois publications dans *Nature* décrivent les premières implications des microARN aux processus de l'oncogénèse [He et al., 2005; O'Donnell et al., 2005; Lu et al., 2005]. Des dérégulations du profil d'expression des microARN, observées à la fois dans les cancers solides et dans les hémopathies



**Figure 16. microARN : oncomiR et supresseur de tumeur**

(d'après Calin et Croce, JCI, 2007)

Exemples des miR-15, miR-16 et miR-21 et de leurs gènes cibles.

Les microARN peuvent être impliqués, directement ou indirectement, dans toutes les phases de la tumorigenèse (transformation, immortalisation, invasion & dissémination métastatique), en agissant soit en supresseurs de tumeurs, soit en oncogènes (Figure 16). Les microARN oncogènes sont dénommés oncomiR.

malignes, peuvent distinguer la plupart des cancers humains en fonction du lignage cellulaire impliqué et le statut de différenciation des cellules cancéreuses.

### 3.3.1. microARN et cancer

Les microARN peuvent être impliqués, directement ou indirectement, dans toutes les phases de la tumorigenèse (transformation, immortalisation, invasion & dissémination métastatique), en agissant soit en suppresseurs de tumeurs, soit en oncogènes (Figure 16). Les microARN oncogènes sont dénommés oncomiR [Slack and Weidhaas, 2006]. En dehors de la dérégulation des microARN, de nombreux composants de la machinerie de biogenèse des microARN comme DICER et DROSHA se sont avérés être également impliqués dans les processus de tumorigenèse [Gregory and Shiekhattar, 2005; Karube et al., 2005; Thomson et al., 2006; Sugito et al., 2006; Chiosea et al., 2006; Kumar et al., 2007; Muralidhar et al., 2007]. Certains microARN pourraient être de bons marqueurs de diagnostic, de pronostic et d'évolutivité de la maladie [Tricoli and Jacobson, 2007], tels les microARN circulants [Hunter et al., 2008]. Plusieurs études ont associé la sur-expression et/ou la sous-expression de plusieurs microARN, à certains cancers et également à leurs facteurs de risques d'apparition. En outre, en fonction du contexte cellulaire et tissulaire dans lequel il se trouve, un même microARN semble pouvoir être soit oncomiR, soit contribuer à la suppression tumorale, en fonction du contexte cellulaire dans lequel il se trouve. Ceci est probablement dû à la multiplicité des cibles potentiels de chacun des microARN. Actuellement, un des grands défis est de parvenir à une meilleure identification des gènes ciblés par ces microARN ainsi qu'à une meilleure connaissance de l'environnement cellulaire dans lequel ils se trouvent, ceci afin de mieux comprendre leur rôle et les conséquences de leur dérégulation dans les cancers.

### 3.3.2. microARN comme agent ou cible thérapeutique

Les microARN pourraient être utilisés comme agents ou cibles thérapeutiques potentiels. Il est de plus en plus évident que de nombreux microARN agiraient comme des oncogènes : ainsi le cluster miR-17-92, sur-exprimé dans nombre de cancers, régule négativement des gènes suppresseurs de tumeurs, anti-apoptotiques ou de



différenciation ; de même miR-10b est un marqueur de l'angiogenèse et de l'invasion métastatique dans le cancer du sein [Ma and Weinberg, 2008a;Ma and Weinberg, 2008b]. L'utilisation des antagomirs, inhibiteurs spécifiques des microARN, pour éteindre efficacement l'expression de ces microARN est l'un des outils à visée thérapeutique de plus en plus utilisé *in vitro* et *in vivo* [He et al., 2010]. A l'inverse, d'autres microARN, comme le miR-34 et la famille des let-7 sont des suppresseurs de tumeurs clefs ; ils contribuent directement au ralentissement de la croissance tumorale des cancers du poumon lorsqu'ils sont injectés aux animaux lors d'essais pré-cliniques [Slack, 2010].

### 3.3.3. microARN des fluides corporels comme marqueurs diagnostique ou pronostique dans les diverses pathologies

Depuis leur découverte, le grand intérêt des microARN réside dans la régulation de l'expression des gènes et de l'implication de l'expression aberrante de microARN spécifiques dans la pathogenèse des cancers, des maladies cardiaques, immunologiques et d'autres encore. Récemment, un champ important d'investigations s'est développé autour des microARN circulants dans le sérum, le plasma et d'autres fluides corporels, ce qui sous-entend que les microARN agiraient non seulement au site initial de leur synthèse, mais également sur d'autres sites à distance dans le corps. La détection de microARN dans les fluides corporels représente un eldorado potentiel pour la recherche de biomarqueurs non-invasifs dans le cancer, d'autant plus que les microARN sont biologiquement stables. Puisque la dérégulation de l'expression des microARN serait un évènement précoce dans la tumorigenèse, la détection des niveaux d'expression de microARN circulants spécifique pourrait être très utile à une détection précoce des cancers, et ainsi contribuer grandement à la prise en charge thérapeutique et au succès du traitement. De plus, les niveaux d'expression de microARN dans les fluides corporels pourraient être utilisés comme prédicteurs ou comme marqueurs de suivi de la réponse au traitement : un vaste domaine qui commence depuis peu de temps à être exploré [Cortez et al., 2011].



### 3.4. microARN soumis à empreinte parentale

Deux clusters de microARN de grande taille comprenant près de 50 microARN chacun ont été identifiés comme étant soumis à empreinte parentale : C14MC et C19MC sont localisés sur les loci 14q32 et 19q13, respectivement.

#### 3.4.1. Biologie et fonctions des clusters C14MC et C19MC

Le degré d'activation du cluster C14MC et plus largement du locus entier corrèle positivement les niveaux de pluripotence des cellules souches murines. En effet, C14MC est activé dans les cellules souches pluripotentes murines et réprimé dans les cellules pluripotentes partielles [Liu et al., 2010a]. Par ailleurs, une étude, controversée aujourd'hui, a montré que seule l'expression du locus DLK1-DIO3, comprenant le cluster C14MC, différait entre des cellules souches pluripotentes induites (iPSC) et des cellules souches embryonnaires chez la souris. En effet, sa faible expression dans les iPSC empêcherait, à elle seule, le développement de souriceaux viables à partir des iPSC. Un traitement préalable des iPSC avec un inhibiteur des histones déacétylases, réactivant l'expression des transcrits du locus DLK1-DIO3, permet de restaurer un développement complet et viable des souriceaux, entièrement conçus à partir d'iPSC [Stadtfeld et al., 2010].

Dans le cas non pathologique de la gestation, une étude portant sur l'identification de microARN associé à la grossesse a montré que 81 microARN sur 723 analysés étaient produits de façon prédominante (plus de 100 fois) dans le placenta par rapport aux cellules de sang maternel. Parmi ces 81 microARN, 43 sont produits à partir du C19MC et 13 du C14MC, soit 70% des microARN majoritairement exprimés dans le placenta. De ces 81 microARN, 24 dont 21 des deux clusters montraient une diminution de concentration dans le plasma maternel après la délivrance. Tandis que la concentration des microARN du C19MC (miR-515-3p, miR-517a, miR-517c, miR-518b, miR-526b) augmente dans le plasma au cours de la grossesse et chute brusquement à la délivrance, la concentration du miR-323-3p du C14MC reste constante durant la grossesse pour chuter également après la délivrance [Miura et al., 2010]. Le fait que la majorité des microARN identifiés soit située sur les loci 19q13.42 et 14q32.31 n'est pas surprenant puisque ces loci sont





situés sur des régions critiques pour la croissance placentaire et le développement embryonnaire [Seitz et al., 2004; Bentwich et al., 2005; Royo et al., 2006; Tsai et al., 2009]. L'identification de ces microARN comme associés à la grossesse peut permettre de les utiliser comme marqueurs moléculaires de détection précoce ou de suivi prénatal pour la détection de maladies liées à la grossesse comme les pré-éclampsies, les placentas *accreta*, les croissances intra-utérine ou encore les môles hydatidiformes.

### 3.4.2. Implication de C14MC et de C19MC dans les cancers

Depuis la découverte de ce cluster, de nombreuses études ont identifié des dérégulations des microARN du cluster C14MC dans plusieurs variétés de cancers, que ce soit les hémopathies malignes ou les tumeurs solides [Girardot et al., 2012; Benetatos et al., 2013].

#### Hémopathies malignes

Tout d'abord dans les hémopathies malignes, Li et coll. ont analysé l'expression des microARN dans 52 leucémies myéloïdes aiguës (LMA) présentant des translocations classiques. Plusieurs microARN du C14MC sont différentiellement exprimés et caractérisent les différents sous-types de la maladie en fonction des altérations retrouvées suggérant leur rôle dans la pathogenèse des leucémies promyélocyaires aiguës (LPA) [Li et al., 2008]. Des résultats similaires ont été rapportés après l'analyse de 157 microARN sur 100 patients couvrant l'ensemble du spectre des altérations caryotypiques caractéristiques des LMA [Dixon-McIver et al., 2008]. Cette étude a mis en évidence une sur-régulation d'un groupe de microARN du C14MC associée significativement et spécifiquement aux LPA.

#### Cancers de l'appareil digestif

Neuf microARN du C14MC ont été trouvés sur-régulés dans le sérum de patients présentant des carcinomes épidermoïdes œsophagiens ; ils pourraient stratifier le risque associé à ces tumeurs [Zhang et al., 2010].

Une étude menée sur 61 tumeurs stromales gastro-intestinales (GIST) a montré le haut degré de co-expression des microARN du cluster C14MC dont la faible expression est



associée à la progression tumorale et à une plus courte survie sans évènement [Haller et al., 2010]. De façon plus précise, certains microARN du C14MC sont spécifiquement et hautement exprimés dans les GIST intestinaux de meilleur pronostic que les GIST gastriques. Même si l'expression de C14MC était significativement plus faible dans les GIST présentant une délétion du bras long du chromosome 14, l'association pronostique de l'expression du cluster est indépendante du statut génomique de la région 14q [Haller et al., 2010].

Dans les cancers du colon, plusieurs microARN du C14MC sont également sous-exprimés à la fois dans les lignées cellulaires de cancer colorectal et les échantillons tumoraux de patients [Bandres et al., 2006; Mosakhani et al., 2012].

Enfin, deux microARN du C14MC sont aussi sous-régulés dans les cellules de cholangiocarcinomes [Olaru et al., 2011].

#### Cancer du foie

Dans un modèle murin de carcinome hépatocellulaire (HCC), Luk et coll. ont identifié une série de 23 microARN du C14MC sur-exprimé dans toutes les tumeurs isolées des foies de souris transgéniques HCC TRE-c-Met-driven par rapport au tissu sain adjacent [Luk et al., 2011]. Une analyse menée dans 97 patients HCC associés à une infection au virus de l'hépatite B montre que la forte expression des microARN du C14MC corrèle positivement les marqueurs de cellules souches HCC (CD133, CD90, EpCAM, Nestin) et s'avère associée à un niveau élevé d' $\alpha$ -foetoprotéine sérique (biomarqueur conventionnel des cancers du foie) et, à un plus faible taux, de survie des patients [Luk et al., 2011]. Ces données sont en contradiction avec une étude sur le rat dans laquelle les auteurs montrent que la sous-régulation de certains microARN du C14MC, et par conséquent la décroissance des processus d'apoptose, conduit au développement de HCC [Tryndyak et al., 2009].

#### Cancers de l'appareil reproducteur féminin

L'étude des microARN dans les cancers séreux de l'ovaire propose 11 microARN du C14MC associés à l'évolution de la maladie et à la survie globale des patients [Shih et al., 2011]. Une étude fonctionnelle montre que miR-376c (du cluster C14MC), sur-exprimé dans les cellules de cancer ovarien, inhibe la mort cellulaire induite par le cisplatine [Ye et



al., 2011]. En outre, d'autres microARN du C14MC sont sur-régulés dans la composante sarcomateuse des carcino-sarcomes de l'endomètre, comparée à la composante épithéliale ; ils permettraient de distinguer la trans-différenciation épithélio-mésenchymateuse dans ce type de tumeur [Castilla et al., 2011]. Dans les cancers invasifs du col de l'utérus, plusieurs microARN du C14MC sont significativement surexprimés comparés aux tissus sains [Lee et al., 2008]. Zhang et coll. montrent également la sous-expression des microARN du C14MC dans les cancers épithéliaux de l'ovaire leur suggérant un rôle de suppresseur de tumeur majeur dans ces tumeurs [Zhang et al., 2008a]. Dans une étude plus récente, des microARN du C14MC et du C19MC ont été identifiés comme significativement surexprimés dans les carcino-sarcomes utérins, comparés à des endomètres sains. De plus, les auteurs ont analysé l'expression de deux transcrits du locus, *DLK1* et *MEG3* ; les résultats montrent que les niveaux d'expression de *MEG3* ne sont pas altérés alors que ceux de *DLK1* le sont de près de cent fois plus élevés dans les carcinosarcomes utérins. L'analyse de la méthylation de l'IG-DMR par séquençage au bisulfite ne montre pas d'altération de la méthylation [Devor et al., 2012].

#### Cancers du système nerveux

Les microARN du C14MC sont également dérégulés dans les cancers du système nerveux central, avec pour exemple, le miR-381 jouant un rôle majeur dans la progression des gliomes par ciblage du suppresseur de tumeurs LRCC4 [Tang et al., 2011]. Précédemment en 2010, a été publiée une analyse de 180 microARN dans différents gliomes (astrocytome, oligoastrocytome, oligodendrogliome, glioblastome multiforme) comparés aux cellules souches embryonnaires, aux cellules précurseurs neurales et aux cerveaux normaux adultes. Soixante et onze des 180 microARN analysés montraient un profil d'expression spécifique aux gliomes, comparés aux cerveaux normaux adultes. Ce profil de 71 microARN était remarquablement similaire aux profils retrouvés dans les cellules souches embryonnaires et précurseurs neurales. Près de la moitié des microARN identifiés sont clustérisés dans 7 régions génomiques : (1-3) la famille miR-17, contenant les clusters miR-17-92, miR-106b-25 et miR-106a-363 situés sur les locus 13q31.3, 7q22.1 et Xq21.1 respectivement ; (4) le cluster miR-183-182 sur le locus 7q32.1 ; (5) le cluster miR-367-302 sur le locus 4q25 ; (6) le cluster miR-371-373 sur le locus 19q13.42 ; et (7) le cluster C14MC sur le locus 14q32.31. Mis à part le cluster C14MC, les six autres clusters



comprenant le cluster miR-371-373 sont sur-exprimés dans les gliomes par rapport à des tissus sains de cerveau. La sous-expression du cluster C14MC a été confirmée par RT-qPCR sur 13 microARN dans 15 gliomes comprenant à la fois des tumeurs astrocytaires et des oligodendrogliomes. Une analyse de perte d'hétérozygotie sur les marqueurs D14S65 et D14S252 (situés respectivement sur les locus 14q32.2 et 14q32.31) a permis d'identifier une perte d'hétérozygotie dans 5% des oligodendrogliomes et 35% des glioblastomes multiples analysés [Lavon et al., 2010]. La sous-régulation des microARN du C14MC dans les gliomes (comparés au cerveau adulte) a été confirmée l'année suivante par séquençage à haut débit [Skalsky and Cullen, 2011].

Dans les neuroblastomes, une étude focalisée sur le miR-380-5p du C14MC a montré que ce microARN discriminait parmi les tumeurs amplifiées en *N-MYC*, les patients de mauvaise évolution, tandis qu'il n'était pas associé à la survie dans la population générale des neuroblastomes. Du point de vue fonctionnel, ce microARN est caractéristique des cellules non différenciées et interagit directement avec les ARNm de p53, H-RAS et p21<sup>waf1</sup> [Swarbrick et al., 2010]. En décembre 2011, une analyse de l'expression des microARN dans les neurones matures, les cellules progénitrices neurales et les cellules de neuroblastomes de rat, a permis d'identifier 191 microARN différentiellement exprimés suivant les trois types cellulaires. Trente-deux sont sous-exprimés dans les neurones matures comparés aux deux autres types cellulaires et cinquante-huit sont sous exprimés dans les cellules de neuroblastomes, comparés aux neurones matures et aux cellules progénitrices neurales, parmi eux un grand nombre de microARN du C14MC [Liu et al., 2012].

La faible expression de 13 microARN du C14MC a été également décrite dans les adénomes hypophysaires [Cheunschon et al., 2011].

Enfin, une sous-expression de certains microARN du C14MC est associée aux phéochromocytomes malins récurrents et métastatiques [Tombol et al., 2010].

### Cancers de la thyroïde

Les adénomes de la thyroïde sont des tumeurs humaines fréquentes mais bénignes à forte prévalence dans les populations adultes déficientes en iode. Des réarrangements chromosomiques de la cyto-bande 19q13.4, fréquente dans ces tumeurs, provoque la sur-expression des microARN des clusters C19MC et miR-371-3 par rapport à des tumeurs ne





présentant pas ces réarrangements. Les auteurs spéculent que cette sur-expression pourrait être à l'origine de la pathogenèse des tumeurs correspondantes [Rippe et al., 1999;Rippe et al., 2010].

#### Cancers de l'appareil respiratoire

Un grand nombre de microARN du C14MC sont retrouvés sous-exprimés dans les carcinomes du poumon à petites cellules [Guo et al., 2010], tandis qu'une surexpression est retrouvée dans les adénocarcinomes de poumon mutés K-RAS [Dacic et al., 2010], résultats confirmés dans les cancers du poumon chez la souris [Liu et al., 2010b].

De plus, d'autres microARN du C14MC sont associées aux mésothéliomes malins de différents types histologiques [Guled et al., 2009].

#### Cancers du sein

Une série de microARN du C14MC est sur-exprimée dans deux sous-populations de cellules souches de cancers du sein avec miR-495 ciblant particulièrement la E-Cadhérine et *REDD1*, ce qui suggère un rôle dans la croissance et l'invasion des cellules tumorales sous hypoxie [Hwang-Verslues et al., 2011]. De plus, trois signatures prédictives du statut hormonal des cancers du sein ont été identifiées, chacune comprenant des microARN du C14MC [Lowery et al., 2009]. D'autres études ont montré également des différences d'expression du C14MC entre les sous-types de cancers du sein : basal-like et luminal-like [Yan et al., 2008;Bockmeyer et al., 2011].

En outre, Keklikoglou et coll. ont révélé pour les clusters C19MC et miR-371-3 un rôle suppresseur de tumeur dans les cancers du sein RE (récepteurs aux œstrogènes) négatifs au travers d'interactions avec les voies de signalisation NF- $\kappa$ B et TGF- $\beta$ , interférant donc avec la progression tumorale, les métastases et l'inflammation [Keklikoglou et al., 2012].

#### Choriocarcinomes

En 2012, Poaty et coll. ont étudié par CGH-array onze échantillons de choriocarcinome et identifié vingt-trois régions critiques minimales potentiellement impliquées dans la pathogenèse. Un grand nombre de gènes soumis à empreinte sont localisés dans ces régions incluant également les clusters C14MC et C19MC. Des gains chromosomiques de grande taille sont retrouvés au niveau des deux loci portant ces clusters, suggérant une



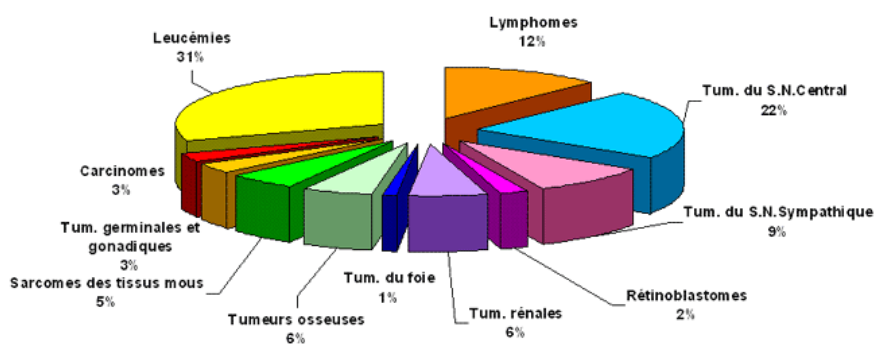
sur-expression des gènes et microARN associés, sans pour autant l'avoir vérifiée [Poaty et al., 2012].

En conclusion, l'ensemble des données indique l'intérêt potentiel de ces microARN comme nouveaux marqueurs pronostiques des cancers. La sous-expression de l'ensemble des microARN du C14MC associée à la progression de la maladie constituerait un mécanisme général de l'oncogenèse. Cependant, les différences observées dans les microARN les plus discriminants de chaque type de tumeurs suggèrent une spécificité cellulaire. Plusieurs études précédemment cités montrent *in vitro* la sur-régulation des microARN du C14MC lors de l'administration de traitement à l'azacytidine avec ou sans acide phényl-butyrique. Le fait que ces microARN soient principalement décrits comme potentiels suppresseurs de tumeurs, pourraient expliquer, au moins en partie, les effets thérapeutiques de ces drogues, notamment dans les syndromes myélodysplasiques.

#### 3.4.3. Implication de C14MC et C19MC dans d'autres syndromes et maladies

C14MC et C19MC sont retrouvés dérégulés dans de nombreux syndromes et maladies autres que le cancer. C14MC est décrit notamment comme sous-exprimé dans les placentas pré-éclamptiques tandis que C19MC est sur-exprimé dans ces mêmes placentas [Zhu et al., 2009;Enquobahrie et al., 2011]. La pré-éclampsie, syndrome spécifique affectant au moins 5% des grossesses dans le monde, est caractérisée par une hypertension et une protéinurie. Elle conduit à une morbidité et peut entraîner la mort à la fois de la mère et du fœtus. Même si la cause n'est pas connue, il est accepté que les prééclampsies résultent de la simple présence d'un placenta puisque la délivrance suffit à faire régresser les symptômes rapidement [Redman, 1991].

En 2010, une étude a identifié un groupe de microARN anormalement exprimés dans la muqueuse colique de patients souffrant de maladies inflammatoires de l'intestin (maladie de Crohn et colite ulcéreuse) par rapport à une muqueuse saine [Fasseu et al., 2010]. Kriegel et coll. ont montré une sur-régulation des microARN du C14MC après un traitement au TGF $\beta$ 1 dans des cellules épithéliales rénales humaines, un modèle pour l'étude de la transition épithélio-mésenchymateuse dans le développement des fibroses interstitielles rénales [Kriegel and Amiji, 2011].



**Figure 17. Répartition des cancers pédiatriques**

En France, les cancers pédiatriques sont un problème de santé publique majeur car ils constituent la seconde cause de mortalité chez l'enfant après les causes accidentelles. Ils représentent environ 2 000 nouveaux cas par an, soit un tiers d'hémopathies malignes (leucémies et lymphomes) et deux tiers de tumeurs solides. Tous les ans en France, près de 150 enfants sont diagnostiqués pour un neuroblastome, tumeur du tissu nerveux sympathique du très jeune enfant.

#### 4. NEUROBLASTOME

En France, les cancers pédiatriques constituent la seconde cause de mortalité chez l'enfant après les causes accidentelles, et représentent un problème de santé publique majeur. Environ 2 000 nouveaux cas sont recensés par an, avec un tiers d'hémopathies malignes (leucémies et lymphomes) et deux tiers de tumeurs solides (Figure 17). En dépit des progrès scientifiques et médicaux ayant permis aujourd'hui de guérir près de 80% des enfants atteints de cancers, plusieurs formes de cancers, notamment le neuroblastome métastatique, résistent à tous les traitements proposés. Sur les enfants qui succombent à leur cancer chaque année, 15% meurent d'un neuroblastome. Sous sa forme agressive, le neuroblastome est l'un des cancers pédiatriques le plus meurtrier.

Dans le monde, tous les ans, plus de 10 000 enfants sont diagnostiqués pour un neuroblastome, représentant 10% des cancers pédiatriques. Le neuroblastome est une tumeur du tissu nerveux sympathique du très jeune enfant (Figure 17). Il s'agit d'une tumeur embryonnaire de type neuro-ectodermique dérivant des cellules originaires des crêtes neurales. Dans le développement normal, les crêtes neurales fournissent, entre autres, les cellules nerveuses du système nerveux sympathique composé des deux chaînes ganglionnaires sympathiques para-vertébrales et de la médullo-surrénale. La médullo-surrénale fœtale consiste en un ensemble de cellules chromaffines et de cellules ganglionnaires matures [Hoehner et al., 1996; Gestblom et al., 1997].

Cette origine embryonnaire confère au neuroblastome des caractères liés au développement. Près de 90% des neuroblastomes sont diagnostiqués chez des enfants de moins de 5 ans, l'âge médian de survenue étant de 17 mois, et plus de 50% sont métastatiques d'emblée au diagnostic. Le neuroblastome est une des rares tumeurs démontrant des régressions spontanées, faisant passer un tissu tumoral indifférencié à un tissu apparemment bénin appelé ganglioneurome ; un processus qui suggère une origine dysembryogénétique [Maris et al., 2007]. Par de multiples aspects, il s'agit d'une maladie extrêmement hétérogène, stratifiée en plusieurs groupes de risque en fonction de facteurs pronostiques cliniques, histologiques et génétiques. Tandis que les neuroblastomes de faible risque présentent une très bonne évolution, les neuroblastomes de plus haut risque sont de très mauvaise évolution malgré des thérapeutiques intensives multimodales.



#### 4.1. Historique

En 1864, le médecin allemand Rudolf Virchow a été le premier à décrire une tumeur abdominale chez l'enfant qu'il qualifia alors de « gliome ». Les caractéristiques des tumeurs du système nerveux sympathique et de la médullo-surrénale ont été décrites en 1891 par le pathologiste allemand Félix Marchand. En 1901, la présentation particulière des stades 4S (voir section 4.4.5.) chez le nourrisson a été décrite par William Pepper, ce qui lui vaut le nom de « Syndrome de Pepper ». En 1910, James Homer Wright comprenait que la tumeur dérive des cellules neurales primitives, et la rebaptise « neuroblastome ». Il remarque aussi les « circular clumps », des cellules dans la moelle osseuse qui sont aujourd'hui appelées « pseudo-rosettes d'Homer-Wright » [Wright, 1910].

#### 4.2. Epidémiologie

L'incidence annuelle du neuroblastome s'élève à 10,2 par millions d'enfants de moins de 15 ans. En France, le neuroblastome représente un cas sur 7 000 naissances, soit environ 150 nouveaux cas annuels. Classé parmi les maladies rares (moins d'une personne atteinte sur 2 000), sa prévalence est néanmoins élevée à l'échelle de l'oncologie pédiatrique. Au second rang des tumeurs solides du jeune enfant après les tumeurs du système nerveux central, les neuroblastomes représentent en effet près de 10% de tous les cancers pédiatriques. Par contre, chez le nourrisson, il s'agit de la tumeur maligne la plus fréquente, l'âge médian de survenue étant de 24 mois. Dans un tiers des cas, la tumeur survient chez des enfants de moins de un an et dans 96% des cas avant l'âge de 10 ans. Dans certains cas, il peut même être diagnostiqué *in utero* ou dès la naissance. Les neuroblastomes représentent néanmoins près de 15% des décès par cancer chez l'enfant [Izbicki et al., 2003].

Le sexe de l'enfant n'influe pas sur la fréquence d'apparition des neuroblastomes. Toutefois des études ont montré une influence de l'ethnie et de la localisation géographique : le neuroblastome serait plus fréquent en Amérique de Nord qu'en Europe, mais plus rare en Afrique Sub-Saharienne ou en Asie [Izbicki et al., 2003].





### 4.3. Etiologie

Encore aujourd'hui l'étiologie du neuroblastome n'est pas bien comprise. Cependant certains rares cas de neuroblastomes familiaux (2% des neuroblastomes) sont décrits [Maris et al., 2007] comme associés à des mutations de la lignée germinale dans le gène *PHOX2B* [Trochet et al., 2004] ou dans le gène *ALK* (anaplastic lymphoma kinase) [George et al., 2008; Janoueix-Lerosey et al., 2008; Chen et al., 2008] ou encore plus récemment dans le gène *LMO1* [Wang et al., 2011]. Dans ce cas, la transmission est de type autosomique dominant à pénétrance incomplète ce qui suggère l'intervention d'autres facteurs de risque. Il existe également une fréquence accrue de neuroblastome chez les patients atteints de la maladie de Recklinghausen.

Plusieurs facteurs de risque ont été proposés et sont toujours recherchés. Dû au développement précoce des neuroblastomes, de nombreuses études se sont portées sur des facteurs parentaux propres à la conception et à la gestation, incluant l'exposition aux produits chimiques, le tabac, l'alcool, l'utilisation de médicament durant la grossesse, sans entraîner de résultats concluants [Olshan et al., 1999; Yang et al., 2000].

Par ailleurs, une alimentation enrichie en acide folique ou incluant des cocktails multivitaminés lors de la grossesse diminueraient significativement le risque de neuroblastome [Ahmad, 2003; French et al., 2003; Goh et al., 2007]. Un effet protecteur de l'allaitement a également été montré [Martin et al., 2005]. Fait intéressant, la trisomie 21 aurait un effet protecteur sur la survenue d'un neuroblastome [Satge et al., 1998].

### 4.4. Origine embryonnaire des neuroblastomes

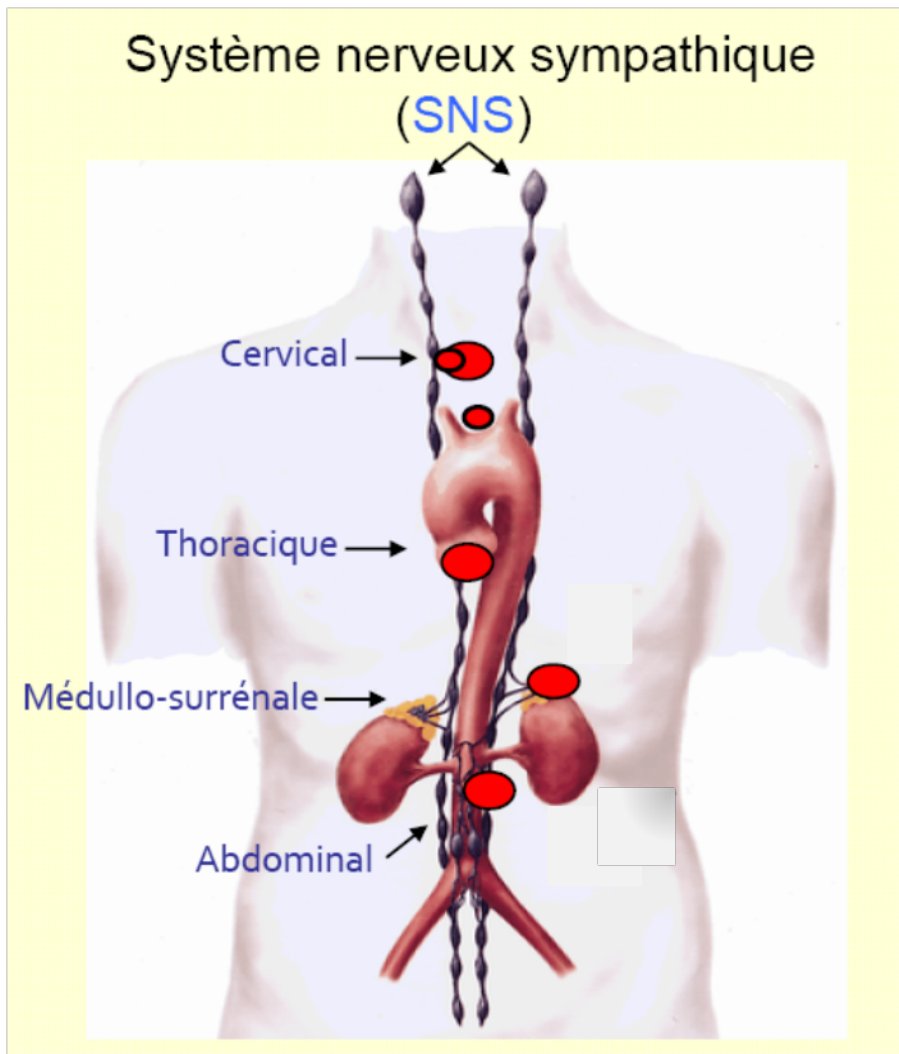
Les tumeurs d'origine neuro-ectodermique regroupent les tumeurs des systèmes nerveux central et périphérique. Leur classification se fonde sur le type cellulaire prédominant dans la tumeur (neuronal, astrocytaire, schwannien). Trois grands types de tumeurs neuro-ectodermiques dérivent des cellules des crêtes neurales : les schwanomes, les neurofibromes et les tumeurs neuro-ectodermique primitives périphériques, incluant les neuroblastomes et les sarcomes d'Ewing [Zhu and Parada, 2002].



Les neuroblastomes sont composés de tissus proches de ceux de l'embryon : c'est ce que l'on appelle une tumeur « de blastème ». De plus, ces tumeurs apparaissent très tôt au cours de la vie, à un âge où les facteurs carcinogènes conduisant à l'oncogenèse chez l'adulte n'ont pas eu le temps d'agir. Ce type de cancer est souvent considéré comme résultant d'une anomalie du développement, les formes évoluant vers la régression pouvant même être audacieusement suggérés comme étant des dysembryogenèses. On peut raisonnablement proposer que le neuroblastome résulte d'un défaut de migration et/ou de différenciation des cellules des crêtes neurales.

Dans l'embryogenèse humaine, au 17<sup>ème</sup> jour de la gestation, le système nerveux se met en place lors de la neurulation. La région dorsale de l'embryon s'épaissit pour former la plaque neurale, qui va s'invaginer (stade de la gouttière neurale), puis se refermer pour former le tube neural, dont est issu le système nerveux central. Avant la fermeture du tube neural, des groupes de cellules acquièrent des capacités migratoires et se détachent de la zone où les bords se raccordent à l'ectoderme et forment les crêtes neurales. A la fermeture, les crêtes se séparent à la fois de l'ectoderme et du tube neural néo-formé (étape de délamination). Ces cellules possèdent, en dehors de la capacité migratoire, une grande pluripotentialité puisqu'elles vont donner naissance à un grand nombre de types cellulaires dans tout l'organisme. La migration et la différenciation des cellules des crêtes neurales s'opèrent selon des processus spatio-temporels très finement régulés [LaBonne and Furst, 1989].

Les crêtes neurales sont ainsi à l'origine du système nerveux périphérique suite à leur différenciation en neurones sympathiques, en cellules gliales (cellules satellites des ganglions et cellules de Schwann) et en cellules chromaffines (cellules neuroendocrines de la médullo-surrénale). Elles donnent également naissance aux cellules pigmentaires (mélanocytes), aux cellules du stroma conjonctif des glandes thyroïdiennes, lacrymales, salivaires, hypophysaire..., et aux cellules dentaires (odontoblastes), ainsi qu'à tout l'appareil osseux crânien. La quantité de cellules de l'organisme issues des crêtes neurales est telle qu'elles sont parfois qualifiées de « quatrième feuillet embryonnaire ».



**Figure 18. Localisation de la tumeur primitive**

Dérivant des cellules ganglionnaires sympathiques périphériques, la tumeur primitive peut siéger n'importe où le long des deux chaînes ganglionnaires para-vertébrales, se localisant dans près de 45% des cas au niveau de la médullo-surrénale, 25% au niveau abdominal, 17% au niveau thoracique, 5% au niveau cervical, 2% au niveau pelvien et 1% avec extension dans la colonne vertébrale. Dans 5% des cas, la tumeur primitive ne peut être localisée.

#### 4.5. Présentation clinique du neuroblastome

Dérivant des cellules ganglionnaires sympathiques périphériques, la tumeur primitive siège le long des deux chaînes ganglionnaires para-vertébrales, se localisant dans près de 45% des cas au niveau de la médullo-surrénale, 25% au niveau abdominal, 17% au niveau thoracique, 5% au niveau cervical, 2% au niveau pelvien et 1% avec extension dans la colonne vertébrale (Figure 18). Dans 5% des cas, la tumeur primitive ne peut être localisée [Lonergan et al., 2002].

Près de 60% des neuroblastomes sont métastatiques d'emblée au diagnostic. Les métastases à proximité de la tumeur primitive se situent au niveau des ganglions lymphatiques, celles à distance envahissent la moelle osseuse, les os, plus rarement les poumons et la plèvre. Dans le cas particulier des neuroblastomes métastatiques du nourrisson (stade 4S ou Syndrome de Pepper ; voir section 4.4.5), les métastases sont majoritairement cutanées sous forme de nodules et/ou hépatiques, sans jamais être osseuses [Maris et al., 2007].

Le neuroblastome est une tumeur au diagnostic difficile à porter immédiatement, compte tenu de sa rareté et de l'âge des enfants concernés. Un dépistage systématique a été proposé et réalisé dans les années 1990 au Canada, au Japon et en France afin de diagnostiquer des tumeurs en formation chez le petit enfant. Il a consisté en un dosage des catécholamines urinaires sur papier buvard et n'a pas démontré son intérêt dans la mesure où étaient dépistés des neuroblastomes régressant spontanément. En 1998, il a été mis fin à ce dépistage.

##### 4.5.1. Maladies et syndromes rares associés

Très rarement le neuroblastome peut s'associer à une neurofibromatose de type 1, une maladie de Hirschsprung ou encore un syndrome d'Ondine, et très exceptionnellement, à un syndrome de Beckwith-Wiedeman ou un syndrome de Di-George. Les tumeurs localisées au niveau cervical, quand elles sont situées assez basses, sont souvent la cause d'un syndrome de Claude Bernard Horner avec myosis, ptosis et énoptalmie.



#### 4.5.2. Diagnostic

Les symptômes dépendent de la localisation du neuroblastome, généralement assez profonde dans l'abdomen sous diaphragmatique. Les symptômes les plus fréquemment observés sont liés au volume tumoral (distension abdominale), à la compression d'organes de voisinage (hémiplégie, troubles sphinctériens, par exemple, difficilement détectable à l'âge de l'acquisition de la marche et de la propreté) ou à une douleur osseuse d'origine métastatique. Le neuroblastome, situé le plus souvent abdominal à un niveau rétropéritonéal, est alors palpable dans la fosse lombaire.

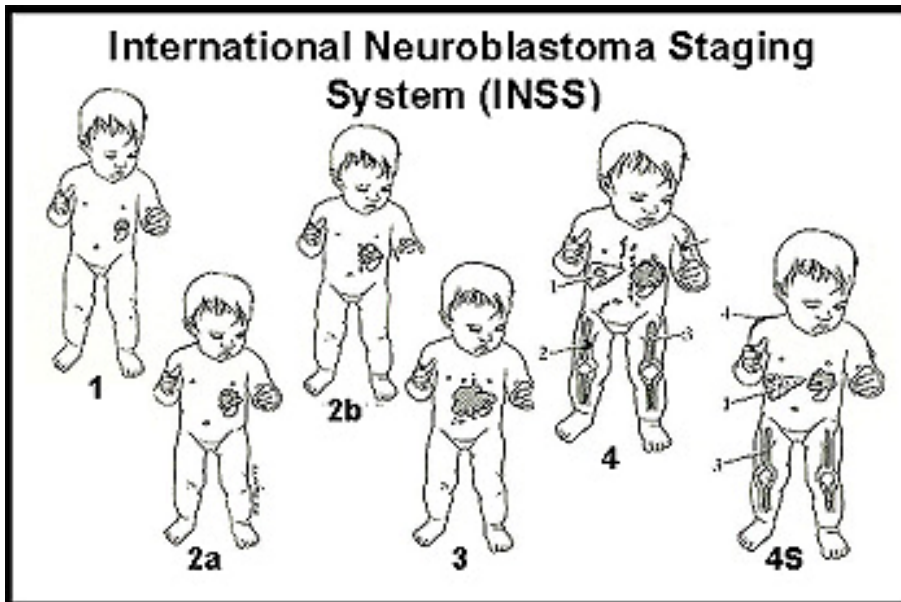
Les symptômes directement liés aux métastases sont généralement révélateurs puisque 60% des neuroblastomes sont d'emblée métastatiques au diagnostic. Il existe alors une altération de l'état général, souvent associée à des douleurs osseuses. Les hématomes orbitaires spontanés, définissant le syndrome de Hutchinson, sont une manifestation quasi-spécifique des métastases. Des nodules sous-cutanés et une hépatomégalie, non associée à une anomalie biologique hépatique ou d'hémostase mais, en cas d'évolution, s'accompagnant de troubles respiratoires compressifs, caractérisent principalement certaines formes métastatiques du nourrisson : il s'agit dans ce cas du neuroblastome de stade 4S ou syndrome de Pepper.

#### 4.5.3. Bilan initial

##### 4.5.3.1. Biochimie

Dans 95% des cas de neuroblastome, des niveaux élevés de catécholamines ou ses métabolites sont retrouvés dans les urines et/ou le sang. Les catécholamines et leurs métabolites comprennent la dopamine, l'acide homovanillique et/ou l'acide vanillylmandélique. Ces marqueurs diagnostiques constituent aussi des éléments de surveillance de la maladie.





**Figure 19.** La classification de l'INSS (« *International Neuroblastoma Staging System* ») distingue six catégories de neuroblastomes en fonction de la taille de la tumeur primaire et de la dissémination métastatique au diagnostic

**Stade 1 :** tumeur localisée, confinée à la zone d'origine.

**Stade 2A :** tumeur unilatérale avec exérèse incomplète ; nœuds lymphatiques homolatéral et controlatéral négatifs.

**Stade 2B :** tumeur unilatérale avec exérèse complète ou incomplète avec nœud lymphatique homolatéral positif et nœud lymphatique controlatéral négatif.

**Stade 3 :** tumeur unilatérale avec implication du nœud lymphatique controlatéral ; ou tumeur infiltrant la ligne médiane avec ou sans implication du nœud lymphatique régional ; ou tumeur infiltrant la ligne médiane avec implication bilatérale des nœuds lymphatiques.

**Stade 4 :** dissémination de la tumeur aux nœuds lymphatiques distants, à la moelle osseuse (3), aux os (2), au foie (1) et autres organes, exception faite des stades 4S.

**Stade 4S ou Syndrome de Pepper :** nourrisson âgé de moins de 1 an avec une tumeur primaire localisée comme défini aux stades 1 ou 2, avec dissémination limitée au foie (1), à la peau (4) et/ou à la moelle osseuse avec moins de 10% d'envahissement (3).

#### 4.5.3.2. Imagerie : bilan d'extensions locale et métastatique

La tumeur primitive est recherchée par échographie, scanner et/ou IRM. Ces techniques permettent d'évaluer le rapport de la tumeur avec les gros vaisseaux (l'aorte et ses branches, les veines cave et porte), les organes de voisinage (les reins et le foie), les trous de conjugaison, afin d'identifier son caractère chirurgicalement extirpable. De plus, une biopsie de la tumeur primitive est effectuée pour analyse histologique et recherche de facteurs génétiques pronostiques.

La scintigraphie au MIBG (meta-iodobenzylguanidine) permet de faire le bilan des métastases. Le MIBG est un traceur positif se concentrant spécifiquement dans le tissu tumoral par ciblage des neurones sympathiques. Analogue fonctionnel de la noradrénaline, cette molécule marquée entre en compétition avec l'hormone sympathique. Cet examen d'une très grande sensibilité permet l'exploration du corps entier avec une spécificité proche de 100% ; les faux-positifs sont exceptionnels. C'est une technique incontournable dans le bilan et dans le suivi de la maladie.

#### 4.5.4. Stade : International Neuroblastoma Staging System

La classification de l'INSS (« *International Neuroblastoma Staging System* »), établie en 1986 et révisée en 1988, distingue six catégories de neuroblastomes en fonction de la taille de la tumeur primaire et de la dissémination métastatique au diagnostic (Figure 19) [Evans et al., 1971] :

- Stade 1 : tumeur localisée, confinée à la zone d'origine.
- Stade 2A : tumeur unilatérale avec exérèse incomplète ; nœuds lymphatiques homolatéral et controlatéral négatifs.
- Stade 2B : tumeur unilatérale avec exérèse complète ou incomplète avec nœud lymphatique homolatéral positif et nœud lymphatique controlatéral négatif.
- Stade 3 : tumeur unilatérale avec implication du nœud lymphatique controlatéral ; ou tumeur infiltrant la ligne médiane avec ou sans implication du nœud lymphatique régional ; ou tumeur infiltrant la ligne médiane avec implication bilatérale des nœuds lymphatiques.



- Stade 4 : dissémination de la tumeur aux nœuds lymphatiques distants, à la moelle osseuse, aux os, au foie et autres organes, exception faite des stades 4S.
- Stade 4S ou Syndrome de Pepper : nourrisson âgé de moins de 1 an avec une tumeur primaire localisée comme défini aux stades 1 ou 2, avec dissémination limitée au foie, à la peau et/ou à la moelle osseuse (moins de 10% d'envahissement).

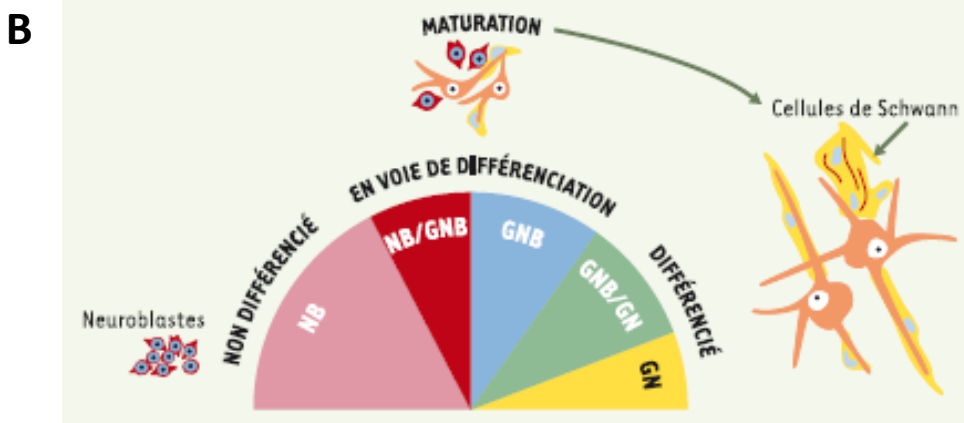
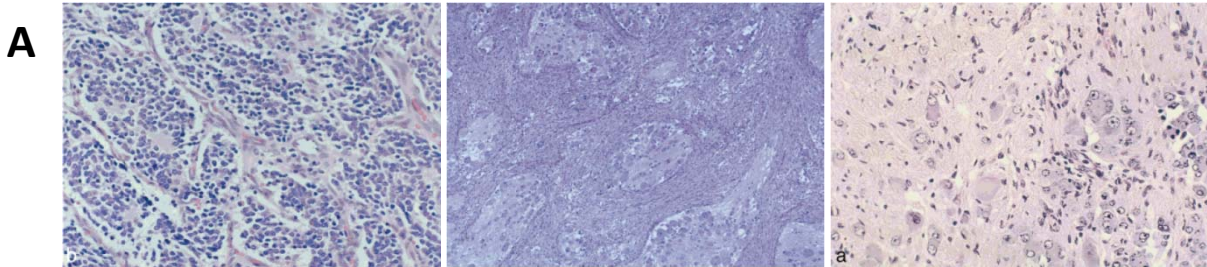
Tandis que les tumeurs de stades 1 et 2 sont de très bon pronostic, les tumeurs de stade 3 sont généralement inopérables d'emblée mais sont globalement de bon pronostic, contrairement aux tumeurs de stade 4 au pronostic le plus souvent défavorable. Cas particulier des neuroblastomes, le syndrome de Pepper (ou stade 4S) présente une dissémination métastatique particulière, mais avec un très bon pronostic, une forte proportion régressant spontanément.

#### 4.5.5. Age au diagnostic

L'âge au diagnostic est un facteur pronostique indépendant de la maladie uniquement dans les cas de neuroblastomes métastatiques. En effet, le taux de survie à 5 ans des enfants de moins de 12 mois est de 75%, alors qu'il tombe à 30% pour les patients plus âgés, et ce malgré les traitements intensifs [Brodeur et al., 1997]. Plusieurs études américaines ont proposé de relever le seuil de 12 mois à 18 mois sans perte de puissance pronostique [George et al., 2005; Schmidt et al., 2005]. Cependant, les études très récentes de la communauté pédiatrique française et européenne indiquent que le seuil de 12 mois doit être retenu plutôt que celui de 18 mois proposé par les équipes américaines.

#### 4.5.6. Histologie

Le neuroblastome au sens strict du terme est en fait la forme la plus indifférenciée d'un groupe plus large de tumeurs, les tumeurs neuroblastiques ; le terme neuroblastome étant utilisé pour désigner l'ensemble de ces tumeurs en général. Ces tumeurs sont



**Figure 20.** Classification histologique des tumeurs neuroblastiques

**(A)** Caractères histologiques des coupes de tumeurs neuroblastiques colorées à l'hématoxyline-éosine. De gauche à droite : neuroblastome à stroma schwannien pauvre, ganglioneuroblastome à stroma schwannien riche et ganglioneurome à stroma schwannien dominant.

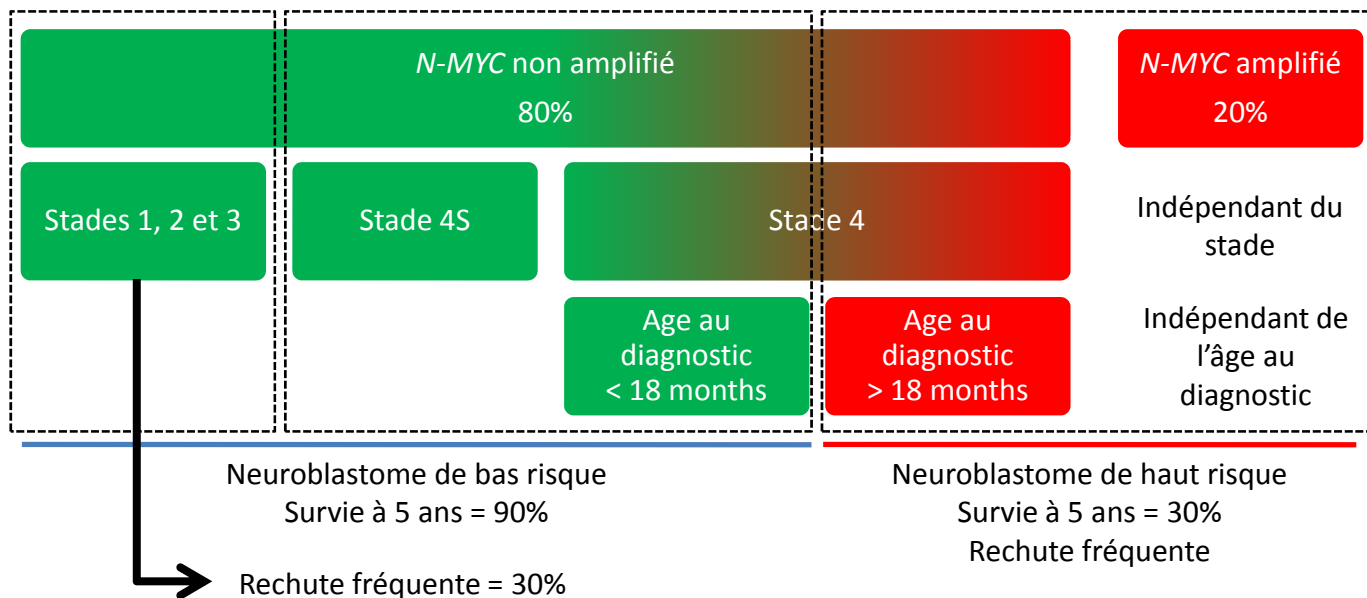
**(B)** De gauche à droite : le neuroblastome (NB) est formé de petites cellules (neuroblastes malins) non différenciées. Le neuroblastome/ganglioneuroblastome (NB/GNB) et le ganglioneuroblastome (GNB) sont formés de cellules sympathiques différenciantes plus grosses, et de quelques cellules de Schwann. Le ganglioneuroblastome/ganglioneurome (GNB/GN) et le ganglioneurome (GN) sont formés de grosses cellules ganglionnaires sympathiques totalement différenciées, prolongées par des extensions neuritiques et entourées de cellules de Schwann.

principalement composées de deux types cellulaires : les neuroblastes et les cellules de Schwann qui constituent le stroma.

Au microscope, les cellules tumorales sont typiquement rondes, de petite taille et sous forme de rosettes : les pseudo-rosettes d'Homer-Wright, amas de cellules tumorales entourant la neuropile. Les neuroblastomes montrent un large éventail dans le degré de différenciation neuronale. La classification histologique des tumeurs neuroblastiques par l'INPC (« *International Neuroblastoma Pathology Committee* ») est fondée sur le degré de différenciation des neuroblastes et sur l'abondance du stroma schwannien ; elle distingue quatre catégories de tumeurs neuroblastiques (Figure 20) :

- Les neuroblastomes malins sont des tumeurs au stroma pauvre en cellules de Schwann. Elles sont formées essentiellement de cellules neuroblastiques peu ou pas différenciées, formant des groupes séparés par des cloisons stromales fines ou incomplètes.
- Les ganglioneuroblastomes possèdent un stroma schwannien abondant et sont formés de neuroblastes à différents stades de différenciation.
- Les ganglioneuroblastomes nodulaires sont des tumeurs hétérogènes composées de différents clones de cellules neuroblastiques à différents stades de différenciation.
- Les ganglioneuromes bénins sont essentiellement constitués par un stroma schwannien dense. Les cellules neuroblastiques rares se sont différenciées en cellules ganglionnaires à part entière. En effet, ces tumeurs ne se forment pas spontanément. Elles dérivent généralement d'une tumeur neuroblastique qui a mûri spontanément ou après un traitement induisant la différenciation.

Cette classification histologique est un important facteur pronostique. Ce système de classification pathologique distingue des formes favorables et défavorables dans le système de classification de Shimada, en 1999 et révisé en 2003 [Shimada et al., 1999a; Shimada et al., 1999b; Peuchmaur et al., 2003]. En effet, plus la différenciation est avancée, plus le pronostic est favorable. Conséquence thérapeutique : une stratégie consiste en l'utilisation d'agents différenciateurs comme l'acide rétinoïque pour faire évoluer les neuroblastomes en des formes plus matures.



**Figure 21.** Âge au diagnostic, stade et amplification de *N-MYC* : les critères de l'algorithme de la stratification du risque des tumeurs neuroblastiques

Les trois facteurs de la stratification standard du risque des tumeurs neuroblastiques sont l'âge au diagnostic, le stade et l'amplification de *N-MYC*. Cette stratification permet de distinguer schématiquement les formes de bas risque et celles de haut risque qui représentent 55 et 45% respectivement de l'ensemble des tumeurs neuroblastiques.

Les neuroblastomes de bas risque sont définis par les tumeurs non amplifiées en *N-MYC* suivante :

- les formes localisées (stade 1, 2A, 2B, 3),
- les formes métastatiques de moins de 18 mois au diagnostic
- et les stades 4S.

Les neuroblastomes de haut risque sont définis par :

- les tumeurs métastatiques de plus de 18 mois au diagnostic quelque soit le statut *N-MYC*
- et les tumeurs avec une amplification *N-MYC*, quelque soit le stade et l'âge au diagnostic.

#### 4.5.7. Amplification de l'oncogène *N-MYC*

L'amplification de l'oncogène *N-MYC* est un facteur de mauvais pronostic. Environ 20% des neuroblastomes présentent ce caractère et correspondent à des stades avancés de la maladie [Brodeur et al., 1984; Schwab et al., 1984]. En 1991, cette altération a été proposée notamment par notre laboratoire comme nouveau marqueur pronostique de la maladie [Bourhis et al., 1991]. Quelque soit le stade *INSS* et l'âge au diagnostic des patients, les neuroblastomes présentant ce génotype sont considérés à haut risque. Cependant, dans les tumeurs métastatiques de l'enfant de plus de 18 mois, le risque n'est pas accru, que la tumeur soit amplifiée ou non en *N-MYC* [George et al., 2005].

#### 4.6. Âge au diagnostic, stade et amplification de *N-MYC* : les critères de la stratification standard du risque

Les trois facteurs de la stratification standard du risque des tumeurs neuroblastiques sont l'âge au diagnostic, le stade et l'amplification de *N-MYC*. Cette stratification permet de distinguer schématiquement les formes de bas risque et celles de haut risque qui représentent 55 et 45% respectivement de l'ensemble des tumeurs neuroblastiques (Figure 21).

Les neuroblastomes de bas risque sont définis par les tumeurs non amplifiées en *N-MYC* suivante :

- les formes localisées (stade 1, 2A, 2B, 3),
- les formes métastatiques de moins de 18 mois au diagnostic
- et les stades 4S.

Les neuroblastomes de haut risque sont définis par :

- les tumeurs métastatiques de plus de 18 mois au diagnostic quelque soit le statut *N-MYC*
- et les tumeurs avec une amplification *N-MYC* quel que soit le stade et l'âge au diagnostic.

Actuellement, ces trois facteurs ne suffisent pas pour classer les neuroblastomes et aucun autre marqueur simple n'existe pour prédire l'évolution des neuroblastomes ne présentant pas d'amplification *N-MYC*. Depuis peu, les recherches pour améliorer le





pronostic s'orientent vers une analyse systématique des modifications chromosomiques des neuroblastomes, en introduisant en routine des méthodes d'analyses pangénomiques comme la CGH-array (voir section 5.1.3.3).

#### 4.7. Prise en charge thérapeutique

Le traitement des neuroblastomes dépend essentiellement de leur classification clinico-génotypique. Les patients présentant des neuroblastomes localisés sont le plus souvent traités par chirurgie seule avec adjonction de chimiothérapie conventionnelle légère dans le cas d'une tumeur inopérable d'emblée. Dans le cas des stades 4S, une surveillance seule est généralement préconisée, la tumeur régressant spontanément. Dans les cas de neuroblastomes de haut risque, les patients sont traités par, tout d'abord, une chimiothérapie d'induction, visant à réduire la taille de la tumeur primitive et à éliminer les métastases, puis une chirurgie de la tumeur, suivi d'une chimiothérapie à hautes doses et une autogreffe de cellules souches hématopoïétiques. Une irradiation du site de la tumeur primitive est souvent préconisée. Ce traitement lourd est prolongé par un traitement d'entretien par l'acide 13-*cis*-rétinoïque (isotretinoïne ou accutane), agent différenciateur, qui améliore la survie des patients [Pritchard et al., 1982;Matthay et al., 1999;Hartmann et al., 1999;Valteau-Couanet, 2005;Berthold et al., 2005].

Avec ces traitements, même s'ils présentent des taux de rechute de l'ordre de 30%, les patients de bas risque ont un excellent pronostic avec des taux de guérison de 80 à 90%. En revanche, les patients de haut risque ne présentent des taux de guérison que de 30 à 40%. En effet, si une chimiosensibilité est fréquemment observée, seule une minorité se révèle réellement chimiocurables. Ainsi, après une première phase de rémission, la maladie métastatique réapparaît et échappe à tout contrôle.

En raison de l'échec de la chimiothérapie conventionnelle, de nombreuses études sur de nouvelles approches thérapeutiques sont en cours. Notamment sur l'immunothérapie, où la cible la plus fréquente d'essai clinique est le disialoganglioside GD2, un glycolipide de surface, marqueur des cellules neuro-ectodermiques. Si les anticorps anti-GD2 n'entraîne pas l'effet notable d'un traitement offensif, les résultats sont prometteurs pour traiter la maladie résiduelle [Modak and Cheung, 2007].



## 5. GENETIQUE DES NEUROBLASTOMES

Un ensemble d'anomalies génétiques caractérise les tumeurs neuroblastiques. Les neuroblastes malins présentent en effet de nombreuses anomalies tant au niveau du nombre et de la structure des chromosomes eux-mêmes que de l'expression génique. Figurent principalement l'amplification génomique de l'oncogène *N-MYC*, les pertes alléliques des chromosomes 1p, 3p, 11q et 14q, ainsi que la polysomie du 17q et l'expression différentielle des récepteurs aux neurotrophines TrkA/TrkB/TrkC qui sont tous associées au comportement tumoral [Brodeur, 2003] ; l'indicateur pronostic clé restant l'amplification *N-MYC* présente dans près de 20% des cas.

### 5.1. Prédisposition génétique

Dans 1 à 2% des cas, une prédisposition génétique au neuroblastome existe [Knudson, Jr. and Strong, 1972]. Au sein de ces familles, la transmission est de type autosomique dominant à pénétrance incomplète, estimée à environ 11% [Kushner et al., 1986]. Par des analyses de liaison, un locus de prédisposition a été décrit en 16p12-13 dans des familles nord-américaines [Weiss et al., 2000; Maris et al., 2002]. Dans des familles européennes, une association est apparue avec la région 4p16 [Perri et al., 2002] où a été identifié le premier gène de prédisposition au neuroblastome : le gène *Phox2b*, codant pour un facteur de transcription à homéodomaine. Des mutations germinales de ce gène ont été caractérisées chez des patients présentant un neuroblastome associé à des maladies de la crête neurale [Mosse et al., 2004; Trochet et al., 2004]. Des pertes d'hétérozygotie au niveau du locus 4p16, ainsi qu'une altération de l'expression de ce gène par méthylation de son promoteur ont été aussi retrouvées dans des cas de neuroblastomes sporadiques ; ces données confirment l'implication de *Phox2b* dans la pathogenèse du neuroblastome [de Pontual et al., 2007].

Plus récemment, des cas familiaux ont pu être corrélés à la présence de mutations des gènes *ALK* et *LMO1* [George et al., 2008; Janoueix-Lerosey et al., 2008; Chen et al., 2008; Wang et al., 2011].



## 5.2. Anomalies de la ploïdie

L'aneuploïdie, fréquemment retrouvée dans le neuroblastome, est caractérisée par la perte ou le gain de chromosomes entiers d'un génome diploïde. On peut distinguer deux catégories de neuroblastome corrélées aux caractéristiques cliniques et au pronostic, sachant que l'analyse de la ploïdie perd tout intérêt pronostique pour les enfants âgés de plus de deux ans.

- Les tumeurs diploïdes ou tétraploïdes présentent peu d'anomalies de nombre de chromosomes, la tétraploïdie étant obtenue par la duplication du génome complet. Ces tumeurs présentent de nombreuses anomalies génétiques structurales et remaniements chromosomiques. Rencontrées principalement chez des enfants de plus de 18 mois, elles corrélerent un pronostic défavorable.
- Les tumeurs triploïdes comportent de multiples anomalies du nombre de chromosomes (gain du 17 ou du 7, perte du 4, du 3 et du 14) mais peu ou pas d'anomalies de structure. Ces tumeurs affectant principalement des enfants jeunes sont de bon pronostic. On classe également dans cette catégorie les tumeurs hyperploïdes (plus de quatre copies du génome) dont font principalement partie les stade 4S [Look et al., 1984; Bourhis et al., 1991].

## 5.3. Anomalies chromosomiques

De nombreuses anomalies chromosomiques sont acquises par les neuroblastes malins au cours de leur progression. Elles sont causées le plus souvent par des translocations déséquilibrées qui touchent en particulier les régions de réplication précoce du génome.

### 5.3.1. Locus 2p24 : amplification du gène *N-MYC*

Situé au locus 2p24, l'oncogène *N-MYC* code pour un facteur de transcription dont les gènes cibles sont impliqués dans la prolifération et la dissémination métastatique. Un des évènements récurrents des tumeurs neuroblastiques est la présence, en 2p24, d'un amplicon qui peut couvrir jusqu'à 1Mb, contenant non seulement le gène *N-MYC* mais aussi des gènes vicinaux tels *DDX1*, un gène de la famille DEAD box au rôle biologique



encore non élucidé. L'amplicon *N-MYC* 2p24 se présente soit sous forme de doubles minutes (ADN extra-chromosomique), soit sous forme d'HSR (homogeneous stained region), présentant un grand nombre de copies du gène (10 à 500 copies), avec une grande variabilité intercellulaire [Squire et al., 1996]. L'amplification de l'oncogène *N-MYC* qui concerne 20% des tumeurs, corrèle des tumeurs de stades avancés et de mauvaise évolution [Brodeur et al., 1984; Schwab et al., 1984; Bourhis et al., 1991; Tang et al., 2006]. Des gains modérés de la région 2p24 (1 à 4 copies surnuméraires), également observés dans 6 à 8% des neuroblastomes, peuvent être dus soit à des duplications du locus, soit à une translocation déséquilibrée [Corvi et al., 1994; Valent et al., 2002].

### 5.3.2. Pertes et gains de bras courts et longs des chromosomes 1, 4, 11, 14 et 17

Un grand nombre de déséquilibres chromosomiques à grande échelle incluant la perte du bras court du chromosome 1, celle du bras long du chromosome 11 et la polysomie du bras long du chromosome 17, sont associés à une mauvaise survie [Spitz et al., 2003; Vandesompele et al., 2005; Attiyeh et al., 2005].

Les gains du bras long du chromosome 17 (17q) constituent l'anomalie la plus fréquente dans les neuroblastomes : ils concerneraient 50 à 70% des tumeurs et, associés à des caractères cliniques péjoratifs, 90% des neuroblastomes avancés [Plantaz et al., 1997]. Les surreprésentations du 17q sont dues à des translocations déséquilibrées, le plus souvent avec les chromosomes 1 et 11 [Savelyeva et al., 1994; Stark et al., 2003]. Les points de cassure du chromosome 17 sont très hétérogènes rendant peu probable l'existence d'un gène de fusion mais déterminant néanmoins une région constante de gain entre 17q23 et 17qter [Janoueix-Lerosey et al., 2000].

Un certain nombre d'autres loci apparaissent amplifiés dans les neuroblastomes, notamment 2p22, 2p13, 12q13 ou encore 1p32. Des gains ou des amplifications du 4p, du 6p, du 7q, du 11q et du 18q ont également été rapportés.

La délétion hétérozygote du bras court du chromosome 1 est retrouvée dans 30% des tumeurs [White et al., 2001]. Elle résulte fréquemment d'une translocation déséquilibrée avec la région 17q. Des analyses cytogénétiques et moléculaires ont conduit à





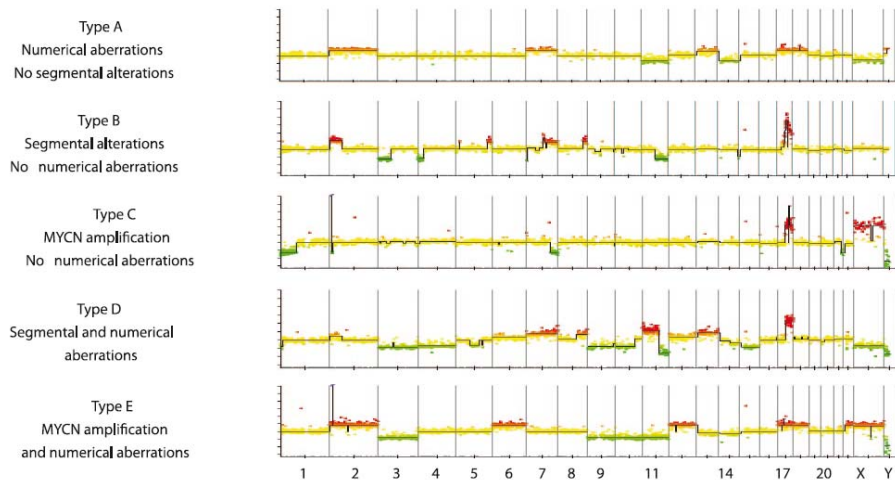
l'identification de deux régions consensus de délétion dépendant du statut d'amplification de *N-MYC*. Dans le cas de neuroblastome *N-MYC* amplifié, la région délétée s'étend du locus 1p35 à l'extrémité du bras court du chromosome 1, contrairement aux tumeurs *N-MYC* non amplifiées où la délétion se limite au locus 1p36.3. Dans les deux cas, l'anomalie est corrélée à une issue défavorable [Takeda et al., 1994].

La région 11q est, avec le 1p, l'autre site préférentiel de translocation déséquilibrée avec le 17q. Cette délétion, observée dans environ 40% des neuroblastomes, corrèle inversement l'amplification *N-MYC* et les délétions 1p. Ne modifiant pas le pronostic pour les patients présentant une tumeur amplifiée en *N-MYC*, la délétion 1p est défavorable dans les tumeurs non-amplifiées [Guo et al., 1999].

D'autres loci apparaissent fréquemment délétés dans les neuroblastomes, notamment le 14q [Suzuki et al., 1989], le 4p [Caron et al., 1996] et le 3p [Altura et al., 1997], dont les pertes sont associées aux délétions du 11q [Luttikhuis et al., 2001]. Des pertes du 4p, région dans laquelle se trouve *PHOX2B*, ont été rapportées dans des cas de neuroblastome familial [Perri et al., 2002]. Enfin des pertes du 9p ont également été décrites et concernent 20% des neuroblastomes [Takita et al., 1997].

### 5.3.3. Profils génomiques globaux par CGH-array

L'étude par CGH-array de l'ADN tumoral, réalisée depuis 2007 par l'*Institut Curie*, a confirmé et étendu l'ensemble des altérations génétiques énoncées ci-dessus. Dans un premier temps, l'analyse de 147 neuroblastomes non amplifiés en *N-MYC*, par CGH-array, conduite par Schleiermacher *et coll.* a fourni un aperçu complet des déséquilibres génomiques acquis et a permis de distinguer des tumeurs de type 1 présentant des gains ou des pertes de chromosomes entiers, et des tumeurs de type 2 présentant des gains ou des pertes chromosomiques partielles, y compris le gain impliquant le chromosome 17q. Tandis qu'un profil de type 1 est observé plus fréquemment dans la plupart des formes localisées, et chez les patients de moins de 12 mois au diagnostic, un profil génomique de type 2 est associé à un risque plus élevé de rechute dans la population générale, mais aussi dans certaines formes localisées de la maladie. En analyse multivariée, le profil génomique apparaît comme un facteur pronostique indépendant [Schleiermacher et al., 2007].



**Figure 22.** Profils génomiques globaux par CGH-array des tumeurs neuroblastiques

(d'après Janoueix-Lerosey et al., *J Clin Onc*, 2009)

Une stratification en cinq classes selon les altérations génomiques rencontrées a été proposée.

- Les tumeurs de type A présentant exclusivement des anomalies numériques du nombre de chromosomes sont associées à une excellente survie.
- Les tumeurs présentant des anomalies segmentaires des chromosomes avec ou sans présence d'anomalies numériques sont associées à un haut risque de rechute et de décès (respectivement classes B et D).
- La présence de l'amplification du gène *N-MYC* dans des tumeurs présentant des anomalies segmentaires ou numériques diminue drastiquement la survie des patients (respectivement classes C et E).

Cette classification synthétise en un ensemble simple et compréhensible l'intégralité des facteurs pronostiques basés sur les anomalies chromosomiques décrits à ce jour tels que la ploïdie, l'amplification de *N-MYC* et les gains et pertes partiels de chromosomes.

Ce travail a conduit à l'analyse d'une cohorte de 493 neuroblastomes et a permis d'affiner cette classification génomique, montrant qu'elle prédisait l'évolution des neuroblastomes. Une stratification en cinq classes selon les altérations génomiques rencontrées a été proposée (Figure 22) [Janoueix-Lerosey et al., 2009] :

- Les tumeurs présentant exclusivement des anomalies numériques du nombre de chromosomes sont associées à une excellente survie (classe A).
- Les tumeurs présentant des anomalies segmentaires des chromosomes avec ou sans présence d'anomalies numériques sont associées à un haut risque de rechute et de décès (classes B et D).
- La présence de l'amplification du gène *N-MYC* dans des tumeurs présentant des anomalies segmentaires ou numériques diminue drastiquement la survie des patients (classes C et E).

Cette classification synthétise, en un ensemble simple et compréhensible, l'intégralité des facteurs pronostiques basés sur les anomalies chromosomiques décrites à ce jour telles que la ploïdie, l'amplification de *N-MYC* et les gains et pertes partiels de chromosomes. Aujourd'hui, l'analyse par CGH-array de l'ADN tumoral est proposée comme nouvel outil pour le pronostic du neuroblastome ; elle est d'ores et déjà utilisée en routine hospitalière.

#### 5.4. Anomalies d'expression des gènes

##### 5.4.1. Expression des récepteurs aux neurotrophines

Les neurotrophines jouent un rôle fondamental pour le développement et la survie des systèmes nerveux central et périphérique. L'expression du récepteur de haute affinité au NGF, TrkA, est corrèle un bon pronostic ; les cellules exprimant TrkA se différencient en présence de NGF et entrent en apoptose en l'absence de ce facteur de croissance. Les neuroblastomes de mauvais pronostic sur-expriment plus fréquemment le récepteur au BDNF ou TrkB [Kogner et al., 1994].



#### 5.4.2. Expression de *N-MYC* et *TWIST*

L'amplification *N-MYC*, événement majeur de l'oncogenèse du neuroblastome, est généralement associée à une très forte expression de l'onco-protéine correspondante dans les neuroblastes malins : pour autant, à ce jour, l'expression de l'oncoprotéine mesurée à partir des tumeurs des patients n'a pas été démontrée formellement comme reliée au pronostic. La dualité fonctionnelle des membres de la famille MYC est bien établie ; elle dépend de leur niveau d'expression : à taux élevé, stimulation de la prolifération, et à taux faible, promotion de l'apoptose.

La grande résistance à l'apoptose manifestée par les neuroblastomes, tout particulièrement ceux présentant l'amplification du gène *N-MYC* d'une part, et l'absence de mutation de p53 dans les tumeurs neuroblastiques d'autre part, ont conduit l'équipe d'Alain Puisieux du *Centre Léon Bérard*, à Lyon, à rechercher un partenaire oncogénique à l'oncoprotéine *N-MYC*, capable d'expliquer son rôle oncogénique majeur dans les neuroblastomes. Ainsi, en 2004, Valesia-Wittman et coll., ont démontré que *TWIST1* agissait comme un oncogène dans le neuroblastome en protégeant les neuroblastes malins de l'effet pro-apoptotique de *N-MYC* par l'inhibition de la voie de signalisation ARF/p53 [Valesia-Wittmann et al., 2004]. *TWIST1* a été également décrit dans un modèle murin comme un facteur clé du processus métastatique dans le cancer du sein par une action directe sur la transition épithélio-mésenchymateuse nécessaire à la dissémination métastatique [Yang et al., 2004]. De plus, *TWIST1* a été montré comme surexprimé dans les cancers gastriques [Rosivatz et al., 2002] et dans les rhabdomyosarcomes [Maestro et al., 1999].

En outre, sept microARN du C14MC (miR-300, -382, -494, -495, -539, -543 et -544) répriment de façon coordonnée la transition épithélio-mésenchymateuse ainsi que la prolifération de cellules de carcinomes mammaires, par ciblage directe de *TWIST1* [Haga and Phinney, 2012].

La famille de protéines basiques hélice-boucle-hélice (bHLH) comprend, outre *TWIST1*, un autre membre hautement conservé, *TWIST2*. Le mode d'action de ces protéines passe principalement par la liaison directe de l'ADN au niveau de séquences consensus E-box et le recrutement de co-activateurs ou de répresseurs pour la régulation de l'expression des gènes cibles. *TWIST2* présente 66% de similarités globales de séquences avec *TWIST1* ;



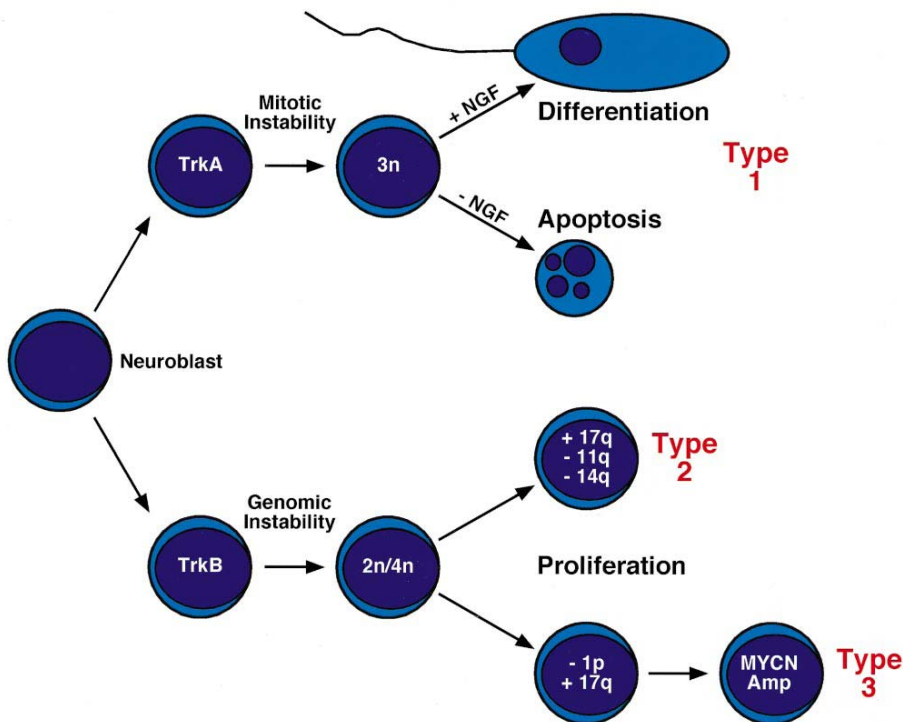
son homologie avec TWIST1 augmente à 98% au niveau de la région critique bHLH. Même si aucune étude ne tend à le confirmer, l'existence de phénomène compensatoire entre ces deux protéines pourrait assurer une régulation fine de certains processus cellulaires. Même si leur rôle dans la transition épithélio-mésenchymateuse est avéré, aucune étude ne s'est intéressée à l'expression simultanée des deux protéines sœurs TWIST dans les cancers, hormis en 2011, où Gasparotto *et coll.*, ont montré une sur-expression de *TWIST1* et de *TWIST2* dans les carcinomes des cellules squameuses de la tête et du cou, seule *TWIST2* corrélant un mauvais pronostic [Gasparotto et al., 2011].

#### 5.4.3. Expression des gènes *GALNT*

Les enzymes UDP-N-acetyl- $\alpha$ -D-galactos-amine:polypeptide N-acetyl-galactos-aminyl-transférase (*GALNT*) catalyse la première étape de la O-Glycosylation ; certaines *GALNT* ont été décrites comme exprimées de façon différentielle dans les neuroblastomes. En 2006, *GALNT13* a été proposé comme nouveau marqueur de progression tumorale chez les patients atteints de neuroblastome. En effet, *GALNT13* a été retrouvée exprimée dans les échantillons de moelles osseuses envahies de patients de stade 4 alors qu'elle n'était pas détectée dans les moelles osseuses de donneurs sains [Berois et al., 2006]. Ce travail a conduit à l'analyse de l'expression de 14 *GALNT* dans une cohorte de 122 neuroblastomes, et a permis de montrer que l'expression de *GALNT9* dans les tumeurs neuroblastiques corrèle une excellente survie qu'il s'agisse de tumeurs classées comme étant de bas ou de haut risque [Berois et al., 2013].

Les altérations des profils glycanes sont importantes dans le développement des cancers en lien à l'expression d'antigènes carbohydrates particuliers associés à la tumeur. En effet, des productions anormales d'O-glycane particuliers par les cellules cancéreuses contribuent de manière importante au phénotype malin et jouent un rôle fonctionnel dans l'adhésion cellulaire et l'invasion [Brockhausen et al., 2006].





**Figure 23.** Vers un modèle génétique du neuroblastome

(d'après Brodeur et al., Nat Rev Cancer, 2003)

Les différentes anomalies génomiques récurrentes ont permis de classer les tumeurs neuroblastiques en trois types, 1, 2A et 2B, en fonction de critères suivants :

- Le type 1, constitué de cellules triploïdes, est causé par une instabilité mitotique. Les altérations génétiques sont peu nombreuses et les cellules sur-expriment TrkA. Ces cellules entrent en apoptose ou se différencient ; la tumeur est de bon pronostic.
- Le type 2, constitué de cellules di- ou tétraploïdes, présente de nombreuses altérations dont la polysomie du 17q causées par une instabilité chromosomique. Ces tumeurs sur-expriment TrkB et sont de mauvais pronostic. On distingue deux sous-catégories : tandis que le type 2A, moins agressif, est associé à des pertes du 11q et du 14q, le type 2B, de très mauvais pronostic, présente des délétions 1p et des amplifications de *N-MYC*.

#### 5.4.4. Profil d'expression globale des ARNm

De nombreuses analyses du transcriptome des tumeurs neuroblastiques ont montré que le profil d'expression des gènes pourrait être utilisé dans une stratification du risque afin d'adapter les protocoles thérapeutiques aux patients en fonction des profils moléculaires de leur tumeur [Schramm et al., 2005; Wang et al., 2006; Oberthuer et al., 2006; Oberthuer et al., 2010; De Preter et al., 2010; Valentijn et al., 2012].

#### 5.5. Proposition de classification génétique des neuroblastomes basée sur les anomalies chromosomiques et les variations d'expressions géniques

Les différentes anomalies génomiques récurrentes ont permis de classer les tumeurs neuroblastiques en trois types, 1, 2A et 2B, en fonction de critères suivants (Figure 23) [Brodeur, 2003] :

- Le type 1, constitué de cellules triploïdes, est causé par une instabilité mitotique. Les altérations génétiques sont peu nombreuses et les cellules sur-expriment TrkA. Ces cellules entrent en apoptose ou se différencient ; la tumeur est de bon pronostic.
- Le type 2, constitué de cellules di- ou tétraploïdes, présente de nombreuses altérations dont la polysomie du 17q causées par une instabilité chromosomique. Ces tumeurs sur-expriment TrkB et sont de mauvais pronostic. On distingue deux sous-catégories : tandis que le type 2A est associé à des pertes du 11q et du 14q et est moins agressif, le type 2B présente des délétions 1p et des amplifications de *N-MYC* et est de très mauvais pronostic.

A partir de cette classification, les classes génomiques proposées par Janoueix-Lerosey et coll. sont facilement superposables (Figure 22). En effet, tandis que le type 1 correspondrait aux tumeurs de classe A, le type 2A coïnciderait aux classes B et D, et le type 2B aux classes C et E [Janoueix-Lerosey et al., 2009].



## 5.6. Anomalies d'expression des microARN

Depuis 2007, le profilage de l'expression des microARN dans le neuroblastome a identifié un grand nombre de microARN qui s'avèrent différentiellement exprimés entre des formes tumorales favorables et non-favorables ; ces études se sont essentiellement attachées à comparer les formes amplifiées en *N-MYC* à celles non amplifiées. Cependant pour la plupart des études, la corrélation entre l'expression des microARN identifiés et la survie des patients n'a pu être établie comme un facteur pronostique indépendant des facteurs cliniques standard (stade *INSS*, âge au diagnostic et amplification de *N-MYC*).

Concernant l'implication des microARN dans la progression tumorale des tumeurs neuroblastiques, dans un travail séminal publié en 2007, Chen & Stallings ont mesuré l'expression de 157 microARN par RT-qPCR dans 35 tumeurs caractérisées par des altérations génomiques de trois types : anomalies du nombre de chromosomes entiers (hyper-diploïdie), délétion du 11q et amplification de *N-MYC*. Les auteurs ont montré que 20% de ces microARN avaient une expression différentielle entre les trois types tumoraux ; la comparaison binaire de ces microARN a montré que 20% de ces microARN étaient différentiellement exprimés entre les tumeurs hyper-diploïdes et les tumeurs 11q- alors que plus de 70% l'étaient entre les tumeurs hyper-diploïdes et celles présentant une amplification *N-MYC*, 40% de ces microARN discriminant les tumeurs *N-MYC* amplifiées des tumeurs 11q-. De façon intéressante, la majorité des microARN dérégulés dans les tumeurs *N-MYC* amplifiées étaient faiblement exprimés [Chen and Stallings, 2007].

Puis en 2008, l'établissement d'un modèle *in vitro* d'activation conditionnelle de *N-MYC* a permis à Schulte et coll. d'identifier 11 microARN sur-régulés sur 384 analysés, aucun n'étant sous-régulé. Fait notable, ces 11 microARN présentent dans leurs régions promotrices des séquences E-box de liaison préférentielle avec le facteur de transcription *N-MYC*, ce qui suggère une régulation directe de ces microARN par l'oncogène *N-MYC*. L'analyse de 24 tumeurs primaires a uniquement identifié 14 microARN sur-exprimés dans les neuroblastomes avec amplification *N-MYC* dont 7 en commun avec la signature obtenue *in vitro* [Schulte et al., 2008].

En 2009, poursuivant la même ligne de recherche, Bray et coll. ont montré que *N-MYC* régulait l'expression de certains microARN, pouvant ainsi causer une importante sous-régulation de l'expression des microARN [Bray et al., 2009]. L'analyse de l'expression de



430 microARN par RT-qPCR dans 144 tumeurs primaires, a indiqué que 25% étaient différentiellement exprimés de manière significative entre des tumeurs *N-MYC* amplifiées et non amplifiées, régulés directement ou indirectement par *N-MYC*, d'après les auteurs : 1/3 sont sur-exprimés et 2/3 sont sous-exprimés dans les tumeurs amplifiées. Après exclusion des membres du même cluster polycistronique (ici miR-17-5p-92 dont la sur-expression a été précédemment rapporté [Chen and Stallings, 2007;Schulte et al., 2008] et C14MC qui a été trouvé sous-exprimé dans les tumeurs non amplifiées), une ultime signature de 15 microARN prédictive de l'évolution clinique a été proposée. Une analyse génomique a permis aux auteurs de montrer que les déséquilibres génomiques ne perturbent que 15% des loci encodant pour des microARN analysés dans l'étude [Bray et al., 2009].

En 2010, Schulte *et coll.* ont comparé, par « deep-sequencing », le transcriptome non codant de 5 neuroblastomes de stade 1 non *N-MYC* amplifiés à 5 neuroblastomes de stade 4 *N-MYC* amplifiés, pour mettre en évidence 76 microARN différentiellement exprimés entre les deux groupes de tumeurs [Schulte et al., 2010].

En 2010 également, l'étude de Lin *et coll.*, réalisée sur 66 neuroblastomes, a mesuré l'expression de 162 microARN par RT-qPCR, pour retrouver la majorité d'entre eux sous-régulés dans les neuroblastomes de stade 4, tout particulièrement ceux présentant une amplification de *N-MYC*, de pronostic très défavorable [Lin et al., 2010a]. Ainsi les auteurs proposèrent une signature de 27 microARN comme outil de prédiction du risque au diagnostic. S'intéressant aux enzymes nécessaires à la maturation des microARN, les auteurs ont montré également une sous-régulation de *DICER* et *DROSHA* dans les neuroblastomes avancés avec une différence très marquée entre stades 4 et stades 4S. La faible expression des transcrits de ces deux enzymes corrèle une plus faible survie des patients. Au final, les auteurs proposent un modèle de prédiction comprenant l'âge au diagnostic, 12 microARN et le couple *DICER/DROSHA* [Lin et al., 2010a].

L'étude la plus récente réalisée en 2011 sur 609 tumeurs neuroblastiques par De Preter et coll., propose une signature de 25 microARN permettant de distinguer les neuroblastomes de bas et ceux de haut risque. Cette signature, comprenant 14 microARN sur-exprimés et 11 sous-exprimés dans les neuroblastome de haut risque, s'avère être un marqueur pronostic indépendant des autres co-variables testées (âge au diagnostic, stade *INSS* et amplification *N-MYC* [De Preter et al., 2011].

**Tableau 1.** Liste des microARN potentiellement impliqué dans l'oncogenèse des neuroblastomes d'après la méta-analyse de la littérature

microARN	Localisation chromosomique	De Preter et al., 2011	Lin et al., 2010	Schulte et al., 2010	Bray et al., 2009	Schulte et al., 2008	Chen et Stallings, 2007
		Haut risque vs Bas risque	Haut risque vs Bas risque	MNA vs non-MNA	MNA vs non-MNA	MNA vs non-MNA	MNA vs non-MNA
<b>Sur-expression</b>							
hsa-miR-17-5p	13q31.3	+		+	+	+	
hsa-miR-18a*	13q31.3	+		+	+		
hsa-miR-20a-5p	13q31.3	+			+	+	
hsa-miR-25	7q22.1	+		+	+	+	
hsa-miR-92a-3p	13q31.3 / Xq23.2	+			+	+	+
hsa-miR-181a	9q33.3			+		+	+
<b>Sous-expression</b>							
hsa-miR-30c	1p34.2 / 6q13	-	-				-
hsa-miR-129-5p	7q32.1 / 11p11.2		-	-			-
hsa-miR-137	1p21.3		-	-			-
hsa-miR-149	2q37.3		-	-	-		-
hsa-miR-190	15q22.2	-	-	-	-		-
hsa-miR-324-5p	17p13.1		-	-	-		-
hsa-miR-331-3p	12q22		-	-			-

En résumé, les études réalisées sur les tumeurs neuroblastiques désignent les microARN sélectionnés comme impliqués dans la progression tumorale des neuroblastomes. Appartenant pour la plupart à des clusters répartis sur le génome, la dérégulation de ces microARN est, en règle générale, une sous-régulation d'expression. La compilation de ces publications, présentée dans la table 2, fait ressortir treize microARN d'intérêt, leur suggérant un rôle particulièrement important dans l'oncogenèse du neuroblastome (Tableau 1). Plusieurs d'entre eux ont fait l'objet d'études fonctionnelles dans le neuroblastome, notamment, les microARN du cluster 17-92.

Les microARN du cluster miR-17-92 sont transcrits à partir d'un transcrite polycistronique codé à partir du chromosome 13. En effet, ce cluster est transcrit en un long transcrite primaire contenant les miR-17, miR-18, miR-19, miR-20 et miR-92 [He et al., 2005; O'Donnell et al., 2005]. Les clusters de microARN 106a et 106b, localisés sur les chromosomes 7 et X respectivement, sont des paralogues du cluster miR-17-92. Retrouvés sur-exprimés dans de nombreux cancers due à l'amplification fréquente de leur loci [He et al., 2005; Hayashita et al., 2005], des analyses fonctionnelles ont révélé que ce cluster était la cible directe de la famille d'oncogène *MYC* [O'Donnell et al., 2005; Schulte et al., 2008]. L'expression ectopique de ce cluster permet la transformation maligne de cellules progénitrices hématopoïétiques [He et al., 2005]. Plusieurs gènes cibles de ces microARN ont été identifiés comme *E2F1* ou encore des inhibiteurs de l'angiogenèse, trombospondin 1 et connective tissue growth factor [O'Donnell et al., 2005; Dews et al., 2006]. Dans le neuroblastome, Mestdagh et coll. ont montré que le cluster miR-17-92 régule plusieurs composants de la voie de signalisation TGF- $\beta$  dans le neuroblastome [Mestdagh et al., 2010]. En effet, en utilisant la technique SILAC couplé à de la spectrométrie de masse quantitative, les auteurs ont examiné l'effet de l'activation du cluster miR-17-92 sur l'expression globale des protéines dans des cellules de neuroblastome ; ils ont montré que le cluster miR-17-92 est potentiellement un inhibiteur de la voie de signalisation TGF- $\beta$  en ciblant directement les gènes *TGFBR2*, *SMAD2* et *SMAD4*. De nombreux gènes de réponses à la voie TGF- $\beta$  ont été également décrits dans une étude précédente sur le neuroblastome comme étant les cibles directes du cluster miR-17-92, notamment les gènes *CDKN1A* et *BCL2L11* [Fontana et al., 2008].





## 6. BASES RATIONNELLES, HYPOTHESES ET OBJECTIFS DU TRAVAIL DE THESE

L'ensemble des données présentées ci-dessus – cliniques, histologiques, biologiques et génétiques – concourt à définir le neuroblastome comme une maladie complexe présentant plusieurs entités tumorales distinctes, justifiant d'un traitement adapté à chacune d'entre elles. Malgré des années de recherche intensives, les étapes initiales de l'oncogenèse de ce cancer sont loin d'être élucidées. De manière spéculative, il s'agirait d'un processus multi-étapes avec un premier évènement moléculaire inconnu induisant une instabilité génomique non-aléatoire, déclenchant une dérégulation de la prolifération cellulaire et/ou un blocage de la différenciation du lignage sympathique issu des crêtes neurales.

Compte-tenu du caractère embryonnaire de ce cancer du très jeune enfant, on peut affirmer que son oncogenèse diffère radicalement de celle d'un carcinome dérivé d'un tissu différencié, une distinction valant aussi bien au plan clinique que génétique. En effet, la précocité de survenue dans la vie et le caractère généralement explosif des tumeurs neuroblastiques contrastent avec les caractéristiques d'un carcinome, de survenue et de croissance beaucoup plus lentes. Au plan génétique, un autre cancer pédiatrique d'origine neuro-ectodermique, le rétinoblastome, représente le paradigme de l'oncogenèse d'une tumeur embryonnaire : à lui seul, le gène *Rb* muté est instrumental en induisant une instabilité génomique généralisée initiant une progression tumorale. Aussi est-il raisonnable de penser que le neuroblastome n'impliquerait qu'un tout petit nombre d'évènements génétiques, à l'inverse du tableau décrivant la genèse d'un carcinome. Pour autant, la découverte de gènes de prédisposition à la maladie (mutations de *PHOX2B*, *LMO1*, *ALK*), à partir des très rares familles à neuroblastome, n'a pas permis d'inférer à ces gènes une implication significative dans la genèse des formes sporadiques. Quant à la traque des gènes identifiés comme impliqués dans la biologie des tumeurs neuroblastiques, elle s'est avérée peu fructueuse ; qu'il s'agissent du gène *TrkA* situé en 17q13.1 encodant le récepteur au NGF de haute affinité [Kogner et al., 1994], du gène *TP53* lui-même non muté et dont la protéine est séquestrée dans le cytoplasme des neuroblastes malins [Moll et al., 1995], du gène *AP14* en 17q25 encodant la protéine anti-apoptotique survivine [Adida et al., 1998], ou du gène *TP73* situé dans le locus de la



délétion récurrente, en1p36.33 [Douc-Rasy et al., 2002]. La seule exception est l'oncogène *N-MYC* qui, exprimé dans des souris transgéniques, induit le développement d'une tumeur neuroblastique [Weiss et al., 1997]; cependant l'ensemble des tumeurs neuroblastiques n'est pas associée à une hyper-expression de *N-MYC*. L'approche transcriptomique a mis à jour un ensemble de gènes dont le rôle dans l'oncogénèse est loin d'être clair. En l'absence de translocation équilibrée qui pourrait permettre d'identifier un gène de fusion initiateur d'oncogénèse, les seuls événements génétiques à notre disposition aujourd'hui sont l'ensemble des gains et des pertes génomiques récurrents mis en évidence durant les trois dernières décennies. Pour autant, on ne sait s'ils représentent les causes ou les conséquences de l'oncogénèse. Ces gains et ces pertes génomiques reflètent néanmoins une grande instabilité génétique. Si aucun de ces événements ne présente à priori d'impact dans l'oncogénèse, en revanche, l'ensemble permet une stratification de risque au diagnostic de la maladie qui permet de mieux adapter le traitement. A ce jour, néanmoins, aucun marqueur fiable de la réponse au traitement n'est proposé pour les formes de haut risque, les plus meurtrières. Il importe donc de rechercher de nouveaux marqueurs pronostiques capables soit d'améliorer la classification actuelle, soit, dans un groupe de risque donnée, de prédire l'évolution de la maladie.

Tenter d'explorer certains aspects de l'épigénétique des tumeurs neuroblastiques, en recherchant la dérégulation des processus contrôlant l'expression génique, peut apporter des éléments clefs fondant cette instabilité et permettre de révéler un événement oncogénique majeur. Aussi, la caractérisation récente des microARN et leur dérégulation d'expression dans les cancers nous a conduit à les choisir comme molécules d'étude dans une approche fondamentale d'une part pour établir leur rôle dans la progression tumorale des neuroblastomes et d'autre part, pour les appliquer comme outils de stratification du risque de la maladie.



Disposant des tumeurs neuroblastiques primaires d'une grande cohorte et des informations cliniques associées de patients ainsi que de lignées cellulaires neuroblastiques, les objectifs du travail de thèse se définissent comme suit :

- à l'aide d'une cohorte tumorale préalablement établie, identifier un (des) microARN doté(s) d'une valeur pronostique indépendante des facteurs de risque existants (âge au diagnostic, stade *INSS*, amplification de l'oncogène *N-MYC*),
- à l'aide de cette cohorte tumorale et des lignées cellulaires, analyser la dérégulation de l'expression de ce (ces) microARN(s) pour mettre en évidence leur implication dans la progression tumorale des neuroblastomes.



## ***Première Partie***

Les microARN des clusters C14MC et C19MC,  
marqueurs pronostiques du neuroblastome



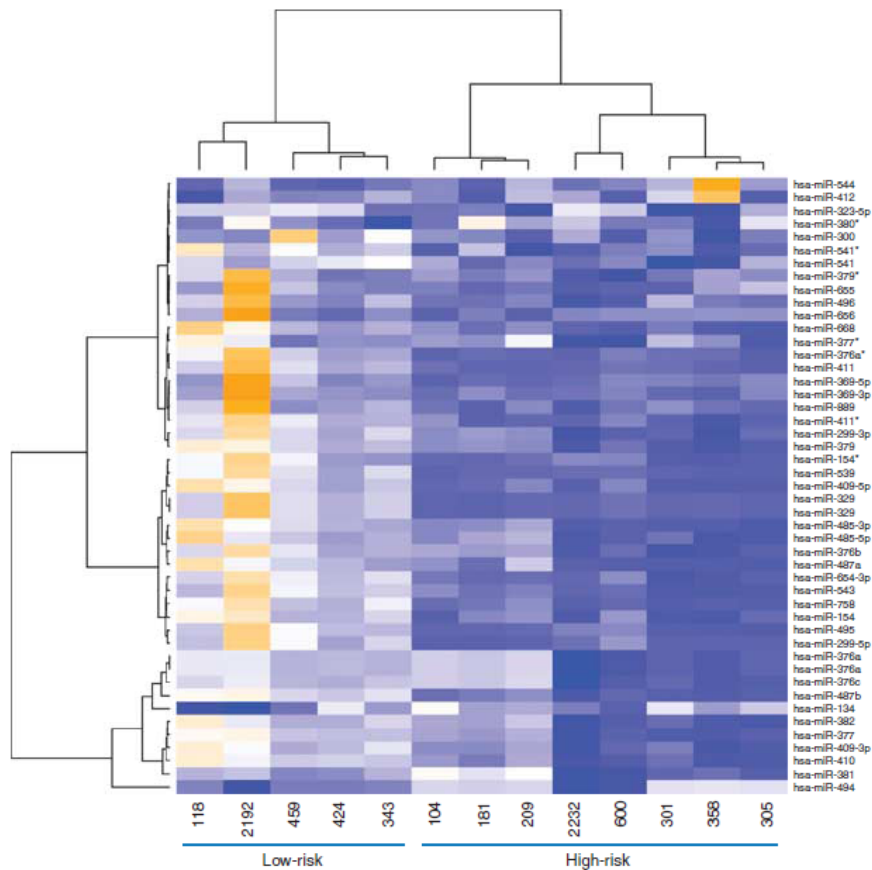


## Présentation du travail

L'expression génique d'une cellule normale est hautement régulée par un réseau de signalisation complexe. Parmi les ARN non codants mis à jour, les microARN jouent un rôle important dans le maintien de cette régulation qui, si elle vient à être rompue, entraîne la cellule normale vers un état transformé. L'expression des microARN étant tissu-spécifique dans une cellule normale, la dérégulation d'expression observée dans un cancer concernerait les mêmes microARN que ceux opérant dans son tissu originel. Une telle spécificité offre ainsi des outils diagnostiques et pronostiques nouveaux.

Concernant le neuroblastome, le diagnostic ne pose plus de problème aujourd'hui. En revanche, la prédiction du risque encouru par l'enfant au diagnostic est un réel problème de santé publique qui conditionne le traitement à mettre en place.

Par ailleurs, si le risque encouru corrèle l'agressivité de la tumeur, il reflète aussi la progression tumorale. L'objectif initial du travail de thèse étant d'identifier les microARN déterminant la progression tumorale, une cohorte importante d'échantillons tumoraux d'enfants présentant un neuroblastome a été analysée pour identifier les microARN dont l'expression est associée de façon significative à la survie globale et sans événement.



**Figure 24.** Carte d'expression des microARN du cluster C14MC dans les tumeurs neuroblastiques (n=13)

(d'après Gattolliat et al., *Br J Cancer*, 2011)

Les données sont représentés sous formes de deux dendrogrammes. Le dendrogramme vertical indique les échantillons tumoraux avec le profil d'expression de microARN. Le dendrogramme horizontal indique les microARN avec leur profil d'expression dans chaque échantillon. La distance euclidienne a été utilisée comme distance métrique et le « clustering » a été effectué par la méthode « ward ». Les couleurs s'échelonnent du orange pour les valeurs de forte expression, au bleu pour les valeurs de faible expression. Les microARN utilisés discriminent fortement les neuroblastomes de haut risque de ceux de bas risque.

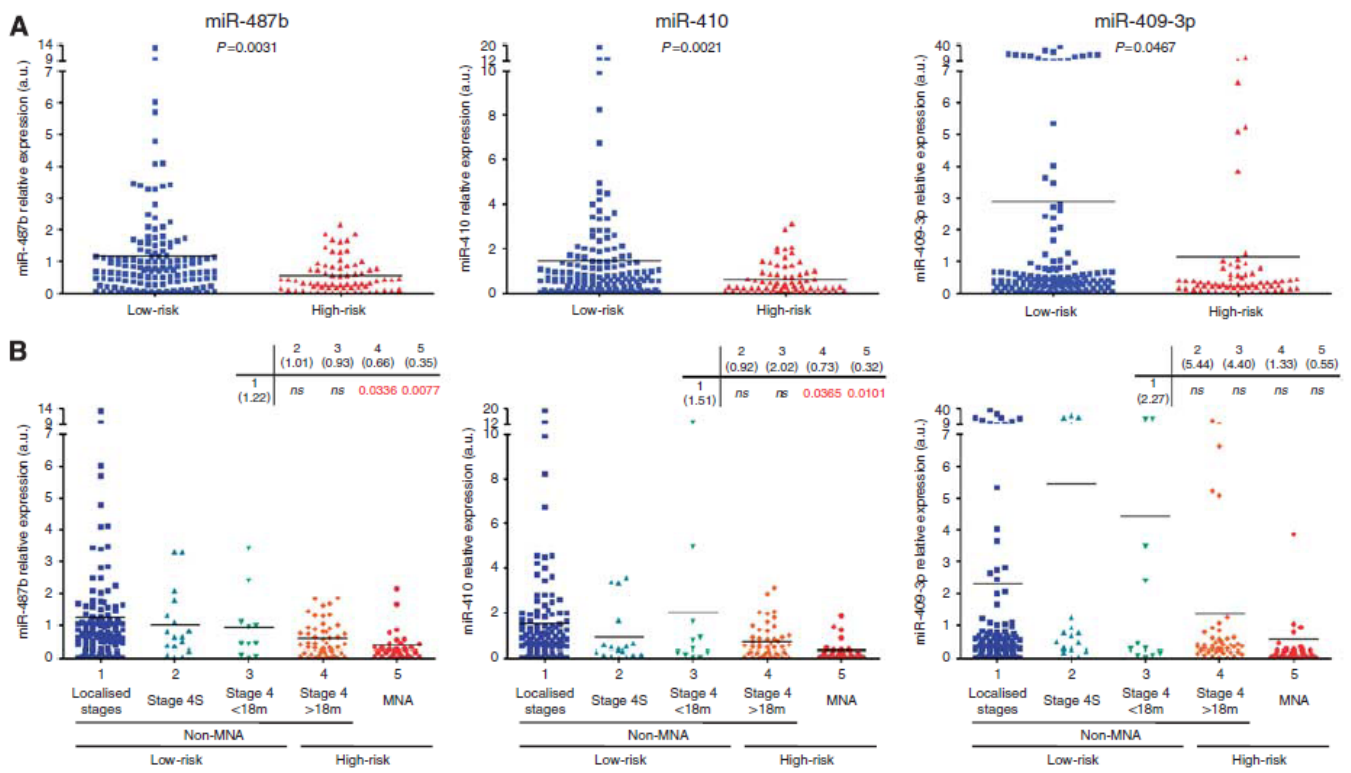
## 1. L'expression du miR-487b et miR-410 du cluster C14MC est un marqueur pronostique du neuroblastome

**Gattolliat CH**, Thomas L, Ciafrè SA, Meurice G, Le Teuff G, Job B, Richon C, Combaret V, Dessen P, Valteau-Couanet D, May E, Busson P, Douc-Rasy S, Bénard J. Expression of miR-487b and miR-410 encoded by 14q32.31 locus is a prognostic marker in neuroblastoma. *Br J Cancer*. 2011 Oct; 105(9):1352-61.

L'algorithme standard (âge au diagnostic, stade et amplification de *N-MYC*) stratifie les neuroblastomes en deux groupes de pronostic : bas risque et haut risque. Une première approche a consisté à rechercher une signature de microARN discriminant ces deux groupes de risque. Dans un second temps, le pouvoir pronostique de ces microARN a été démontré, indépendamment du groupe de risque défini par l'algorithme standard.

A partir d'une cohorte préliminaire de 13 tumeurs neuroblastiques (8 de haut risque et 5 de bas risque), le profil d'expression de 851 microARN humains a été mesuré par microarray (Agilent Technologies). L'expression des microARN identifiés et sélectionnés a été tout d'abord confirmée par RT-PCR quantitative puis validée sur une cohorte de 214 patients. La relation entre l'expression du/des microARN sélectionnés et la survie globale ou sans maladie a été analysée sur l'ensemble de la cohorte des 226 patients en utilisant le test du log-rank et le modèle multivarié de Cox.

Sur les 851 microARN humains analysés, 50 sont exprimés, de façon différentielle, entre les neuroblastomes de haut risque et ceux de bas risque avec une p-value brute inférieure au seuil de significativité. Tandis que 37 étaient sous-exprimés, 13 étaient sur-exprimés dans les neuroblastomes de haut risque. En accord avec la littérature, près de 40% des microARN de la signature décrite en section 5.6 de l'Introduction, ont été retrouvés dans les résultats obtenus. Une grande partie des autres microARN identifiés avait déjà été montrée comme dérégulée dans le neuroblastome. Le résultat important de l'étude réside en la mise en évidence d'une co-régulation de 18 microARN du cluster C14MC du locus 14q32. La sous-expression de ces microARN caractérise les neuroblastomes de haut risque (Figure 24).



**Figure 25.** Analyse statistique des niveaux d'expression de miR-487b, miR-410 et miR-409-3p dans les échantillons tumoraux de neuroblastome

(d'après Gattolliat et al., *Br J Cancer*, 2011)

(A) La cohorte de validation (n=214) a été stratifiée en deux groupes : bas risque (en bleu, n=142) vs haut risque (en rouge, n=72).

(B) La cohorte globale (n=227) a été stratifiée selon l'âge au diagnostic, le stade et le statut de l'amplification de N-MYC. (1 : n=119 ; 2 : n=17 ; 3 : n=11 ; 4 : n=49 ; 5 : n=31).

Le t-test de Student indique la significativité entre deux groupes de tumeurs. Les barres noires indiquent les valeurs moyennes des niveaux expression des microARN

**Tableau 2.** Modèles univariés et multivariés de Cox pour la survie (globale et sans maladie) dans tous les patients (n=226)

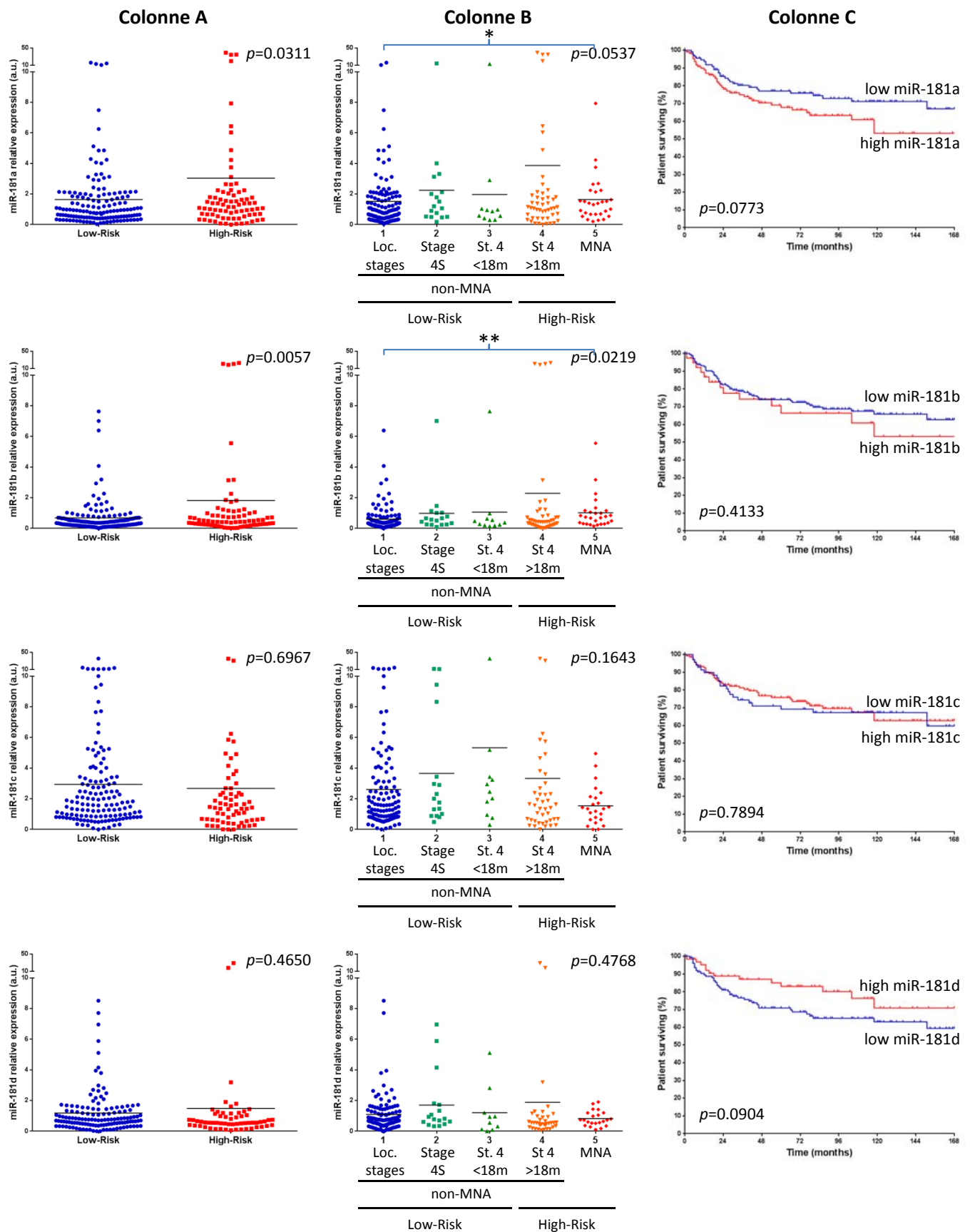
	Univariate analysis		Multivariable analysis with miR-487b		Multivariable analysis with miR-410	
	Hazard ratio (95% CI)	P-value	Hazard ratio (95% CI)	P-value	Hazard ratio (95% CI)	P-value
<i>Overall survival</i>						
Age at diagnosis						
> 18 months	1.0 (reference)	< 0.0001	1.0 (reference)	0.0441	1.0 (reference)	0.0258
< 18 months	0.247 (0.139–0.440)		0.521 (0.276–0.983)		0.485 (0.257–0.917)	
Stage						
4	1.0 (reference)	< 0.0001	1.0 (reference)	0.0001	1.0 (reference)	< 0.0001
1, 2, 3, 4S	0.160 (0.093–0.275)		0.294 (0.158–0.547)		0.279 (0.148–0.526)	
MYCN status						
Amplified	1.0 (reference)	< 0.0001	1.0 (reference)	0.0704	1.0 (reference)	0.0376
Non-amplified	0.288 (0.171–0.487)		0.601 (0.346–1.043)		0.554 (0.318–0.967)	
miR-487b expression						
High	1.0 (reference)	0.0001	1.0 (reference)	0.0183		
Low	5.129 (2.218–11.861)		2.833 (1.192–6.731)			
miR-410 expression						
High	1.0 (reference)	0.0034			1.0 (reference)	0.2906
Low	2.623 (1.375–5.003)				1.448 (0.729–2.875)	
<i>Disease-free survival</i>						
Age at diagnosis						
> 18 months	1.0 (reference)	0.0002	1.0 (reference)	0.1678	1.0 (reference)	0.0990
< 18 months	0.429 (0.274–0.672)		0.703 (0.427–1.160)		0.656 (0.397–1.083)	
Stage						
4	1.0 (reference)	< 0.0001	1.0 (reference)	0.0014	1.0 (reference)	0.0016
1, 2, 3, 4S	0.307 (0.200–0.470)		0.445 (0.270–0.731)		0.443 (0.268–0.735)	
MYCN status						
Amplified	1.0 (reference)	0.0016	1.0 (reference)	0.3112	1.0 (reference)	0.2479
Non-amplified	0.449 (0.273–0.738)		0.762 (0.450–1.290)		0.733 (0.432–1.242)	
miR-487b expression						
High	1.0 (reference)	0.0002	1.0 (reference)	0.0144		
Low	3.036 (1.686–5.466)		2.145 (1.164–3.952)			
miR-410 expression						
High	1.0 (reference)	0.0026			1.0 (reference)	0.0912
Low	2.253 (1.328–3.820)				1.614 (0.926–2.813)	

Abbreviation: CI = confidence interval.

L'expression de trois microARN du cluster C14MC –miR-487b, miR-410 et miR-409-3p – a été analysée par RT-qPCR dans une cohorte de validation de 214 échantillons de neuroblastomes comprenant 142 de bas risque et 72 de haut risque (classification standard) ; leur expression était significativement plus faible dans le groupe de haut risque (Figure 25A).

Les 227 échantillons tumoraux (13 de la cohorte préliminaire + 214 de la cohorte de validation) ont été classés en cinq groupes en fonction de l'âge au diagnostic, du stade et de l'amplification de *N-MYC* (Figure 25B). Lorsque comparés aux tumeurs localisées (stades 1, 2 et 3) non amplifiées en *N-MYC*, les niveaux moyens d'expression des miR-487b et miR-410, mais non de miR-409-3p, sont significativement inférieurs pour les deux sous-groupes de neuroblastomes de haut risque représentés par les tumeurs *N-MYC* amplifiées ( $p < 0.01$ ) et les tumeurs non *N-MYC* amplifiées de stade 4 d'enfants âgés de plus de 18 mois ( $p < 0.04$ ). Ces résultats révèlent que la faible expression des miR-487b et miR-410 corrèle l'agressivité de la maladie, et ce, indépendamment de l'amplification de *N-MYC*.

Des analyses statistiques ont été réalisées afin de déterminer la relevance de l'expression des miR-487b et miR-410 comme marqueurs pronostiques indépendants du neuroblastome. Les analyses multivariées ont montré que seule l'expression du miR-487b était un facteur pronostique de la survie globale et de la survie sans maladie, indépendant des trois autres co-variables « standards » du modèle (Tableau 2). D'autre part, une analyse de survie Kaplan-Meier a révélé que l'expression des miR-487b et miR-410 était significativement associée à la survie sans maladie des patients atteints de neuroblastome, avec une forte expression de ces deux microARN associée à une plus longue survie, et une faible expression associée à une plus courte survie et un nombre plus important d'évènements (rechute ou décès). De plus, l'association avec la survie de l'expression des deux microARN a été analysée dans chaque sous-groupe de risque de façon indépendante. Tandis que seule une tendance se dessinait pour le groupe de haut risque, l'expression des deux microARN était significativement associée à la survie des deux sous-groupes de neuroblastomes de bas risque non amplifiés en *N-MYC*, à savoir les stades localisés (stade 1, 2 et 3) et les stades 4 et 4S diagnostiqués avant 18 mois.



**Figure 26.** Analyse statistique des niveaux d'expression de miR-181a, miR-181b, miR-181c et miR-181d dans les échantillons tumoraux

(A) La cohorte de validation (n=214) a été stratifiée en deux groupes : bas risque (en bleu, n=142) vs haut risque (en rouge, n=72).

(B) La cohorte globale (n=227) a été stratifiée selon l'âge au diagnostic, le stade et le statut de l'amplification de N-MYC. (1 : n=119 ; 2 : n=17 ; 3 : n=11 ; 4 : n=49 ; 5 : n=31).

Le t-test de Student indique la significativité entre deux groupes de tumeurs. Les barres noires indiquent les valeurs moyennes des niveaux expression des microARN.

(C) Courbes Kaplan-Meier de la survie globale des patients pour l'expression de miR-181a, miR-181b, miR-181c et miR-181d. Le niveau d'expression des microARN a été converti en variable discrète en discriminant les échantillons de la cohorte en deux classes : faible expression en bleu et forte expression en rouge.

En conclusion, dans la recherche d'une signature de microARN capable d'améliorer la stratification de risque des neuroblastomes, les microARN du cluster C14MC ont été identifiés comme sous-exprimés dans les neuroblastomes de haut risque par rapport à ceux de bas risque. Particulièrement, deux d'entre eux – miR-487b et miR-410 – permettent de discriminer les neuroblastomes de haut risque de ceux de bas risque et peuvent ainsi être considérés comme de potentiels facteurs pronostiques indépendants de la maladie. De plus, l'expression de ces deux microARN était significativement associée à la survie globale et sans maladie pour des patients considérés jusqu'à maintenant comme bas risque. Finalement, les miR-487b et miR-410 ont une valeur prédictive supérieure à celle de la stratification classique du risque et sont de nouveaux marqueurs de rechute dans les neuroblastomes favorables.

Remarque : L'analyse de quatre autres microARN – miR-181a, b, c et d, localisés en 1q31.3 et 9q33.3 – a également été réalisée sur la cohorte utilisée dans le cadre d'un projet collaboratif avec l'équipe du Dr Patrick Mehlen au Centre Léon Bérard à Lyon. Les résultats confirment ceux obtenus à la fois dans les analyses par microarray et ceux dans plusieurs études décrites en section 3.5 de l'introduction. A savoir que les miR-181a et b sont sur-exprimés dans les neuroblastomes de haut risque, tandis qu'aucune différence d'expression entre les deux groupes de neuroblastomes est retrouvée pour les miR-181c et d (Figures 26A et B). De plus, seule l'expression de miR-181a est marginalement associée à la survie globale des patients (Figure 26C). L'ensemble de ces résultats suggèrent une implication de ces deux microARN dans l'oncogenèse du neuroblastome.





## ***Article 1***

Expression of miR-487b and miR-410 encoded by 14q32.31 locus is  
a prognostic marker in neuroblastoma.



# Expression of miR-487b and miR-410 encoded by 14q32.31 locus is a prognostic marker in neuroblastoma

C-H Gattolliat<sup>1</sup>, L Thomas<sup>1</sup>, SA Ciafrè<sup>2</sup>, G Meurice<sup>3</sup>, G Le Teuff<sup>4</sup>, B Job<sup>3</sup>, C Richon<sup>3</sup>, V Combaret<sup>5</sup>, P Dessen<sup>3</sup>, D Valteau-Couanet<sup>6</sup>, E May<sup>1</sup>, P Busson<sup>1</sup>, S Douc-Rasy<sup>\*,1</sup> and J Bénard<sup>\*,1,7</sup>

<sup>1</sup>CNRS UMR 8126, University Paris-Sud 11, Institut Gustave Roussy, 114 rue Edouard, Villejuif F-94805, France; <sup>2</sup>Department of Experimental Medicine and Biochemical Sciences, University of Roma 'Tor Vergata', Roma I-00133, Italy; <sup>3</sup>Functional Genomic Platform, Institut Gustave Roussy, Villejuif F-94805, France; <sup>4</sup>Department of Statistics and Epidemiology, Institut Gustave Roussy, Villejuif F-94805, France; <sup>5</sup>INSERM U 590, Centre Léon Bérard, Lyon F-69008, France; <sup>6</sup>Paediatric Department, Institut Gustave Roussy, Villejuif F-94805, France; <sup>7</sup>Medical Biology and Pathology Department, Institut Gustave Roussy, Villejuif F-94805, France

**BACKGROUND:** Combination of age at diagnosis, stage and *MYCN* amplification stratifies neuroblastoma into low-risk and high-risk. We aimed to establish whether a microRNA (miRNA) signature could be associated with prognosis in both groups.

**METHODS:** Microarray expression profiling of human miRNAs and quantitative reverse-transcriptase PCR of selected miRNAs were performed on a preliminary cohort of 13 patients. Results were validated on an independent cohort of 214 patients. The relationship between miRNA expression and the overall or disease-free survival was analysed on the total cohort of 227 patients using the log-rank test and the multivariable Cox proportional hazard model.

**RESULTS:** A total of 15 of 17 miRNAs that discriminated high-risk from low-risk neuroblastoma belonged to the imprinted human 14q32.31 miRNA cluster and two, miR-487b and miR-410, were significantly downregulated in the high-risk group. Multivariable analyses showed miR-487b expression as associated with overall survival and disease-free survival in the whole cohort, independently of clinical covariates. Moreover, miR-487b and miR-410 expression was significantly associated with disease-free survival of the non-*MYCN*-amplified favourable neuroblastoma: localised (stage 1, 2 and 3) and stage 4 of infant < 18 months.

**CONCLUSION:** Expression of miR-487b and miR-410 shows predictive value beyond the classical high-/low-risk stratification and is a biomarker of relapse in favourable neuroblastoma.

*British Journal of Cancer* (2011) **105**, 1352–1361. doi:10.1038/bjc.2011.388 www.bjcancer.com

Published online 4 October 2011

© 2011 Cancer Research UK

**Keywords:** neuroblastoma; non-*MYCN*-amplified; microRNA; 14q32.31 locus; prognosis

Neuroblastoma, the most common solid tumour of childhood, affects very young children (median age: 17 months at diagnosis). Although neuroblastoma accounts for the highest morbidity and mortality among childhood cancers, some rare forms spontaneously regress, a unique phenomenon in human oncology. Moreover, the wide spectrum of clinical behaviours of neuroblastoma constitutes a model of tumour heterogeneity. Stage, age and *MYCN* amplification represent the basic parameters used for risk stratification for management and treatment of the disease (Maris, 2010). Last decade has dealt with the search of tumour-oriented genomic information that refines prognostic classification of patients. Hyperdiploidy and several genomic aberrations, among which gain or loss of whole chromosomes and intra-chromosomal alterations including loss of 1p, 11q, 14q and gain of 17q (Ambros *et al*, 2003; Maris, 2010) have finally led to pan-genomic DNA analyses whose prognostic values are under

investigation (Janoueix-Lerosey *et al*, 2009; Ambros *et al*, 2011). According to the basic clinical stratification, paediatric oncologists distinguish two groups of neuroblastoma at diagnosis, the optimal age cutoff being 18 months (Cohn *et al*, 2009). The low-risk group consists of non-*MYCN*-amplified tumours that occur either as localised forms (stage 1, 2 and 3) or as metastatic forms in the children of age < 18 months (stage 4 and 4S). The high-risk group comprises all *MYCN*-amplified neuroblastoma regardless of stage and age of the child, and non-*MYCN*-amplified stage 4 neuroblastoma for children of age ≥ 18 months. If the low-risk group elicits up to 90% survival (De Bernardi *et al*, 2009; Rubie *et al*, 2011), the high-risk group shows aggressive tumours leading to death very frequently with a survival around 35% at 5 years. However, relapse for low-risk patients constitutes a current concern. With regards to treatment, low-risk patients benefit essentially of surgery and induction chemotherapy to improve response rates while high-risk patients undergo a systematic induction chemotherapy before surgery, high-dose chemotherapy and retinoic acid-based maintenance treatments (Matthay *et al*, 1999; Valteau-Couanet *et al*, 2005). Thus, in terms of prognosis, current clinical issues are to predict survival for the high-risk group and disease-free survival for the low-risk group in order to optimise therapy.

\*Correspondence: Dr J Bénard or Dr S Douc-Rasy;

E-mail: jean.benard@igr.fr or setha.douc-rasy@igr.fr

Received 18 May 2011; revised 25 July 2011; accepted 7 August 2011; published online 4 October 2011



It is commonly admitted that a better knowledge of molecular and genetic mechanisms could be helpful in these respects.

The use of array technologies to characterise microRNAs (miRNAs) has enabled discovering unique miRNA expression patterns related to clinical features of several cancers. The miRNAs are endogenous small non-coding RNAs that regulate gene expression by promoting mRNA degradation or preventing translation by imperfect sequence-specific interaction with the 3'-untranslated region of mRNAs. Deregulation of miRNA expression at a number of loci has already been reported in neuroblastoma. Expression profiling analysis of 157 miRNA's loci in neuroblastoma led to the identification of 32 loci that were differentially expressed in favourable and unfavourable tumour subtypes indicating a potential role of miRNAs in neuroblastoma pathogenesis (Chen and Stallings, 2007). Many of these loci are significantly underexpressed in tumours with *MYCN* amplification (Schulte *et al*, 2008; Bray *et al*, 2009). By deep sequencing analysis of five favourable and five unfavourable *MYCN*-amplified neuroblastoma, Schulte *et al* (2010) reported the underexpression of 20 miRNAs. Lin *et al* (2010) found a global downregulation of miRNA expression in advanced neuroblastoma, and identified 27 miRNAs that clearly distinguish low- from high-risk patients.

To our knowledge, no data are available on the possibility to use deregulated specific miRNA as predictors of relapse for low-risk patients and survival for high-risk patients. In the present work, we show that the downregulation of miR-487b and miR-410, two miRNAs located at the 14q32.31 locus, is associated with the outcome of neuroblastoma in terms of both overall survival and relapse whether *MYCN* is amplified or not. Importantly, our results point out that underexpression of these two miRNAs could predict relapse among neuroblastoma currently classified as low-risk.

## MATERIALS AND METHODS

### Tumour collection

Tumour samples from a retrospective cohort of 227 patients staged according to the International Neuroblastoma Staging System (Brodeur, 2003) were gathered between 1987 and 2009 at the Institut Gustave Roussy ( $n=215$ ) and at the Centre Leon Bérard ( $n=12$ ) with the approval of the appropriate ethic committees and according to the national law on the protection of people taking part in biomedical research. Primary tumour tissues, obtained from patients either by true-cut or after surgery, were immediately snap frozen before being stored in liquid nitrogen until nucleic acids extraction.

### Tumour cryosections and total RNA extraction

The first and last cryosections were used to select tumour tissues with a malignant tumour cell content of  $\geq 60\%$ . (Ambros *et al*, 2003; Benard *et al*, 2008). Total RNA was isolated using TRIzol Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) according to the manufacturer's protocols. Nucleic acid concentration and purity were determined by using Nanodrop ND-1000 (Nanodrop, Wilmington, DE, USA), while quality was verified with a 2100 Bioanalyser (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA).

### miRNA microarray expression analysis

Each sample was prepared according to the Agilent's miRNA Microarray System protocol. Total RNA (100 ng) was labelled and hybridised to Agilent human miRNA  $8 \times 16$ -k microarrays (v3) containing 851 human and 88 human viral miRNAs each replicated 16 times, according to the manufacturer's instructions. Agilent miRNA assays integrate eight individual microarrays on a single glass slide. Each microarray includes  $\sim 15$ -k features containing probes sourced from the miRBASE public database, release 13.0

(Griffiths-Jones *et al*, 2008). The probes were 40–60-mer oligonucleotides directly synthesised on the array with a special design to cope with the small size of miRNA. Indeed, each probe was composed of three features: hybridisation sequence (10–20 nucleotides), a G residue at 5' end of the hybridisation sequence that complement the 3' end C residue introduced in labelling and an extended 5' hairpin abutting on the probe–target region to increase target size and miRNA specificity. The additional G–C pair in the probe–target interaction region stabilises targeted miRNA relative to homologous RNAs. The array also contained a set of repeated positive and negative controls. All processing methods used for miRNA analyses were performed on the Cy3 Median Signal from Agilent Feature Extraction raw data files in R, using functions and package collected in the Bioconductor project (Gentleman *et al*, 2004) as well as customised writer routines. Flagged spots as well as control spots were systematically removed, and data were log<sub>2</sub> transformed. A quantile normalisation was then performed using the *normalizeBetweenArray* function from R package 'LIMMA' (Smyth *et al*, 2005) from the Bioconductor project. The median of each probe for a given miRNA was computed and the corresponding value was assigned to the miRNA. Data were then filtered according to the maximum number of missing values allowed for each miRNA (30%).

Unsupervised hierarchical clusters were computed using the 'dist' function from R, using the 'Euclidian' method as distance measure. The hierarchical clustering was performed with the 'hclust' function from R using the distance matrix previously computed and the ward method.

To assess differentially expressed miRNAs, we first estimated the fold changes and standard errors between two groups of samples by fitting a linear model for each miRNA with the 'lmFit' function of LIMMA package (Smyth *et al*, 2005). Then, we applied an empirical Bayes smoothing to the standard errors to the linear model previously computed with 'eBayes' function of LIMMA. To extract a table of the top-ranked genes from the linear model fit, we used top Table function from LIMMA. The results were saved in a table file format.

### miRNA real-time reverse-transcription PCR

Total RNA (10 ng) was reverse transcribed on the PTC-100 (MJ Research Inc., Waltham, MA, USA) using the stem-loop reverse transcription (TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit, Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) for three selected miRNAs from the miRNA microarray analysis, hsa-miR-409-3p, hsa-miR-410 and hsa-miR-487b, vs RNU-44 (small nuclear RNA) as a control. Real-time PCR amplifications run in duplicate using  $2 \times$  FastStart Universal Probe Master (Roche, Mannheim, Germany) were performed on the StepOnePlus RealTime PCR System (Applied Biosystems) according to the MIQE guidelines (Bustin *et al*, 2009). Samples that lacked either a template or reverse transcriptase were used as controls. The relative expression of each miRNA was calculated according to the comparative  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  quantification method where  $\Delta C_t = C_t(\text{sample}) - C_t(\text{normaliser})$  and  $\Delta\Delta C_t = \Delta C_t(\text{sample}) - \Delta C_t(\text{calibrator})$  (Livak and Schmittgen, 2001). RNU 44 was used as a normaliser and IGR-N-835 cell line (Bettan-Renaud *et al*, 1989) as the miRNA expression level reference, sample and reference being amplified in separate wells.

### Statistical analysis

The quantitative reverse-transcriptase PCR (qRT-PCR) data were analysed using GraphPad Prism software to generate scatter plots, and two-tailed Student *t*-test was used to compare the different neuroblastoma groups. The association between various clinical characteristics and miRNA expression levels were examined by the two-tailed Fisher's exact test.



To determine if miRNA expressions were related significantly to overall and disease-free survival of patients (endpoint of cancer-specific death and relapse, respectively), we performed several analyses. Kaplan–Meier survival curves and univariate and multivariable Cox proportional hazards analyses were performed with SAS software. To generate survival curves, we converted continuous miRNA expression levels measured by qRT-PCR to a dichotomous variable, using as cutoff the expression level of IGR-N-835 cell line taken as one. This cutoff was found to be very close to those computed for the expression of miRNAs that best discriminate patients for overall survival (the time from the diagnosis to the date of death of disease) and for disease-free survival (the time from diagnosis to the date of first appearance of relapse or death). This procedure enabled division of samples into two levels with high and low expression of miRNA (over and under the cutoff point, respectively). We compared survival curves by log-rank test and judged  $P < 0.05$  significant. We undertook univariate Cox proportional hazards regression in SAS software and judged a significance if  $P < 0.05$ . We examined the joint effect of covariates with Cox proportional hazards regression to ascertain whether miRNAs were independent prognostic factors. Age was dichotomised into groups, less and over 18 months. Stage was dichotomised on the whole neuroblastoma cohort on the basis of metastatic progression, stage 1, 2, 3 vs stage 4. Stage 4S was included in stage 1, 2, 3 groups because the prognosis of these patients is usually considered as good.

For all miRNAs, patients were categorised into groups with high and low expression, as described above. All variables with  $P < 0.05$  in univariate analyses were selected in the multivariable model. To evaluate the predictive ability of the markers, sensitivity and specificity were estimated within 2, 5 and 8 years because the event of interest is time-dependent (Heagerty *et al*, 2000). Sensitivity was defined as the probability that a patient having low expression of 14q32.31 miRNA (below the cutoff) to be in the high-risk group and specificity as the probability that a patient with high expression of 14q32.31 miRNA (above the cutoff) to be in the low-risk group.

## RESULTS

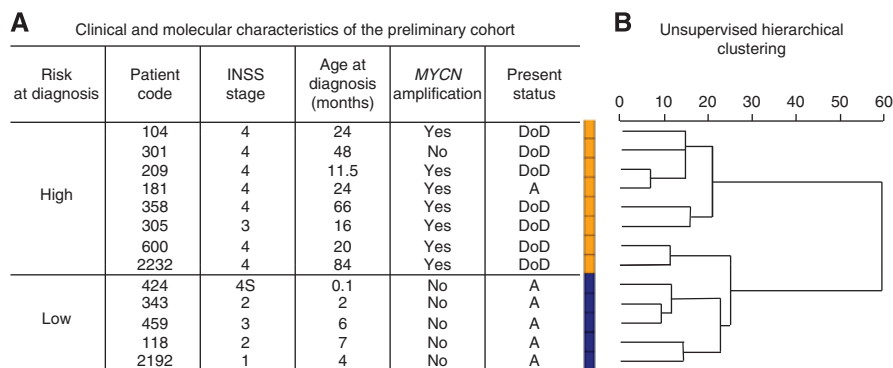
### miRNA expression profiling from patients with opposite outcome

The search for a miRNA expression signature associated with patient outcome was first performed on a preliminary cohort of 13 primary neuroblastoma tumours whose risk at diagnosis was defined according to clinical criteria (age at diagnosis and stage) and

*MYCN* amplification (Figure 1A). This consisted of neuroblastoma with opposite outcomes, namely five low-risk obtained from infants (median age: 3.8 months, median follow-up: 112.6 months) and eight high-risk from children (median age: 27.5 months, median follow-up: 14.8 months). Consistent with this risk stratification, comparative genomic hybridisation array (CGHa) profiles showed chromosomal alterations that were numerical in low-risk and segmental in high-risk neuroblastoma (Supplementary Table 1). As shown in Figure 1B, unsupervised hierarchical clustering on the 851 human and 88 human viral miRNA expression profiling discriminated high-risk from low-risk tumours except for two tumours classified as high risk (patients 600 and 2232). Among the 851 human miRNAs, 50 were differentially expressed in the high-risk relatively to the low-risk group (raw  $P$ -values  $< 0.05$ ), that is, 37 were downregulated and 13 were upregulated (Supplementary Table 2). In accordance with Chen and Stallings (2007), miRNA-181a and miRNA-181b were found to be upregulated. None of the upregulated miRNAs elicited a significant adjusted  $P$ -value, whereas 17 downregulated miRNAs displayed highly significant adjusted  $P$ -values as well as the highest fold change. Strikingly, 15 of the 17 downregulated miRNAs were located at the chromosome 14q32.31 locus (Table 1), a locus that harbours the largest miRNA cluster identified so far in the human genome (Seitz *et al*, 2004). This observation led us to perform an unsupervised hierarchical clustering on the totality of miRNAs encoded at locus 14q32.31. Results efficiently discriminated all high-risk, including patients 600 and 2232, from low-risk (Figure 2 and Supplementary Table 3). As loss of 14q heterozygosity in neuroblastoma was reported (Thompson *et al*, 2001), we performed CGHa that ruled out the possibility that the low expression of 14q32.31 miRNAs in high-risk neuroblastoma was the result of a genomic copy loss (Supplementary Table 1). To confirm microarray data obtained from the preliminary cohort, qRT-PCR was applied to three downregulated 14q32.31 miRNAs, namely miR-487b, miR-410 and miR-409-3p, that were selected because miR-487b and miR-410 showed the highest fold changes and adjusted  $P$ -values while miR-409-3p ranked in a mean position for both fold change and  $P$ -value (Table 1). The qRT-PCR analysis confirmed a significant downregulation of these three miRNAs in high-risk compared with low-risk neuroblastoma (Supplementary Table 4). These results suggested a possible association between underexpression of miR-487b, miR-410 and miR-409-3p and risk of death.

### Validation of the low expression of 14q32.31 miRNAs associated with high-risk neuroblastoma

To validate the low expression of 14q32.31 miRNAs potentially associated with risk of death, an independent cohort of 214



**Figure 1** Patients characteristics and tumour clustering using miRNA expression profiling. **(A)** Clinical main characteristics of patients from the preliminary cohort. INSS: International Neuroblastoma Staging System. Present status February 2011: A, Alive; DoD, dead of disease. **(B)** Unsupervised hierarchical clustering. The unsupervised cluster was built by computing a distance matrix (Euclidian distance) between all arrays using the `dist()` function of R. The distance matrix was then clustered according to 'ward' method available in `hclust()` function of R. The high-risk neuroblastomas are indicated in orange and the low-risk neuroblastomas in blue.





patients (142 classified as low-risk and 72 as high-risk) was analysed. The main clinical features of patients and tumour characteristics are described in Table 2 and Supplementary Table 4.

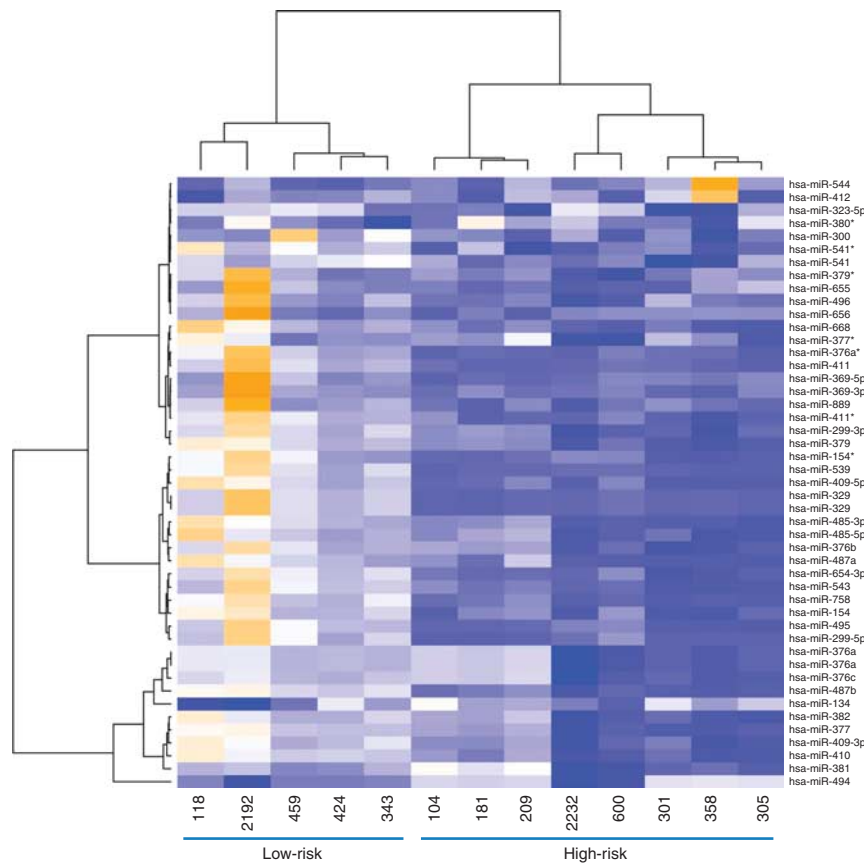
**Table 1** Differential miRNA expression between low- and high-risk neuroblastoma with adjusted *P*-value <0.05

miRNAs	Chromosome location	Fold change low/high risk	Raw <i>P</i> -value	Adjusted <i>P</i> -value
miR-487b	14q32.31	5.75	$2.36 \times 10^{-6}$	$9.38 \times 10^{-4}$
miR-149	2q37.3	4.69	$3.59 \times 10^{-4}$	$1.30 \times 10^{-2}$
miR-410	14q32.31	3.97	$1.33 \times 10^{-4}$	$7.53 \times 10^{-3}$
miR-331-3p	12q22	3.79	$6.94 \times 10^{-5}$	$5.51 \times 10^{-3}$
miR-323-3p	14q32.31	3.61	$2.38 \times 10^{-7}$	$1.89 \times 10^{-4}$
miR-758	14q32.31	3.20	$1.94 \times 10^{-5}$	$2.92 \times 10^{-3}$
miR-299-5p	14q32.31	3.08	$1.15 \times 10^{-4}$	$7.03 \times 10^{-3}$
miR-654-3p	14q32.31	3.00	$1.32 \times 10^{-5}$	$2.63 \times 10^{-3}$
miR-495	14q32.31	2.98	$8.79 \times 10^{-5}$	$5.87 \times 10^{-3}$
miR-409-3p	14q32.31	2.69	$4.97 \times 10^{-4}$	$1.58 \times 10^{-2}$
miR-377	14q32.31	2.37	$7.92 \times 10^{-4}$	$2.19 \times 10^{-2}$
miR-485-3p	14q32.31	2.34	$4.14 \times 10^{-4}$	$1.43 \times 10^{-2}$
miR-543	14q32.31	2.26	$8.87 \times 10^{-5}$	$5.87 \times 10^{-3}$
miR-409-5p	14q32.31	2.25	$6.83 \times 10^{-5}$	$5.51 \times 10^{-3}$
miR-329	14q32.31	2.25	$5.10 \times 10^{-5}$	$5.07 \times 10^{-3}$
miR-154	14q32.31	2.11	$2.67 \times 10^{-4}$	$1.12 \times 10^{-2}$
miR-154*	14q32.31	2.06	$5.88 \times 10^{-4}$	$1.73 \times 10^{-2}$

Abbreviation: miRNA = microRNA.

The expression levels of miR-487b, miR-410 and miR-409-3p were evaluated by qRT-PCR (Supplementary Table 4) relatively to the IGR-N-835 cell line (Bettan-Renaud *et al*, 1989). As presented in the scatter plots, mean expression levels of the three miRNAs were significantly lower in high-risk than in low-risk tumours (Figure 3A). Next, the data were stratified according to age, stage and *MYCN* amplification on the whole cohort of 227 tumours (13 of the preliminary cohort and 214 of the validation set) (Figure 3B). As compared with the non-*MYCN*-amplified localised (stage 1, 2, and 3) tumours, the mean expression levels of miR-487b and miR-410, but not of miR-409-3p, were significantly downregulated in the two high-risk neuroblastoma subgroups, that is, *MYCN*-amplified ( $P < 0.01$ ) and non-*MYCN*-amplified stage 4 children aged  $\geq 18$  months ( $P < 0.04$ ). These results revealed that the low expression level of miR-487b and miR-410 was significantly associated with the high-risk groups, independently of *MYCN* amplification. Regarding the non-*MYCN*-amplified tumours, it is noteworthy that the average expression values for the three miRNA from stage 4 patients <18 months ( $n = 11$ ) were higher than those  $\geq 18$  months ( $n = 49$ ) (Figure 3B). The difference was significant for miR-410 and miR-409-3p ( $P = 0.0321$  and  $0.0474$ , respectively) but not for miR-487b, very likely owing to the small number of stage 4 patients <18 months.

Next, we investigated whether downregulation of the three selected miRNAs was associated with clinical features. To this aim, the statistical analyses were performed on the global retrospective cohort of the 226 clinically documented patients, by converting the continuous miRNA expression values into a dichotomic variable,



**Figure 2** Summary heat map showing the clustering based on 14q32.31 miRNA cluster. Data are represented as two dendrograms. The vertical dendrogram indicates patient sample with closest miRNA expression patterns. The horizontal dendrogram indicates miRNA with closest expression pattern across all patient samples. The Euclidian distance has been used as distance metric, and the clustering is using the 'ward' method to gather miRNAs or patient samples together. The heat map colours range from orange (high intensity values) to blue (low intensity values). The miRNAs used for the clustering strongly discriminate the high-risk from the low-risk neuroblastoma. See also Table 1 and Supplementary Table 3.



low and high expression, as described in Materials and methods. Fisher's exact test indicated that, except for miR-409-3p, down-regulation of either miR-487b or miR-410 was well associated with

stage and MYCN amplification ( $P < 0.01$ ) (Supplementary Table 5), confirming a link of miR-487b and miR-410, but not miR-409-3p, with the high-risk phenotype. miR-409-3p was thus excluded for further investigations.

**Table 2** Characteristics of patients and tissues

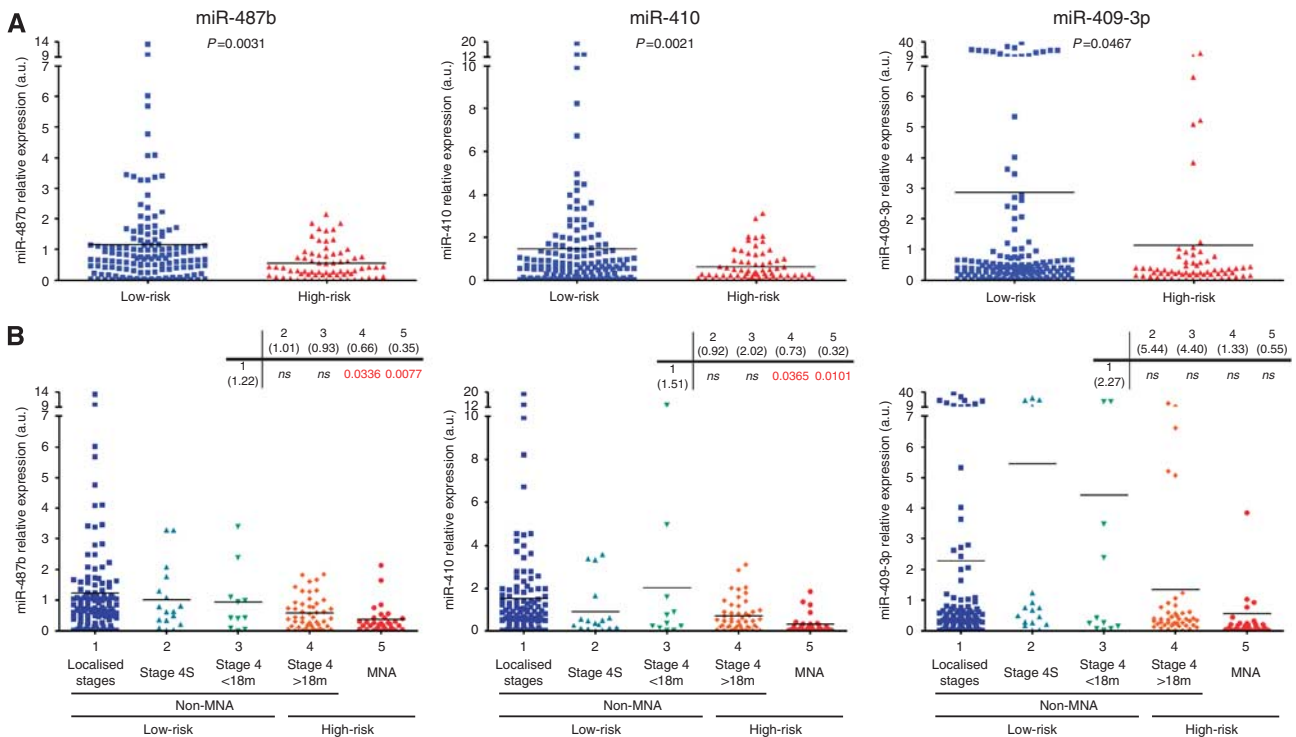
	Preliminary cohort (%)	Validation set (%)	Total (%)
Number of tissues	13	214	227 <sup>a</sup>
Stage			
1	1 (8)	33 (15)	34 (15)
2	2 (15)	45 (21)	47 (21)
3	2 (15)	46 (21)	48 (21)
4	7 (54)	74 (36)	81 (36)
4S	1 (8)	16 (7)	17 (7)
Age at diagnosis			
< 18 months	8 (62)	101 (47)	109 (48)
≥ 18 months	5 (38)	113 (53)	118 (52)
MYCN status			
Amplified	8 (62)	23 (11)	31 (14)
Non-amplified	5 (38)	191 (89)	196 (86)
Number of patients			226 <sup>a</sup>
Present status			
Alive	6 (46)	152 (71)	158 (70)
Death of disease	7 (54)	62 (29)	68 (30)
Disease-free status			
Disease-free	4 (31)	132 (62)	136 (60)
Disease	9 (69)	82 (38)	90 (40)

<sup>a</sup>Two tumour specimens were obtained from the same patient at different time of resection, one at diagnosis (validation set), the second at relapse (preliminary cohort).

**Expression of miR-487b and miR-410 as prognostic marker of patient survival**

Statistical analyses were performed to determine the significance of miR-487b and miR-410 expression level as prognostic factor. Disease outcome (survival and relapse events) was known for the 227 patients. The final follow-up date was February 2011 with a median follow-up of 92 months (95% CI = 79–104). An event (death or relapse) was registered for 90 patients (40%) with death recorded for 68 patients (30%). An univariate Cox proportional hazards regression showed that patients with low expression of either miR-487b or miR-410 had an overall and disease-free survival significantly lower than patients with high expression (Table 3). Consistent with the univariate Cox regression analysis, Kaplan–Meier survival highlighted that patients with high expression levels of miR-487b and miR-410 displayed a better prognosis than did those with low levels both in terms of overall survival and disease-free survival ( $P < 0.0001$  and  $P < 0.002$ , respectively, Figure 4). Two multivariable Cox proportional hazard model analyses were performed to assess whether each miRNA was an independent prognostic factor (Table 3). While miR-410 was not statistically associated to overall survival (HR = 1.448 95% CI = 0.729–2.875,  $P = 0.29$ ) and disease-free survival (HR = 1.614 95% CI = 0.926–2.813,  $P = 0.0912$ ), miR-487b was found to be an independent prognostic factor both in overall and in disease-free survival (HR = 2.833 95% CI = 1.192–6.731,  $P = 0.018$  and HR = 2.145 95% CI = 1.164–3.952,  $P = 0.014$ , respectively).

Molecular Diagnostics



**Figure 3** Scatter plots showing the statistical analysis of miR-487b, miR-410 and miR-409-3p expression levels in tissue samples of validation test. (A) Validation set tumours ( $n = 214$ ) stratified in two groups, low-risk (blue,  $n = 142$ ) vs high-risk (red,  $n = 72$ ). (B) Analysis of the whole cohort ( $n = 227$ ) stratified according to age, stage and MYCN-amplification status (1:  $n = 1192$ ; 2:  $n = 173$ ; 3:  $n = 114$ ; 4:  $n = 495$ ; 5:  $n = 31$ ). Two-tailed Student t-test indicates significance between the two subgroups. Black bars inside the plots indicate the mean value of miRNA expression levels.



**Table 3** Univariate and multivariable Cox regression analysis of overall and disease-free survival in all neuroblastoma patients ( $n = 226$ )

	Univariate analysis		Multivariable analysis with miR-487b		Multivariable analysis with miR-410	
	Hazard ratio (95% CI)	P-value	Hazard ratio (95% CI)	P-value	Hazard ratio (95% CI)	P-value
<i>Overall survival</i>						
Age at diagnosis						
> 18 months	1.0 (reference)	<0.0001	1.0 (reference)	0.0441	1.0 (reference)	0.0258
< 18 months	0.247 (0.139–0.440)		0.521 (0.276–0.983)		0.485 (0.257–0.917)	
Stage						
4	1.0 (reference)	<0.0001	1.0 (reference)	0.0001	1.0 (reference)	<0.0001
1, 2, 3, 4S	0.160 (0.093–0.275)		0.294 (0.158–0.547)		0.279 (0.148–0.526)	
MYCN status						
Amplified	1.0 (reference)	<0.0001	1.0 (reference)	0.0704	1.0 (reference)	0.0376
Non-amplified	0.288 (0.171–0.487)		0.601 (0.346–1.043)		0.554 (0.318–0.967)	
MiR-487b expression						
High	1.0 (reference)	0.0001	1.0 (reference)	0.0183		
Low	5.129 (2.218–11.861)		2.833 (1.192–6.731)			
MiR-410 expression						
High	1.0 (reference)	0.0034			1.0 (reference)	0.2906
Low	2.623 (1.375–5.003)				1.448 (0.729–2.875)	
<i>Disease-free survival</i>						
Age at diagnosis						
> 18 months	1.0 (reference)	0.0002	1.0 (reference)	0.1678	1.0 (reference)	0.0990
< 18 months	0.429 (0.274–0.672)		0.703 (0.427–1.160)		0.656 (0.397–1.083)	
Stage						
4	1.0 (reference)	<0.0001	1.0 (reference)	0.0014	1.0 (reference)	0.0016
1, 2, 3, 4S	0.307 (0.200–0.470)		0.445 (0.270–0.731)		0.443 (0.268–0.735)	
MYCN status						
Amplified	1.0 (reference)	0.0016	1.0 (reference)	0.3112	1.0 (reference)	0.2479
Non-amplified	0.449 (0.273–0.738)		0.762 (0.450–1.290)		0.733 (0.432–1.242)	
MiR-487b expression						
High	1.0 (reference)	0.0002	1.0 (reference)	0.0144		
Low	3.036 (1.686–5.466)		2.145 (1.164–3.952)			
MiR-410 expression						
High	1.0 (reference)	0.0026			1.0 (reference)	0.0912
Low	2.253 (1.328–3.820)				1.614 (0.926–2.813)	

Abbreviation: CI = confidence interval.

In addition to the strong association between miR-487b with either the overall survival or the disease-free survival measured by the hazard ratios (Table 3), Table 4 showed the sensitivity and the specificity of miR-487b predictive ability. The high sensitivities ( $\geq 0.84$ ) within 2, 5 and 8 years indicated the good ability of miR-487b to discriminate between overall survival and disease-free survival. The specificity giving the probability of patients with high expression of miR-487b to be part of the low-risk group was between 34% and 45%.

#### miR-487b and miR-410 expression predict overall and disease-free survival in low-risk neuroblastoma

Next, the association of the two miRNAs with survival was investigated in the group of high-risk patients ( $n = 80$ ). Kaplan–Meier curves showed a trend of significance regarding the association of miR-487b or miR-410 expression with overall survival ( $P = 0.059$ ) and disease-free survival ( $P = 0.067$ ) (Supplementary Figure 1).

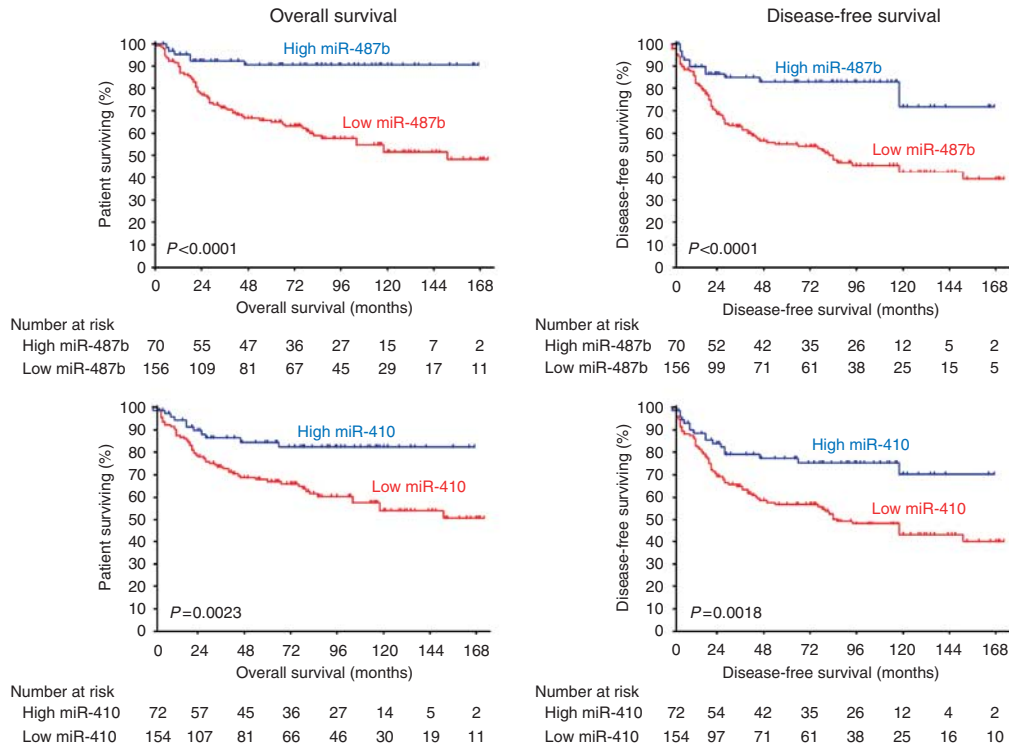
Finally, we investigated the prognostic value of miR-487b and miR-410 expression levels in the subgroup of low-risk patients as defined by non-MYCN-amplified stage 1, 2 and 3 tumours.

Kaplan–Meier survival curves revealed that the clinical outcome (overall and disease-free survival) of patients with high expression levels of either miR-487b or miR-410 was strongly correlated with better survival than patients with low expression levels (Figure 5A). Kaplan–Meier survival curves were also performed with the low-risk subgroup defined by non-MYCN-amplified tumours of stage 4 <18 months including stage 4S. Again, irrespective of the small number of samples ( $n = 28$ ), survival curves showed that patients with high expression levels of either miR-487b or miR-410 had a better prognosis in terms of overall and disease-free survival than those with low expression levels (Figure 5B).

#### DISCUSSION

A body of evidence demonstrates that some specific miRNAs can be considered as biomarkers for clinical applications especially for neuroblastoma (Stallings *et al*, 2010). In the search of a unique miRNA signature able to improve risk classification of these tumours, we identified a set encoded by the chromosome 14q32.31 miRNA cluster locus that was significantly downregulated in





**Figure 4** Kaplan–Meier curves for overall and disease-free survival of the whole neuroblastoma cohort ( $n = 226$ ) for miR-487b and miR-410 expression. The miRNA expression levels were converted into discrete variables by discriminating the samples into two classes (high and low), under or over the cutoffs.

**Table 4** Sensitivity and specificity of the miR-487b marker in all neuroblastoma patients ( $n = 226$ ) with 156 'low expression' and 70 'high expression'

Outcome	Within	Sensitivity <sup>a</sup>	Specificity <sup>a</sup>
DoD	2 years	0.87	0.34
R or DoD		0.84	0.36
DoD	5 years	0.89	0.38
R or DoD		0.85	0.4
DoD	8 years	0.9	0.41
R or DoD		0.88	0.45

Abbreviations: DoD = death of disease; R = relapse. <sup>a</sup>Sensitivity and specificity are estimated through the Kaplan–Meier estimator.

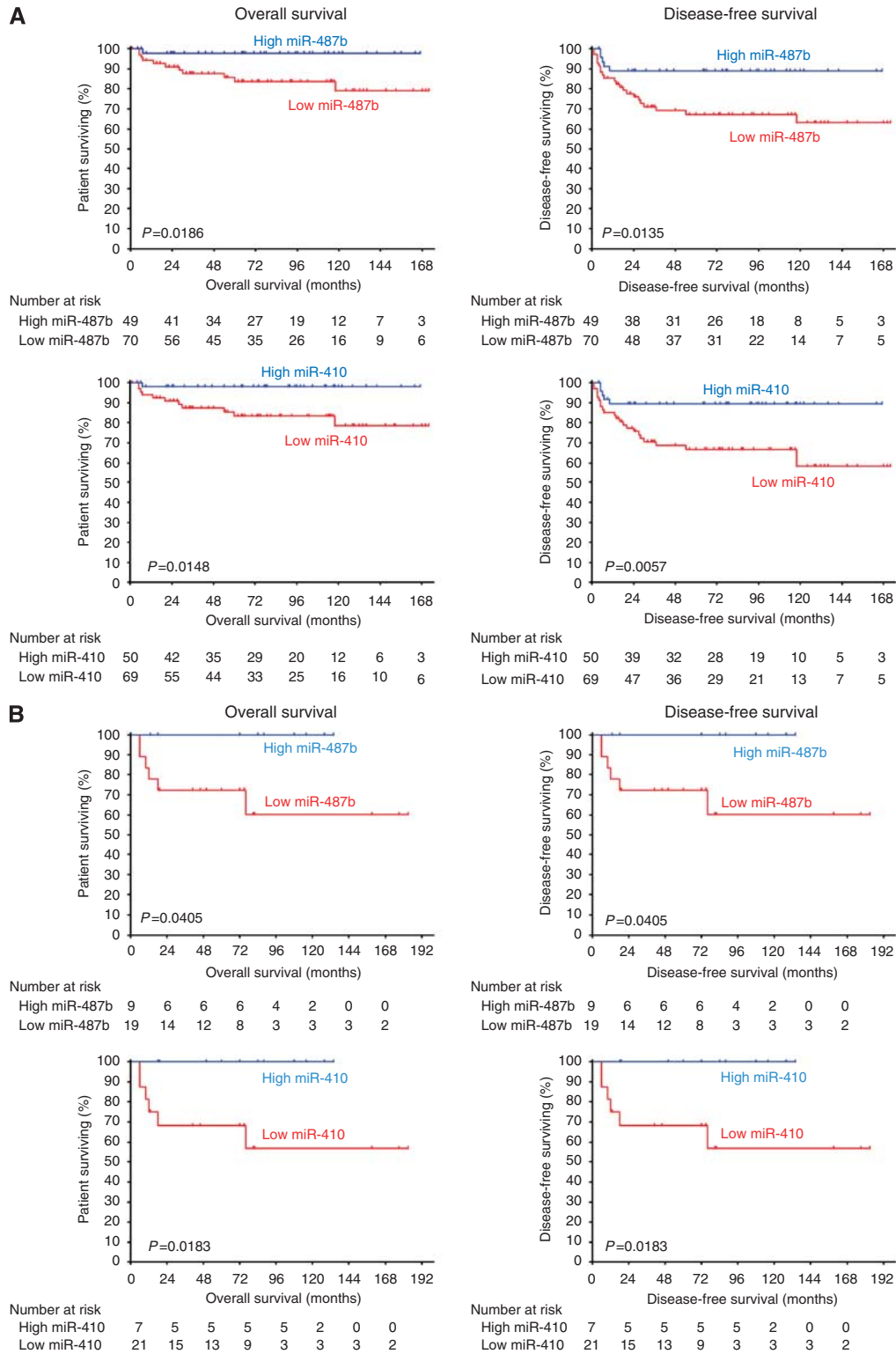
high-risk neuroblastoma. We report here that two of them, miR-410 and miR-487, which exhibited the highest fold change were able to discriminate high-risk from low-risk neuroblastoma and could be considered as putative prognostic factors. Moreover, expression of these two miRNAs was significantly associated with the overall survival and disease-free survival in the subgroup of neuroblastoma so far delineated as low-risk.

The wide spectrum of biological and clinical behaviours of neuroblastoma has resulted in basic risk stratification parameters (age, stage and *MYCN* amplification) that discriminate high-risk from low-risk patients (Cohn *et al*, 2009; Maris, 2010). However, limitations in this stratification system are generally recognised and addition of prognostic factors might be helpful to provide optimised and personalised neuroblastoma treatment. Most results dealing with miRNA in neuroblastoma concern the identification of miRNAs differentially expressed in *MYCN*-amplified vs non-*MYCN*-amplified tumours (Chen and Stallings, 2007; Bray *et al*, 2009). Dysregulation of some miRNAs encoded by the 14q32.31 locus has been already reported but the relationship between their

abnormal expression and the clinical outcome of the disease has not been investigated (Bray *et al*, 2009). We performed microarray expression profiling on a preliminary cohort of 13 neuroblastoma tumours that allowed identification of 17 downregulated miRNAs that were significant discriminators of high-risk neuroblastoma. Notably, 15 were located at the 14q32.31 chromosomal locus. Three miRNAs were selected for further studies, miR-487b, miR-410, with the highest fold change, and miR-409-3p, with a medium fold change. The significant downregulation of these three miRNAs found in high-risk neuroblastoma was first confirmed by qRT-PCR on the preliminary cohort samples and then validated using an independent cohort of 214 tumours. To investigate the possible clinical use of these three miRNAs as potential biomarkers of aggressiveness, statistical analyses were performed on the whole retrospective cohort of the 227 neuroblastoma patients. Expression values were set up as binary variables coded as 0 for low expression and 1 for high. The results indicated that low expression levels of miR-487b, miR-410 and miR-409-3p were strongly and significantly associated with high-risk phenotype independent of *MYCN* amplification for miR-487b and miR-410, but not for miR-409-3p. Moreover, expression levels of miR-487b were independent of clinical covariates (age, stage and *MYCN* amplification) associated with overall and disease-free survival in the multivariable model. Then, we surveyed the prognostic impact of miR-487b and miR-410 expression levels in each group of risk; miR-409-3p that was found not associated with non-*MYCN*-amplified high-risk tumours was not retained for further analyses. In high-risk neuroblastoma ( $n = 80$ ), we found that the expression of each miRNA was associated with overall survival, though with a trend of significance. By contrast, considering the two subgroups of low-risk neuroblastoma, that is, non-*MYCN*-amplified stage 1, 2 and 3 patients and non-*MYCN*-amplified stage 4 of infant <18 months, expression levels of both miR-487b and miR-410 displayed a highly significant association with overall and disease-free survival. Thus, our study clearly shows the clinical







**Figure 5** Kaplan–Meier curves for overall and disease-free survival of (A) non-MYC amplified localised neuroblastoma ( $n = 119$ ) and (B) non-MYC amplified stage 4S and 4 neuroblastoma of age < 18 months ( $n = 28$ ) for miR-487b and miR-410 expression. The miRNA expression levels were converted into discrete variables into high and low classes, under or over the cutoffs. No relapse was observed in patients on (B).

potential of miR-410 and miR-487b for the non-MYC amplified low-risk neuroblastoma. In combination with other markers of relapse, high levels of these two miRNAs could indicate the prescription of treatment des-escalation and low levels

escalation. Whether the rest of top-ranked miRNAs of the 14q32.31 set, not considered in the present study, could help to discriminate unfavourable neuroblastoma remains to be investigated.



With regards to the high-risk group (*MYCN*-amplified and non-*MYCN*-amplified stage 4  $\geq$  18 months), the marginal significance of overall survival may be owing to the low number of survivors at 5 years post diagnosis. Noteworthy, most survivors showed a high expression level of miR-487b and miR-410. It remains thus to extend our investigation to a higher number of high-risk neuroblastoma.

From a functional point of view, the fact that 15/17 miRNAs (88%) significantly downregulated in high-risk neuroblastoma are encoded by the 14q32.31 locus suggests a tumour suppressive role for this chromosomal region; this is in agreement with reduced expression levels of these miRNAs measured in aggressive forms of several human cancers (Cobbs *et al*, 2008; Haller *et al*, 2010; Lavon *et al*, 2010). As the largest miRNA cluster identified so far in human (Glazov *et al*, 2008), the 14q32.31 locus encompasses >40 miRNAs likely encoded in a single pri-miRNA (Tierling *et al*, 2006). Noteworthy, this genetically imprinted region (Seitz *et al*, 2004) modulates neuronal responses with some miRNAs shown to have a crucial role in dendritic outgrowth in response to the environment (Khudayberdiev *et al*, 2009). In the same line of evidence, the mouse homologous region at chromosome 12 has been defined as a cancer susceptibility locus (Sevignani *et al*, 2007; Kircher *et al*, 2008). No loss of 14q copy in high-risk neuroblastoma samples suggests that the reduced expression of the encoded miRNAs is likely the result of a transcriptional or processing regulation, in agreement with reports stating the epigenetic transcriptional silencing of this genomic locus (Zhang *et al*, 2008; Haller *et al*, 2010; Lavon *et al*, 2010). Noteworthy, the proved target genes of 14q32.31 miRNAs are involved in numerous key biological functions such as transcription factors (E2F1, HNF-6 and NF-YB), cell cycle regulation (CDK1), proliferation (HER2), stress response (SOD1, 2), cytoskeleton signalling

(PAK1) and cell interaction (E-Cadherin), of which dysregulation could lead to malignancy (Supplementary Table 6).

In conclusion, our results point out the involvement of 14q32.31 miRNAs in tumour progression of neuroblastoma. More importantly, our study suggests the potential of two miRNAs, miR-487b and miR-410, as clinically useful markers of both overall survival and disease-free survival in the two clinical entities delineated so far as low-risk, for example, non-*MYCN*-amplified stage 1, 2 and 3 and non-*MYCN*-amplified stage 4 < 18 months. If our findings can be confirmed in other studies, miR-487b and miR-410 might be integrated as molecular markers in the stratification algorithm under investigation that would enable to optimise the treatment of those patients. To the best of our knowledge, no data are available on the potential of miRNAs to be used as predictors of relapse for low-risk patients and of survival for high-risk patients.

## ACKNOWLEDGEMENTS

This study was funded by the Ligue contre le Cancer (Comités Oise et Montbéliard), Fédération Enfants et Santé et Société Française de Lutte contre les Cancers et les Leucémies de l'Enfant et de l'Adolescent and Association Princesse Framboise. We thank Dr Françoise Wendling for scientific input and manuscript editing. We thank Dr Marie-Anne Raquin (IGR, Villejuif) for providing clinical annotations of the tumour specimens, Dr Matthieu Bauer for preliminary studies and Anissa Ilias for technical assistance.

Supplementary Information accompanies the paper on British Journal of Cancer website (<http://www.nature.com/bjc>)

## REFERENCES

- Ambros IM, Benard J, Boavida M, Bown N, Caron H, Combaret V, Couturier J, Darnfors C, Delattre O, Freeman-Edward J, Gambini C, Gross N, Hattinger CM, Luegmayr A, Lunec J, Martinsson T, Mazzocco K, Navarro S, Noguera R, O'Neill S, Potschger U, Rumpfer S, Speleman F, Tonini GP, Valent A, van Roy N, Amann G, De Bernardi B, Kogner P, Ladenstein R, Michon J, Pearson AD, Ambros PF (2003) Quality assessment of genetic markers used for therapy stratification. *J Clin Oncol* 21: 2077–2084
- Ambros IM, Brunner B, Aigner G, Bedwell C, Beiske K, Benard J, Bown N, Combaret V, Couturier J, Defferrari R, Gross N, Jeison M, Lunec J, Marques B, Martinsson T, Mazzocco K, Noguera R, Schleiermacher G, Speleman F, Stallings R, Tonini GP, Tweddle DA, Valent A, Vicha A, Roy NV, Villamon E, Ziegler A, Preuner S, Drobnics M, Ladenstein R, Amann G, Schuit RJ, Potschger U, Ambros PF (2011) A multilocus technique for risk evaluation of patients with neuroblastoma. *Clin Cancer Res* 17: 792–804
- Benard J, Raguenez G, Kauffmann A, Valent A, Ripoché H, Joulin V, Job B, Danglot G, Cantais S, Robert T, Terrier-Lacombe MJ, Chassevent A, Koscielny S, Fischer M, Berthold F, Lipinski M, Tursz T, Dessen P, Lazar V, Valteau-Couanet D (2008) *MYCN*-non-amplified metastatic neuroblastoma with good prognosis and spontaneous regression: a molecular portrait of stage 4S. *Mol Oncol* 2: 261–271
- Bettan-Renaud L, Bayle C, Teyssier JR, Benard J (1989) Stability of phenotypic and genotypic traits during the establishment of a human neuroblastoma cell line, IGR-N-835. *Int J Cancer* 44: 460–466
- Bray I, Bryan K, Prenter S, Buckley PG, Foley NH, Murphy DM, Alcock L, Mestdagh P, Vandesompele J, Speleman F, London WB, McGrady PW, Higgins DG, O'Meara A, O'Sullivan M, Stallings RL (2009) Widespread dysregulation of miRNAs by *MYCN* amplification and chromosomal imbalances in neuroblastoma: association of miRNA expression with survival. *PLoS ONE* 4: e7850
- Brodeur GM (2003) Neuroblastoma: biological insights into a clinical enigma. *Nat Rev Cancer* 3: 203–216
- Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl MW, Shipley GL, Vandesompele J, Wittwer CT (2009) The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem* 55: 611–622
- Chen Y, Stallings RL (2007) Differential patterns of microRNA expression in neuroblastoma are correlated with prognosis, differentiation, and apoptosis. *Cancer Res* 67: 976–983
- Cobbs CS, Soroceanu L, Denham S, Zhang W, Kraus MH (2008) Modulation of oncogenic phenotype in human glioma cells by cytomegalovirus IE1-mediated mitogenicity. *Cancer Res* 68: 724–730
- Cohn SL, Pearson AD, London WB, Monclair T, Ambros PF, Brodeur GM, Faldum A, Hero B, Iehara T, Machin D, Mosseri V, Simon T, Garaventa A, Castel V, Matthay KK (2009) The International Neuroblastoma Risk Group (INRG) classification system: an INRG Task Force report. *J Clin Oncol* 27: 289–297
- De Bernardi B, Gerrard M, Boni L, Rubie H, Canete A, Di Cataldo A, Castel V, Forjaz dL, Ladenstein R, Ruud E, Brichard B, Couturier J, Ellershaw C, Munzer C, Bruzzi P, Michon J, Pearson AD (2009) Excellent outcome with reduced treatment for infants with disseminated neuroblastoma without *MYCN* gene amplification. *J Clin Oncol* 27: 1034–1040
- Gentleman RC, Carey VJ, Bates DM, Bolstad B, Dettling M, Dudoit S, Ellis B, Gautier L, Ge Y, Gentry J, Hornik K, Hothorn T, Huber W, Iacus S, Irizarry R, Leisch F, Li C, Maechler M, Rossini AJ, Sawitzki G, Smith C, Smyth G, Tierney L, Yang JY, Zhang J (2004) Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biol* 5: R80
- Glazov EA, McWilliam S, Barris WC, Dalrymple BP (2008) Origin, evolution, and biological role of miRNA cluster in DLK-DIO3 genomic region in placental mammals. *Mol Biol Evol* 25: 939–948
- Griffiths-Jones S, Saini HK, van Dongen S, Enright AJ (2008) miRBase: tools for microRNA genomics. *Nucleic Acids Res* 36: D154–D158
- Haller F, von Heydebreck A, Zhang JD, Gunawan B, Langer C, Ramadori G, Wiemann S, Sahin O (2010) Localization- and mutation-dependent



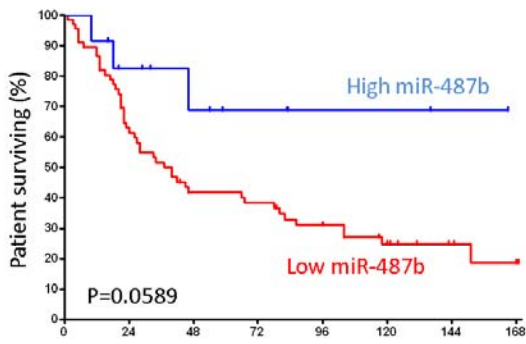
- microRNA (miRNA) expression signatures in gastrointestinal stromal tumours (GISTs), with a cluster of co-expressed miRNAs located at 14q32.31. *J Pathol* **220**: 71–86
- Heagerty PJ, Lumley T, Pepe MS (2000) Time-dependent ROC curves for censored survival data and a diagnostic marker. *Biometrics* **56**: 337–344
- Janoueix-Lerosey I, Schleiermacher G, Michels E, Mosseri V, Ribeiro A, Lequin D, Vermeulen J, Couturier J, Peuchmaur M, Valent A, Plantaz D, Rubie H, Valteau-Couanet D, Thomas C, Combaret V, Rousseau R, Eggert A, Michon J, Speleman F, Delattre O (2009) Overall genomic pattern is a predictor of outcome in neuroblastoma. *J Clin Oncol* **27**: 1026–1033
- Khudayberdiev S, Fiore R, Schrott G (2009) MicroRNA as modulators of neuronal responses. *Commun Integr Biol* **2**: 411–413
- Kircher M, Bock C, Paulsen M (2008) Structural conservation versus functional divergence of maternally expressed microRNAs in the Dlk1/Gtl2 imprinting region. *BMC Genomics* **9**: 346
- Lavon I, Zrihan D, Granit A, Einstein O, Fainstein N, Cohen MA, Cohen MA, Zelikovitch B, Shoshan Y, Spektor S, Reubinoff BE, Felig Y, Gerlitz O, Ben Hur T, Smith Y, Siegal T (2010) Gliomas display a microRNA expression profile reminiscent of neural precursor cells. *Neuro Oncol* **12**: 422–433
- Lin RJ, Lin YC, Chen J, Kuo HH, Chen YY, Diccianni MB, London WB, Chang CH, Yu AL (2010) microRNA signature and expression of Dicer and Drosha can predict prognosis and delineate risk groups in neuroblastoma. *Cancer Res* **70**: 7841–7850
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method. *Methods* **25**: 402–408
- Maris JM (2010) Recent advances in neuroblastoma. *N Engl J Med* **362**: 2202–2211
- Maris JM, Matthay KK (1999) Molecular biology of neuroblastoma. *J Clin Oncol* **17**: 2264–2279
- Matthay KK, Villablanca JG, Seeger RC, Stram DO, Harris RE, Ramsay NK, Swift P, Shimada H, Black CT, Brodeur GM, Gerbing RB, Reynolds CP (1999) Treatment of high-risk neuroblastoma with intensive chemotherapy, radiotherapy, autologous bone marrow transplantation, and 13-cis-retinoic acid. Children's Cancer Group. *N Engl J Med* **341**: 1165–1173
- Rubie H, De Bernardi B, Gerrard M, Canete A, Ladenstein R, Couturier J, Ambros P, Munzer C, Pearson AD, Garaventa A, Brock P, Castel V, Valteau-Couanet D, Holmes K, Di Cataldo A, Brichard B, Mosseri V, Marquez C, Plantaz D, Boni L, Michon J (2011) Excellent outcome with reduced treatment in infants with nonmetastatic and unresectable neuroblastoma without MYCN amplification: results of the prospective INES 99.1. *J Clin Oncol* **29**: 449–455
- Schulte JH, Horn S, Otto T, Samans B, Heukamp LC, Eilers UC, Krause M, Astrahantseff K, Klein-Hitpass L, Buettner R, Schramm A, Christiansen H, Eilers M, Eggert A, Berwanger B (2008) MYCN regulates oncogenic microRNAs in neuroblastoma. *Int J Cancer* **122**: 699–704
- Schulte JH, Marschall T, Martin M, Rosenstiel P, Mestdagh P, Schlierf S, Thor T, Vandesompele J, Eggert A, Schreiber S, Rahmann S, Schramm A (2010) Deep sequencing reveals differential expression of microRNAs in favorable versus unfavorable neuroblastoma. *Nucleic Acids Res* **38**: 5919–5928
- Seitz H, Royo H, Bortolin ML, Lin SP, Ferguson-Smith AC, Cavaille J (2004) A large imprinted microRNA gene cluster at the mouse Dlk1-Gtl2 domain. *Genome Res* **14**: 1741–1748
- Sevignani C, Calin GA, Nnadi SC, Shimizu M, Davuluri RV, Hyslop T, Demant P, Croce CM, Siracusa LD (2007) MicroRNA genes are frequently located near mouse cancer susceptibility loci. *Proc Natl Acad Sci USA* **104**: 8017–8022
- Smyth GK, Michaud J, Scott HS (2005) Use of within-array replicate spots for assessing differential expression in microarray experiments. *Bioinformatics* **21**: 2067–2075
- Stallings RL, Foley NH, Bryan K, Buckley PG, Bray I (2010) Therapeutic targeting of miRNAs in neuroblastoma. *Expert Opin Ther Targets* **14**: 951–962
- Thompson PM, Seifried BA, Kyemba SK, Jensen SJ, Guo C, Maris JM, Brodeur GM, Stram DO, Seeger RC, Gerbing R, Matthay KK, Matisse TC, White PS (2001) Loss of heterozygosity for chromosome 14q in neuroblastoma. *Med Pediatr Oncol* **36**: 28–31
- Tierling S, Dalbert S, Schoppenhorst S, Tsai CE, Oligier S, Ferguson-Smith AC, Paulsen M, Walter J (2006) High-resolution map and imprinting analysis of the Gtl2-Dnchc1 domain on mouse chromosome 12. *Genomics* **87**: 225–235
- Valteau-Couanet D, Michon J, Boneu A, Rodary C, Perel Y, Bergeron C, Rubie H, Coze C, Plantaz D, Bernard F, Chastagner P, Bouzy J, Hartmann O (2005) Results of induction chemotherapy in children older than 1 year with a stage 4 neuroblastoma treated with the NB 97 French Society of Pediatric Oncology (SFOP) protocol. *J Clin Oncol* **23**: 532–540
- Zhang L, Volinia S, Bonome T, Calin GA, Greshock J, Yang N, Liu CG, Giannakakis A, Alexiou P, Hasegawa K, Johnstone CN, Megraw MS, Adams S, Lassus H, Huang J, Kaur S, Liang S, Sethupathy P, Leminen A, Simossis VA, Sandaltzopoulos R, Naomoto Y, Katsaros D, Gimotty PA, DeMichele A, Huang Q, Butzow R, Rustgi AK, Weber BL, Birrer MJ, Hatzigeorgiou AG, Croce CM, Coukos G (2008) Genomic and epigenetic alterations deregulate microRNA expression in human epithelial ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci USA* **105**: 7004–7009

This work is published under the standard license to publish agreement. After 12 months the work will become freely available and the license terms will switch to a Creative Commons Attribution-NonCommercial-Share Alike 3.0 Unported License.



Supplementary Figure 1 Gattolliat et al

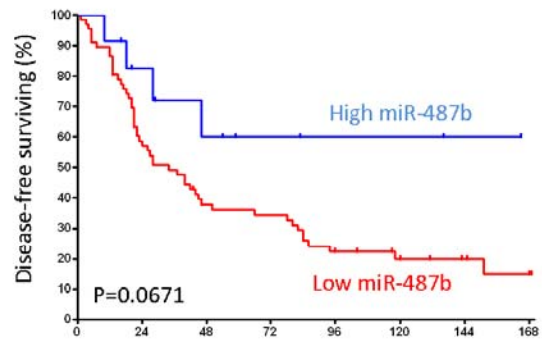
Overall survival



Number at risk

	0	24	48	72	96	120	144	168
High miR-487b	13	9	6	4	3	2	1	0
Low miR-487b	67	39	24	22	17	10	5	3

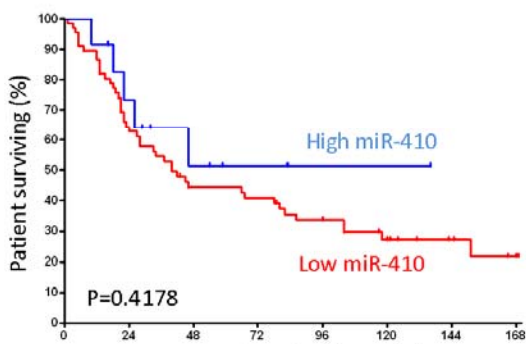
Disease-free survival



Number at risk

	0	24	48	72	96	120	144	168
High miR-487b	13	9	6	4	3	2	1	0
Low miR-487b	67	37	22	20	13	8	5	3

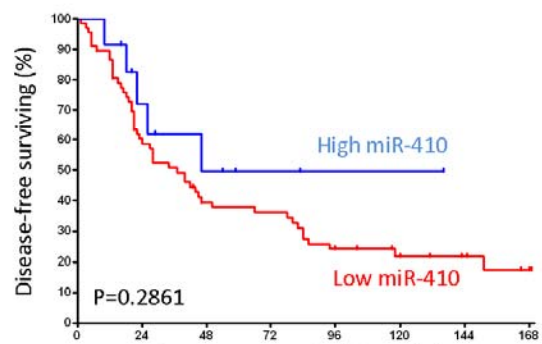
Overall survival



Number at risk

	0	24	48	72	96	120	144	168
High miR-410	16	11	6	3	2	1	0	0
Low miR-410	64	37	24	23	18	11	6	3

Disease-Free survival



Number at risk

	0	24	48	72	96	120	144	168
High miR-410	16	11	6	3	2	1	0	0
Low miR-410	64	35	22	21	14	9	6	3





**Supplementary Table 1** Genomic characteristics of tumors used in the preliminary cohort

Risk at diagnosis	High								Low				
Patient Code	104	301	209	181	358	305	600	2232	424	343	459	118	2192
CGH Curies's stratification <sup>a</sup>	C	B	C	C	C	C	C	C	A	A	A	NO	D
1p loss <sup>b</sup>	yes	no	yes	yes	yes	no	yes	no	no	no	no	no	no
1q gain <sup>b</sup>	no	no	no	no	no	no	no	no	no	no	no	no	no
3p loss <sup>b</sup>	no	no	no	no	no	no	no	no	no	no	no	no	no
7q gain <sup>b</sup>	yes	yes	yes	no	no	no	no	no	no	no	no	no	no
11q loss <sup>b</sup>	yes	no	no	no	no	no	no	no	no	no	no	no	no
17q gain <sup>b</sup>	yes	no	yes	no	no	no	yes	no	no	no	no	no	no
14q32.31 loss <sup>b</sup>	0	0	0	0	0	0	-0.36	0	0	0	-0.16	-0.19	-0.19

<sup>a</sup>using CGH-array; A, B, C and D types according to neuroblastoma stratification with **A**: numerical aberrations, no segmental aberrations; **B**: segmental aberrations, no numerical aberrations; **C**: *MYCN* amplification, no numerical aberrations; **D**: segmental and numerical aberrations; <sup>b</sup>obtained using CGH-array (Janoueix-Lerosey et al., 2009); +: yes .

#### Array-based CGH for Genomic DNA Analysis Protocol Version 4.0

**Sample preparation and hybridization.** Before labelling and hybridization, genomic DNA (0.2- 0.5 µg) was fragmented by a double enzymatic digestion with *AluI* and *RsaI* and checked with LabOnChip (2100 Bioanalyzer System, Agilent Technologies). Control DNA from Promega (Human Genomic DNA Female G1521) and tumor DNAs were labelled by random priming with CY5-dCTP and CY3-dCTP using Labelling Kit PLUS (Agilent p/n 5188-5309). The DNA hybridization was carried out for 17 hours at 65°C in a rotating oven (Robbins Scientific, Mountain View, CA) at 20 rpm using a clean gasket slide (Agilent p/n G2534-60013) and then covered with the Agilent 244K microarray containing an Agilent Oligo aCGH/ChIP-Chip Hybridization Kit (Agilent p/n 5188-5220). The chips were scanned on an Agilent Technologies G2505C.

**Normalization.** Signal acquisition and normalization from the scanned image was performed using the Feature Extraction software version 10.1.1.1 from Agilent Technologies, with protocol CGH-v4\_10\_Apr08, and the array design version 014693\_D\_20080627, both from Agilent Technologies. Default settings were used within the software. Normalized data were re-centralized using a custom script, then analyzed using CGH Analytics 3.4.40 software under the following parameters: ADM-2 used as the segmentation method, with a threshold of 10 [ref\_ADM2]. Aberration calling was performed using an aberration-level filter of 5 consecutive probes for an absolute log<sub>2</sub> (ratio) > 0.15. The UCSC human genome build version hg18 of March 2006 was used for all the genomic coordinates [http://genome.ucsc.edu].

#### Reference

Janoueix-Lerosey I, Schleiermacher G, Michels E, et al. Overall genomic pattern is a predictor of outcome in neuroblastoma. *J Clin Oncol* 2009; 27: 1026-33.



**Supplementary Table 2** Differential miRNA expression between low-risk and high-risk neuroblastoma with raw p-value <0.05

microRNAs	chromosome location	raw p-value	adjusted p-value	fold change	previously described in neuroblastoma
<b>up-regulated</b>					
hsa-miR-181a	1q32.1 / 9q33.3	8.99 10 <sup>-03</sup>	ns	3.34	Chen et al., 2007; Schulte et al., 2008; Schulte et al., 2010
hsa-miR-181b	1q32.1 / 9q33.3	4.11 10 <sup>-03</sup>	ns	2.22	Chen et al., 2007; Schulte et al., 2008; Schulte et al., 2010
hsa-miR-135a*	3p21.1 / 12q23.1	5.18 10 <sup>-03</sup>	ns	2.66	
hsa-miR-874	5q31.2	7.15 10 <sup>-03</sup>	ns	2.13	
hsa-miR-486-5p	8p11.21	2.82 10 <sup>-02</sup>	ns	2.22	
hsa-miR-630	15q24.1	2.76 10 <sup>-02</sup>	ns	3.37	
hsa-miR-144	17q11.2	2.06 10 <sup>-02</sup>	ns	2.15	
hsa-miR-125a-3p	19q13.41	4.25 10 <sup>-02</sup>	ns	2.22	
hsa-miR-99a	21q21.1	7.35 10 <sup>-03</sup>	ns	2.31	
hsa-let-7c	21q21.1	1.29 10 <sup>-02</sup>	ns	2.26	
hsa-miR-188-5p	Xp21.23	3.43 10 <sup>-02</sup>	ns	2.53	
hsa-miR-513b	Xq27.3	1.06 10 <sup>-02</sup>	ns	2.20	
hsa-miR-513c	Xq27.3	8.25 10 <sup>-03</sup>	ns	2.18	
<b>down-regulated</b>					
hsa-miR-137	1p21.3	3.30 10 <sup>-03</sup>	ns	0.36	Chen et al., 2007; Lin et al., 2010; Schulte et al., 2010
hsa-miR-30c	1p34.2 / 6q13	1.51 10 <sup>-02</sup>	ns	0.44	Chen et al., 2007; Lin et al., 2010
hsa-miR-128	2q21.3 / 3p22.3	3.01 10 <sup>-02</sup>	ns	0.44	Lin et al., 2010
hsa-miR-149	2q37.3	3.59 10 <sup>-04</sup>	0.0130	0.21	Bray et al., 2009; Chen et al., 2007; Lin et al., 2010; Schulte et al., 2010
hsa-miR-26a	3p22.2 / 12q14.1	2.49 10 <sup>-02</sup>	ns	0.44	
hsa-miR-103	5q34 / 20p13	2.91 10 <sup>-02</sup>	ns	0.48	
hsa-miR-340	5q35.3	1.02 10 <sup>-02</sup>	ns	0.46	
hsa-miR-106b	7q22.1	7.39 10 <sup>-03</sup>	ns	0.33	
hsa-miR-23b	9q22.32	3.36 10 <sup>-02</sup>	ns	0.39	Lin et al., 2010
hsa-miR-107	10q23.31	1.46 10 <sup>-02</sup>	ns	0.36	Chen et al., 2007
hsa-miR-331-3p	12q22	6.94 10 <sup>-05</sup>	0.0055	0.26	Schulte et al., 2010
hsa-miR-19a	13q31.3	3.54 10 <sup>-02</sup>	ns	0.40	Bray et al., 2009
hsa-miR-19b	13q31.3 / Xq26.2	1.09 10 <sup>-02</sup>	ns	0.42	Bray et al., 2009
hsa-miR-154*	14q32.31	5.88 10 <sup>-04</sup>	0.0173	0.49	
hsa-miR-154	14q32.31	2.67 10 <sup>-04</sup>	0.0112	0.47	
hsa-miR-329	14q32.31	5.11 10 <sup>-05</sup>	0.0051	0.44	Bray et al., 2009
hsa-miR-409-5p	14q32.31	6.83 10 <sup>-05</sup>	0.0055	0.44	Bray et al., 2009
hsa-miR-382	14q32.31	4.21 10 <sup>-03</sup>	ns	0.44	
hsa-miR-543	14q32.31	8.87 10 <sup>-05</sup>	0.0059	0.44	
hsa-miR-376c	14q32.31	4.02 10 <sup>-02</sup>	ns	0.44	
hsa-miR-376a	14q32.31	3.54 10 <sup>-02</sup>	ns	0.44	
hsa-miR-485-3p	14q32.31	4.14 10 <sup>-04</sup>	0.0143	0.43	
hsa-miR-377	14q32.31	7.92 10 <sup>-04</sup>	0.0219	0.42	
hsa-miR-409-3p	14q32.31	4.97 10 <sup>-04</sup>	0.0158	0.37	
hsa-miR-495	14q32.31	8.79 10 <sup>-05</sup>	0.0059	0.34	
hsa-miR-654-3p	14q32.31	1.32 10 <sup>-05</sup>	0.0026	0.33	
hsa-miR-299-5p	14q32.31	1.15 10 <sup>-04</sup>	0.0070	0.32	
hsa-miR-758	14q32.31	1.94 10 <sup>-05</sup>	0.0029	0.31	
hsa-miR-323-3p	14q32.31	2.38 10 <sup>-07</sup>	0.0002	0.28	
hsa-miR-410	14q32.31	1.33 10 <sup>-04</sup>	0.0075	0.25	
hsa-miR-487b	14q32.31	2.36 10 <sup>-06</sup>	0.0009	0.17	
hsa-miR-301a	17q22	4.87 10 <sup>-03</sup>	ns	0.17	Chen et al., 2007
hsa-miR-23a	19p13.13	4.38 10 <sup>-02</sup>	ns	0.47	
hsa-let-7e	19q13.41	4.31 10 <sup>-02</sup>	ns	0.34	
hsa-miR-301b	22q11.21	3.28 10 <sup>-02</sup>	ns	0.49	
hsa-miR-374b	Xq13.2	3.24 10 <sup>-02</sup>	ns	0.45	
hsa-miR-424	Xq26.3	2.45 10 <sup>-02</sup>	ns	0.46	Bray et al., 2009



**Supplementary Table 3** Differential 14q32.31 miRNA expression of the training set.

14q32.31 miRNA	fold change high- / low-risk	raw <i>p</i> -value	adjusted <i>p</i> -value
hsa-miR-379	0.72	0.0002	0.0097
hsa-miR-379*	0.94	0.0667	0.2575
hsa-miR-411	0.72	0.0003	0.0123
hsa-miR-411*	0.85	0.0002	0.0097
hsa-miR-299-3p	0.73	0.0005	0.0158
hsa-miR-299-5p	0.32	0.0001	0.0070
hsa-miR-380	0.92	0.0489	0.2246
hsa-miR-380*	1.01	0.6003	0.7566
hsa-miR-323-3p	0.28	<0.0001	0.0002
hsa-miR-323-5p	0.96	0.1003	0.3202
hsa-miR-758	0.31	<0.0001	0.0029
hsa-miR-329	0.44	0.0001	0.0051
hsa-miR-494	2.52	0.1215	0.3589
hsa-miR-543	0.44	0.0001	0.0059
hsa-miR-495	0.34	0.0001	0.0059
hsa-miR-376c	0.44	0.0402	0.2147
hsa-miR-376a	0.44	0.0354	0.2065
hsa-miR-376a*	0.72	0.0006	0.0170
hsa-miR-654-3p	0.33	<0.0001	0.0026
hsa-miR-654-5p	0.91	0.2718	0.5402
hsa-miR-376b	0.54	0.0021	0.0473
hsa-miR-300	0.97	0.0534	0.2323
hsa-miR-381	0.82	0.5540	0.7356
hsa-miR-487b	0.17	<0.0001	0.0009
hsa-miR-539	0.51	<0.0001	0.0026
hsa-miR-889	0.86	0.0107	0.1223
hsa-miR-544	1.03	0.2333	0.5095
hsa-miR-655	0.96	0.0814	0.2902
hsa-miR-487a	0.53	0.0015	0.0374
hsa-miR-382	0.44	0.0042	0.0743
hsa-miR-134	1.78	0.1295	0.3718
hsa-miR-668	0.79	0.0014	0.0350
hsa-miR-485-3p	0.43	0.0004	0.0143
hsa-miR-485-5p	0.52	0.0036	0.0707
hsa-miR-323-3p	0.28	<0.0001	0.0002
hsa-miR-323-5p	0.96	0.1003	0.3202
hsa-miR-154	0.47	0.0003	0.0112
hsa-miR-154*	0.49	0.0006	0.0173
hsa-miR-496	0.91	0.0193	0.1701
hsa-miR-377	0.42	0.0003	0.0219
hsa-miR-377*	0.92	0.1940	0.4629
hsa-miR-541	0.94	0.0074	0.1013
hsa-miR-541*	0.97	0.0135	0.1379
hsa-miR-409-3p	0.37	0.0005	0.0158
hsa-miR-409-5p	0.44	0.0001	0.0055
hsa-miR-412	1.01	0.5854	0.7516
hsa-miR-369-3p	0.88	0.0423	0.2169
hsa-miR-369-5p	0.88	0.0349	0.2065
hsa-miR-410	0.25	0.0001	0.0075
hsa-miR-656	0.94	0.1727	0.4344



**Supplementary Table 4** Main characteristics of the preliminary cohort and validation set and the expression levels of the three selected miRNAs using qRT-PCR

Patient	Code	Risk at diagnosis	Age at diagnosis (months)	INSS Stage	MYCN amplification	Disease-Free Survival (months)	Disease status	Overall Survival (months)	Present status	miR-487b expression levels	miR-410 expression levels	miR-409-3p expression levels
<b>Preliminary cohort (n=13)</b>												
104		High	35	4	yes	5	DoD	5	DoD	0.41	0.88	0.20
118		Low	8	2	no	122	alive	122	alive	2.84	2.00	0.47
181		High	24	4	yes	131	alive	131	alive	0.10	0.09	0.04
209		High	12	4	yes	15	DoD	15	DoD	0.23	0.34	0.10
301		High	49	4	yes	18	DoD	18	DoD	0.30	0.36	0.17
305		High	16	3	yes	19	DoD	19	DoD	0.10	0.11	0.07
343		Low	2	2	no	5	relapse	122	alive	1.24	1.30	0.81
358		High	66	4	yes	21	DoD	21	DoD	0.04	0.03	0.02
424		Low	0	4S	no	134	alive	134	alive	2.07	3.56	0.68
459		Low	6	3	no	118	relapse	156	alive	1.08	1.81	1.08
600		High	20	4	yes	7	DoD	7	DoD	0.05	0.03	0.04
2192		Low	3	1	no	77	alive	77	alive	2.49	4.55	1.08
2232		High	8	4	yes	84	relapse	104	DoD	0.03	0.05	0.02
<b>Validation set (n=214)</b>												
101		Low	13	3	no	102	alive	102	alive	0.65	0.54	0.59
102		High	43	4	no	255	alive	255	alive	0.19	0.21	0.18
105		High	42	4	yes	13	DoD	13	DoD	0.56	0.37	0.32
109		Low	2	2	no	74	alive	74	alive	0.69	0.53	0.36
110		High	58	4	no	22	DoD	22	DoD	0.29	0.27	6.61
153		Low	6	1	no	153	alive	153	alive	0.01	0.03	0.01
158		High	54	4	no	40	DoD	40	DoD	0.44	0.45	0.32
159		High	54	4	no	22	DoD	22	DoD	0.72	2.03	5.09
162		Low	5	3	no	136	alive	136	alive	1.36	2.47	0.54
164		Low	4	4S	no	159	alive	159	alive	3.27	3.33	1.23
171		High	42	4	no	34	DoD	34	DoD	0.02	0.02	0.06
182		Low	4	4S	no	81	alive	81	alive	0.10	0.13	0.20
207		Low	6	3	no	172	alive	172	alive	0.68	0.54	0.40
217		Low	12	3	no	25	alive	25	alive	3.37	4.2	11.87
227		Low	2	4S	no	183	alive	183	alive	0.21	0.28	0.92
232		Low	12	4	no	84	alive	84	alive	2.38	4.97	2.38
235		Low	28	3	no	6	DoD	6	DoD	0.03	0.00	0.42
239		Low	0	4S	no	128	alive	128	alive	0.02	0.01	0.03
245		Low	0	4S	no	108	alive	108	alive	3.27	3.38	0.75
246		High	61	4	no	45	DoD	45	DoD	0.86	0.81	0.78
260		High	36	4	no	13	DoD	13	DoD	0.08	0.05	0.11
261		Low	36	3	no	118	DoD	118	DoD	0.12	0.11	0.11
291		High	92	4	no	151	DoD	151	DoD	0.01	0.00	0.26
293		Low	5	1	no	221	alive	221	alive	0.05	0.05	0.01
297		Low	8	2	no	118	relapse	152	alive	1.12	1.00	0.10
299		High	42	4	no	46	DoD	46	DoD	0.28	0.26	0.38
300		High	36	4	no	4	DoD	4	DoD	0.08	0.22	0.06
302		High	15	3	yes	29	alive	29	alive	1.65	1.38	0.93
307		High	38	4	yes	82	DoD	82	DoD	0.53	0.2	0.20
317		Low	7	4	no	41	alive	41	alive	3.40	12.96	3.48
319		Low	4	4	no	12	DoD	12	DoD	0.00	0.01	0.01
326		Low	1	1	no	35	alive	35	alive	0.48	0.12	0.20
331		High	19	4	yes	168	alive	168	alive	0.01	0.02	0.01
373		Low	33	3	no	124	alive	124	alive	0.18	0.11	0.32
376		Low	79	1	no	91	alive	91	alive	1.56	1.133	38.8
390		Low	80	2	no	1	alive	1	alive	0.43	0.63	0.31
397		Low	15	1	no	70	alive	70	alive	0.31	0.57	0.13
400		Low	2	4	no	76	DoD	76	DoD	0.41	0.25	0.24
403		Low	4	3	no	66	alive	66	alive	1.05	0.78	15.61
405		Low	8	3	no	6	alive	6	alive	1.03	0.76	0.79
411		High	73	4	yes	13	DoD	13	DoD	0.43	0.29	0.45
414		High	7	3	yes	145	alive	145	alive	0.43	0.27	0.25
418		High	4	4	yes	1	DoD	1	DoD	0.85	1.23	0.25
440		High	73	4	no	118	DoD	118	DoD	0.66	0.73	16.69
441		Low	2	2	no	176	alive	176	alive	1.49	12.94	17.99
443		High	73	4	no	118	DoD	118	DoD	1.00	0.99	26.82
444		Low	22	3	no	214	alive	214	alive	3.46	2.78	2.61
445		Low	14	2	no	168	alive	168	alive	0.66	0.43	0.47
449		Low	153	3	no	13	DoD	13	DoD	0.37	0.08	0.41
471		Low	83	3	no	6	alive	6	alive	2.48	2.52	0.94
499		High	62	3	yes	3	DoD	3	DoD	0.24	0.03	0.06
500		High	32	4	no	165	alive	165	alive	1.32	0.6	0.62
511		Low	13	3	no	7	alive	7	alive	2.22	1.943	0.49
513		Low	40	2	no	79	alive	79	alive	0.01	0.01	0.02
518		Low	13	2	no	113	alive	113	alive	0.99	1.28	0.58
530		High	62	4	no	13	alive	13	alive	0.42	0.48	0.4
542		Low	45	3	no	37	relapse	41	alive	0.00	0.00	0.00
547		Low	105	2	no	112	alive	112	alive	5.69	3.71	4.02
553		High	109	4	no	80	DoD	80	DoD	0.02	0.03	0.02
559		Low	43	3	no	27	relapse	200	alive	0.02	0.01	0.03
565		Low	1	1	no	170	alive	170	alive	0.54	0.37	0.25
569		High	42	4	yes	120	alive	120	alive	0.27	0.00	0.12
576		Low	17	1	no	142	alive	142	alive	2.80	3.42	2.8
583		High	39	2	yes	21	relapse	33	DoD	0.30	0.19	0.2
584		High	20	4	no	169	alive	169	alive	0.07	0.06	0.18
588		Low	42	2	no	117	alive	117	alive	6.01	4.54	5.33
593		Low	9	4S	no	88	alive	88	alive	1.30	1.65	0.50
594		Low	47	3	no	147	alive	147	alive	0.02	0.01	0.02
595		High	54	4	no	42	DoD	42	DoD	0.14	0.24	0.16
605		High	30	4	no	94	relapse	121	alive	0.00	0.01	0.01
612		Low	73	1	no	54	DoD	54	DoD	0.46	0.01	0.04
613		Low	4	2	no	96	alive	96	alive	1.73	2.8	0.66
623		High	50	4	no	26	DoD	26	DoD	0.88	1.8	0.46
624		Low	30	3	no	164	alive	164	alive	4.78	8.24	2.00
645		High	25	2	yes	7	alive	7	alive	0.17	0.08	7.02
646		Low	4	4S	no	50	alive	50	alive	0.81	0.57	23.78
650		Low	47	1	no	112	alive	112	alive	13.28	9.95	3.62
663		Low	23	1	no	118	alive	118	alive	0.56	1.12	0.41
664		Low	3	1	no	74	alive	74	alive	0.93	1.25	0.34
667		High	54	4	no	21	DoD	21	DoD	0.78	0.72	0.58
670		Low	8	2	no	16	relapse	60	DoD	0.27	0.55	22.45
671		Low	48	3	no	14	relapse	20	alive	0.57	0.38	12.39
672		High	60	4	yes	12	DoD	12	DoD	0.18	0.2	0.22
680		Low	23	1	no	36	alive	36	alive	0.03	0.02	0.06
692		Low	63	1	no	5	DoD	5	DoD	0.00	0.00	0.00
703		High	42	4	no	136	alive	136	alive	1.61	2.85	0.83
705		Low	19	2	no	56	alive	56	alive	0.00	0.00	0.00
712		Low	25	2	no	7	alive	7	alive	0.16	0.17	0.38





723	Low	26	2	no	24	alive	24	alive	1.15	1.62	0.53
739	High	25	3	yes	5	DoD	5	DoD	0.10	0.11	0.14
741	Low	2	1	no	114	alive	114	alive	1.14	0.64	0.31
751	Low	14	3	no	179	alive	179	alive	1.08	1.40	0.29
758	Low	16	2	no	167	alive	167	alive	2.07	1.41	30.18
760	Low	3	1	no	75	alive	75	alive	1.43	0.82	0.35
773	Low	2	4S	no	177	alive	177	alive	0.03	0.5	0.75
785	Low	14	3	no	105	alive	105	alive	1.04	1.98	0.41
802	High	98	4	no	17	DoD	17	DoD	0.01	0.01	0.38
804	Low	21	3	no	30	DoD	30	DoD	0.62	0.54	0.21
805	Low	1	2	no	129	alive	129	alive	0.01	0.01	0.01
824	Low	18	2	no	47	alive	47	alive	1.24	2.07	0.44
860	Low	5	3	no	120	alive	120	alive	1.09	1.34	0.33
872	High	58	4	yes	78	DoD	78	DoD	0.28	0.31	0.19
888	Low	0	3	no	6	relapse	9	alive	2.01	1.17	1.01
930	Low	1	2	no	73	alive	73	alive	0.03	0.04	0.02
933	Low	14	3	no	181	alive	181	alive	0.25	0.37	0.34
944	High	43	4	no	23	DoD	23	DoD	0.38	0.16	0.38
947	Low	1	4S	no	116	alive	116	alive	0.79	0.63	23.19
966	High	2	1	yes	117	alive	117	alive	0.76	0.33	0.78
968	Low	5	1	no	25	alive	25	alive	0.84	0.64	9.91
979	Low	31	3	no	7	DoD	7	DoD	4.07	3.62	2.43
982	High	60	4	no	37	DoD	37	DoD	0.11	0.21	0.12
1030	High	31	4	yes	104	alive	104	alive	0.17	0.22	0.07
1056	Low	31	3	no	7	DoD	7	DoD	0.23	0.00	0.04
1061	Low	0	1	no	136	alive	136	alive	0.77	0.91	0.32
1070	High	43	4	no	27	DoD	27	DoD	0.61	0.64	0.14
1078	Low	9	4S	no	6	DoD	6	DoD	0.37	0.12	10.83
1090	Low	9	4S	no	13	alive	13	alive	1.76	0.10	0.27
1099	High	43	4	no	96	alive	96	alive	0.21	0.29	0.32
1116	High	9	4	yes	84	relapse	104	DoD	0.00	0.01	0.01
1146	High	40	4	no	16	relapse	19	alive	0.31	0.47	0.27
1150	Low	21	1	no	9	alive	9	alive	0.60	1.39	0.43
1162	High	23	4	yes	104	alive	104	alive	0.00	0.01	0.02
1176	Low	7	2	no	100	alive	100	alive	1.62	2.31	0.65
1196	Low	2	3	no	86	alive	86	alive	1.13	0.72	0.71
1271	High	117	4	no	28	DoD	28	DoD	0.03	0.02	0.09
1309	High	83	4	no	10	DoD	10	DoD	4.40	9.90	22.21
1320	Low	10	4	no	18	DoD	18	DoD	0.09	0.15	0.07
1325	Low	14	1	no	134	alive	134	alive	0.07	0.09	0.09
1355	Low	202	1	no	132	alive	132	alive	0.88	0.59	0.27
1357	Low	3	4	no	88	alive	88	alive	0.94	0.92	20.83
1358	Low	202	3	no	5	relapse	20	DoD	0.08	0.02	0.07
1364	High	32	4	no	13	relapse	124	alive	0.06	0.09	0.24
1365	High	37	4	no	143	alive	143	alive	0.26	0.19	0.24
1389	Low	4	4S	no	19	alive	19	alive	1.09	0.30	28.48
1392	Low	1	2	no	1	relapse	113	alive	0.67	0.69	0.17
1415	High	131	4	no	46	DoD	46	DoD	1.67	1.43	1.24
1420	Low	2	4	no	46	alive	46	alive	0.43	0.38	0.14
1427	Low	10	3	no	128	alive	128	alive	0.64	0.54	0.37
1429	Low	10	3	no	118	alive	118	alive	0.46	0.62	0.21
1441	High	77	4	no	28	DoD	28	DoD	0.80	1.19	0.60
1456	Low	10	4	no	75	alive	75	alive	1.10	0.77	20.53
1501	Low	29	2	no	92	alive	92	alive	0.42	1.09	0.35
1513	Low	90	3	no	128	alive	128	alive	0.90	1.84	0.41
1529	Low	142	2	no	103	alive	103	alive	1.71	0.52	0.61
1536	High	90	4	yes	5	DoD	5	DoD	0.27	0.44	0.20
1546	Low	5	2	no	96	alive	96	alive	9.67	19.56	1.65
1551	High	65	4	no	66	DoD	66	DoD	0.92	1.95	0.55
1565	High	42	4	no	20	DoD	20	DoD	0.59	0.55	0.25
1571	Low	48	2	no	117	alive	117	alive	0.09	0.10	0.14
1582	Low	5	2	no	79	alive	79	alive	0.84	1.24	0.50
1583	Low	6	3	no	64	alive	64	alive	1.00	1.62	0.62
1588	Low	11	3	no	115	alive	115	alive	0.39	0.18	0.17
1631	High	16	4	yes	12	DoD	12	DoD	0.17	0.22	0.10
1656	Low	142	2	no	65	alive	65	alive	0.72	0.53	0.19
1657	High	25	4	no	21	DoD	21	DoD	0.31	0.18	0.29
1659	Low	101	2	no	98	alive	98	alive	0.71	1.06	0.51
1675	Low	35	2	no	81	alive	81	alive	0.01	0.01	0.01
1710	High	64	4	no	44	relapse	67	DoD	0.62	0.74	0.23
1736	High	48	4	no	54	alive	54	alive	1.43	1.41	0.36
1741	High	35	4	no	59	alive	59	alive	1.83	3.1	1.07
1780	Low	30	1	no	78	alive	78	alive	1.31	1.93	0.57
1893	Low	50	1	no	32	alive	32	alive	0.04	0.02	0.06
1900	High	177	4	no	40	DoD	40	DoD	0.45	0.21	5.22
1906	High	29	4	no	18	DoD	18	DoD	1.28	2.04	0.9
1923	Low	6	1	no	65	alive	65	alive	1.05	1.67	0.45
1976	High	24	4	no	86	DoD	86	DoD	0.73	0.85	0.17
1983	Low	2	3	no	93	alive	93	alive	0.01	0.01	0.01
1990	Low	1	1	no	95	alive	95	alive	1.13	1.44	0.36
1998	Low	2	4	no	10	DoD	10	DoD	0.42	0.24	0.26
2004	High	1	4	yes	24	DoD	24	DoD	0.02	0.03	0.02
2040	Low	11	2	no	65	alive	65	alive	1.75	1.04	22.00
2076	High	7	2	yes	83	alive	83	alive	2.13	1.85	1.02
2096	Low	1	4S	no	72	alive	72	alive	0.35	0.53	0.16
2108	Low	2	2	no	87	alive	87	alive	0.02	0.01	0.03
2122	Low	40	3	no	48	alive	48	alive	0.83	0.82	22.45
2160	Low	6	4S	no	82	alive	82	alive	0.5	0.00	0.01
2166	Low	27	1	no	71	alive	71	alive	1.04	1.49	0.50
2173	Low	6	1	no	27	alive	27	alive	0.69	0.94	0.24
2204	High	32	4	no	50	relapse	79	alive	0.56	0.91	0.34
2247	Low	15	4	no	72	alive	72	alive	0.99	1.59	0.42
2276	Low	2	4	no	60	alive	60	alive	0.05	0.02	0.08
2278	Low	15	4S	no	6	DoD	6	DoD	0.61	0.37	0.29
2305	Low	15	1	no	60	alive	60	alive	0.72	0.9	0.26
2342	Low	11	3	no	10	relapse	60	alive	1.55	2.00	1.20
2400	High	85	4	no	20	relapse	22	DoD	0.71	0.92	22.12
2419	Low	21	3	no	4	alive	4	alive	1.67	2.56	0.66
2444	Low	18	3	no	28	DoD	28	DoD	0.25	0.16	10.06
2446	High	71	1	yes	46	alive	46	alive	0.20	0.14	3.84
2452	High	33	4	no	43	alive	43	alive	0.40	0.56	10.25
2468	Low	55	2	no	43	alive	43	alive	1.05	1.33	0.47
2521	Low	52	2	no	31	alive	31	alive	1.58	2.78	0.79
2522	Low	52	2	no	31	alive	31	alive	2.08	3.99	1.02
2540	Low	16	1	no	34	alive	34	alive	0.47	0.63	0.23
2564	Low	3	3	no	39	alive	39	alive	3.41	6.74	2.05
2566	High	21	4	no	28	relapse	32	alive	1.84	1.25	35.24



2643	Low	44	2	no	22	alive	22	alive	0.82	1.01	0.59
2657	Low	8	2	no	23	alive	23	alive	1.01	0.93	0.28
2674	High	132	4	no	21	alive	21	alive	0.16	0.5	0.41
2679	Low	108	2	no	15	alive	15	alive	0.5	0.97	0.26
2680	Low	13	2	no	21	alive	21	alive	1.57	2.10	0.66
2691	High	28	4	no	20	alive	20	alive	1.04	0.81	27.5
2693	Low	158	2	no	17	alive	17	alive	0.46	0.89	0.29
2696	High	116	4	no	16	alive	16	alive	1.29	1.59	0.48
2700	Low	16	2	no	5	alive	5	alive	0.76	0.79	0.18
2703	Low	5	4S	no	18	alive	18	alive	0.63	0.16	0.46
3836	Low	16	2	no	1	relapse	163	alive	0.51	0.33	0.42
4239	Low	5	3	no	20	relapse	64	alive	0.52	0.61	0.39
4242	Low	14	1	no	3	relapse	116	alive	0.75	0.70	0.72
4411	Low	48	2	no	18	relapse	45	alive	0.99	0.56	0.77
4615	Low	1	1	no	5	relapse	54	alive	4.10	4.49	2.72
4697	Low	13	1	no	3	relapse	55	alive	0.6	0.46	0.42
4702	Low	4	3	no	4	relapse	62	alive	0.13	0.06	0.27
5096	Low	2	2	no	24	relapse	41	alive	0.16	0.01	0.28
5112	Low	2	3	no	3	relapse	5	DoD	0.02	0.58	0.03



**Supplementary Table 5** Relationship between various clinical characteristics and 14q32.31 miRNA expression levels using two-sided Fisher's exact test

Characteristics	Cases	miR-487b			miR-410			miR-409-3p		
		Low	High	<i>p</i>	Low	High	<i>p</i>	Low	High	<i>p</i>
Age at diagnosis										
≥ 18 months	120	92	28	0.0067	85	35	0.3223	95	25	0.8718
< 18 months	107	64	43		69	38		83	24	
INSS Stage										
4	81	67	14	0.0009	64	17	0.0077	65	16	0.7367
1, 2, 3, 4S	146	89	57		90	56		113	33	
MYCN status										
Amplified	31	29	2	0.0007	28	3	0.0033	28	3	0.1012
Non-amplified	196	127	69		126	70		150	46	



**Supplementary Table 6** Proved target genes and their known involvement in neuroblastoma

MicroRNA	Proved targets	Neuroblastoma involvement of the targets
miR-410	CDK1	
miR-331-3p	HER2 E2F1	- Upregulated in neuroblastoma <sup>1</sup> - Upregulated in stage 4 non- <i>MYCN</i> -amplified tumors vs stage 1 tumor <sup>2</sup> - Downregulated in tumours with a favourable prognosis vs unfavourable <sup>3</sup>
miR-299-5p	OPN	- Upregulated in neuroblastoma <sup>1</sup> - High in unfavorable neuroblastoma <sup>4</sup>
miR-654-3p	CDKN1A	- Upregulated in neuroblastoma <sup>1</sup> - High in unfavorable neuroblastoma <sup>4</sup>
miR-495	E-cadherin OC-2 REDD1 HNF-6	- Negatively correlated with overall survival <sup>5</sup>
miR-409-3p	FGB	
miR-377	SOD1 SOD2 PAK1	- Higher expressed in unfavorable neuroblastoma <sup>6</sup>
miR-485-3p	NF-YB	

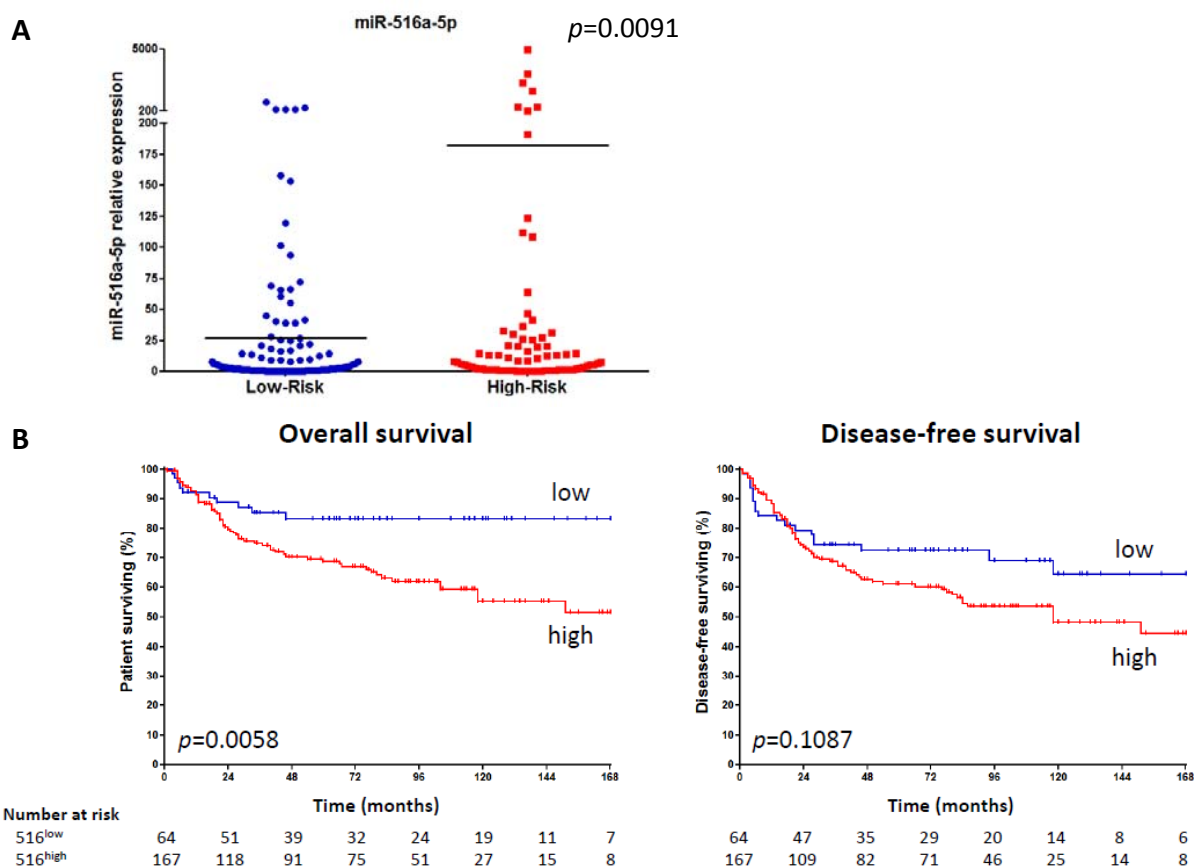
**Reference List**

- 1 - Roberts SS, Mori M, Pattee P, et al. GABAergic system gene expression predicts clinical outcome in patients with neuroblastoma. *J Clin Oncol* 2004; 22: 4127-34.
- 2 - Krasnoselsky AL, Whiteford CC, Wei JS, et al. Altered expression of cell cycle genes distinguishes aggressive neuroblastoma. *Oncogene* 2005; 24: 1533-41.
- 3 - Warnat P, Oberthuer A, Fischer M, et al. Cross-study analysis of gene expression data for intermediate neuroblastoma identifies two biological subtypes. *BMC Cancer* 2007; 7: 89.
- 4 - Abel F, Sjoberg RM, Nilsson S, Kogner P, Martinsson T. Imbalance of the mitochondrial pro- and anti-apoptotic mediators in neuroblastoma tumours with unfavourable biology. *Eur J Cancer* 2005; 41: 635-46.
- 5 - Oberthuer A, Kaderali L, Kahlert Y, et al. Subclassification and individual survival time prediction from gene expression data of neuroblastoma patients by using CASPAR. *Clin Cancer Res* 2008; 14: 6590-601.
- 6 - Hiyama E, Hiyama K, Yamaoka H, et al. Expression profiling of favorable and unfavorable neuroblastomas. *Pediatr Surg Int* 2004; 20: 33-8.









**Figure 27.** Analyse statistique des niveaux d'expression de miR-516a-5p dans les échantillons tumoraux (d'après Gattolliat et al., en soumission *Clinical Cancer Research*)

(A) La cohorte (n=231) a été stratifiée en deux groupes : bas risque (en bleu, n=151) vs haut risque (en rouge, n=80). Le t-test de Student indique la significativité entre deux groupes de tumeurs. Les barres noires indiquent les valeurs moyennes des niveaux expression des microARN.

(B) Courbes Kaplan-Meier de la survie globale et de la survie sans maladie des patients pour l'expression de miR-516a-5p. Le niveau d'expression du microARN a été converti en variable discrète en discriminant les échantillons de la cohorte en deux classes : faible expression en bleu et forte expression en rouge.

## 2. L'expression de deux microARN des clusters C14MC et C19MC soumis à empreinte parentale identifie une nouvelle stratification du risque dans le neuroblastome

**Gattolliat CH**, et al. The expression of two parental imprinted miRNAs identifies a new neuroblastoma risk-stratification. (en soumission à *Clinical Cancer Research*)

Ayant montré l'intérêt pronostique de deux microARN du cluster C14MC, l'un des deux plus importants clusters en nombre de microARN du génome humain, l'intérêt s'est porté sur le second plus grand cluster de microARN, C19MC. L'analyse des « micro-array » de la cohorte préliminaire des 13 tumeurs neuroblastiques a révélé que les microARN du C19MC étaient globalement sur-exprimés dans les neuroblastomes de haut risque sans que cette différence soit significative ; miR-516a-5p étant le microARN candidat le plus dérégulé entre les deux groupes de tumeurs.

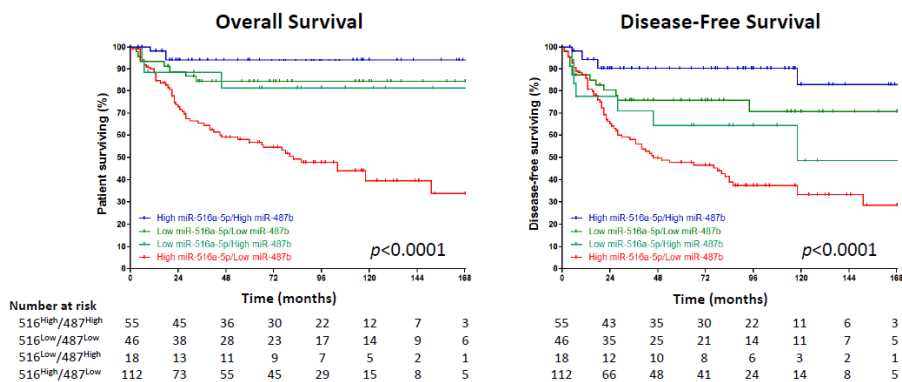
L'étude présentée dans cette partie montre l'intérêt de la combinaison de deux microARN, miR-516a-5p et miR-487b, tous deux soumis à empreinte parentale. Associés, les deux microARN permettent de proposer une nouvelle classification du risque, pour une meilleure prise de décision thérapeutique.

Dans ce but, l'expression de ces deux microARN – miR-487b et miR-516a-5p – a été mesurée par RT-PCR quantitative dans 231 tumeurs neuroblastiques de patients aux évolutions opposées. Plusieurs modèles de Cox couplés à des analyses de survie ont été développés afin de déterminer leurs rôles respectifs dans la prédiction de la survie globale et de la survie sans maladie des patients. La performance de ces modèles a été mesurée par des analyses d'AUC (pour « Area Under the Curve ») temps-dépendant.

L'analyse par RT-qPCR de l'expression du miR-516a-5p dans les 231 tumeurs de la cohorte étudiée a révélé une sur-expression significative de ce microARN dans les tumeurs de haut risque par rapport à celles de bas risque ( $p=0.0091$  ; Figure 27A). L'analyse Kaplan-Meier a indiqué que les patients avec une tumeur de forte expression du miR-516a-5p dans leur tumeur, avaient des durées de survie significativement plus

**Tableau 3.** Modèles multivariés de Cox pour la survie (globale et sans maladie) dans tous les patients (n=231)

Characteristics		Without miRNA	With miR-487b	With miR-516a-5p	With both miRNAs
<b>Overall Survival</b>					
Age at diagnosis	<18 months (reference)	1.000	1.000	1.000	1.000
	≥18 months	2.037 [1.077-3.850]	1.929 [1.020-3.648]	1.917 [1.009-3.644]	1.817 [0.954-3.462]
INSS Stage	1, 2, 3, 4S (reference)	1.000	1.000	1.000	1.000
	4	4.142 [2.231-7.688]	3.550 [1.903-6.624]	4.026 [2.156-7.519]	3.304 [1.747-6.247]
MYCN status	not-amplified (reference)	1.000	1.000	1.000	1.000
	amplified	1.813 [1.045-3.145]	1.552 [0.890-2.707]	1.837 [1.056-3.196]	1.570 [0.898-2.745]
miR-487b	low (reference)		1.000		1.000
	high		0.332 [0.140-0.789]		0.313 [0.131-0.746]
mir-516a-5p	low (reference)			1.000	1.000
	high			1.851 [0.940-3.642]	1.983 [1.004-3.918]
<b>Performance measurements</b>	<b>-2Log(likelihood) (AIC)</b>	<b>631.527 (637.527)</b>	<b>623.498 (631.498)</b>	<b>627.891 (635.891)</b>	<b>619.002 (629.002)</b>
<b>Disease-Free Survival</b>					
Age at diagnosis	<18 months (reference)	1.000	1.000	1.000	1.000
	≥18 months	1.547 [0.931-2.573]	1.482 [0.891-2.466]	1.501 [0.898-2.509]	1.424 [0.851-2.383]
INSS Stage	1, 2, 3, 4S (reference)	1.000	1.000	1.000	1.000
	4	2.686 [1.631-4.422]	2.376 [1.435-3.933]	2.676 [1.622-4.413]	2.329 [1.400-3.875]
MYCN status	not-amplified (reference)	1.000	1.000	1.000	1.000
	amplified	1.427 [0.841-2.422]	1.252 [0.734-2.135]	1.430 [0.842-2.427]	1.249 [0.732-2.132]
miR-487b	low (reference)		1.000		1.000
	high		0.455 [0.247-0.839]		0.440 [0.238-0.815]
mir-516a-5p	low (reference)			1.000	1.000
	high			1.239 [0.741-2.071]	1.334 [0.795-2.239]
<b>Performance measurements</b>	<b>-2Log(likelihood) (AIC)</b>	<b>861.985 (867.985)</b>	<b>854.645 (862.645)</b>	<b>861.293 (869.293)</b>	<b>853.392 (863.392)</b>



**Figure 28.** Courbes Kaplan-Meier de la survie globale et de la survie sans maladie des patients stratifiés selon des niveaux d'expression de miR-516a-5p et miR-487b

(d'après Gattolliat et al., en soumission *Clinical Cancer Research*)

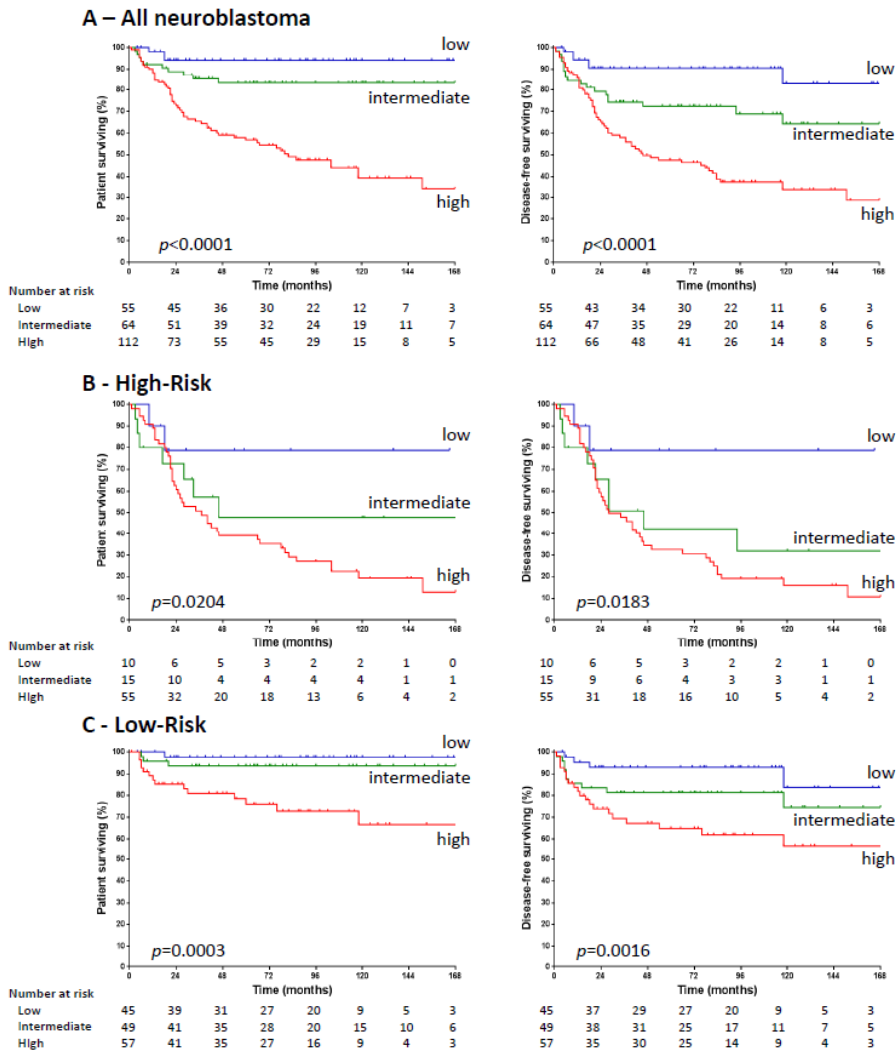
Le niveau d'expression des microARN ont été convertis en variable discrète en discriminant les échantillons de la cohorte en quatre classes : [miR-516a-5p<sup>fort</sup>/miR-487b<sup>fort</sup>] en bleu, [miR-516a-5p<sup>faible</sup>/miR-487b<sup>faible</sup>] en vert foncé, [miR-516a-5p<sup>faible</sup>/miR-487b<sup>fort</sup>] en vert clair, et [miR-516a-5p<sup>fort</sup>/miR-487b<sup>faible</sup>] en rouge.

courtes, alors que ceux, ayant des niveaux d'expression plus faibles du miR-516a-5p, avaient des durées de survie significativement plus longues ( $p=0.0058$ ) (Figure 27B). Cependant, l'expression du miR-516a-5p n'était pas associée à la survie sans maladie ( $p=0.1087$ ) (Figure 27B).

Dans le modèle de Cox, la survie globale était marginalement associée à l'expression du miR-516a-5p (HR=1.851, 95%CI=[0.940-3.642],  $p=0.0748$ ), mais pas la survie sans maladie (HR=1.239, 95%CI=[0.741-2.071],  $p=0.4144$ ), lorsqu'ajusté par rapport aux facteurs de risque classiques (Tableau 3). Ainsi, les rapports de risque mesurés pour le miR-516a-5p étaient clairement en opposition à ceux mesurés pour le miR-487b sans pour autant traduire que leurs expressions soient négativement corrélés (Tableau 3). En effet, aucune corrélation d'expression de ces deux microARN n'a été relevée alors qu'ils discriminent de façon opposé les neuroblastomes.

Lorsque les deux microARN, miR-487b et miR-516a-5p, sont incorporés au modèle de référence comprenant l'âge au diagnostic, le stade et l'amplification *N-MYC*, la performance du modèle est très significativement augmentée par rapport au modèle de référence (Tableau 3). En effet, dans ce modèle, l'expression élevée du miR-487b est associée à une diminution de 67% du risque de décès (HR=0.33, 95%CI=[0.14-0.79]) et de 54% du risque de rechute des patient (HR=0.46, 95%CI=[0.25-0.84]). L'expression élevée de miR-516a-5p double le risque de décès des patients (HR=1.98, 95%CI=[1.00-3.92]).

Ces résultats sont retrouvés lorsque la cohorte est stratifiée en quatre groupes définis par la combinaison de l'expression des miR-487b et miR-516a-5p, dont les courbes de survie sont présentées en figure 27 ; une différence significative globale de survie existe entre les différentes combinaisons d'expression ( $p<0.0001$ ) (Figure 28). Trois groupes pronostiques peuvent alors être identifiés à savoir, bas, intermédiaire et haut, définis comme suit : les patients avec une forte expression des deux microARN ont un bon pronostic ; les patients avec une faible expression du miR-516a-5p quelque soit le niveau d'expression du miR-487b ont un pronostic intermédiaire puisque les courbes de survie globale et sans maladie correspondantes ne sont pas significativement différentes (respectivement,  $p=0.8282$  et  $p=0.3652$ ) ; et les patients avec une forte expression du



**Figure 29.** Courbes Kaplan-Meier de la survie globale (gauche) et de la survie sans maladie (droite) selon les trois groupes définis par la combinaison de miR-516a-5p et miR-487b dans (A) toute la cohorte de patients, (B) les patients de haut risque et (C) de bas risque de la classification standard.

(d'après Gattolliat et al., en soumission *Clinical Cancer Research*)

miR-516a-5p et une faible expression du miR-487b ont un mauvais pronostic. Ces résultats suggèrent un effet modificateur de l'expression du miR-516a-5p sur la valeur pronostique du miR-487b.

Finalement, les courbes de survie des trois groupes de patients résultant de cette classification fondée sur l'expression des deux microARN, miR-516a-5p et miR-487b, sont significativement différentes ( $p < 0.0001$ ). La combinaison des deux microARN, miR-516a-5p et miR-487b augmente significativement la prédiction du risque pour toutes les formes de neuroblastome définies par les facteurs standards de risques (Figure 29).

Dans cette étude, le potentiel de deux microARN, miR-487b et miR-516a-5p, encodés par les deux plus larges clusters de microARN soumis à empreinte parentale, C14MC et C19MC respectivement, a été évalué. Basé sur la valeur pronostique séparée de chacun de ces deux microARN, un modèle prédictif combinant ces deux marqueurs permet de distinguer trois groupes de risque : bas [miR-516a-5p<sup>fort</sup>/miR-487b<sup>fort</sup>], intermédiaire [miR-516a-5p<sup>faible</sup>/miR-487b<sup>fort/faible</sup>] et haut [miR-516a-5p<sup>fort</sup>/miR-487b<sup>faible</sup>]. Globalement, ces résultats démontrent que les deux microARN, miR-487b et miR-516a-5p augmentent la prédiction de la survie, comparés à l'algorithme standard (âge au diagnostic, stade *INSS* et amplification *N-MYC*).





***Manuscrit 2***

The expression of two parental imprinted miRNAs identifies  
a new neuroblastoma risk-stratification



**The expression of two parental imprinted miRNAs identifies a new neuroblastoma risk-stratification**

Charles-Henry Gattolliat *et al.*

**Running Title: Two imprinted miRNAs stratify risk for neuroblastoma**



## **ABSTRACT**

### **PURPOSE**

The current risk-stratification for neuroblastoma patients is based on age at diagnosis, stage and *MYCN* amplification and defines patients at low-and high-risk. Refinement of this stratification is needed to help in the treatment decision. In this study, we assessed the interest of 2 parental imprinted miRNAs to propose a new prognostic classification scheme.

### **EXPERIMENTAL DESIGN**

Expression levels of maternal miR-487b and paternal miR-516a-5p were determined using quantitative RT-PCR from 231 neuroblastoma tumors from patients exhibiting opposite outcome. Multivariable Cox models were developed to assess their role in predicting the overall survival (OS) and disease-free survival (DFS). The performance of these models were measured using time-dependent area under curves.

### **RESULTS**

miR-516a-5p and miR-487b add prognostic information to the current risk factors in improving both the predictive and discriminant ability. Three risk-groups were identified: low (miR-516a-5p<sup>high</sup>/miR-487b<sup>high</sup>), intermediate (miR-516a-5p<sup>low</sup> whatever miR-487b level) and high (miR-516a-5p<sup>high</sup>/miR-487b<sup>low</sup>). Their survival curves are significantly different in subgroups with different current risk: low risk ( $p=0.0003$  and  $p=0.0016$  for OS and DFS) and high risk group ( $p=0.0204$  and  $p=0.0183$  for OS and DFS).

### **CONCLUSIONS**

We show the potential clinical utility of parental imprinted miRNAs to define new neuroblastoma risk-subgroups. These findings suggest that miRNA analysis could be a useful adjunct in the risk-algorithm to better manage patient with neuroblastoma.

**KEYWORDS:** neuroblastoma, miRNA clusters, parental imprinting, prognostic factors



## INTRODUCTION

Neuroblastoma, a malignant solid tumor of neural crest origin, accounts for 10% of all childhood cancers and exhibits a high clinical heterogeneity<sup>1</sup>. The standard algorithm currently used to stratify patients into low- and high-risk groups, both for overall survival (OS) and disease-free survival (DFS), is based on a combination of age at diagnosis, tumor stage and *MYCN* amplification status<sup>2,3</sup>. The low-risk group (up to 90% survival at 5 years) consists of non-*MYCN*-amplified tumors that are either localized (stage 1, 2 and 3) or metastatic in children <18 months old (stage 4 and 4S). The high-risk group (around 35% survival at 5 years) comprises all cases *MYCN*-amplified neuroblastoma regardless of stage and age, plus non-*MYCN*-amplified stage 4 tumors in children ≥18 months old. Additional prognostic markers of relapse for low-risk patients and of survival for high-risk patients are required to optimize the management of neuroblastoma and to improve outcome for the patients<sup>1,4</sup>. Recurrent genomic aberrations (gain or loss of whole chromosomes and intra-chromosomal alterations) have been used for the development of a pan-genomic algorithm to refine the standard risk-stratification<sup>5,6</sup>.

miRNAs interfere with diverse biological functions through the post-transcriptional regulation of gene expression by acting on the stability or translational rate of mRNA<sup>7</sup>. The involvement of miRNAs in tumor initiation and progression is well established and offers new perspectives in the treatment of neuroblastoma patients<sup>8,9</sup>. Some recent works have been published concerning neuroblastoma patients. Each study proposed different miRNA signatures associated to neuroblastoma prognosis but not compared to the current classification systems<sup>10-13</sup>. De Preter et al. have proposed a 25-miRNA signature able to identify a cohort of high-risk neuroblastoma patients at greater risk for poor outcome<sup>14</sup>.

We recently showed the prognostic role of miR-487b beyond the current risk factors<sup>15</sup>. This miRNA belongs to the largest imprinted miRNA cluster (C14MC) at the 14q32.31 locus. A second large imprinted miRNA cluster, called chromosome 19 microRNA cluster (C19MC), is located at the 19q13.4 locus. Several studies showed the over-expression of C19MC miRNAs as associated with poor prognosis of primitive neuroectodermal tumors<sup>16</sup>, thyroid adenomas<sup>17</sup> and hepatocellular carcinoma<sup>18</sup>.





In this study, the objective is to propose a new neuroblastoma risk-stratification based on the expression of two miRNAs encoded by the two imprinted clusters, C14MC and C19MC. To this purpose, we evaluate the added prognostic information of miRNAs from these clusters to the current risk factors on the survival outcomes.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Tumour collection, cryosections and total RNA extraction**

Tumors samples of a retrospective cohort of 231 patients were gathered between 1987 and 2009 at the *Institut Gustave Roussy* (n=223) and at the *Centre Leon Bérard* (n=8) with the approval of the appropriate ethic committees and according to the national law on the protection of patients taking part in biomedical research. Patients were staged according to the *International Neuroblastoma Staging System*<sup>19</sup>. Storage of primary tumor tissues, cryosections and total RNA isolation were previously described<sup>15</sup>. The first and last cryosections were used to select tumour tissues with a malignant tumour cell content of  $\geq 60\%$ <sup>1,20</sup>.

### **miRNA quantitative RT-PCR**

The quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR) and statistical analyses were done as previously described<sup>15</sup>. Briefly, qRT-PCR was performed according to the MIQE guidelines<sup>21</sup> and the quantification method was done according to Livak and Schmittgen<sup>22</sup>. RNU44 was used as normalizer and IGR-N-835 cell line<sup>23</sup> as calibrator. The statistical analyses compared the miRNA expression level between low- and high-risk using two-tailed Student t-test.

### **Statistical analysis**

The median follow-up was calculated with the Schemper's method<sup>24</sup>. Overall survival (OS) and disease-free survival (DFS) were defined as the time from the diagnosis to death and to the first occurrence of relapse or death, respectively. To potentially select the best candidate of miRNAs when screening miRNAs on the cluster C14MC, a backward-selection Cox model was performed in controlling for the current risk factors (age at



diagnosis, stage and *MYCN* amplification). When expression of miRNAs from C14MC cluster was correlated, a sensitivity analysis was performed based on bootstrap resampling. Survival curves were estimated using the Kaplan-Meier method and were compared with the log-rank and trend test. This latter test is more powerful when comparing ordered groups. Several nested multivariable Cox proportional hazard models were used to estimate the added prognostic information of one imprinted miRNA from C14MC, one from C19MC and a combination of both miRNAs to the current risk factors. The reference model was the model that includes only the current risk factors. The interaction between the two selected miRNAs was also investigated. All models were compared using the likelihood test ratio and Akaike's information criterion (AIC). The discriminant performance of models was measured using the time-dependent area under the curve (AUC) with the *SurvivalROC* R package<sup>25</sup>. This criterion allows to evaluate whether a marker may correctly classify a patient with an event and a patient without event at a time point; AUC close to 1 indicates a better classification. For all analyses, continuous miRNA expression levels were dichotomized using the cut-off as previously described<sup>15</sup>. An association will be considered as statistically significant when the p-value is lower than or equal to 0.05. All statistical analyses were done with SAS 9.3.

## RESULTS

The cohort of 231 neuroblastoma patients was followed until March 2012. The median follow-up was 7.7 years (95% Confidence Interval [CI]=[6.8-8.7]). The characteristics of the cohort is described in Table 1. Individual patient data are reported in Supplementary Table 1. According to the standard algorithm of disease outcome based on age at diagnosis, stage and *MYCN* amplification, 65% (n=151) patients were classified at low-risk and 35% (n=80) at high-risk. The observed number of deaths was 69 (30%) and the number of events (death or relapse) was 90 (39%).

### **Strong expression of miR-516a-5p from the C19MC is associated with high-risk neuroblastoma**

Previous miRNA microarray profiling of a screening cohort of 13 tumors (8 high-risk and 5 low-risk) revealed that miRNAs from C19MC were globally over-expressed in high-risk



neuroblastomas, miR-516a-5p being the top-candidate of this cluster. These results as confirmed by qRT-PCR in the 231 patient cohort showed that, in contrast to miR-487b, miR-516a-5p expression levels were higher in high-risk tumors ( $p=0.0091$ , Supplementary Figure 1). Kaplan-Meier analyses indicated that patients with high expression levels of miR-516a-5p showed a shorter OS ( $p=0.0058$ ) but not shorter DFS ( $p=0.1087$ ), compared to patients with low levels of expression (Figure 1A). In terms of hazard ratios, OS was marginally associated (HR=1.851, 95%CI=[0.940-3.642],  $p=0.0748$ ), and not DFS (HR=1.239, 95%CI=[0.741-2.071],  $p=0.4144$ ) when controlling for the current risk factors (Table 2). These hazard ratios were in the opposite direction compared to those of miR-487b. In addition, the expression of these two miRNAs was not correlated: the percentage of high expression of miR-516a-5p was 70.89% and 75.34% in low and high expression of miR-487b, respectively ( $p=0.4817$ ).

### **miR-487b and miR-516a-5p add prognostic information to the current risk factors**

The survival curves of the 4 groups defined by the combination of miR-487b and miR-516a-5p are represented in Figure 1B. A significance global difference exists ( $p<0.0001$  for OS and DFS) and three main prognostic patterns can be outlined: low, intermediate and high. Patients with high expression of the 2 miRNAs have a good prognosis; patients with low expression of miR-516a-5p whatever the expression level of miR-487b (high or low) have an intermediate prognosis while patients with high expression of miR-516a-5p and low expression of miR-487b have a poor prognosis. Indeed, the difference between miR-487b-based survival curves was not significant in patients with low miR-516a-5p expression ( $p=0.8282$  and  $p=0.3652$  for OS and DFS, respectively) but was significant in patients with high miR-516a-5p expression ( $p<0.0001$  for OS and DFS); this suggests a modifier effect of miR-516a-5p on the prognostic value of miR-487b.

The analysis of Cox models (reference model, model including miR-487b or miR-516a-5p and both) in measuring the adjusted associations of each covariate with the hazard ratios of OS and DFS are summarized in Table 2. Each model corresponds to a separate column in the table. The models including both miR-487b and miR-516a-5p for OS and including only miR-487b for DFS fit the data considerably better than the reference model (likelihood ratio test  $p=0.002$  with lowest AIC=629.002 for OS and  $p=0.007$  with lowest AIC=862.645 for DFS compared to the reference model). In these 2 models, high expression of miR-487b is associated with a 67% decrease in the hazard of



death (HR=0.33, 95%CI=[0.14-0.79]) and 54% decrease in the hazard of relapse (HR=0.46, 95%CI=[0.25-0.84]). High expression of miR-516a-5p is associated with a 98% increase in the hazard of death (HR=1.98, 95%CI=[1.00-3.92]). A significant interaction term ( $p=0.013$  and  $0.0005$  for OS and DFS, respectively) leads to a better predictive ability represented by the lowest AIC (AIC=624.851 and 853.590 for OS and DFS, respectively) compared to all other models. miR-516a-5p was a statistically significant predictor of OS (HR=2.77, 95%CI=[1.25-6.15],  $p=0.0120$ ) and DFS (HR=2.05, 95%CI=[1.09-3.82],  $p=0.0248$ ) while miR-487b was significantly associated with both OS (HR=0.17, 95%CI=[0.05-0.55],  $p=0.0031$ ) and DFS (HR=0.22, 95%CI=[0.09-0.52],  $p=0.0005$ ) for high expression of miR-516a-5p (Supplementary table 2).

In addition, we evaluated the discriminant ability of the 2 models retained above, *i.e.*, including both miR-516a-5p and miR-487b (with or without interaction term) in comparing their time-dependent AUCs with that of the reference model. Table 3 represents the time-dependent AUC within the first 5 years (See Supplementary figure 2 for the time-dependent AUCs until 10 years of all models). The addition of the two miRNAs (with or without interaction) gave a better risk discrimination than did the reference model, as shown by larger AUC leading to a relative increase which ranges from 8% to 62%. The model with interaction indicated, however, a lower discriminant ability compared to the model without interaction (Supplementary Table 2).

We also performed Kaplan-Meier survival analyses by grouping the patients with low expression of miR-516a-5p whatever the expression level of miR-487b (Figure 2) as suggested by the Figure 1B. The survival curves of the 3 resulting groups were significantly different ( $p_{\text{trend}} < 0.0001$  for OS and DFS). In the low-risk group (high expression of the 2 miRNAs), OS was 98.1%, 94.2%, 94.2%, 94.2% at 1, 2, 3 and 5 years; in the intermediate-risk group (low expression of miR-516a-5p whatever the expression level of miR-487b), OS was 92.1%, 88.7%, 85.1%, 83.0% at 1, 2, 3 and 5 years; and in the high-risk group (high expression of miR-516a-5p and low expression of miR-487b), OS was 89.1%, 72.6%, 65.3%, 56.8% at 1, 2, 3 and 5 years. Similar results were observed for DFS. The adjunct of both miR-516a-5p and miR-487b, compared to the current risk factors, greatly improves the risk prediction as shown by a statistically significant discrimination of survival curves between the 3 risk-groups obtained from the subgroup analyses of patients with low- and high-risk defined by the standard risk factors ( $p_{\text{trend}} = 0.0003$  and  $0.0204$  for OS in low- and





high-risk, respectively and  $p_{\text{trend}} = 0.0016$  and  $0.0183$  for DFS in low- and high-risk, respectively) (Figure 2). The multivariable Cox model with this new predictor combining the 2 markers into 3 classes (low, intermediate and high) fitted as well as the model with an interaction term eliciting AIC=623.531 and 853.750 for OS and DFS, respectively. Therefore, this predictor remained globally statistically significant after controlling for age, stage and *MYCN* ( $p < 0.0001$  both for OS and DFS). The high-risk group was a significant predictor of OS (HR=6.05, 95%CI=[1.85-19.81],  $p=0.003$ ) and DFS (HR=4.62, 95%CI=[1.96-10.89],  $p=0.0005$ ) while the intermediate-risk group was only a significant predictor of DFS (2.76, 95%CI=[1.09-6.97],  $p=0.0314$ ) (Table 4). The subgroup analyses showed that the high-risk group remained a significant predictor of OS (HR=11.63, 95%CI=[1.53-88.61],  $p=0.0179$ ) and DFS (HR=4.50, 95%CI=[1.53-13.18],  $p=0.0061$ ) in current low-risk and significant or marginally significant in current high-risk group (HR=3.74, 95%CI=[0.89-15.72],  $p=0.0718$  for OS and HR=4.41, 95%CI=[1.06-18.44],  $p=0.0419$  for DFS) (Table 4). The intermediate-risk group, with a hazard ratio close to 2.5, was not a significant predictor for OS and DFS, both in the current low- and high-risk group, probably due to a lack of power (Table 4).

Overall, our findings demonstrate that the 2 markers, miR-487b and miR-516a-5p, proposed in this study improve the prediction of survival outcomes relative to the current risk factors.

## DISCUSSION

To increase accuracy of the standard neuroblastoma risk-stratification in using miRNAs as markers, two instrumental approaches may be used: either finding a global miRNA signature<sup>14</sup> or surveying expression of selected miRNAs<sup>26</sup>. In this study, we evaluated the potential of two miRNAs, miR-487b and miR-516a-5p, encoded by the two largest imprinted miRNA clusters, C14MC and C19MC, respectively. Based on the prognostic value of miR-487b and miR-516a-5p separately, we have generated a predictive model by combining these two markers. This model improves the predictive accuracy, as indicated by the greater AUC. The interaction between these two markers identifies three risk-groups: low [miR-516a-5p<sup>high</sup>/miR-487b<sup>high</sup>], high [miR-516a-5p<sup>high</sup>/miR-487b<sup>low</sup>], and intermediate (including both [miR-516a-5p<sup>low</sup>/miR-487b<sup>low</sup>] and



[miR-516a-5p<sup>low</sup>/miR-487b<sup>high</sup>]). In this regard, the new classification based on these two miRNA expression has a better discriminant ability than that of the standard classification.

New molecular markers have been searched to improve classification and prognosis of neuroblastoma. Several studies have examined the role of array-CGH analysis in neuroblastoma samples and have identified different genomic alteration patterns in this context<sup>5,6</sup>. Although some studies point out an improved accuracy for prognosis of neuroblastoma by array-CGH analysis, a large number of samples escape this classification. In the other hand, several reports have identified gene-expression patterns to predict the outcome of neuroblastoma patients<sup>3,27</sup>. Recently, Valentijn *et al.* defined a 157-gene signature that predict clinical outcome of neuroblastoma irrespective of *MYCN* amplification<sup>28</sup>. However the predictive accuracy of these two approaches (array-CGH and gene panel) in neuroblastoma remains to be validated in a clinical practice.

miRNAs have been identified as important prognostic markers in neuroblastoma over the last 5 years<sup>10-14</sup>. One advantage of miRNAs is their high stability as compared to mRNA that limite the clinic routine application of gene expression<sup>29</sup>. De Preter *et al.* evaluated the discriminant ability of miRNAs using a predictive statistical model with a 25 miRNA signature<sup>14</sup>. This signature provided a good performance in terms of classification with AUC equal to 0.74 and 0.72 for OS and DFS, respectively with a point date at 3 years. Using only two specific miRNAs, the performance of our simple predictive model is similar for OS (AUC=0.76) and less for DFS (AUC=0.67). The performance of our model increases slightly over time after 3 years. Noteworthy, our model enables to predict a poor outcome for patients with good standard markers. However additional independent studies are required to further validate the predictive role of these two miRNAs in neuroblastoma.

The evaluation of two miRNAs expression in daily clinical practice is realistic and feasible in an easy and rapid way using quantitative RT-PCR; not to mention this analysis can be done with a low number of cells such as that of fine needle aspirations obtained at bedside . Our results were obtained from tumour tissues with a malignant tumour cell content of  $\geq 60\%$ . In this respect, as for global genomic approaches (array-CGH and gene expression panel), the routine application of RT-PCR analysis in clinical practice might be considerably limited by stromal cells contamination. So the RT-PCR analysis must be



completed with single-cell methods, such as fluorescence *in situ* hybridization, to evaluate the results concordance and the clinical implications.

In summary, we developed a predictive model based on the expression of two miRNAs, miR-516a-5p and miR-487b, that distinguishes patients with events from those without event, with better discriminant ability than standard risk classification. Application of this model might provide better therapeutic management by paediatric clinicians. Besides neuroblastoma tumors, alterations of expression of either C14MC<sup>30-33</sup> or C19MC<sup>16-18</sup> are frequently found in many other human cancers. In the present study, we show that alterations of both clusters were associated with neuroblastoma events. It would be interesting to extend this observation to other human cancers.

## **TRANSLATIONAL RELEVANCE**

Neuroblastoma, the most common solid tumor of childhood, is characterized by the high variability of its clinical behavior ranging from spontaneous regression to rapid progression despite aggressive therapy. In the last decade, the pan-genomic approaches (array-CGH and gene expression signatures) have been used to improve prediction of patient outcome. In this study from a retrospective cohort of 231 patients, we were able to develop from multivariable Cox regressions using time-dependent area under curves, a statistical model including the current risk factors (age, stage and MYCN amplification). We found that two miRNAs, miR-487b and miR-516a-5p expression predict more accurately relapse and death with a greater performance. These two miRNAs are encoded by 14q32.31 and 19q13.41 loci, respectively, which are subject to parental imprinting.

Thus, expression combination of miR-487b and miR-516a-5p, biologically stable molecules, might be a surrogate prognostic marker able to improve stratification of neuroblastoma leading to a better treatment management.

## **ACKNOWLEDGEMENTS**

The authors thank Dr. Valérie Combaret for providing with total RNA material and Dr Evelyne May for invaluable discussion, scientific input and manuscript editing.

## **GRANT SUPPORT**

This study was supported by the Ligue contre le Cancer (Comités Oise et Montbéliard), Fédération Enfant et Santé (Société Française des Cancers de l'Enfant).



## **DISCLOSURE OF POTENTIAL CONFLICTS OF INTEREST**

No potential conflicts of interest were disclosed.

## **AUTHOR CONTRIBUTIONS**

Conception and design: JB and SDR

Development of methodology and acquisition of data: CHG and GLT

Analysis and interpretation of data: CHG, GLT, JB and SDR

Writing, review and/or revision of the manuscript: CHG, GLT, JB and SDR

Administrative, technical and material support: CHG, DVC and JB

Study supervision: PB, JB and SDR





## FIGURES ET TABLES

**Figure 1. (A)** Kaplan-Meier curves for overall survival (left) and disease-free survival (right) of the neuroblastoma cohort (n=231) for miR-516a-5p. MiRNA expression levels were converted into discrete variables by discriminating the samples into two classes (high and low expression), under or over the cut-off. **(B)** Kaplan-Meier curves for overall survival and disease-free survival of the neuroblastoma cohort (n=231) for the different combinations of miRNA expression: “miR-516a-5p<sup>high</sup>/miR-487b<sup>high</sup>”, “miR-516a-5p<sup>high</sup>/miR-487b<sup>low</sup>”, “miR-516a-5p<sup>low</sup>/miR-487b<sup>high</sup>”, and “miR-516a-5p<sup>low</sup>/miR-487b<sup>low</sup>”

**Figure 2.** Kaplan-Meier analysis of miR-516a-5p- and miR-487b based on 3 groups for overall survival (left) and disease-free survival (right) in **(A)** all, current **(B)** low- and **(C)** high-risk patients

**Table 1.** Description of patients and tissues (n=231)

**Table 2.** Cox model analyses for overall survival and disease-free survival in neuroblastoma patients (n=231)

**Table 3.** Area under the curve (Relative variation in %) at different times for different prognostic models including or not both miRNA and an interaction term controlling for the current risk factors in neuroblastoma patients (n=231)

**Table 4.** Hazard ratios (95%CI) of 3 new risk-subgroups in all, low- and high-risk neuroblastoma after controlling for current risk factors

## SUPPLEMENTARY INFORMATION

**Supplementary Figure 1.** Scatter-plots showing the statistical analysis of miR-516a-5p expression level in the neuroblastoma cohort (n=231) stratified in two groups, low-risk (blue, n=151) vs high-risk (red, n=80). Two-tailed Student t-test indicates significance between the two subgroups. Black bars inside the plots indicate the mean value of miRNA expression levels.

**Supplementary Figure 2.** Area under the curve (AUC) of different prognostic models applied to the neuroblastoma patients cohort (n=231).



**Supplementary Table 1.** Main characteristics of the 231 neuroblastoma patients and the expression levels of the selected miRNAs using qRT-PCR.

**Supplementary Table 2.** Multivariable Cox regression analyses and performance measurements of miRNA interaction prognostic models in neuroblastoma patients (n=231).



## REFERENCE LIST

1. Ambros, I. M., Benard, J., Boavida, M., Bown, N., Caron, H., Combaret, V., Couturier, J., Darnfors, C., Delattre, O., Freeman-Edward, J., Gambini, C., Gross, N., Hattinger, C. M., Luegmayr, A., Lunec, J., Martinsson, T., Mazzocco, K., Navarro, S., Noguera, R., O'Neill, S., Potschger, U., Rumpler, S., Speleman, F., Tonini, G. P., Valent, A., van Roy, N., Amann, G., De Bernardi, B., Kogner, P., Ladenstein, R., Michon, J., Pearson, A. D., and Ambros, P. F. Quality assessment of genetic markers used for therapy stratification. *J.Clin.Oncol.*, 21: 2077-2084, 2003.
2. Vermeulen, J., De Preter, K., Mestdagh, P., Laureys, G., Speleman, F., and Vandesompele, J. Predicting outcomes for children with neuroblastoma. *Discov.Med.*, 10: 29-36, 2010.
3. De Preter, K., Vermeulen, J., Brors, B., Delattre, O., Eggert, A., Fischer, M., Janoueix-Lerosey, I., Lavarino, C., Maris, J. M., Mora, J., Nakagawara, A., Oberthuer, A., Ohira, M., Schleiermacher, G., Schramm, A., Schulte, J. H., Wang, Q., Westermann, F., Speleman, F., and Vandesompele, J. Accurate outcome prediction in neuroblastoma across independent data sets using a multigene signature. *Clin.Cancer Res.*, 16: 1532-1541, 2010.
4. Maris, J. M. Recent advances in neuroblastoma. *N.Engl.J.Med.*, 362: 2202-2211, 2010.
5. Janoueix-Lerosey, I., Schleiermacher, G., Michels, E., Mosseri, V., Ribeiro, A., Lequin, D., Vermeulen, J., Couturier, J., Peuchmaur, M., Valent, A., Plantaz, D., Rubie, H., Valteau-Couanet, D., Thomas, C., Combaret, V., Rousseau, R., Eggert, A., Michon, J., Speleman, F., and Delattre, O. Overall genomic pattern is a predictor of outcome in neuroblastoma. *J.Clin.Oncol.*, 27: 1026-1033, 2009.
6. Ambros, I. M., Brunner, B., Aigner, G., Bedwell, C., Beiske, K., Benard, J., Bown, N., Combaret, V., Couturier, J., Defferrari, R., Gross, N., Jeison, M., Lunec, J., Marques, B., Martinsson, T., Mazzocco, K., Noguera, R., Schleiermacher, G., Speleman, F., Stallings, R., Tonini, G. P., Tweddle, D. A., Valent, A., Vicha, A., Roy, N. V., Villamon, E., Ziegler, A., Preuner, S., Drobnics, M., Ladenstein, R., Amann, G., Schuit, R. J., Potschger, U., and Ambros, P. F. A multilocus technique for risk evaluation of patients with neuroblastoma. *Clin.Cancer Res.*, 17: 792-804, 2011.



7. Bartel, D. P. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*, 136: 215-233, 2009.
8. Kasinski, A. L. and Slack, F. J. Epigenetics and genetics. MicroRNAs en route to the clinic: progress in validating and targeting microRNAs for cancer therapy. *Nat.Rev.Cancer*, 11: 849-864, 2011.
9. Wiemer, E. A. The role of microRNAs in cancer: no small matter. *Eur.J.Cancer*, 43: 1529-1544, 2007.
10. Chen, Y. and Stallings, R. L. Differential patterns of microRNA expression in neuroblastoma are correlated with prognosis, differentiation, and apoptosis. *Cancer Res.*, 67: 976-983, 2007.
11. Bray, I., Bryan, K., Prenter, S., Buckley, P. G., Foley, N. H., Murphy, D. M., Alcock, L., Mestdagh, P., Vandesompele, J., Speleman, F., London, W. B., McGrady, P. W., Higgins, D. G., O'Meara, A., O'Sullivan, M., and Stallings, R. L. Widespread dysregulation of MiRNAs by MYCN amplification and chromosomal imbalances in neuroblastoma: association of miRNA expression with survival. *PLoS.ONE.*, 4: e7850, 2009.
12. Schulte, J. H., Schowe, B., Mestdagh, P., Kaderali, L., Kalaghatgi, P., Schlierf, S., Vermeulen, J., Brockmeyer, B., Pajtler, K., Thor, T., De Preter, K., Speleman, F., Morik, K., Eggert, A., Vandesompele, J., and Schramm, A. Accurate prediction of neuroblastoma outcome based on miRNA expression profiles. *Int.J.Cancer*, 2010.
13. Lin, R. J., Lin, Y. C., Chen, J., Kuo, H. H., Chen, Y. Y., Diccianni, M. B., London, W. B., Chang, C. H., and Yu, A. L. microRNA signature and expression of Dicer and Drosha can predict prognosis and delineate risk groups in neuroblastoma. *Cancer Res.*, 70: 7841-7850, 2010.
14. De Preter, K., Mestdagh, P., Vermeulen, J., Zeka, F., Naranjo, A., Bray, I., Castel, V., Chen, C., Drozynska, E., Eggert, A., Hogarty, M. D., Izycka-Swieszewska, E., London, W. B., Noguera, R., Piqueras, M., Bryan, K., Schowe, B., van Sluis, P., Molenaar, J. J., Schramm, A., Schulte, J. H., Stallings, R. L., Versteeg, R., Laureys, G., van Roy, N., Speleman, F., and Vandesompele, J. miRNA expression profiling enables risk stratification in archived and fresh neuroblastoma tumor samples. *Clin.Cancer Res.*, 17: 7684-7692, 2011.





15. Gattolliat, C. H., Thomas, L., Ciafre, S. A., Meurice, G., Le Teuff, G., Job, B., Richon, C., Combaret, V., Dessen, P., Valteau-Couanet, D., May, E., Busson, P., Douc-Rasy, S., and Benard, J. Expression of miR-487b and miR-410 encoded by 14q32.31 locus is a prognostic marker in neuroblastoma. *Br.J.Cancer*, 105: 1352-1361, 2011.
16. Li, M., Lee, K. F., Lu, Y., Clarke, I., Shih, D., Eberhart, C., Collins, V. P., Van Meter, T., Picard, D., Zhou, L., Boutros, P. C., Modena, P., Liang, M. L., Scherer, S. W., Bouffet, E., Rutka, J. T., Pomeroy, S. L., Lau, C. C., Taylor, M. D., Gajjar, A., Dirks, P. B., Hawkins, C. E., and Huang, A. Frequent amplification of a chr19q13.41 microRNA polycistron in aggressive primitive neuroectodermal brain tumors. *Cancer Cell*, 16: 533-546, 2009.
17. Rippe, V., Dittberner, L., Lorenz, V. N., Drieschner, N., Nimzyk, R., Sendt, W., Junker, K., Belge, G., and Bullerdiek, J. The two stem cell microRNA gene clusters C19MC and miR-371-3 are activated by specific chromosomal rearrangements in a subgroup of thyroid adenomas. *PLoS.ONE.*, 5: e9485, 2010.
18. Augello, C., Vaira, V., Caruso, L., Destro, A., Maggioni, M., Park, Y. N., Montorsi, M., Santambrogio, R., Roncalli, M., and Bosari, S. MicroRNA profiling of hepatocarcinogenesis identifies C19MC cluster as a novel prognostic biomarker in hepatocellular carcinoma. *Liver Int.*, 32: 772-782, 2012.
19. Brodeur, G. M. Neuroblastoma: biological insights into a clinical enigma. *Nat.Rev.Cancer*, 3: 203-216, 2003.
20. Benard, J., Raguenez, G., Kauffmann, A., Valent, A., Ripoche, H., Joulin, V., Job, B., Danglot, G., Cantais, S., Robert, T., Terrier-Lacombe, M. J., Chassevent, A., Koscielny, S., Fischer, M., Berthold, F., Lipinski, M., Tursz, T., Dessen, P., Lazar, V., and Valteau-Couanet, D. MYCN-non-amplified metastatic neuroblastoma with good prognosis and spontaneous regression: a molecular portrait of stage 4S. *Mol.Oncol.*, 2: 261-271, 2008.
21. Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J. A., Hellems, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M. W., Shipley, G. L., Vandesompele, J., and Wittwer, C. T. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin.Chem.*, 55: 611-622, 2009.



22. Livak, K. J. and Schmittgen, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-(\Delta\Delta C(T))}$  Method. *Methods*, 25: 402-408, 2001.
23. Bettan-Renaud, L., Bayle, C., Teyssier, J. R., and Benard, J. Stability of phenotypic and genotypic traits during the establishment of a human neuroblastoma cell line, IGR-N-835. *Int.J.Cancer*, 44: 460-466, 1989.
24. Schemper, M., Wakounig, S., and Heinze, G. The estimation of average hazard ratios by weighted Cox regression. *Stat.Med.*, 28: 2473-2489, 2009.
25. Heagerty, P. J., Lumley, T., and Pepe, M. S. Time-dependent ROC curves for censored survival data and a diagnostic marker. *Biometrics*, 56: 337-344, 2000.
26. Keutgen, X. M., Filicori, F., Crowley, M. J., Wang, Y., Scognamiglio, T., Hoda, R., Buitrago, D., Cooper, D., Zeiger, M. A., Zarnegar, R., Elemento, O., and Fahey, T. J., III A panel of four miRNAs accurately differentiates malignant from benign indeterminate thyroid lesions on fine needle aspiration. *Clin.Cancer Res.*, 18: 2032-2038, 2012.
27. Oberthuer, A., Hero, B., Berthold, F., Juraeva, D., Faldum, A., Kahlert, Y., Asgharzadeh, S., Seeger, R., Scaruffi, P., Tonini, G. P., Janoueix-Lerosey, I., Delattre, O., Schleiermacher, G., Vandesompele, J., Vermeulen, J., Speleman, F., Noguera, R., Piqueras, M., Benard, J., Valent, A., Avigad, S., Yaniv, I., Weber, A., Christiansen, H., Grundy, R. G., Schardt, K., Schwab, M., Eils, R., Warnat, P., Kaderali, L., Simon, T., Decarolis, B., Theissen, J., Westermann, F., Brors, B., and Fischer, M. Prognostic impact of gene expression-based classification for neuroblastoma. *J.Clin.Oncol.*, 28: 3506-3515, 2010.
28. Valentijn, L. J., Koster, J., Haneveld, F., Aissa, R. A., van Sluis, P., Broekmans, M. E., Molenaar, J. J., van Nes, J., and Versteeg, R. Functional MYCN signature predicts outcome of neuroblastoma irrespective of MYCN amplification. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 109: 19190-19195, 2012.
29. Fischer, M. and Berthold, F. The role of complex genomic alterations in neuroblastoma risk estimation. *Genome Med.*, 2: 31, 2010.
30. Lavon, I., Zrihan, D., Granit, A., Einstein, O., Fainstein, N., Cohen, M. A., Cohen, M. A., Zelikovitch, B., Shoshan, Y., Spektor, S., Reubinoff, B. E., Felig, Y., Gerlitz, O.,



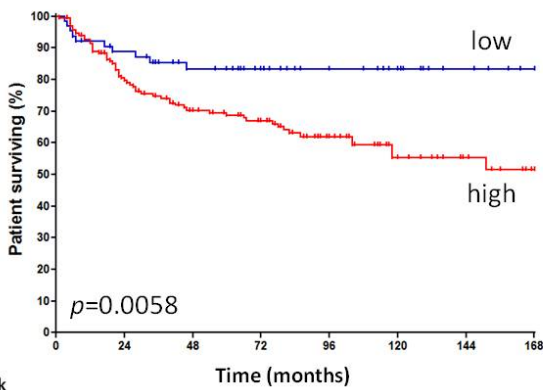
- Ben Hur, T., Smith, Y., and Siegal, T. Gliomas display a microRNA expression profile reminiscent of neural precursor cells. *Neuro.Oncol.*, 12: 422-433, 2010.
31. Zehavi, L., Avraham, R., Barzilai, A., Bar-Ilan, D., Navon, R., Sidi, Y., Avni, D., and Leibowitz-Amit, R. Silencing of a large microRNA cluster on human chromosome 14q32 in melanoma: biological effects of mir-376a and mir-376c on insulin growth factor 1 receptor. *Mol.Cancer*, 11: 44, 2012.
  32. Sarver, A. L., Thayanithy, V., Scott, M. C., Cleton-Jansen, A. M., Hogendoorn, P. C., Modiano, J. F., and Subramanian, S. MicroRNAs at the human 14q32 locus have prognostic significance in osteosarcoma. *Orphanet.J.Rare.Dis.*, 8: 7, 2013.
  33. Haller, F., von Heydebreck, A., Zhang, J. D., Gunawan, B., Langer, C., Ramadori, G., Wiemann, S., and Sahin, O. Localization- and mutation-dependent microRNA (miRNA) expression signatures in gastrointestinal stromal tumours (GISTs), with a cluster of co-expressed miRNAs located at 14q32.31. *J.Pathol.*, 220: 71-86, 2010.



Figure 1

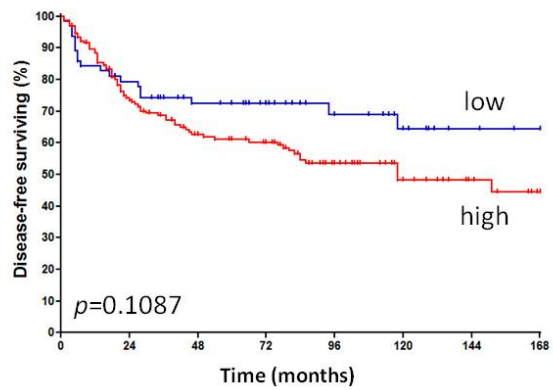
**A – miR-516a-5p**

**Overall survival**



Number at risk	Time (months)							
516 <sup>low</sup>	64	51	39	32	24	19	11	7
516 <sup>high</sup>	167	118	91	75	51	27	15	8

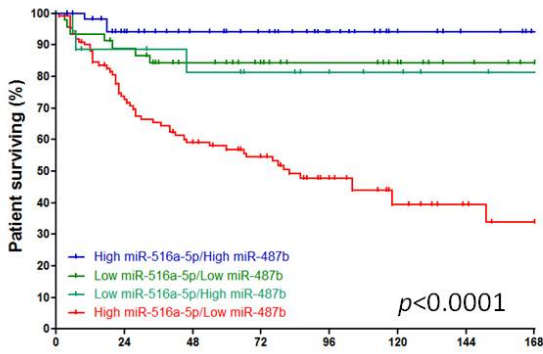
**Disease-free survival**



Number at risk	Time (months)							
low	64	47	35	29	20	14	8	6
high	167	109	82	71	46	25	14	8

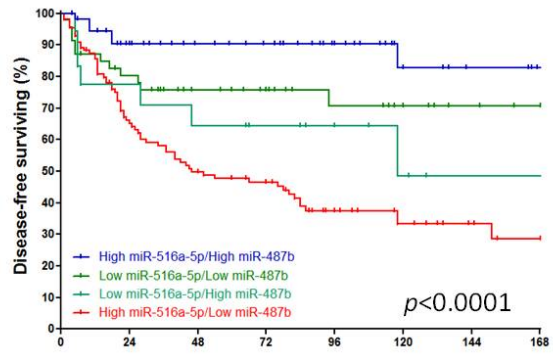
**B - Combinaison**

**Overall Survival**



Number at risk	Time (months)							
516 <sup>High</sup> /487 <sup>High</sup>	55	45	36	30	22	12	7	3
516 <sup>Low</sup> /487 <sup>Low</sup>	46	38	28	23	17	14	9	6
516 <sup>Low</sup> /487 <sup>High</sup>	18	13	11	9	7	5	2	1
516 <sup>High</sup> /487 <sup>Low</sup>	112	73	55	45	29	15	8	5

**Disease-Free Survival**



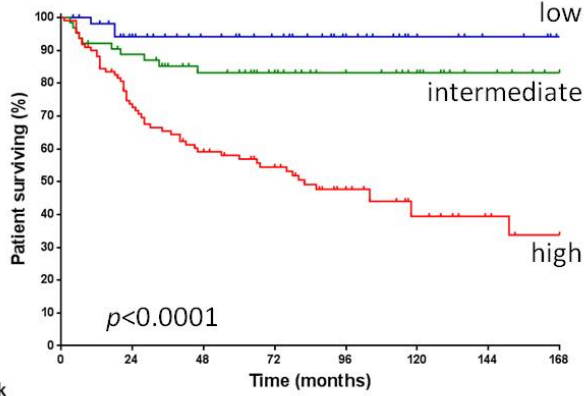
Number at risk	Time (months)							
High miR-516a-5p/High miR-487b	55	43	35	30	22	11	6	3
Low miR-516a-5p/Low miR-487b	46	35	25	21	14	11	7	5
Low miR-516a-5p/High miR-487b	18	12	10	8	6	3	2	1
High miR-516a-5p/Low miR-487b	112	66	48	41	24	14	8	5



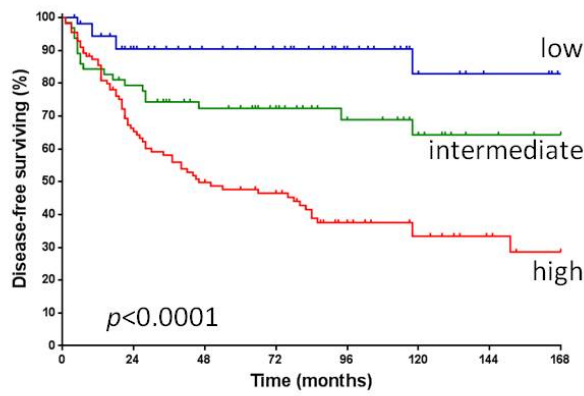


Figure 2.

**A – All neuroblastoma**

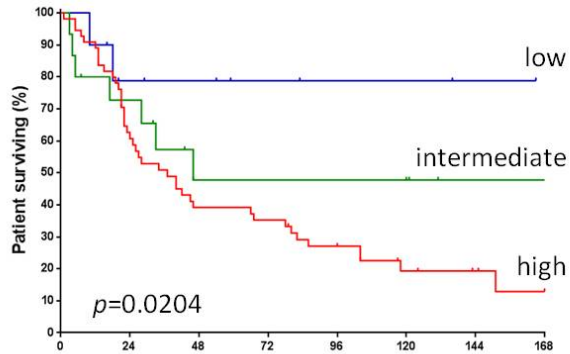


Number at risk	Time (months)							
	0	24	48	72	96	120	144	168
Low	55	45	36	30	22	12	7	3
Intermediate	64	51	39	32	24	19	11	7
High	112	73	55	45	29	15	8	5

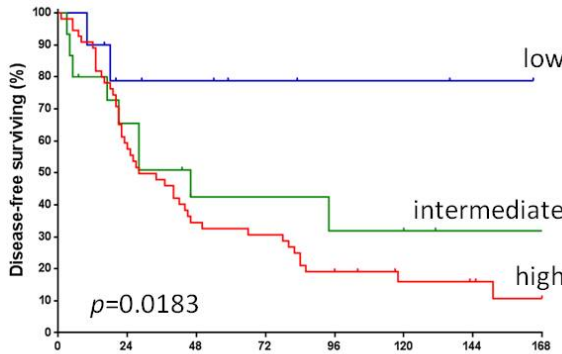


Number at risk	Time (months)							
	0	24	48	72	96	120	144	168
Low	55	43	34	30	22	11	6	3
Intermediate	64	47	35	29	20	14	8	6
High	112	66	48	41	26	14	8	5

**B - High-Risk**

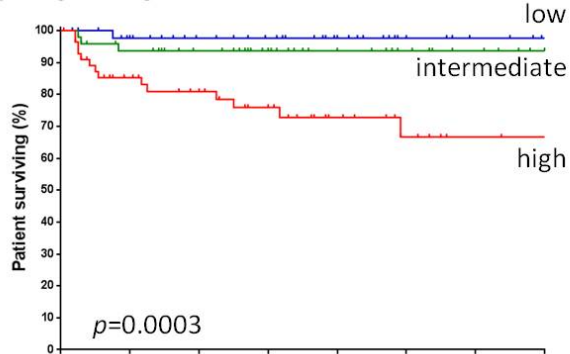


Number at risk	Time (months)							
	0	24	48	72	96	120	144	168
Low	10	6	5	3	2	2	1	0
Intermediate	15	10	4	4	4	4	1	1
High	55	32	20	18	13	6	4	2

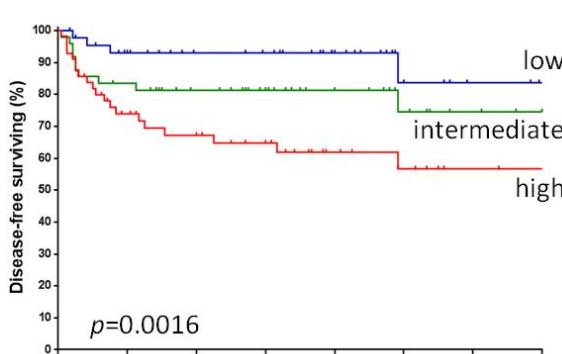


Number at risk	Time (months)							
	0	24	48	72	96	120	144	168
Low	10	6	5	3	2	2	1	0
Intermediate	15	9	6	4	3	3	1	1
High	55	31	18	16	10	5	4	2

**C - Low-Risk**



Number at risk	Time (months)							
	0	24	48	72	96	120	144	168
Low	45	39	31	27	20	9	5	3
Intermediate	49	41	35	28	20	15	10	6
High	57	41	35	27	16	9	4	3



Number at risk	Time (months)							
	0	24	48	72	96	120	144	168
Low	45	37	29	27	20	9	5	3
Intermediate	49	38	31	25	17	11	7	5
High	57	35	30	25	14	9	4	3



**Table 1.** Description of patients and tissues (n=231)

Stage	
1	34 (15%)
2	47 (20%)
3	50 (22%)
4	81 (35%)
4S	19 (8%)
Age at diagnosis	
<18 months	110 (48%)
≥18 months	121 (52%)
<i>MYCN</i> status	
non-amplified	201 (87%)
amplified	30 (13%)
Standard risk-stratification	
low	151 (65%)
high	80 (35%)



**Table 2.** Cox models analyses for overall survival and disease-free survival in neuroblastoma patients (n=231)

Characteristics		Without miRNA	With miR-487b	With miR-516a-5p	With both miRNAs
<b>Overall Survival</b>					
Age at diagnosis	<18 months (reference)	1.000	1.000	1.000	1.000
	≥18 months	2.037 [1.077-3.850]	1.929 [1.020-3.648]	1.917 [1.009-3.644]	1.817 [0.954-3.462]
INSS Stage	1, 2, 3, 4S (reference)	1.000	1.000	1.000	1.000
	4	4.142 [2.231-7.688]	3.550 [1.903-6.624]	4.026 [2.156-7.519]	3.304 [1.747-6.247]
MYCN status	not-amplified (reference)	1.000	1.000	1.000	1.000
	amplified	1.813 [1.045-3.145]	1.552 [0.890-2.707]	1.837 [1.056-3.196]	1.570 [0.898-2.745]
miR-487b	low (reference)		1.000		1.000
	high		0.332 [0.140-0.789]		0.313 [0.131-0.746]
mir-516a-5p	low (reference)			1.000	1.000
	high			1.851 [0.940-3.642]	1.983 [1.004-3.918]
<b>Performance measurements</b>	-2Log(likelihood) (AIC)	631.527 (637.527)	623.498 (631.498)	627.891 (635.891)	619.002 (629.002)
<b>Disease-Free Survival</b>					
Age at diagnosis	<18 months (reference)	1.000	1.000	1.000	1.000
	≥18 months	1.547 [0.931-2.573]	1.482 [0.891-2.466]	1.501 [0.898-2.509]	1.424 [0.851-2.383]
INSS Stage	1, 2, 3, 4S (reference)	1.000	1.000	1.000	1.000
	4	2.686 [1.631-4.422]	2.376 [1.435-3.933]	2.676 [1.622-4.413]	2.329 [1.400-3.875]
MYCN status	not-amplified (reference)	1.000	1.000	1.000	1.000
	amplified	1.427 [0.841-2.422]	1.252 [0.734-2.135]	1.430 [0.842-2.427]	1.249 [0.732-2.132]
miR-487b	low (reference)		1.000		1.000
	high		0.455 [0.247-0.839]		0.440 [0.238-0.815]
mir-516a-5p	low (reference)			1.000	1.000
	high			1.239 [0.741-2.071]	1.334 [0.795-2.239]
<b>Performance measurements</b>	-2Log(likelihood) (AIC)	861.985 (867.985)	854.645 (862.645)	861.293 (869.293)	853.392 (863.392)



**Table 3.** Area under the curve (Relative variation in %) at different times for different prognostic models including or not both miRNA and an interaction term controlling for the current risk factors in neuroblastoma patients (n=231)

Time (months)	12	24	36	48	60
<b><i>Overall Survival</i></b>					
without miRNA	0.45	0.47	0.49	0.56	0.56
with both miRNAs	0.64 (42%)	0.75 (62%)	0.76 (54%)	0.79 (43%)	0.79 (42%)
miRNA interaction	0.59 (31%)	0.70 (51%)	0.71 (43%)	0.75 (36%)	0.75 (35%)
<b><i>Disease-Free Survival</i></b>					
without miRNA	0.46	0.46	0.49	0.56	0.57
with both miRNAs	0.52 (13%)	0.64 (40%)	0.67 (35%)	0.71 (27%)	0.71 (26%)
miRNA interaction	0.49 (8%)	0.62 (35%)	0.67 (34%)	0.73 (29%)	0.74 (29%)



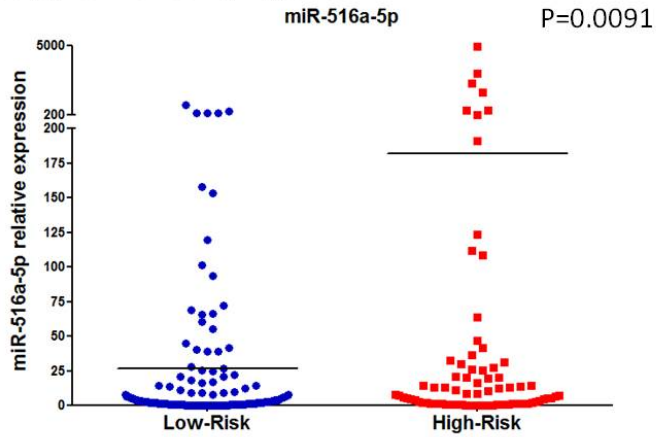


**Table 4.** Hazard ratios [95% CI] of 3 new risk-subgroups in all, low- and high-risk neuroblastoma after controlling for current risk factors

	All	Low-Risk	High-Risk
<b><i>Overall survival</i></b>			
Low	1.000	1.000	1.000
Intermediate	2.509 [0.684-9.198]	2.742 [0.280-26.847]	2.189 [0.440-10.882]
High	6.047 [1.846-19.813]	11.625 [1.525-88.613]	3.740 [0.890-15.718]
-2Log(likelihood) (AIC)	613.531 (623.531)		
<b><i>Disease-free survival</i></b>			
Low	1.000	1.000	1.000
Intermediate	2.762 [1.095-6.966]	2.423 [0.750-7.826]	3.152 [0.665-14.951]
High	4.622 [1.961-10.895]	4.497 [1.534-13.182]	4.413 [1.056-18.440]
-2Log(likelihood) (AIC)	843.750 (853.750)		

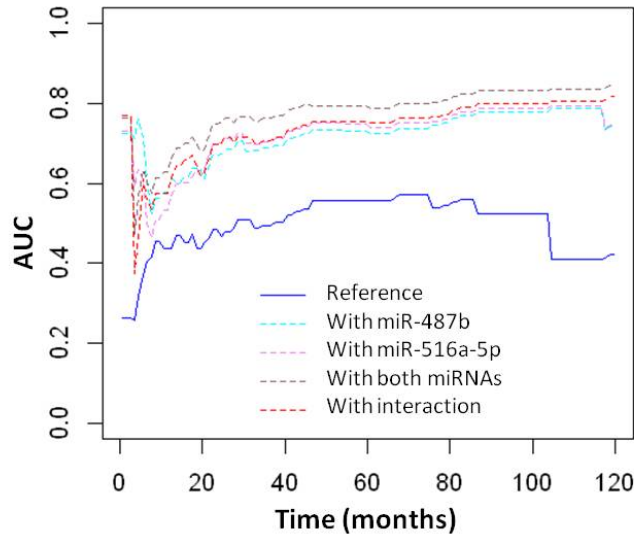


### Supplementary Figure 1

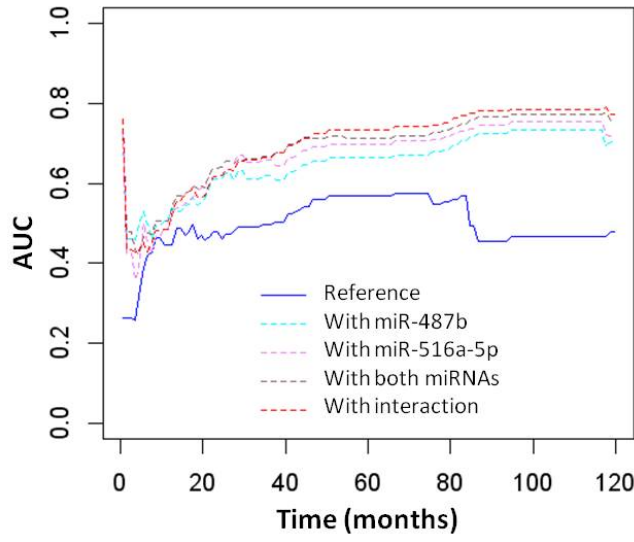


### Supplementary Figure 2

#### Overall Survival



#### Disease-Free Survival





**Supplementary Table 1.** Main characteristics of the 231 neuroblastoma patients and the expression levels of the selected miRNAs using qRT-PCR.

Patient Code	Standard Risk-Stratification	Age at diagnosis (months)	INSS Stage	MYCN amplification	Disease-Free Survival (months)	Disease status	Overall Survival (months)	Present status	miR-516a-5p expression levels	miR-487b expression levels	New Risk-Subgroups
101	Low	13	3	no	102	alive	102	alive	2,60	0,65	High
102	High	43	4	no	255	alive	255	alive	0,14	0,19	Intermediate
104	High	35	4	yes	5	DoD	5	DoD	0,57	0,41	Intermediate
105	High	42	4	yes	13	DoD	13	DoD	19,42	0,56	High
109	Low	2	2	no	74	alive	74	alive	2,54	0,69	High
110	High	58	4	no	22	DoD	22	DoD	1,16	0,29	High
118	Low	8	2	no	122	alive	122	alive	0,84	2,84	Intermediate
153	Low	6	1	no	153	alive	153	alive	1,79	0,01	High
158	High	54	4	no	40	DoD	40	DoD	4,42	0,44	High
159	High	54	4	no	22	DoD	22	DoD	191,00	0,72	High
162	Low	5	3	no	136	alive	136	alive	1,25	1,36	Low
163	Low	24	3	no	114	alive	114	alive	1,64	1,55	Low
164	Low	4	4S	no	159	alive	159	alive	0,14	0,10	Intermediate
171	High	42	4	no	34	DoD	34	DoD	5,97	0,02	High
181	High	24	4	yes	131	alive	131	alive	0,97	0,10	Intermediate
182	Low	4	4S	no	81	alive	81	alive	0,39	0,21	Intermediate
207	Low	6	3	no	172	alive	172	alive	2,03	0,68	High
209	High	12	4	yes	15	DoD	15	DoD	1,64	0,23	High
217	Low	12	3	no	25	alive	25	alive	5,41	3,37	Low
227	Low	2	4S	no	183	alive	183	alive	0,09	0,02	Intermediate
232	Low	12	4	no	84	alive	84	alive	0,10	1,10	Intermediate
235	Low	28	3	no	6	DoD	6	DoD	60,40	0,03	High
239	Low	0	4S	no	128	alive	128	alive	0,37	3,27	Intermediate
245	Low	0	4S	no	108	alive	108	alive	0,18	1,30	Intermediate
246	High	61	4	no	45	DoD	45	DoD	8,50	0,86	High
260	High	36	4	no	13	DoD	13	DoD	20,40	0,08	High
261	Low	36	3	no	118	DoD	118	DoD	21,13	0,12	High
291	High	92	4	no	151	DoD	151	DoD	5,51	0,01	High
293	Low	5	1	no	221	alive	221	alive	0,44	0,05	Intermediate
297	Low	8	2	no	118	relapse	152	alive	0,03	1,12	Intermediate
299	High	42	4	no	46	DoD	46	DoD	13,12	0,28	High
300	High	36	4	no	4	DoD	4	DoD	0,46	0,08	Intermediate
301	High	49	4	yes	18	DoD	18	DoD	8,33	0,30	High
302	High	15	3	yes	29	alive	29	alive	27,27	1,65	Low
305	High	16	3	yes	19	DoD	19	DoD	30,10	0,10	High
307	High	38	4	yes	82	DoD	82	DoD	535,05	0,53	High
317	Low	7	4	no	41	alive	41	alive	0,00	0,42	Intermediate
319	Low	4	4	no	12	DoD	12	DoD	24,92	0,99	High
326	Low	1	1	no	35	alive	35	alive	0,23	0,48	Intermediate
331	High	19	4	yes	168	alive	168	alive	2,80	0,01	High
343	Low	2	2	no	5	relapse	122	alive	0,06	1,24	Intermediate
358	High	66	4	yes	21	DoD	21	DoD	123,74	0,04	High
373	Low	33	3	no	124	alive	124	alive	1,33	0,18	High
376	Low	79	1	no	91	alive	91	alive	3,64	1,56	Low
389	Low	20	3	no	181	alive	181	alive	2,25	3,81	Low
390	Low	80	2	no	1	alive	1	alive	3,38	0,43	High
397	Low	15	1	no	70	alive	70	alive	0,09	0,31	Intermediate
400	Low	2	4	no	76	DoD	76	DoD	101,56	0,05	High
403	Low	4	3	no	66	alive	66	alive	0,97	1,05	Intermediate
405	Low	8	3	no	6	alive	6	alive	0,99	1,03	Intermediate
411	High	73	4	yes	13	DoD	13	DoD	31,31	0,43	High
414	High	7	3	yes	145	alive	145	alive	2,08	0,43	High
418	High	4	4	yes	1	DoD	1	DoD	64,00	0,85	High
424	Low	0	4S	no	134	alive	134	alive	40,14	2,07	Low
441	Low	2	2	no	176	alive	176	alive	0,14	1,49	Intermediate
443	High	73	4	no	118	DoD	118	DoD	2,62	1,00	High
444	Low	22	3	no	214	alive	214	alive	7,61	3,46	Low
445	Low	14	2	no	168	alive	168	alive	0,78	0,66	Intermediate
449	Low	153	3	no	13	DoD	13	DoD	1,93	0,37	High
459	Low	6	3	no	118	relapse	156	alive	1,30	1,08	Low
471	Low	83	3	no	6	alive	6	alive	39,09	2,48	Low
499	High	62	3	yes	3	DoD	3	DoD	0,16	0,24	Intermediate
500	High	32	4	no	165	alive	165	alive	3,77	1,32	Low
511	Low	13	3	no	7	alive	7	alive	0,66	2,22	Intermediate
513	Low	40	2	no	79	alive	79	alive	7,54	0,01	High
518	Low	13	2	no	113	alive	113	alive	0,55	0,99	Intermediate
528	Low	2	4S	no	82	alive	82	alive	55,51	0,57	High
530	High	62	4	no	13	alive	13	alive	1,37	0,42	High
542	Low	45	3	no	37	relapse	41	alive	1,07	0,00	High
547	Low	105	2	no	112	alive	112	alive	2,69	5,69	Low
553	High	109	4	no	80	DoD	80	DoD	1,21	0,02	High
559	Low	43	3	no	27	relapse	200	alive	0,48	0,02	Intermediate
565	Low	1	1	no	170	alive	170	alive	1,07	0,54	High
569	High	42	4	yes	120	alive	120	alive	0,03	0,27	Intermediate
576	Low	17	1	no	142	alive	142	alive	1,51	2,80	Low
583	High	39	2	yes	21	DoD	33	DoD	0,67	0,30	Intermediate
584	High	20	4	no	169	alive	169	alive	1,17	0,07	High
588	Low	42	2	no	117	alive	117	alive	18,08	6,01	Low
593	Low	9	4S	no	88	alive	88	alive	3,68	0,81	High
594	Low	47	3	no	147	alive	147	alive	0,02	0,02	Intermediate



595	High	54	4	no	42	DoD	42	DoD	111,67	0,14	High
600	High	20	4	yes	7	DoD	7	DoD	41,45	0,05	High
605	High	30	4	no	94	relapse	121	alive	0,61	0,00	Intermediate
612	Low	73	1	no	54	DoD	54	DoD	11,00	0,46	High
613	Low	4	2	no	96	alive	96	alive	0,33	1,73	Intermediate
623	High	50	4	no	26	DoD	26	DoD	7,81	0,88	High
624	Low	30	3	no	164	alive	164	alive	72,14	4,78	Low
645	High	25	2	yes	7	alive	7	alive	0,00	0,17	Intermediate
646	Low	4	4S	no	50	alive	50	alive	21,05	0,03	High
650	Low	47	1	no	112	alive	112	alive	157,63	13,28	Low
663	Low	23	1	no	118	alive	118	alive	39,31	0,56	High
664	Low	3	1	no	74	alive	74	alive	9,99	0,93	High
667	High	54	4	no	21	DoD	21	DoD	46,70	0,78	High
670	Low	8	2	no	16	DoD	60	DoD	1,87	0,27	High
671	Low	48	3	no	14	relapse	20	alive	0,84	0,57	Intermediate
672	High	60	4	yes	12	DoD	12	DoD	13,09	0,18	High
680	Low	23	1	no	36	alive	36	alive	0,40	0,03	Intermediate
692	Low	63	1	no	5	DoD	5	DoD	14,43	0,00	High
703	High	42	4	no	136	alive	136	alive	12,15	1,61	Low
705	Low	19	2	no	56	alive	56	alive	0,31	0,00	Intermediate
712	Low	25	2	no	7	alive	7	alive	5,30	0,16	High
723	Low	26	2	no	24	alive	24	alive	4,53	1,15	Low
739	High	25	3	yes	5	DoD	5	DoD	16,46	0,10	High
741	Low	2	1	no	114	alive	114	alive	1,10	1,14	Low
751	Low	14	3	no	179	alive	179	alive	2,38	1,08	Low
758	Low	16	2	no	167	alive	167	alive	2,00	2,07	Low
760	Low	3	1	no	75	alive	75	alive	4,05	1,43	Low
773	Low	2	4S	no	177	alive	177	alive	0,01	0,37	Intermediate
785	Low	14	3	no	105	alive	105	alive	2,61	1,04	Low
802	High	98	4	no	17	DoD	17	DoD	0,22	0,01	Intermediate
804	Low	21	3	no	30	DoD	30	DoD	5,89	0,62	High
805	Low	1	2	no	129	alive	129	alive	0,37	0,01	Intermediate
824	Low	18	2	no	47	alive	47	alive	14,06	1,24	Low
860	Low	5	3	no	120	alive	120	alive	1,47	1,09	Low
872	High	58	4	yes	78	DoD	78	DoD	13,21	0,28	High
888	Low	0	3	no	6	relapse	9	alive	0,78	2,01	Intermediate
930	Low	1	2	no	73	alive	73	alive	0,37	0,03	Intermediate
933	Low	14	3	no	181	alive	181	alive	1,30	0,25	High
944	High	43	4	no	23	DoD	23	DoD	3,25	0,38	High
947	Low	1	4S	no	116	alive	116	alive	2,80	3,27	Low
966	High	2	1	yes	117	alive	117	alive	481,62	0,76	High
968	Low	5	1	no	25	alive	25	alive	1,23	0,84	High
979	Low	31	3	no	7	DoD	7	DoD	0,20	4,07	Intermediate
982	High	60	4	no	37	DoD	37	DoD	25,92	0,11	High
1030	High	31	4	yes	104	alive	104	alive	36,42	0,17	High
1056	Low	31	3	no	7	DoD	7	DoD	1,75	0,23	High
1061	Low	0	1	no	136	alive	136	alive	0,60	0,77	Intermediate
1070	High	43	4	no	27	DoD	27	DoD	1,51	0,61	High
1078	Low	9	4S	no	6	DoD	6	DoD	0,21	1,76	Intermediate
1090	Low	9	4S	no	13	alive	13	alive	16,49	1,09	Low
1099	High	43	4	no	96	alive	96	alive	1,00	0,21	High
1116	High	9	4	yes	84	DoD	104	DoD	4,90	0,00	High
1146	High	40	4	no	16	relapse	19	alive	7,02	0,31	High
1150	Low	21	1	no	9	alive	9	alive	7,70	0,60	High
1162	High	23	4	yes	104	alive	104	alive	1,95	0,00	High
1176	Low	7	2	no	100	alive	100	alive	3,31	1,62	Low
1196	Low	2	3	no	86	alive	86	alive	0,84	1,13	Intermediate
1271	High	117	4	no	28	DoD	28	DoD	10,60	0,03	High
1309	High	83	4	no	10	DoD	10	DoD	2363,44	4,40	Low
1320	Low	10	4	no	18	DoD	18	DoD	68,79	2,38	Low
1325	Low	14	1	no	134	alive	134	alive	119,56	0,07	High
1333	Low	16	2	no	92	alive	92	alive	65,55	1,31	Low
1352	Low	0	4S	no	35	alive	35	alive	8,97	1,29	Low
1355	Low	202	1	no	132	alive	132	alive	27,84	0,88	High
1357	Low	3	4	no	88	alive	88	alive	308,24	3,40	Low
1358	Low	202	3	no	5	DoD	20	DoD	0,72	0,08	Intermediate
1364	High	32	4	no	13	relapse	124	alive	20,48	0,06	High
1365	High	37	4	no	143	alive	143	alive	1,65	0,26	High
1389	Low	4	4S	no	19	alive	19	alive	0,91	0,35	Intermediate
1392	Low	1	2	no	1	relapse	113	alive	6,10	0,67	High
1415	High	131	4	no	46	DoD	46	DoD	0,05	1,67	Intermediate
1420	Low	2	4	no	46	alive	46	alive	0,42	0,00	Intermediate
1427	Low	10	3	no	128	alive	128	alive	4,40	0,64	High
1429	Low	10	3	no	118	alive	118	alive	1,02	0,46	High
1441	High	77	4	no	28	DoD	28	DoD	0,79	0,80	Intermediate
1456	Low	10	4	no	75	alive	75	alive	0,29	0,41	Intermediate
1501	Low	29	2	no	92	alive	92	alive	1,09	0,42	High
1513	Low	90	3	no	128	alive	128	alive	4,11	0,90	High
1529	Low	142	2	no	103	alive	103	alive	5,51	1,71	Low
1536	High	90	4	yes	5	DoD	5	DoD	4939,71	0,27	High
1546	Low	5	2	no	96	alive	96	alive	303,57	9,67	Low
1551	High	65	4	no	66	DoD	66	DoD	11,45	0,92	High
1565	High	42	4	no	20	DoD	20	DoD	6,59	0,59	High
1571	Low	48	2	no	117	alive	117	alive	0,17	0,09	Intermediate





1582	Low	5	2	no	79	alive	79	alive	0,71	0,84	Intermediate
1583	Low	6	3	no	64	alive	64	alive	0,70	1,00	Intermediate
1588	Low	11	3	no	115	alive	115	alive	0,29	0,39	Intermediate
1656	Low	142	2	no	65	alive	65	alive	6,46	0,72	High
1657	High	25	4	no	21	DoD	21	DoD	14,71	0,31	High
1659	Low	101	2	no	98	alive	98	alive	22,03	0,71	High
1675	Low	35	2	no	81	alive	81	alive	0,41	0,01	Intermediate
1710	High	64	4	no	44	DoD	67	DoD	5,17	0,62	High
1736	High	48	4	no	54	alive	54	alive	7,53	1,43	Low
1741	High	35	4	no	59	alive	59	alive	3031,32	1,83	Low
1780	Low	30	1	no	78	alive	78	alive	2,74	1,31	Low
1782	High	297	4	no	8	DoD	8	DoD	1735,88	0,25	High
1871	High	48	4	no	25	DoD	25	DoD	1,98	0,82	High
1893	Low	50	1	no	32	alive	32	alive	0,19	0,04	Intermediate
1900	High	177	4	no	40	DoD	40	DoD	211,58	0,45	High
1906	High	29	4	no	18	DoD	18	DoD	32,53	1,28	Low
1923	Low	6	1	no	65	alive	65	alive	322,77	1,05	Low
1976	High	24	4	no	86	DoD	86	DoD	5,24	0,73	High
1983	Low	2	3	no	93	alive	93	alive	6,85	0,01	High
1990	Low	1	1	no	95	alive	95	alive	8,20	1,13	Low
1998	Low	2	4	no	10	DoD	10	DoD	25,39	0,09	High
2004	High	1	4	yes	24	DoD	24	DoD	1,45	0,02	High
2040	Low	11	2	no	65	alive	65	alive	0,69	1,75	Intermediate
2076	High	7	2	yes	83	alive	83	alive	108,70	2,13	Low
2096	Low	1	4S	no	72	alive	72	alive	1,31	0,50	High
2108	Low	2	2	no	87	alive	87	alive	2,03	0,02	High
2122	Low	40	3	no	48	alive	48	alive	1,28	0,83	High
2160	Low	6	4S	no	82	alive	82	alive	2,03	0,61	High
2166	Low	27	1	no	71	alive	71	alive	14,46	1,04	Low
2173	Low	6	1	no	27	alive	27	alive	1,95	0,69	High
2192	Low	3	1	no	77	alive	77	alive	9,21	2,49	Low
2204	High	32	4	no	50	relapse	79	alive	14,52	0,56	High
2232	High	8	4	yes	84	DoD	104	DoD	20,60	0,03	High
2247	Low	15	4	no	72	alive	72	alive	0,23	0,94	Intermediate
2276	Low	2	4	no	60	alive	60	alive	2,96	0,43	High
2278	Low	15	4S	no	6	DoD	6	DoD	896,49	0,63	High
2305	Low	15	1	no	60	alive	60	alive	0,96	0,72	Intermediate
2342	Low	11	3	no	10	relapse	60	alive	422,49	1,55	Low
2400	High	85	4	no	20	DoD	22	DoD	13,82	0,71	High
2419	Low	21	3	no	4	alive	4	alive	93,77	1,67	Low
2444	Low	18	3	no	28	DoD	28	DoD	2,93	0,25	High
2446	High	71	1	yes	46	alive	46	alive	0,17	0,20	Intermediate
2452	High	33	4	no	43	alive	43	alive	0,47	0,40	Intermediate
2468	Low	55	2	no	43	alive	43	alive	1,57	1,05	Low
2521	Low	52	2	no	31	alive	31	alive	26,62	1,58	Low
2522	Low	52	2	no	31	alive	31	alive	3,84	2,08	Low
2540	Low	16	1	no	34	alive	34	alive	0,59	0,47	Intermediate
2564	Low	3	3	no	39	alive	39	alive	66,15	3,41	Low
2566	High	21	4	no	28	relapse	32	alive	0,03	1,84	Intermediate
2643	Low	44	2	no	22	alive	22	alive	44,61	0,82	High
2657	Low	8	2	no	23	alive	23	alive	9,48	1,01	Low
2674	High	132	4	no	21	alive	21	alive	1,06	0,16	High
2679	Low	108	2	no	15	alive	15	alive	12,32	0,50	High
2680	Low	13	2	no	21	alive	21	alive	3,99	1,57	Low
2691	High	28	4	no	20	alive	20	alive	1,68	1,04	Low
2693	Low	158	2	no	17	alive	17	alive	16,88	0,46	High
2696	High	116	4	no	16	alive	16	alive	25,67	1,29	Low
2700	Low	16	2	no	5	alive	5	alive	6,05	0,76	High
2703	Low	5	4S	no	18	alive	18	alive	152,97	0,79	High
3836	Low	16	2	no	1	relapse	163	alive	0,24	0,51	Intermediate
4239	Low	5	3	no	20	relapse	64	alive	41,64	0,52	High
4242	Low	14	1	no	3	relapse	116	alive	3,47	0,75	High
4411	Low	48	2	no	18	relapse	45	alive	1,22	0,99	High
4615	Low	1	1	no	5	relapse	54	alive	2,23	4,10	Low
4697	Low	13	1	no	3	relapse	55	alive	3,53	0,60	High
4702	Low	4	3	no	4	relapse	62	alive	0,26	0,13	Intermediate
5112	Low	2	3	no	3	DoD	5	DoD	6,36	0,02	High



**Supplementary Table 2.** Multivariable Cox regression analyses and performance measurements of miRNA interaction prognostic models in neuroblastoma patients (n=231).

<b>Characteristics</b>		<b>Overall Survival</b>	<b>Disease-Free Survival</b>
Age at diagnosis	<18 months (reference)	1.000	1.000
	≥18 months	1.957 [1.007-3.802]	1.556 [0.910-2.660]
INSS Stage	1, 2, 3, 4S (reference)	1.000	1.000
	4	3.027 [1.588-5.769]	2.093 [1.246-3.516]
MYCN status	not-amplified (reference)	1.000	1.000
	amplified	1.605 [0.915-2.817]	1.283 [0.749-2.199]
miR-487b	low (reference)	1.000	1.000
	high	1.831 [0.461-7.267]	2.100 [0.809-5.447]
mir-516a-5p	low (reference)	1.000	1.000
	high	2.773 [1.251-6.147]	2.046 [1.095-3.822]
miRNA interaction		0.091 [0.015-0.553]	0.104 [0.029-0.371]
<b>Performance measurements</b>	-2Log(likelihood) (AIC)	612.851 (624.851)	841.590 (853.590)



## DISCUSSION DE LA PREMIERE PARTIE

A l'issue d'une analyse différentielle du microARNôme comparant des neuroblastomes de haut risque à ceux de bas risque, les signatures proposées par la littérature comportent un grand nombre de microARN appartenant à différents loci répartis distinctement sur le génome. Ces études se sont attachées essentiellement à identifier l'expression différentielle des microARN liée à l'amplification *N-MYC*, biaisant ainsi la recherche de marqueur de risque indépendant du statut de l'oncogène *N-MYC*. Près de la moitié des microARN discriminant les neuroblastomes de haut risque de ceux de bas risque identifiés, sont redondants avec ceux obtenus dans la littérature, ce qui suggère un rôle important de ces microARN dans l'oncogenèse des neuroblastomes.

Parmi les microARN identifiés par l'analyse différentielle haut risque vs bas risque, 18 (36%) appartiennent au cluster de microARN soumis à empreinte parentale C14MC. Après sélection des microARN les plus discriminants, la valeur pronostique de l'un d'entre eux – miR-487b – a été évaluée : elle montre une très forte capacité à discriminer les neuroblastomes en fonction de l'évolution clinique des patients. D'autre part, l'existence d'un second cluster de microARN soumis à empreinte, C19MC, a conduit à évaluer sa capacité à discriminer le risque de la maladie. Les résultats montrent que l'expression du miR-516a-5p corrèle la survie des patients. Les valeurs pronostiques puissantes de ces deux microARN, miR-487b et miR-516a-5p, appartenant aux deux plus importants clusters de microARN du génome, qui plus est, soumis à empreinte parentale, ont conduit à éprouver la capacité d'un modèle pronostique les intégrant avec pour objectif, bien sûr, de prédire l'évolution de la maladie, qu'elle soit localisée ou métastatique. Comparé au modèle standard intégrant l'âge au diagnostic, le stade et l'amplification de *N-MYC*, ce modèle améliore de manière très significative la précision de la prédiction. En termes d'expression, ces deux microARN identifient trois groupes de risque – bas [miR-516a-5p<sup>fort</sup>/miR-487b<sup>fort</sup>], intermédiaire [miR-516a-5p<sup>faible</sup>/miR-487b<sup>fort/faible</sup>] et haut [miR-516a-5p<sup>fort</sup>/miR-487b<sup>faible</sup>]. Près de 93% des évènements sont retrouvés dans les groupes de haut risque et de risque intermédiaire. La puissance de ce modèle permet de proposer une nouvelle classification fondée non pas sur la signature de nombreux microARN



comme c'est le cas dans la littérature, mais uniquement sur deux microARN, miR-487b et miR-516a-5p.

De nouveaux marqueurs sont recherchés constamment pour améliorer la classification et le pronostic des neuroblastomes. L'analyse par « CGH-array » a identifié différents profils d'altérations génomiques et amélioré le pronostic [Janoueix-Lerosey et al., 2009]. Néanmoins, certains échantillons échappent à cette classification. De plus, plusieurs publications ont proposé des profils d'expression génique afin de prédire l'évolution des patients atteints de neuroblastome [Oberthuer et al., 2006; Oberthuer et al., 2010; De Preter et al., 2010]. Cependant, la valeur prédictive de ces deux approches (CGH-array et profil génique) dans le neuroblastome reste à valider dans la pratique clinique.

Les microARN ont été identifiés comme des marqueurs pronostiques importants pour le neuroblastome au cours des cinq dernières années. Un avantage des microARN dans leur rôle de marqueurs pronostiques est leur grande stabilité, alors que l'instabilité des ARNm limite l'application en routine clinique des profils d'expression génique. De Preter et coll. ont évalué la capacité discriminante d'une signature de quinze microARN utilisant un modèle statistique de prédiction. Cette signature a fourni une bonne performance en termes de classification pronostique [De Preter et al., 2011]. En utilisant seulement deux microARN spécifiques, la performance du modèle prédictif proposé ici, plus simple car basée sur l'expression de seulement deux microARN, est similaire. Il convient de noter que ce nouveau modèle permet de prédire la mauvaise évolution de patients présentant de « bons » marqueurs classiques (âge au diagnostic < 18 mois ; stades localisé ou 4S ; non amplifié en *N-MYC*). Des études indépendantes supplémentaires sont nécessaires pour valider le rôle prédictif de ces deux microARN dans le neuroblastome.

L'évaluation de l'expression de ces miARN dans la pratique clinique quotidienne apparaît réaliste et réalisable de façon simple et rapide en utilisant la RT-PCR quantitative, d'autant que cette analyse peut être pratiquée à partir d'un très faible nombre de cellules tumorales. Les résultats présentés ici ont été obtenus à partir de tissus tumoraux avec une teneur en cellules tumorales malignes supérieure à 60%. À cet





égard, comme pour les approches génomiques globales (CGH-array et profils géniques), l'application systématique de l'analyse RT-PCR dans la pratique clinique pourrait être considérablement limitée par la contamination des cellules stromales. Aussi, l'analyse par RT-PCR quantitative doit être complétée par des méthodes d'hybridation *in situ* en fluorescence (FISH).

En résumé, le modèle prédictif basé sur l'expression de deux microARN, miR-487b et miR-516a-5p, distingue les patients connaissant des événements de ceux sans événement, avec une meilleure capacité discriminante que la classification standard de risque. L'application de ce modèle pronostique en routine clinique pourrait aboutir à une meilleure gestion thérapeutique des neuroblastomes par les onco-pédiatres. Outre les tumeurs neuroblastiques, des altérations de l'expression des microARN des clusters C14MC et C19MC sont fréquemment retrouvées dans de nombreux autres cancers humains. Il serait donc intéressant d'étendre l'observation de l'association des microARN des deux clusters C14MC et C19MC à d'autres cancers humains.

### **Perspectives de la première partie**

Du point de vue clinique, l'intérêt de la combinaison de l'expression des miR-487b et miR-516a-5p doit maintenant être validée sur des cohortes indépendantes de deux centres français de lutte contre le cancer, le Centre Léon Bérard à *Lyon* et l'Institut Curie à *Paris*, puis à un niveau européen, dans le cadre de l'ENQUA (« *European Neuroblastoma Quality Assessment Group* ») à *Vienne*. Alors validées, ces données permettront de proposer la combinaison de ces deux microARN comme nouveau marqueur pronostique des neuroblastomes. En effet, l'adoption d'un nouveau marqueur pronostique en oncologie s'opère en deux temps. Tout d'abord, en recherche de transfert, une validation multi-institutionnelle rétrospective a pour objectif de montrer l'intérêt potentiel du nouvel élément pronostique. Dans un second temps, en routine hospitalière de manière prospective, le candidat marqueur est mesuré systématiquement sur les prélèvements. Au cours de ces deux phases, il est confronté aux marqueurs pronostiques reconnus comme standard, en l'occurrence ici, le stade, l'âge au diagnostic, l'amplification N-MYC



et la nature des anomalies génomiques (numériques ou segmentaires) relevée par CGH-array. Ces deux étapes franchies, il deviendra marqueur standard de la maladie.

Une étude comparative de la puissance pronostique des deux microARN par rapport à celle de la CGH-array permettra de définir la contribution de chaque approche à la stratification de risque des neuroblastomes. Il est possible que la stratification basée sur l'expression des miR-487b et miR-516a-5p améliore la stratification génomique ; en particulier pour les patients dont la tumeur présente des anomalies segmentaires.

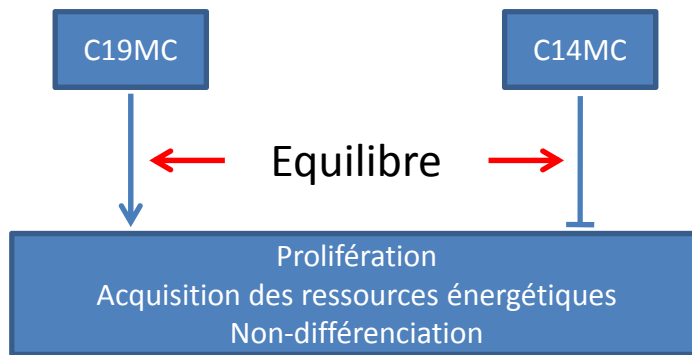
Quoiqu'il en soit, les analyses de l'expression des microARN par RT-PCR quantitative ou celles de CGH-array ne peuvent être concluantes pour les prélèvements au pourcentage de cellules tumorales trop faible (<60% de cellules tumorales) ; dans ces cas là, l'utilisation du FISH en routine représenterait alors la seule solution pour évaluer l'expression des deux microARN dans les tumeurs neuroblastiques. Une telle approche nécessiterait l'étalonnage soigneux d'un tissu normal dont le niveau d'expression serait constant, et/ou d'un microARN dont l'expression serait constante dans toutes les formes de neuroblastome, dans une démarche de contrôle qualité inter-laboratoires.

L'analyse du taux de miR-516a-5p et miR-487b dans le plasma des patients constitue également un projet de recherche appliquée à part entière. Pour un jeune enfant, comparé au prélèvement tumoral à l'aiguille dans des territoires anatomiques parcourus par de grosses artères, l'intérêt du prélèvement sanguin, non invasif, est évident. Dans ce contexte, compte tenu d'une excellente corrélation tumeur/sang, la détection de l'amplification de *N-MYC* circulant dans le plasma est le premier exemple, pour le neuroblastome, d'un marqueur moléculaire circulant [Combaret et al., 2002].

### **Modèle hypothétique d'action des microARN des deux clusters soumis à empreinte, C14MC et C19MC, dans l'oncogenèse du neuroblastome**

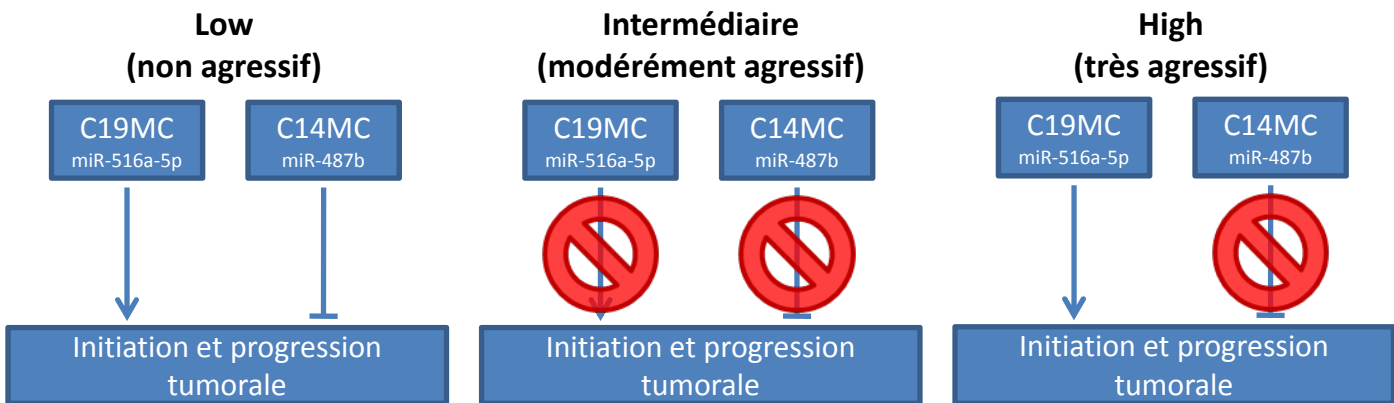
Au-delà de leur importance pronostique majeure, les résultats obtenus ici conduisent au constat que l'effet de l'expression du miR-487b sur la survie, et donc sur l'agressivité tumorale, dépend du statut de l'expression du miR-516a-5p. Cette donnée suggère qu'en présence d'une expression élevée de miR-516a-5p, miR-487b se comporterait comme un

### Cas non pathologique



	Cerveau	Bas	Intermédiaire	Haut
miR-516a-5p	307	141.3	0.4	95.9
miR-487b	2.4	2.4	0.7	0.4

### Dans le neuroblastome :



**Figure 30.** Modèle hypothétique d'action des microARN des deux clusters soumis à empreinte, C14MC et C19MC, dans l'oncogenèse du neuroblastome

Le rond barré rouge représente une perte d'expression du cluster de microARN

suppresseur de tumeur, alors qu'en présence d'une faible expression de miR-516a-5p, l'effet suppresseur de tumeur de miR-487b ne s'exercerait pas et révélerait un effet suppresseur de miR-516a-5p.

De plus, lorsque l'expression de ces deux microARN dans les tumeurs neuroblastiques est comparée à leur expression dans un tissu sain de cerveau, les tumeurs présentent une plus faible expression globale de miR-516a-5p et miR-487b.

L'hypothèse du conflit parental régissant les interactions des gènes soumis à empreinte parentale oppose les gènes dont l'expression est paternelle – promoteurs de la prolifération cellulaire, de l'acquisition des ressources, du caractère « souche », et par conséquent de l'initiation et de la progression tumorale – à ceux dont l'expression est maternelle – promoteurs de la quiescence et de la différenciation cellulaire, et par conséquent de la suppression tumorale. En s'appuyant sur cette hypothèse, et en considérant les résultats obtenus sur l'expression des miR-487b et miR-516a-5p, il semble pertinent d'émettre les hypothèses sur le mode d'action respectif des deux clusters de microARN, C14MC et C19MC, dans l'oncogénèse des neuroblastomes :

- Pour les tumeurs de bas risque [miR-516a-5p<sup>fort</sup>/miR-487b<sup>fort</sup>] : une diminution modérée et concomitante de l'expression des deux clusters de microARN, C14MC et C19MC, entraînerait un phénotype tumoral non agressif.
- Pour les tumeurs de risque intermédiaire [miR-516a-5p<sup>faible</sup>/miR-487b<sup>fort/faible</sup>] : la perte importante d'expression des deux clusters entraînerait un phénotype tumoral modérément agressif.
- Pour les tumeurs de haut risque [miR-516a-5p<sup>fort</sup>/miR-487b<sup>faible</sup>] : la perte du suppresseur de tumeur majeur C14MC induirait un phénotype tumoral très agressif.

Ce modèle hypothétique est schématisé en Figure 30. S'agit-il de démontrer maintenant si les variations d'expression respective des microARN de ces clusters représentent la conséquence de processus oncogéniques sous-jacents ou un évènement oncogénique majeur contribuant à la tumorigénèse des neuroblastomes ?



## ***Seconde Partie***

Les microARN des clusters C14MC et C19MC,  
acteurs de l'oncogenèse du neuroblastome ?





## Présentation du travail

Si la combinaison d'expression des miR-487b et miR-516a-5p, appartenant respectivement aux clusters de microARN C14MC et C19MC soumis à empreinte parentale, constitue un facteur pronostique indépendant de la maladie localisée ou disséminée, la recherche de leur contribution et celle de leurs clusters d'origine à l'oncogenèse du neuroblastome est essentielle afin d'élucider les mécanismes sous-jacents.

Dans ce but, la seconde partie de l'étude s'est attachée, à partir de tumeurs et lignées neuroblastiques, à répondre à trois questions portant sur :

- l'origine de la dérégulation des deux microARN, miR-487b et miR-516a-5p, et plus largement des deux clusters C14MC et C19MC,
- la potentialité de différentes drogues (5-aza-2'-déoxycytidine et acide phénylbutyrique) à moduler l'expression de ces microARN,
- et l'identification des gènes cibles des miR-487b et miR-516a-5p.

### **Remarques générales à considérer pour les analyses de la section 1**

Remarque 1 : D'une tumeur à l'autre, la grande variabilité des niveaux d'expression des différents transcrits analysés a conduit à considérer les valeurs médianes.

Remarque 2 : Le nombre d'échantillons analysés est limité par la quantité d'ARN à disposition. Toutefois les différentes cohortes formées restent équilibrées quant à la répartition des différentes entités cliniques.



## **1. Origine de la dérégulation des deux microARN, miR-487b et miR-516a-5p et plus largement des deux clusters C14MC et C19MC**

### 1.1. Extension de l'analyse de l'expression des microARN matures à cinq autres microARN du cluster C14MC

Afin de déterminer dans quelle mesure la sous-expression des miR-487b, miR-409-3p et miR-410 était partagée par d'autres microARN du cluster C14MC, l'expression de cinq autres microARN de ce cluster – miR-380-5p, miR-494, miR-376c, miR-134 et miR-154 (Figure 31) – a été mesurée par RT-PCR quantitative. Même si les variations de l'expression des huit microARN analysés dans les tumeurs neuroblastiques et leurs associations avec la survie des patients sont comparables à ceux décrits dans la première partie de l'étude (Figures Annexes 1 et 2, pages 147-148), l'analyse statistique montre que seule l'expression du miR-487b peut être considérée comme un facteur pronostique indépendant dans les modèles multivariés de régression de Cox (Tableau 4).

La forte corrélation retrouvée entre chacun des microARN du C14MC, à l'exception du miR-409-3p certainement du au fait d'être une forme mineure, suggère une co-régulation de l'expression de l'ensemble des microARN de ce cluster (Tableau 5). Cependant, les coefficients de corrélation varie du simple au double avec un « point de cassure » séparant deux groupes de microARN : d'une part en 5' avec miR-380-5p et miR-494, d'autre part en 3' avec miR-376c, miR-487b, miR-154, miR-134 et miR-410, avec une plus faible corrélation du miR-376c ( $r < 0.60$ ) avec les autres microARN. Les deux microARN en 5', miR-380-5p et miR-494, sont situés en amont du cluster séparés par un intervalle de 5kb des cinq autres microARN. Ainsi, deux sous-clusters peuvent être distingués, allant pour le premier du miR-379 au miR-495 et pour le second du miR-376c au miR-656, appelées ici « C14MC-SC1 » et « C14MC-SC2 » respectivement (Figure 31). Une analyse bioinformatique de localisation de promoteurs potentiels sur cette région de 50kb permet d'identifier cinq promoteurs putatifs, notamment deux respectivement localisés en amont de chacun des deux sous-clusters proposés (Figure 31) (<http://www.cbs.dtu.dk/services/Promoter/>).



L'ensemble de ces observations et résultats peuvent traduire à la fois des différences dans la maturation des différents microARN ou bien l'existence de multiples transcrits primaires répondant dans les deux cas à des régulations spécifiques.

#### 1.2. Statut génomique des miR-487b et miR-516a-5p représentatifs des deux clusters C14MC et C19MC dans les tumeurs

Dans un contexte génomique d'empreinte parentale, les variations d'expression des microARN associés aux neuroblastomes de mauvais pronostic [miR-516a-5p<sup>fort</sup>/miR-487b<sup>faible</sup>], posent la question de la représentativité des deux allèles sur ces loci. Les dérégulations de ces microARN pourraient en effet résulter d'une délétion de C14MC, et à l'inverse, d'un gain génomique de C19MC.

Les hybridations génomiques comparatives réalisées sur 40 neuroblastomes de la cohorte sur des puces 244k (*Agilent*) n'ont révélé aucune corrélation entre le statut génomique des deux loci et l'expression des microARN. Afin de confirmer ces données, le statut génomique de ces régions a été évalué par qPCR génomique au niveau des séquences des deux microARN d'intérêts, miR-487b et miR-516a-5p. L'analyse des amplicons, d'environ 200pb chacun, obtenus à partir de 131 tumeurs de la cohorte n'a révélé ni gain ni perte de contenu génomique dans toutes les entités tumorales de neuroblastome analysées.

Ces résultats n'excluent pas l'existence potentielle de micro-délétions affectant la régulation de l'expression des microARN de ces deux clusters, ni une éventuelle perte d'hétérozygotie, provoquant ainsi les phénotypes moléculaires observés. Néanmoins, cette absence de variation du contenu génomique des microARN représentatifs des deux clusters C14MC et C19MC conduit à rechercher d'autres mécanismes pouvant rendre compte des variations d'expression des microARN matures.

**Tableau 6.** Coefficients de corrélation entre l'expression des transcrits primaires et les microARN matures des clusters C14MC et C19MC. Les cases grisées représentent des résultats significatifs ( $p < 0.05$ ).

Cohorte entière (n=190)	pri-miR-516a	pri-miR-380	pri-miR-487b
miR-516a-5p	0,00		
miR-380-5p		0,53	0,31
miR-494		0,42	0,29
miR-376c		0,28	0,16
miR-487b		0,17	0,19
miR-134		0,38	0,33
miR-154		0,23	0,15
miR-409-3p		0,07	0,12
miR-410		0,40	0,39

**Tableau 7.** Coefficients de corrélation entre l'expression des deux transcrits primaires du cluster C14MC. Les cases grisées représentent des résultats significatifs ( $p < 0.05$ ).

Cohorte entière (n=190)	pri-miR-380	pri-miR-487b
pri-miR-380	1,00	0,87
pri-miR-487b		1,00

### 1.3. Analyse de l'expression des transcrits primaires de C14MC et C19MC

Les variations d'expression des microARN matures peuvent résulter de plusieurs mécanismes. Une première hypothèse tient aux régulations nécessaires en amont à la production des microARN matures, à commencer par des variations de taux d'expression des transcrits primaires.

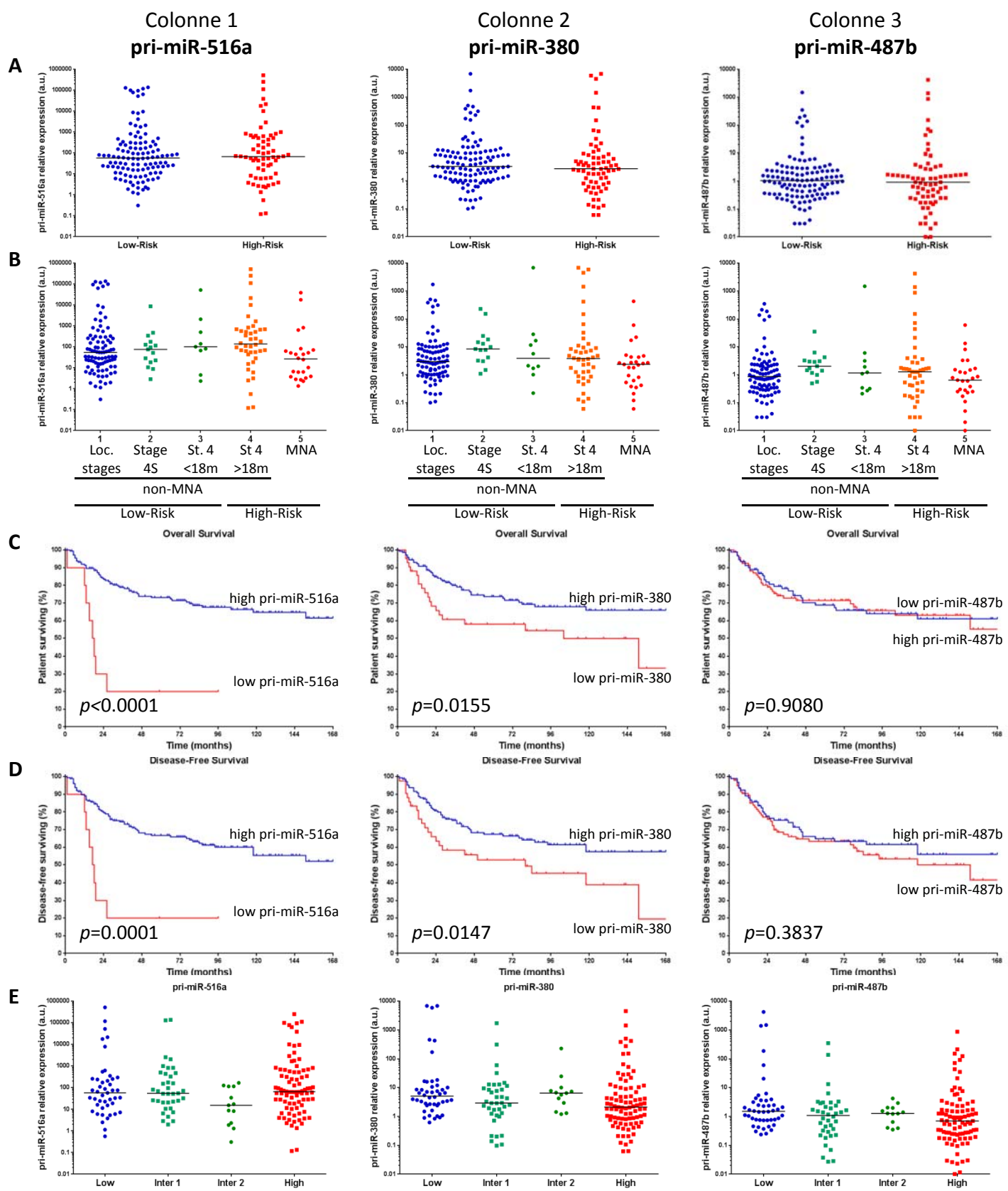
Dans ce but, les mesures d'expression par RT-PCR quantitative des transcrits primaires des deux clusters ont été pratiquées sur 189 tumeurs de la cohorte. Deux amplifications ciblées au niveau des séquences primaires des miR-380-5p (« C14MC-SC1 ») et miR-487b (« C14MC-SC2 ») et une au niveau du miR-516a-5p (C19MC) ont été réalisées.

Tout d'abord, aucune corrélation directe n'a pu être établie entre l'expression du transcrit primaire pri-miR-516a et celle de miR-516a-5p. De faibles corrélations significatives sont retrouvées entre les transcrits primaires, pri-miR-380 et pri-miR-487b, et les microARN matures correspondants dans les tumeurs neuroblastiques (Tableau 6). En outre, les niveaux d'expression des deux transcrits primaires du C14MC étudiés sont comparables pour chaque échantillon analysé, expliquant ainsi la très forte corrélation entre les pri-miR-380 et pri-miR-487b (Tableau 7), et excluant ainsi *a priori* la possibilité de transcrits alternatifs. Ces résultats laissent donc suggérer l'existence de processus de maturation spécifique de chaque microARN.

Aucune différence d'expression des trois transcrits primaires n'a été observée entre les deux groupes de risque standard (haut et bas) (Figure 32A). En subdivisant la cohorte selon les cinq groupes clinico-biologiques classiques (localisés, stade 4S, stade 4 < 18 mois, stade 4 > 18 mois et *N-MYC* amplifiés), aucune différence d'expression n'a pu être objectivée (Figure 32B) ; ces deux derniers résultats n'expliquant pas ceux obtenus pour les microARN matures.

Une analyse d'association avec la survie a été réalisée pour les trois transcrits primaires, pri-miR-516a, pri-miR-380 et pri-miR-487b (Figures 32C et 32D). Pour certains microARN primaires, les résultats divergent de ceux obtenus pour la forme mature. Ainsi :





**Figure 32.** Analyses statistiques des niveaux d'expression des transcrits primaires pri-miR-380 (Colonne 1), pri-miR-487b (Colonne 2) et pri-miR-516a (Colonne 3) des clusters C14MC et C19MC dans les tumeurs neuroblastiques (n=190)

(A) Entre les tumeurs de bas et haut risque selon la classification standard

(B) Entre les cinq groupes clinico-biologiques stratifiés selon les critères de la classification standard

(C) Courbes Kaplan-Meier de la survie globale dans la cohorte globale

(D) Courbes Kaplan-Meier de la survie sans maladie dans la cohorte globale

(E) Entre les quatres groupes de tumeurs classés d'après la combinaison de miR-516a-5p et miR-487b.

Pour les figures A, B et E, les barres noires représentent les médianes d'expression. Pour les figures C et D, le niveau d'expression des transcrits primaires a été converti en variable discrète en discriminant les échantillons de la cohorte en deux classes : forte expression en bleu et faible expression en rouge.

- En accord avec les résultats obtenus pour miR-380-5p, la faible expression du pri-miR-380 est significativement associée aux patients présentant une plus courte survie globale ( $p=0.0155$ ) et sans maladie ( $p=0.0147$ ).
- Par contre, l'expression du pri-miR-487b n'est associée ni à la survie globale ( $p=0.9080$ ) ni à la survie sans maladie ( $p=0.3837$ ), contrairement à miR-487b.
- Et de façon surprenante, la faible expression du pri-miR-516 est significativement associée à une plus courte survie globale ( $p<0.0001$ ) et sans maladie ( $p=0.0001$ ), alors que les tumeurs de ces mêmes patients présentent de forte expression du miR-516a-5p.

Ces résultats suggèrent une implication importante des étapes de maturation dans l'expression des microARN matures dans les tumeurs neuroblastiques.

Enfin, l'expression des transcrits primaires a été comparée dans les quatre groupes de neuroblastomes classés sur la base de la combinaison des miR-487b et miR-516a-5p comme défini dans la première partie. Les médianes d'expression des pri-miR-380 et pri-miR-487b sont plus faibles dans le groupe haut risque (miR-516a-5p<sup>fort</sup>/miR-487b<sup>faible</sup>) par rapport au groupe bas risque (miR-516a-5p<sup>fort</sup>/miR-487b<sup>fort</sup>). En d'autres termes, une tumeur, présentant une forte expression des microARN du C14MC, présente également une forte expression des transcrits primaires et, à l'inverse, une tumeur présentant de faible expression de ces microARN, présente une faible expression des transcrits primaires. Aucune différence d'expression n'a été relevée pour pri-miR-516a entre les deux groupes de tumeurs bas et haut risque, expliquant ainsi l'absence de variation de l'expression du miR-516a-5p (Figure 32E).

Pris ensemble, ces résultats amènent à suggérer un double mécanisme de régulation différentielle des microARN, au niveau de la transcription elle-même (sans qu'il n'y ait de transcrits alternatifs) et au niveau de la maturation des microARN.

Dans l'hypothèse d'anomalies au niveau de la régulation de la transcription des microARN primaires, elles pourraient ne pas se restreindre aux seuls transcrits primaires des deux clusters C14MC et C19MC, mais s'étendre aux gènes environnants des deux loci soumis à empreinte parentale.

**Tableau 8.** Résultats du transcriptome pour cinq gènes des régions 14q32 et 19q13 soumises à empreinte parentale

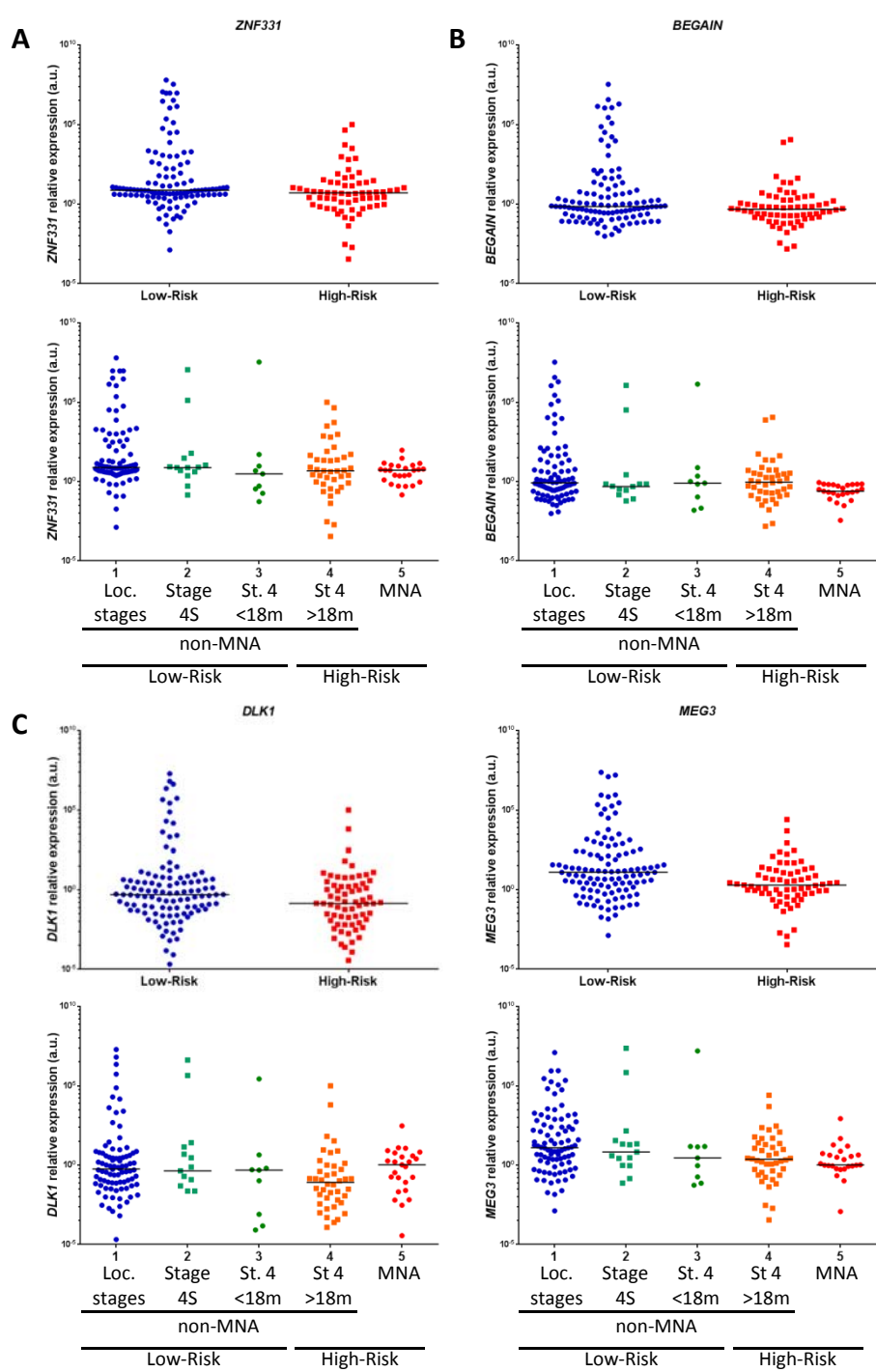
Gènes	Ratio	<i>p</i> -value	adj- <i>p</i> -value	Localisation chromosomique	Origine allélique de l'expression
<i>BEGAIN</i>	1,17	0,7018	0,9178	14q32.2	paternelle
<i>DLK1</i>	2,70	0,2686	0,7063	14q32.2	paternelle
<i>MEG3</i>	0,22	0,0034	0,1702	14q32.2	maternelle
<i>DIO3</i>	1,19	0,5763	0,8696	14q32.31	paternelle
<i>ZNF331</i>	2,16	0,0717	0,4770	19q13.41	maternelle

#### 1.4. Extension de l'analyse à l'expression des gènes soumis à empreinte parentale des loci 14q32 et 19q13

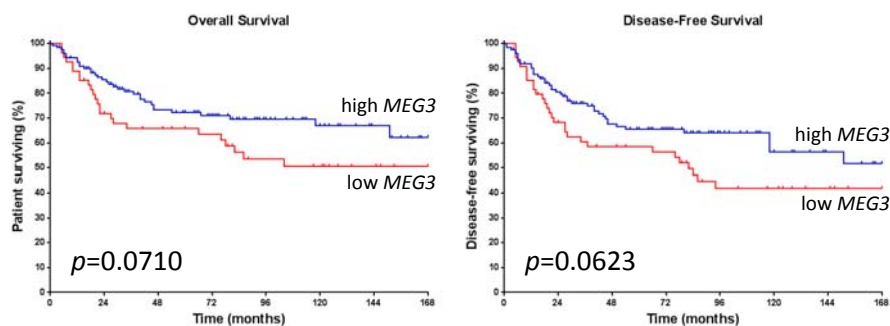
Pour déterminer dans quelle mesure la dérégulation des microARN concernait spécifiquement les clusters C14MC et C19MC ou s'étendait, tout ou partie, aux gènes de ces régions soumises à empreinte parentale, l'expression des quatre gènes *BEGAIN*, *DLK1*, *MEG3* et *DIO3* du locus 14q32 et du gène *ZNF331* du locus 19q13 a été analysée, tout d'abord dans la cohorte préliminaire des 13 neuroblastomes à partir des transcriptomes puis dans une cohorte de 179 tumeurs neuroblastiques par RT-PCR quantitative. Ainsi qu'il a été présenté en introduction dans la section 2.4, le gène *ZNF331*, d'expression maternelle, est situé en amont de C19MC dont il est séparé par la région de contrôle de l'empreinte. Concernant le locus 14q32, les gènes *BEGAIN*, *DLK1* et *DIO3* sont d'expression paternelle alors que le gène *MEG3* est d'expression maternelle. Ce dernier gène code pour un transcrite non-codant de même orientation que les microARN de C14MC, suggérant l'existence d'un seul transcrite primaire codant à la fois pour *MEG3*, et pour les microARN du C14MC. En accord avec cette hypothèse, un seul promoteur a été décrit dans la littérature : celui de *MEG3*.

Le transcriptome des 13 tumeurs constituant la cohorte préliminaire a été analysé de façon concomitante à celle du microARNôme. Pour rappel, l'analyse différentielle des transcrits s'est basée sur la comparaison de 8 neuroblastomes de haut risque à 5 neuroblastomes de bas risque. En sélectionnant les résultats obtenus pour les gènes des loci étudiés, nous observons que *MEG3* est significativement cinq fois plus exprimé dans les neuroblastomes de bas risque ( $p=0.0034$ ) au même titre que les microARN du C14MC ; en revanche, *DLK1* est sur-exprimé de deux fois dans les neuroblastomes de haut risque, un résultat à prendre avec prudence dans la mesure où il n'est pas significatif. Le taux des transcrits des gènes *BEGAIN* et *DIO3* ne présentent aucune différence d'expression entre les deux groupes de neuroblastomes (Tableau 8).

De plus, l'expression du gène *ZNF331* est marginalement deux fois plus élevée dans les neuroblastomes de haut risque (Tableau 8).



**Figure 33.** Analyses statistiques des niveaux d'expression de **(A) ZNF331**, **(B) BEGAIN**, **(C) DLK1**, *MEG3* et *DIO3* entre les tumeurs de bas et haut risque classiques d'une part et entre les cinq groupes clinico-biologiques classiques stratifiés selon les critères de la classification standard. Les barres noires représentent les médianes d'expression.

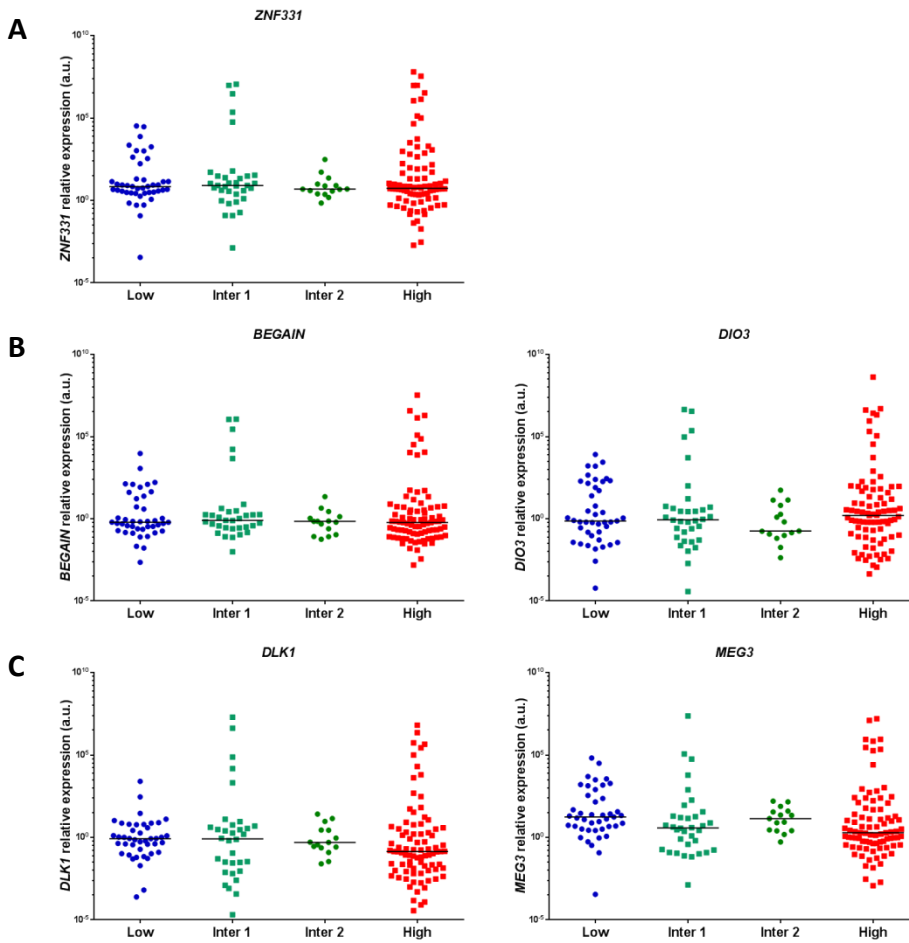


**Figure 34.** Courbes Kaplan-Meier de la survie globale (gauche) et de la survie sans maladie (droite) des patients pour l'expression de *MEG3*. Le niveau d'expression du transcrit *MEG3* a été converti en variable discrète en discriminant les échantillons de la cohorte en deux classes : forte expression en bleu et faible expression en rouge.

L'analyse par RT-PCR quantitative de la cohorte de 179 tumeurs donne les résultats suivants :

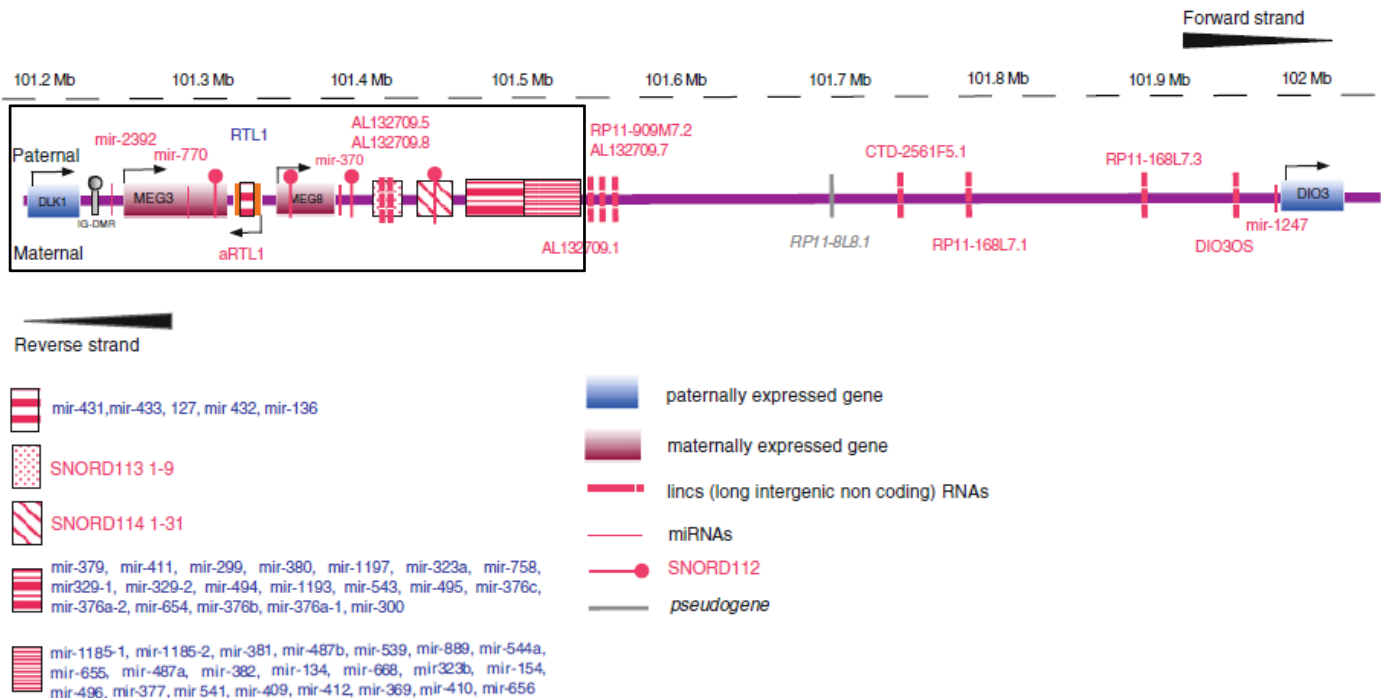
- Aucune différence d'expression médiane n'a été observée pour le gène *ZNF331* ni entre les tumeurs de haut et bas risques classiques, ni entre les cinq groupes clinico-biologiques classiques (localisés, stade 4S, stade 4 < 18 mois, stade 4 > 18 mois et *N-MYC* amplifiés) (Figure 33A).
- De même pour le gène *BEGAIN*, aucune différence d'expression médiane n'a été observée entre les différentes entités cliniques classiques (Figure 33B).
- Les gènes *DLK1*, *MEG3* et *DIO3* sont respectivement 3.6, 6.4 et 2 fois moins exprimés dans les tumeurs de haut risque. Ces variations d'expression médiane sont en adéquation avec celles observés pour les microARN mature du C14MC. De plus, ces trois gènes – *DLK1*, *MEG3* et *DIO3* – présentent globalement des niveaux d'expression médiane plus faible dans les tumeurs de haut risque par rapport à celles de bas risque, selon les critères standards (Figure 33C). Un point intéressant est à souligner dans cette analyse. En effet, le transcrit *MEG3* suit une décroissance d'expression, d'autant plus marquée que la tumeur concernée est métastatique et de mauvais pronostic, suivant ainsi les variations d'expression des microARN du C14MC, renforçant l'hypothèse de l'existence d'un seul transcrit primaire.

De plus, l'expression du gène *ZNF331* pour le locus 19q13 et des gènes *BEGAIN*, *DLK1* et *DIO3* pour le locus 14q32 n'est ni associée à la survie globale ( $p=0.1144$ ,  $p=0.1219$ ,  $p=0.9420$ ,  $p=0.3912$ , respectivement), ni à la survie sans maladie ( $p=0.1529$ ,  $p=0.4302$ ,  $p=0.9873$ ,  $p=0.7493$ , respectivement) (Figure Annexe 3, page 149). Seule l'expression de *MEG3* est marginalement associée à la fois à la survie globale ( $p=0.0710$ ) et la survie sans maladie ( $p=0.0681$ ). Ainsi, à l'instar des microARN du C14MC, la faible expression de *MEG3* est particulièrement associée aux neuroblastomes de plus mauvaise évolution (Figure 34).



**Figure 35.** Analyses statistiques des niveaux d'expression des gènes **(A) ZNF331, (B) BEGAIN, DIO3, (C) DLK1** et **MEG3** entre les quatre groupes de tumeurs classés d'après la combinaison de miR-516a-5p et miR-487b.

Les barres noires représentent les médianes d'expression.



**Figure 10.** Représentation schématique de la région génomique DLK1-DIO3 sur les chromosomes paternel et maternel

(d'après Benetatos, Cell Mol Life Sci Review, 2012)

Les gènes, microARN, snoARN, lincARN et pseudogènes et l'origine allélique de leur expression sont annotés.

Enfin, l'expression des gènes analysés a été comparée dans les quatre groupes de neuroblastomes classés sur la base de la combinaison des miR-487b et miR-516a-5p comme (voir première partie). Les résultats montrent :

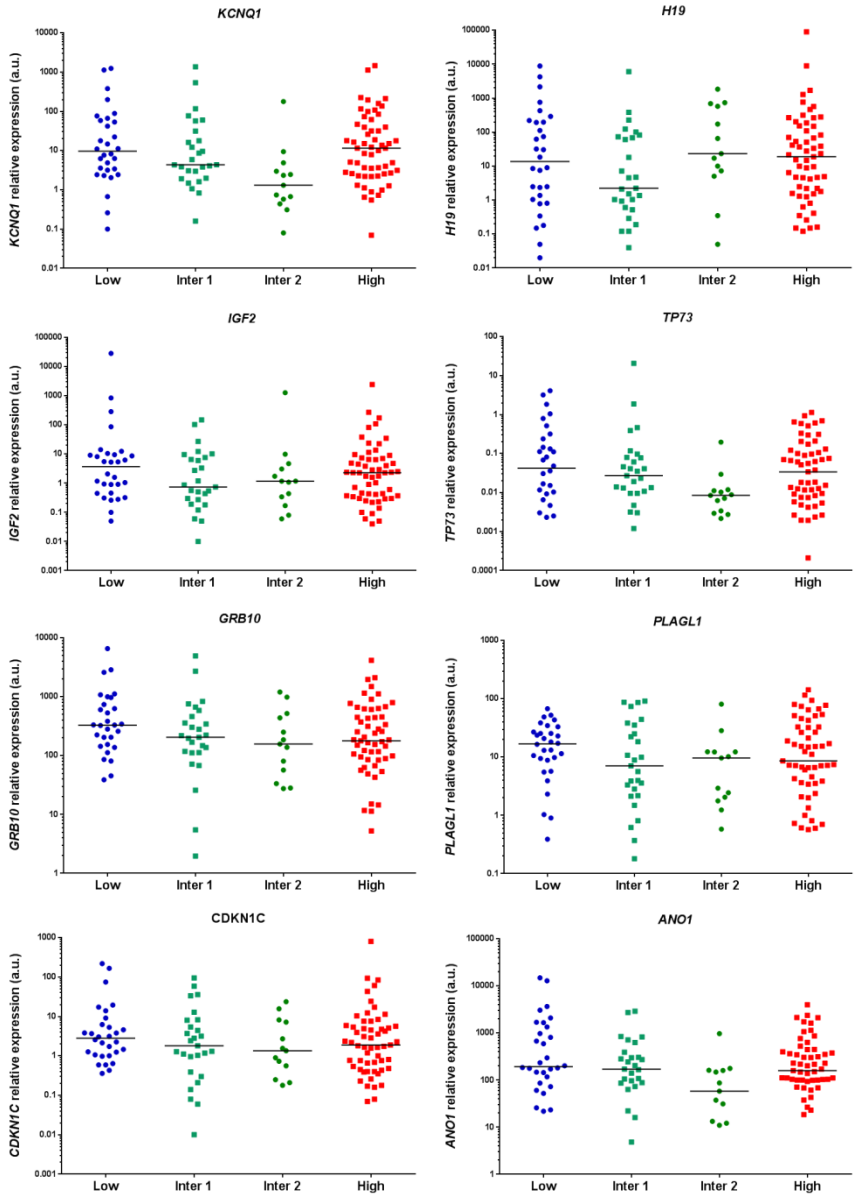
- Concernant le gène *ZNF331*, l'ordre de grandeur des médianes d'expression est similaire dans chacun des quatre groupes de risque (Figure 35A).
- Aucune différence de la médiane d'expression des gènes *BEGAIN* et *DIO3* n'existe entre les quatre groupes de risque (Figure 35B).
- Les médianes d'expression des gènes *DLK1* et *MEG3* décroissent entre les groupes de bas (miR-516a-5p<sup>fort</sup>/miR-487b<sup>fort</sup>) et de haut risque (miR-516a-5p<sup>fort</sup>/miR-487b<sup>faible</sup>) en passant par des valeurs intermédiaires pour les deux groupes intermédiaires « Inter 1 » et « Inter 2 » (miR-516a-5p<sup>faible</sup>/miR-487b<sup>fort/faible</sup>) (Figure 35C).

En résumé, les anomalies de l'expression observées pour les microARN matures et les transcrits primaires associés s'étendent aux gènes *DLK1* et *MEG3*, mais pas aux gènes *BEGAIN*, *DIO3* et *ZNF331*. L'encadré noir sur la figure du locus 14q32 ci-contre (Figure 10) montre les limites actuelles de la dérégulation d'expression des différents transcrits relevée dans les neuroblastomes.



**Tableau 9.** Résultats du transcriptome pour 62 gènes soumis à empreinte parentale du génome humain (en bleu, les gènes dont l'expression a été mesurée par RT-PCR quantitative)

Gènes	Ratio Haut risque vs Bas risque	p-value	adj-p-value
KCNQ1	4,20	0,01	0,23
DLK1	2,70	0,27	0,71
TFPI2	2,38	0,03	0,34
ZNF331	2,16	0,07	0,48
MKRN3	1,61	0,31	0,73
H19	1,58	0,49	0,83
SLC22A18	1,53	0,09	0,52
LRRTM1	1,32	0,37	0,77
IGF2AS	1,30	0,19	0,65
PHLDA2	1,28	0,65	0,90
KLF14	1,28	0,41	0,79
KCNQ1DN	1,28	0,13	0,58
SLC22A3	1,25	0,59	0,87
NAT15	1,21	0,13	0,57
ATP10A	1,19	0,26	0,70
ZNF597	1,18	0,16	0,62
IGF2	1,16	0,46	0,82
ZNF215	1,15	0,53	0,85
TP73	1,11	0,32	0,74
CALCR	1,09	0,76	0,93
M6PR	1,09	0,74	0,93
DLGAP2	1,09	0,86	0,97
SLC22A18AS	1,06	0,78	0,94
IGF2R	1,05	0,87	0,97
WIF1	1,05	0,75	0,93
KCNK9	1,03	0,89	0,98
NLRP2	1,03	0,85	0,96
SLC22A2	1,02	0,89	0,98
PHACTR2	1,02	0,97	0,99
C15orf2	1,00	0,99	1,00
MESTIT1	1,00	0,98	1,00
ZDBF2	0,98	0,96	0,99
SGK2	0,95	0,90	0,98
PEG3	0,91	0,86	0,97
BLCAP	0,91	0,62	0,89
AXL	0,91	0,82	0,95
TCEB3C	0,90	0,51	0,84
SGCE	0,89	0,64	0,89
PEG10	0,89	0,86	0,97
INS	0,89	0,53	0,85
UBE3A	0,88	0,51	0,84
NDN	0,88	0,76	0,94
L3MBTL	0,86	0,43	0,80
CPA4	0,82	0,35	0,76
SNURF	0,80	0,40	0,79
NAP1L5	0,80	0,51	0,84
MEST	0,78	0,44	0,80
RB1	0,77	0,14	0,59
OSBPL5	0,70	0,14	0,59
KCNQ1OT1	0,69	0,19	0,65
COPG2	0,69	0,20	0,66
MAGEL2	0,65	0,10	0,53
DIRAS3	0,63	0,44	0,81
FAM50B	0,60	0,08	0,49
GRB10	0,57	0,03	0,37
INPP5F	0,54	0,08	0,50
PPP1R9A	0,51	0,21	0,67
PLAGL1	0,51	0,02	0,32
CDKN1C	0,48	0,04	0,40
ANO1	0,44	0,20	0,66
NNAT	0,28	0,08	0,50
MEG3	0,22	0,00	0,17



**Figure 36.** Analyses statistiques des niveaux d'expression des gènes soumis à empreinte KCNQ1, H19, IGF2, TP73, GRB10, PLAGL1, CDKN1C et ANO1 dans les quatre groupes de tumeurs classés d'après la combinaison de miR-516a-5p et miR-487b (n=128)

Les barres noires représentent les médianes d'expression.

### 1.5. Extension de l'analyse aux gènes soumis à empreinte parentale du génome

Dans les tumeurs neuroblastiques, les variations d'expression des microARN appartenant aux clusters C14MC et C19MC soumis à empreinte parentale ainsi que des gènes *DLK1* et *MEG3*, conduisent la question suivante : Il y a-t-il dans le neuroblastome une dérégulation locale de l'expression des deux loci 14q32 et 19q13 analysés ou une dérégulation générale impliquant des mécanismes de maintien de l'empreinte parentale ?

Afin de répondre à cette question, l'expression de 62 gènes connus pour être soumis à empreinte parentale a été évaluée d'abord à partir des résultats du transcriptome des 13 tumeurs neuroblastiques de la cohorte préliminaire puis par RT-PCR quantitative pour une cohorte de 147 tumeurs neuroblastiques. D'après les données du transcriptome, d'autres gènes pourraient également être dérégulés, notamment ceux présents sur les loci soumis à empreinte parentale des bras court et long du chromosome 11, comme *ANO1*, *CDKN1C*, *KCNQ1*. A l'inverse, des gènes soumis à empreinte parentale bien connus tels *IGF2*, *H19* et *TP73* ne semblent pas être dérégulés dans les neuroblastomes (Tableau 9).

Sur la base des résultats obtenus à partir des transcriptomes à savoir i) les différences de niveau d'expression entre les neuroblastomes de haut et bas risques, ii) et la significativité des différences d'expression, l'analyse par RT-PCR quantitative de 147 tumeurs neuroblastiques a été effectuée pour les gènes *TP73*, *PLAGL1*, *GRB10*, *H19*, *IGF2*, *KCNQ1*, *CDKN1C* et *ANO1*. Aucune différence d'expression significative n'a été observée entre les différents groupes de risque et ceci, aussi bien pour la stratification du risque classique que pour celle basée sur la combinaison de l'expression des miR-487b et miR-516a-5p comme défini dans la première partie (Figure 36).



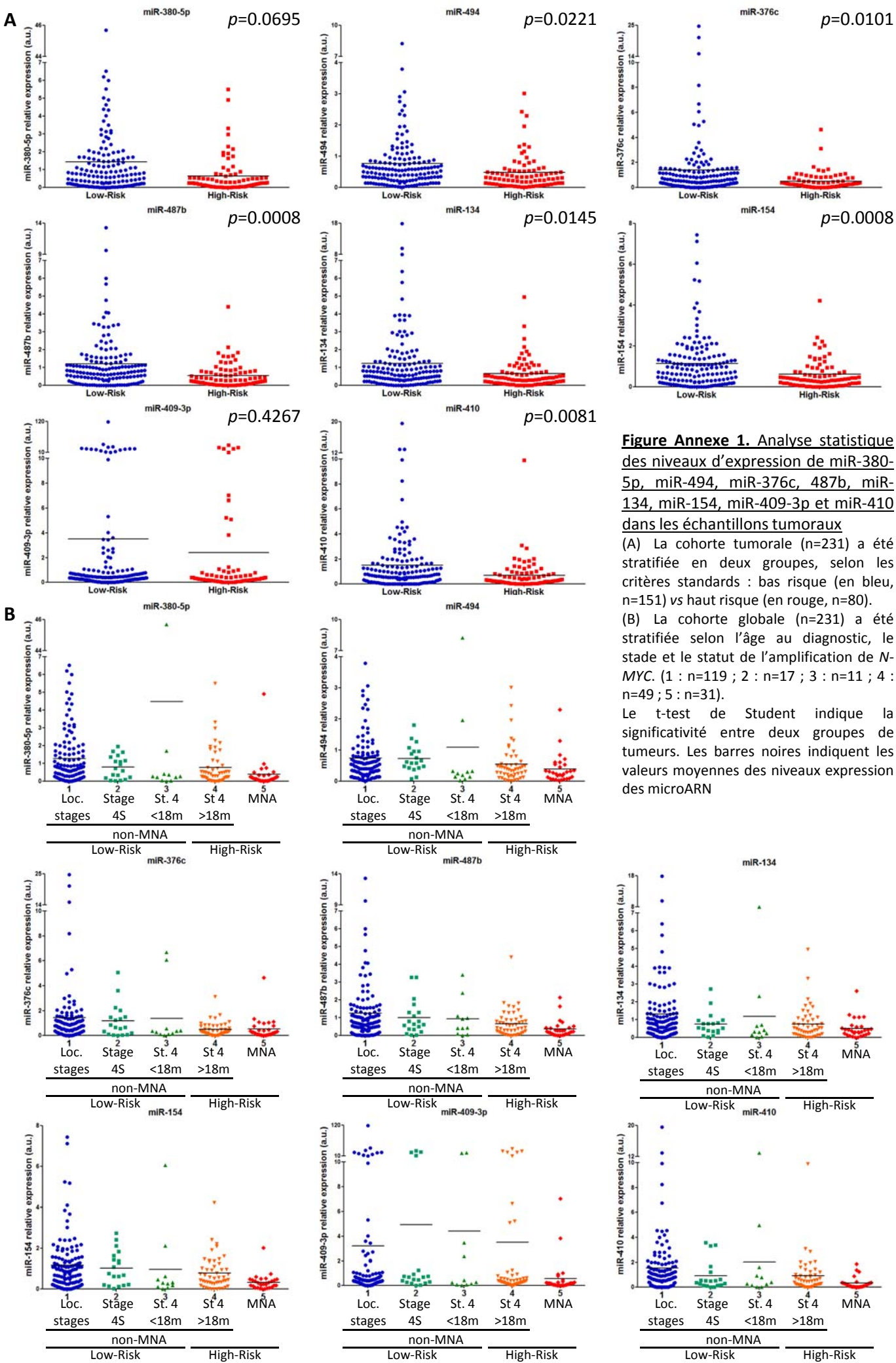
En conclusion, l’empreinte parentale ne serait pas dérégulée de façon générale mais spécifiquement aux deux seuls loci 14q32 et 19q13 ; cette dérégulation concernerait non seulement les deux clusters de microARN, C14MC et C19MC, mais aussi les gènes *DLK1* et *MEG3*.

Afin de compléter les informations déjà obtenues et de mieux comprendre la dérégulation observée dans les neuroblastomes, l’analyse de l’expression des transcrits *RTL1* et *RTL1as*, des trois microARN isolés (miR-2392, miR-770 et miR-370), des snoARN et des longs ARN non codants à la fois en amont et en aval du cluster de microARN C14MC devront être analysés.

Au-delà d’anomalies génomiques potentiels non analysées ici (micro-délétion, perte d’hétérozygotie), et compte tenu du contexte d’empreinte parentale, des anomalies de la méthylation pourraient expliquer les variations d’expression observées. En effet, de nombreux îlots CpG ont été identifiés tout le long des 50kb portant les microARN du cluster C14MC ([www.urogene.org/cgi-bin/methprimer.cgi](http://www.urogene.org/cgi-bin/methprimer.cgi)). Des analyses par PCR spécifique de méthylation et séquençage permettraient de caractériser le statut de méthylation de ces îlots dans les tumeurs. A titre préliminaire sur 16 tumeurs neuroblastiques, des analyses par PCR spécifique de la méthylation sur les îlots 1, 2 et 7 montrent une corrélation inverse entre le pourcentage de méthylation et l’expression des microARN du cluster C14MC (voir Figure 31). Autrement dit, les tumeurs exprimant fortement les microARN du cluster C14MC présente une hémi-méthylation de la région, tandis que les tumeurs présentant une faible expression des microARN, présente 100% de méthylation ; ces données indiqueraient donc une anomalie de la méthylation du locus.

Il serait également intéressant d’identifier l’origine parentale, paternelle ou maternelle, des différents transcrits. L’ensemble de ces résultats permettrait une meilleure compréhension de la régulation de ces régions soumise à empreinte parentale dans les neuroblastomes.





**Figure Annexe 1.** Analyse statistique des niveaux d'expression de miR-380-5p, miR-494, miR-376c, 487b, miR-134, miR-154, miR-409-3p et miR-410 dans les échantillons tumoraux

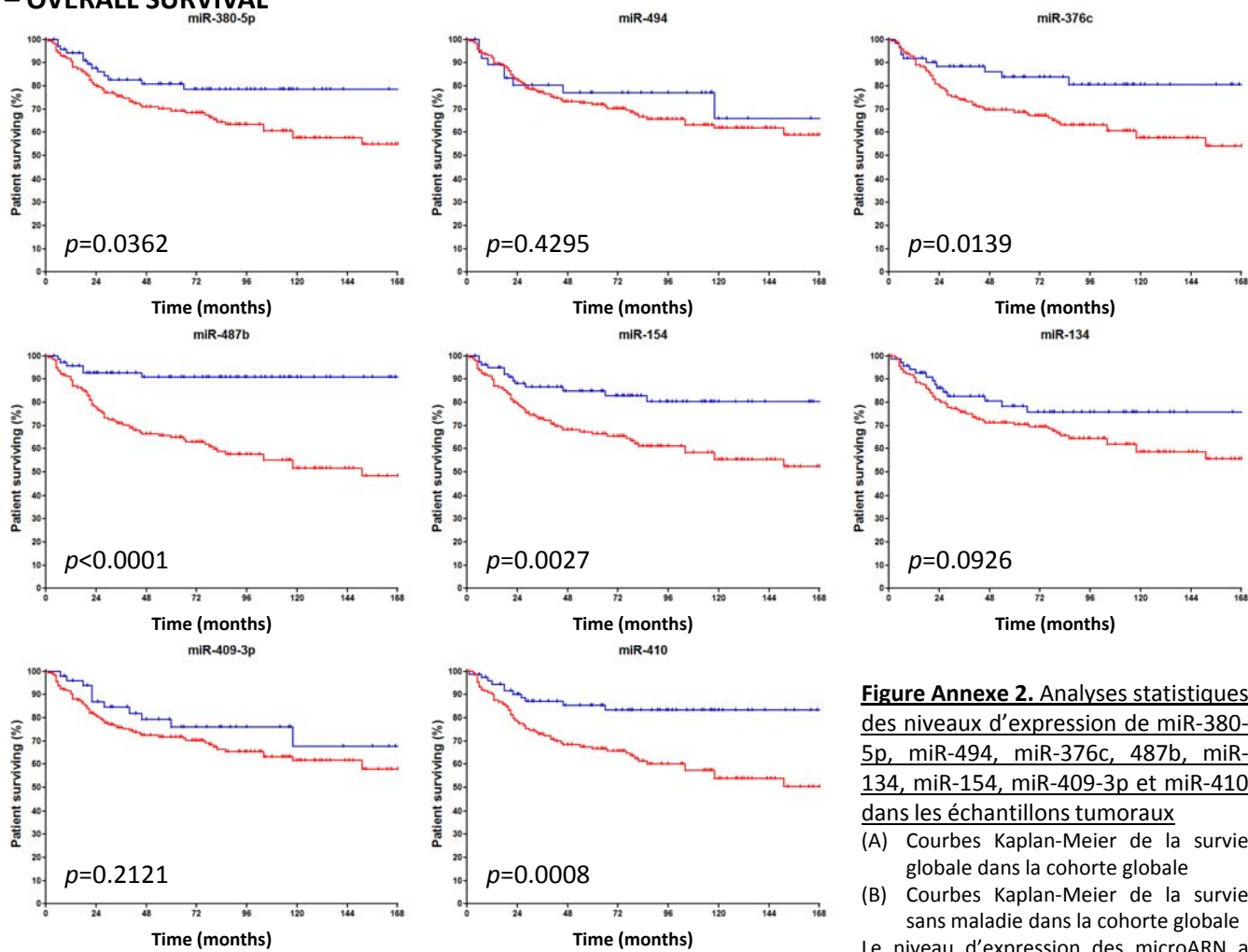
(A) La cohorte tumorale (n=231) a été stratifiée en deux groupes, selon les critères standards : bas risque (en bleu, n=151) vs haut risque (en rouge, n=80).

(B) La cohorte globale (n=231) a été stratifiée selon l'âge au diagnostic, le stade et le statut de l'amplification de *N-MYC*. (1 : n=119 ; 2 : n=17 ; 3 : n=11 ; 4 : n=49 ; 5 : n=31).

Le t-test de Student indique la significativité entre deux groupes de tumeurs. Les barres noires indiquent les valeurs moyennes des niveaux expression des microARN



## A – OVERALL SURVIVAL



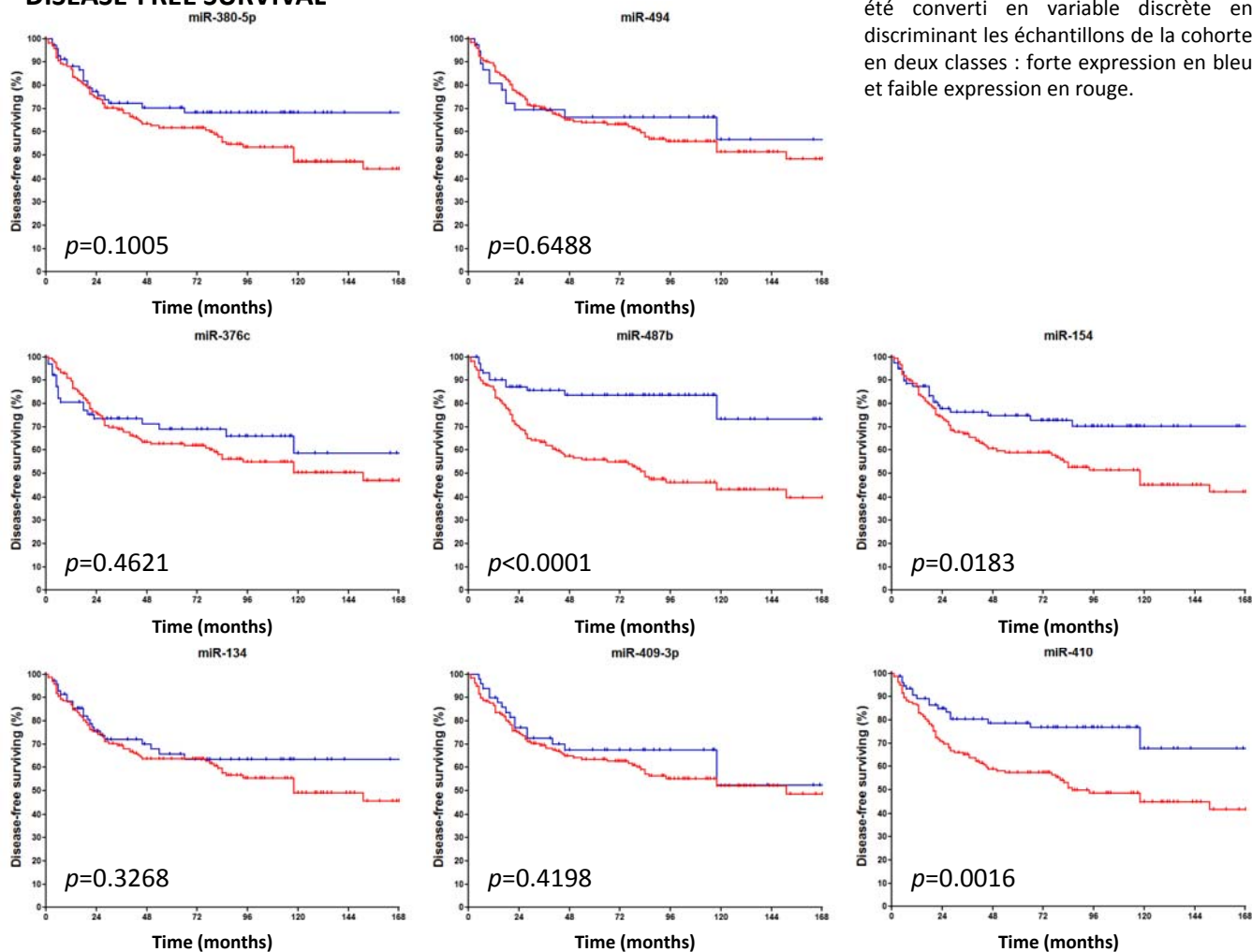
**Figure Annexe 2.** Analyses statistiques des niveaux d'expression de miR-380-5p, miR-494, miR-376c, 487b, miR-134, miR-154, miR-409-3p et miR-410 dans les échantillons tumoraux

(A) Courbes Kaplan-Meier de la survie globale dans la cohorte globale

(B) Courbes Kaplan-Meier de la survie sans maladie dans la cohorte globale

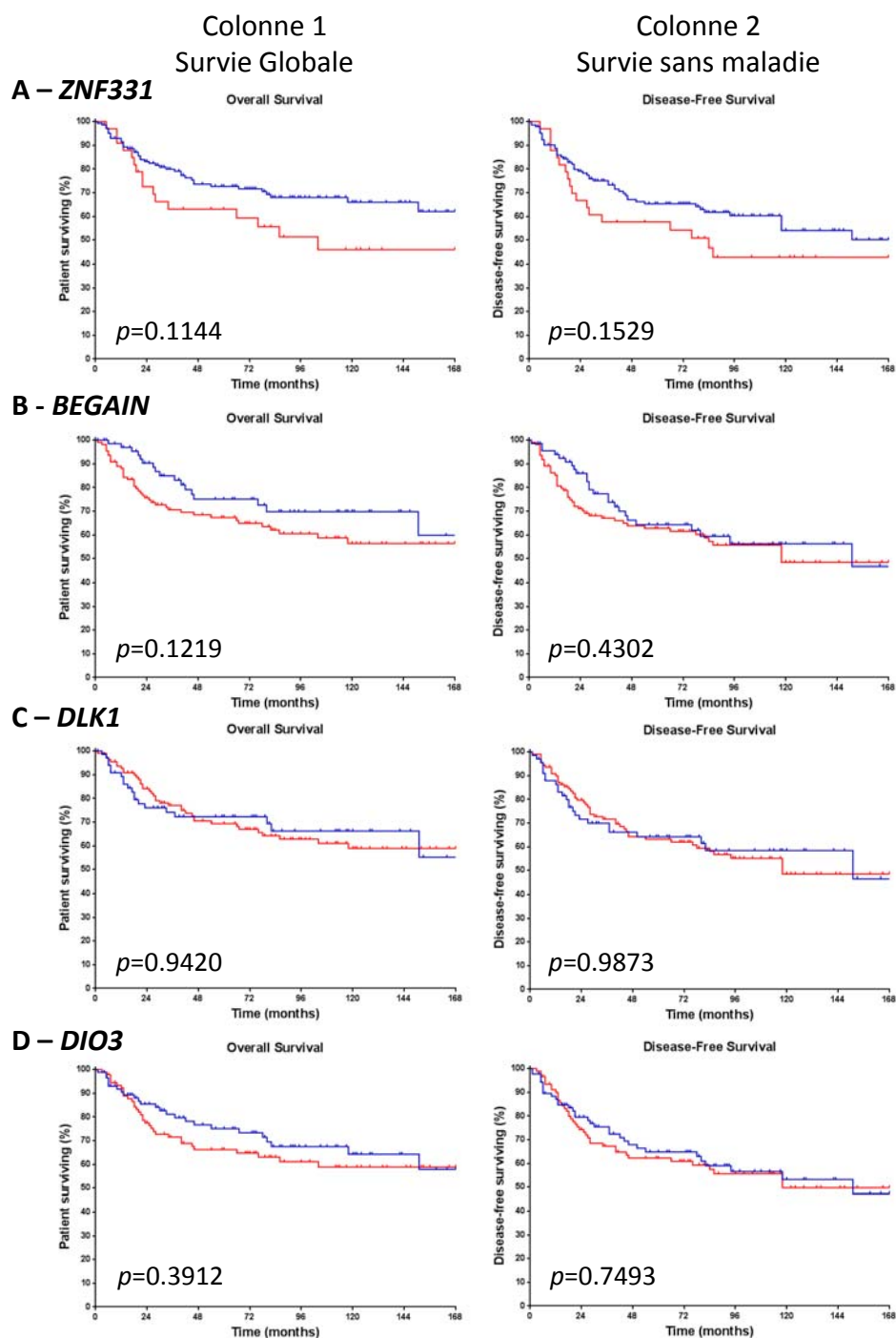
Le niveau d'expression des microARN a été converti en variable discrète en discriminant les échantillons de la cohorte en deux classes : forte expression en bleu et faible expression en rouge.

## B – DISEASE-FREE SURVIVAL









**Figure Annexe 3.** Analyses statistiques des niveaux d'expression de gènes (A) *ZNF331*, (B) *BEGAIN*, (C) *DLK1* et (D) *DIO3* ans les échantillons tumoraux pour la survie globale (colonne 1) et la survie sans maladie (colonne 2)

Le niveau d'expression des microARN a été converti en variable discrète en discriminant les échantillons de la cohorte en deux classes : forte expression en bleu et faible expression en rouge.



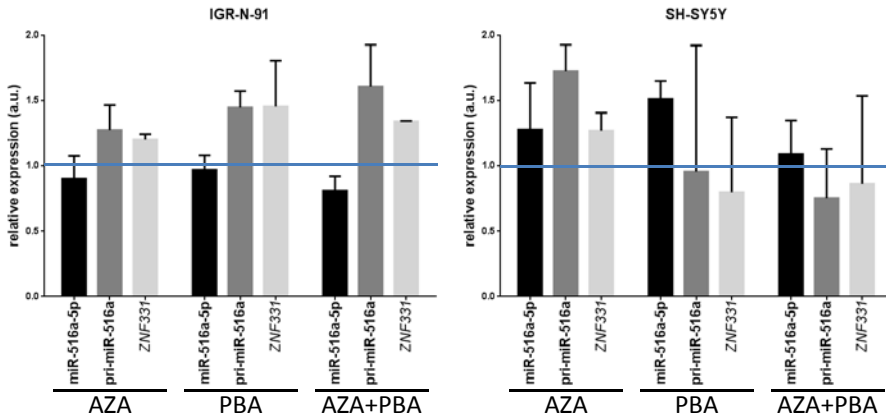
## 2. Modulation de l'expression des microARN par différents agents thérapeutiques

### 2.1. Lignées de neuroblastome : outils d'étude de l'expression des microARN

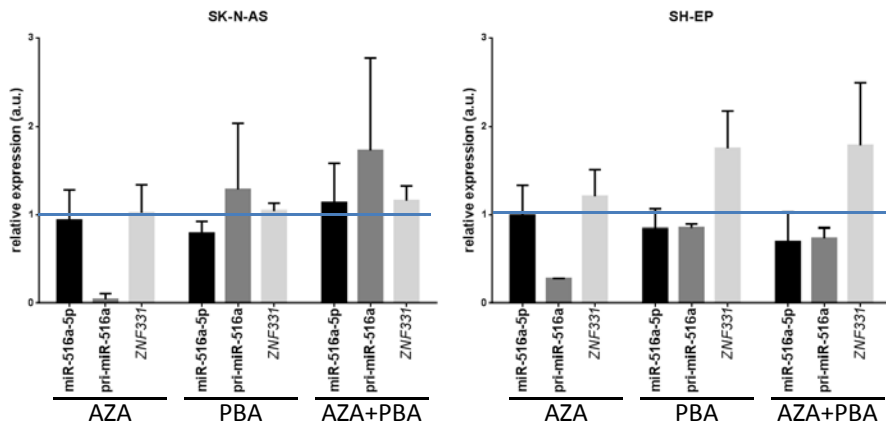
L'hétérogénéité morphologique caractéristique des tumeurs neuroblastiques tient à l'existence de deux contingents cellulaires majeurs : les neuroblastes malins et les cellules schwanniennes stromales. La représentativité de ces deux contingents conditionne l'aptitude ou non des neuroblastes malins à se différencier. En effet, au contact des cellules schwanniennes, les neuroblastes malins s'engageraient dans une différenciation neuronale sympathique qui abolirait la prolifération cellulaire [Ambros et al., 1996]. Les lignées établies à partir des tumeurs neuroblastiques se propagent *ex vivo* vers l'un ou l'autre de ces types cellulaires ; le type « N » (neuronal) et le type « S » (« substrate adhérent » ou schwannien) se distinguent *ex vivo* selon leur morphologie et leurs caractéristiques biochimiques [Biedler et al., 1973]. Un phénotype intermédiaire nommé « I » a été également décrit. Dans le but d'une étude exhaustive représentative des lignées à disposition au laboratoire, quatre lignées et sous-lignées (amplifié ou non pour l'oncogène *N-MYC*) ont été retenues :

- pour le type « N », les lignées IGR-N-91 (amplifiée) et la sous-lignée SH-SY5Y (non amplifiée),
- pour le type « S », la sous-lignée SH-EP (non amplifiée),
- et la lignée SK-N-AS (amplifiée), dont le phénotype n'a pas été analysé parfaitement mais aux caractéristiques la rapprochant du type « S »

Lignées  
« N »



Lignées  
« S »



**Figure 37.** Expression du miR-516a-5p, du pri-miR-516a et de *ZNF331* dans quatre lignées cellulaires neuroblastiques soumises à différents traitements (5-aza-2'-désoxycytidine – AZA, acide phénylbutyrique – PBA)

Les barres bleues représentent le niveau d'expression dans le témoin traité au DMSO.

## 2.2. Traitements des lignées cellulaires neuroblastiques par la 5-aza-2'-déoxycytidine et l'acide phényl-butyrique

La 5-aza-2'-déoxycytidine (AZA), analogue chimique de la cytosine, l'une des bases pyrimidiques qui entrent dans la composition des acides nucléiques, est principalement utilisée dans le traitement des syndromes myélodysplasiques. L'AZA agit via deux mécanismes : i) à faible dose, elle inhibe les ADN méthyltransférases provoquant l'hypométhylation de l'ADN et ainsi l'activation des gènes, ii) à dose élevée, elle s'incorpore aux acides nucléiques (ADN et ARN) entraînant la mort des cellules. L'acide phényl-butyrique (PBA) est utilisé dans les traitements des lymphomes (voir introduction section 1.3) ; c'est un inhibiteur des histone désacétylases qui permet ainsi le maintien des marques d'acétylation, et donc la transcription des gènes.

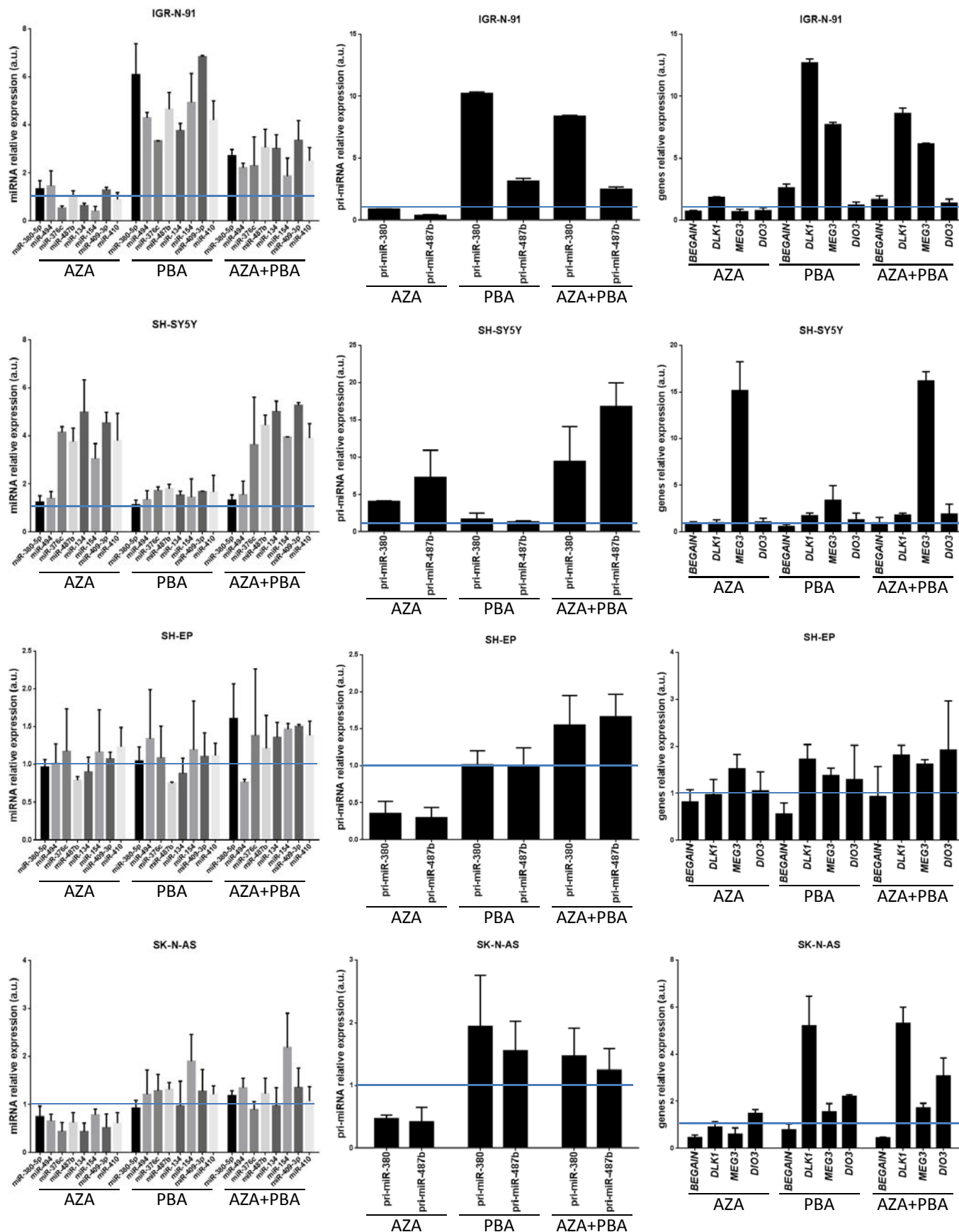
Dans le but d'étudier la modulation d'expression des microARN et plus largement des gènes des loci 14q32 et 19q13, les quatre lignées – IGR-N-91, SH-SY5Y, SH-EP et SK-N-AS – ont été traitées durant 72h soit à l'AZA (10 $\mu$ M), soit au PBA (5mM), soit à une combinaison des deux drogues (AZA/PBA). Les résultats normalisés par rapport à ceux obtenus à partir des cellules contrôles traitées au DMSO sont les suivants :

### i) Analyse du locus 19q13 (Figure 37)

Concernant les deux lignées IGR-N-91 et SH-SY5Y – lignées « N », un traitement à l'AZA, au PBA, ou à la combinaison des deux, n'a pas d'effet sur les taux d'expression de miR-516a-5p mature comme de son transcrite primaire. Les résultats comparables sont obtenus avec les deux lignées « S », SH-EP et SK-N-AS, à l'exception du traitement à l'AZA qui diminue très sensiblement le taux de transcrite primaire.

De même, l'expression du gène *ZNF331* n'est affectée par aucun des trois traitements et cela dans les quatre lignées étudiées.

Ainsi, à l'exception du pri-miR-516a dans les lignées « S » traitée à l'AZA et dans la limite des lignées étudiées, des agents agissant sur la méthylation de l'ADN ou l'acétylation des histones n'ont pas d'effet majeur sur les taux d'expression des transcrits de la région 19q13 soumise à empreinte.



**Figure 38.** Expression des huit microARN du cluster C14MC (colonne de gauche), des microARN primaires (colonne du milieu) et des quatre gènes BEGAIN, DLK1, MEG3 et DIO3 (colonne de droite) de la région 14q32 soumise à empreinte parentale dans quatre lignées cellulaires neuroblastiques soumises à différents traitements (5-az-2'-désoxycytidine – AZA, acide phénylbutyrique – PBA). Les barres bleues représentent le niveau d'expression du témoin traité au DMSO.

ii) Analyse du locus14q32 (Figure 38)

L'étude a été effectuée pour huit microARN matures (miR-380-5p, miR-494, miR-376c, miR-487b, miR-134, miR-154, miR-409-3p et miR-410), deux transcrits primaires (pri-miR-380 et pri-miR-487b), et quatre gènes (*BEGAIN*, *DLK1*, *MEG3* et *DIO3*).

Contrairement au locus 19q13, les variations d'expression des microARN du C14MC dépendent de la lignée analysée. Pour les lignées « S », SK-N-AS et SH-EP, la réponse au traitement est comparable à celle décrite pour miR-516a-5p à savoir, une absence d'effet des traitements sur le taux d'expression des microARN matures mais une diminution significative des deux pri-miRNA dans les cellules traitées à l'AZA.

Les lignées « N » IGR-N-91 et SH-SY5Y répondent aux traitements AZA et PBA de manière opposée. Dans la lignée IGR-N-91, l'expression de l'ensemble des microARN du C14MC est sensible au traitement PBA mais pas au traitement AZA, avec une stimulation moyenne de 5 fois. Le double traitement AZA/PBA diminue sensiblement l'effet du traitement PBA. A l'inverse, la lignée SH-SY5Y réagit à l'AZA mais pas au PBA, avec une stimulation de l'ordre de 4 fois de l'expression de 6 des 8 microARN analysés. miR-380-5p et miR-494 sont les deux microARN dont l'expression ne varie pas. L'addition de PBA au traitement par l'AZA ne modifie pas le taux de stimulation de l'AZA. Enfin, aussi bien dans la lignée IGR-N-91 que dans la lignée SH-SY-5Y, les variations d'expression des deux pri-microARN analysés suivent les variations des transcrits matures, avec, dans les cellules SH-SY5Y, un effet synergique du double traitement AZA/PBA.

Comme pour les microARN, l'expression des quatre gènes soumis à empreinte – *BEGAIN*, *DLK1*, *MEG3* et *DIO3* – n'est pas affectée par le traitement des cellules « S », SH-EP et SK-N-AS, à l'exception du gène *DLK1* augmenté de cinq fois par le traitement au PBA dans la lignée SK-N-AS. En revanche, un traitement au PBA de la lignée IGR-N-91 augmente d'environ 10 fois l'expression des gènes *DLK1* et *MEG3*, alors que l'expression de *MEG3* est augmentée de 15 fois dans la lignée SH-SY5Y traitée à l'AZA. Ces résultats vont dans le même sens que ceux obtenus pour les microARN du cluster C14MC ; ils suggèrent fortement que les gènes soumis à empreinte de la région 14q32 sont sensible à la méthylation de l'ADN dans les cellules SH-SY5Y et à l'acétylation des histones dans la lignée IGR-N-91. Cette sensibilité se limiterait globalement aux microARN et aux gènes *DLK1* et *MEG3*.



	3'---UUAGCAUGUCCCAGU <b>UAGGUGAA</b> -5'	hsa-miR-487b	
	:		
ORF	... CUGAAAGGAAAGG--CAU-CACUA ... Poly(A)	<i>TWIST1</i>	Score 1.591
	3'-UUAG--CAUGUCCCAGU <b>UAGGUGAA</b> -5'	hsa-miR-487b	
	:		
ORF	... --UUGGGGAAAGGCGAAUCCACUC ... Poly(A)	<i>TWIST2</i>	Score 2.912
	3'-AAGAGCUCCUUUCUUC <b>CGUGAAA</b> G-5'	hsa-miR-516a-5p	
	:   : :             :		
ORF	... AACAGGGCGUGGGGCGCACUUU ... Poly(A)	<i>TWIST1</i>	Score 2.420
	3'-AAGAGCUCCUUUCUUC <b>CGUGAAA</b> G-5'	hsa-miR-516a-5p	
	:        :   :		
ORF	... CGUUGGCGGGAGUGAGCACAUUA ... Poly(A)	<i>TWIST2</i>	Score 1.735
	3'-AAGAGCU-CCUUUCUUC <b>GUGAAA</b> G-5'	hsa-miR-516a-5p	
	:		
ORF	... -ACUGGACAGUCACUGCCACUUUG ... Poly(A)	<i>MYCN</i>	Score 2.022
	3'-AAGAGCUCCUUUCUUC <b>GUGAAA</b> G-5'	hsa-miR-516a-5p	
	:		
ORF	... GUAGAUUUUACUUUAU <b>CACUUUU</b> ... Poly(A)	<i>MYCN</i>	Score 2.954
	3'--AAGAGCUCCUUUCUUC <b>CGUGAAA</b> G-5'	hsa-miR-516a-5p	
ORF	... GUGCUGCAUCUUA-UAGCACUUUG ... Poly(A)	<i>MYCN</i>	Score 3.304

**Figure 39.** Les séquences 3'UTR des gènes *N-MYC*, *TWIST1* et *TWIST2* contiennent des séquences cibles de (A) miR-487b et (B) miR-516a-5p

### 3. Recherche de gènes cibles des miR-487b et miR-516a-5p

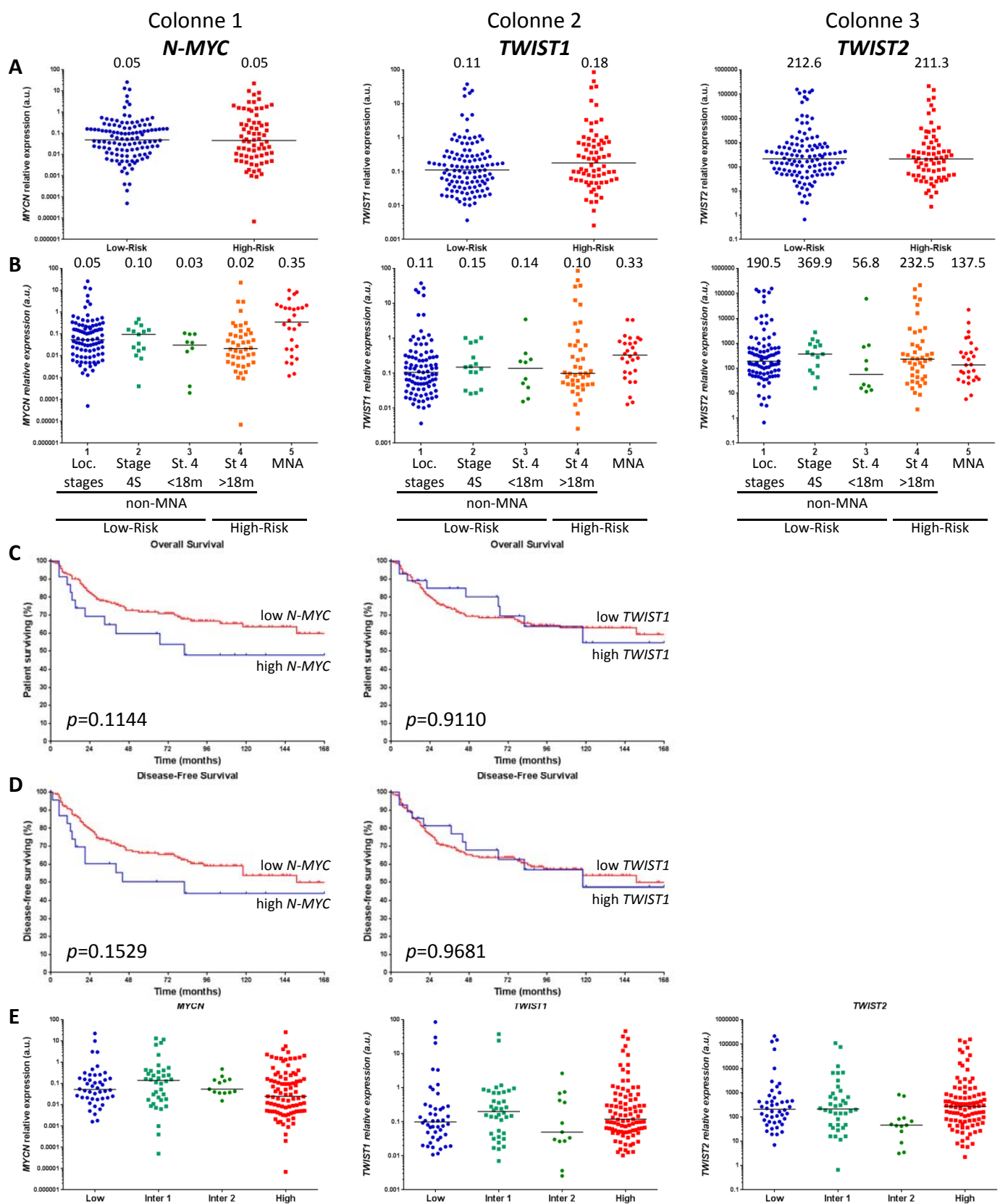
#### 3.1. Recherche de gènes cibles *in silico*

Les microARN des clusters C14MC et C19MC montrent une forte co-régulation de leur expression suggérant des mécanismes d'inhibition des gènes cibles de manière synergique. De plus, les séquences nucléotidiques « graines », éléments clés du ciblage des ARN messagers, présentent de fortes similarités. Ces données suggèrent l'existence d'une redondance parmi les gènes cibles directs de ces microARN, favorisant ainsi le ciblage de telle ou telle voie de signalisation. Il est donc possible que ces microARN agissent simultanément selon un mécanisme plus général d'inhibition de l'expression protéique plutôt que par ciblage spécifique de tel ou tel gène donné.

A partir des bases de données prédictives (*TargetScan*, *miRanda*, *NTNU*), les gènes cibles potentiels sont identifiés en tenant compte de la conservation évolutive des sites de ciblage, par la stabilité de la liaison microARN-ARN messenger et/ou par le nombre de sites de ciblage. Les gènes cibles potentiels des microARN des clusters C14MC et C19MC se révèlent impliqués dans une grande diversité de voies de signalisation cellulaires, suggérant le caractère pléiotropique de ces clusters, à la fois indépendamment et spécifiquement du type cellulaire dans lequel ils s'expriment.

Les analyses prédictives identifient les gènes *N-MYC*, *TWIST1* et *TWIST2* comme des cibles potentielles d'une dizaine de microARN de chacun des deux clusters C14MC et C19MC parmi lesquels on retrouve miR-516a-5p et miR-487b (Figure 39). Afin de déterminer dans quelle mesure ces deux microARN régulent l'expression de *N-MYC*, *TWIST1* et *TWIST2*, les expériences suivantes ont été réalisées :

- *in vivo*, quantification de l'expression de *N-MYC*, *TWIST1* et *TWIST2* dans 190 tumeurs neuroblastiques et recherche d'une possible corrélation inverse entre l'expression de ces gènes et l'expression de miR-516a-5p et miR-487b.
- *ex vivo*, mesure de l'expression des trois gènes cibles potentiels, *N-MYC*, *TWIST1* et *TWIST2*, dans des lignées cellulaires neuroblastiques transfectées avec soit des « mimic » soit des inhibiteurs de miR-516a-5p ou miR-487b.



**Figure 40.** Analyses statistiques des niveaux d'expression des gènes *N-MYC* (Colonne 1), *TWIST1* (Colonne 2) et *TWIST2* (Colonne 3) dans les tumeurs neuroblastiques (n=190)

- (A) Entre les tumeurs de bas et haut risque selon la classification standard
  - (B) Entre les cinq groupes clinico-biologiques stratifiés selon les critères de la classification standard
  - (C) Courbes Kaplan-Meier de la survie globale dans la cohorte globale
  - (D) Courbes Kaplan-Meier de la survie sans maladie dans la cohorte globale
  - (E) Entre les quatre groupes de tumeurs classés d'après la combinaison de miR-516a-5p et miR-487b
- Pour les figures A, B et E, les barres noires représentent les médianes d'expression. Pour les figures C et D, le niveau d'expression des transcrits primaires a été converti en variable discrète en discriminant les échantillons de la cohorte en deux classes : forte expression en bleu et faible expression en rouge.

### 3.2. Expression de *N-MYC*, *TWIST1* et *TWIST2* dans les tumeurs neuroblastiques

Dans un premier temps, l'expression des gènes *N-MYC*, *TWIST1* et *TWIST2* a été quantifiée dans 190 tumeurs neuroblastiques. Tandis qu'aucune différence d'expression de ces trois gènes n'est retrouvée entre les tumeurs de bas et de haut risque selon la classification standard, les médianes d'expression des gènes *N-MYC* et *TWIST1* sont néanmoins respectivement 6 et 3 fois plus élevées dans les tumeurs amplifiées en *N-MYC* (Figures 40A et 40B), sans pour autant qu'il n'y ait une corrélation directe entre le nombre de copies de *N-MYC* et son expression. Mises à part les tumeurs amplifiées en *N-MYC* et contrairement aux données rapportées par la littérature, ni l'expression de *TWIST1* ni celle de *TWIST2* – impliqués dans les processus de la transition épithélio-mésenchymateuse – n'est accrue dans les tumeurs métastatiques, comparées aux tumeurs localisées (Figures 40A et 40B).

De plus, ni l'expression de *TWIST1* ni celle de *TWIST2* n'est associée à la survie dans les patients étudiés. Même si l'expression de *N-MYC* n'est pas associée significativement à la survie (globale,  $p=0.1144$  ; sans maladie,  $p=0.1529$ ), une plus forte expression est néanmoins retrouvée dans les tumeurs de patients de faible survie (Figure 40C et 40D).

L'expression des gènes *N-MYC*, *TWIST1* et *TWIST2* a été comparée dans les quatre groupes de neuroblastomes classés sur la base de la combinaison de l'expression des miR-487b et miR-516a-5p (voir Première Partie). Les résultats ne montrent que très peu de variation des médianes d'expression entre les différents groupes (Figure 40E).

Les tableaux ci-après fournissent les coefficients de corrélation de l'expression des trois gènes *N-MYC*, *TWIST1* et *TWIST2* entre eux (Tableau 10), avec l'expression des microARN matures (Tableau 11) et avec l'expression des transcrits primaires des microARN (Tableau 12).

**Tableau 10.** Coefficients de corrélation entre l'expression des trois gènes *N-MYC*, *TWIST1*, *TWIST2* entre eux dans **(A)** la cohorte entière, **(B)** les cinq groupes clinico-biologiques classiques et **(C)** les quatre groupes classés selon la combinaison des microARN miR-487b et miR-516a-5p. Les cases grisées représentent des résultats significatifs ( $p < 0.05$ ).

<b>A</b>	<i>N-MYC</i>	<i>TWIST 1</i>	<i>TWIST 2</i>
	<b>Cohorte entière (n=190)</b>		
<i>N-MYC</i>	1,00	0,68	0,59
<i>TWIST 1</i>		1,00	0,71
<i>TWIST 2</i>			1,00

<b>B - Classification selon les groupes clinico-biologiques classiques</b>			
	<i>N-MYC</i>	<i>TWIST 1</i>	<i>TWIST 2</i>
<b>Stades localisés (n=93)</b>			
<i>N-MYC</i>	1,00	0,80	0,67
<i>TWIST 1</i>		1,00	0,82
<i>TWIST 2</i>			1,00
<b>Stades 4S et 4 &lt; 18 mois (n=25)</b>			
<i>N-MYC</i>	1,00	-0,27	-0,17
<i>TWIST 1</i>		1,00	0,91
<i>TWIST 2</i>			1,00
<b>Stades 4 &gt; 18 mois (n=44)</b>			
<i>N-MYC</i>	1,00	0,81	0,60
<i>TWIST 1</i>		1,00	0,71
<i>TWIST 2</i>			1,00
<b><i>N-MYC</i> amplifiés (n=28)</b>			
<i>N-MYC</i>	1,00	0,64	0,23
<i>TWIST 1</i>		1,00	0,17
<i>TWIST 2</i>			1,00

<b>C - Classification basée sur la combinaison des deux microARN, miR-516a-5p et miR-487b</b>			
	<i>N-MYC</i>	<i>TWIST 1</i>	<i>TWIST 2</i>
<b>Bas risque (n=46)</b>			
<i>N-MYC</i>	1,00	0,90	0,56
<i>TWIST 1</i>		1,00	0,78
<i>TWIST 2</i>			1,00
<b>Intermédiaires 1 et 2 (n=51)</b>			
<i>N-MYC</i>	1,00	0,84	0,83
<i>TWIST 1</i>		1,00	0,91
<i>TWIST 2</i>			1,00
<b>Haut risque (n=93)</b>			
<i>N-MYC</i>	1,00	0,36	0,55
<i>TWIST 1</i>		1,00	0,53
<i>TWIST 2</i>			1,00

**Tableau 11.** Coefficients de corrélation entre l'expression des trois gènes *N-MYC*, *TWIST1*, *TWIST2* et l'expression des microARN matures des clusters C14MC et C19MC dans la cohorte entière. Les cases grisées représentent des résultats significatifs ( $p < 0.05$ ).

	<i>N-MYC</i>	<i>TWIST 1</i>	<i>TWIST 2</i>
<b>Cohorte entière (n=190)</b>			
miR-516a-5p	0,02	0,07	0,17
miR-380-5p	0,00	0,02	0,15
miR-494	-0,01	0,05	0,13
miR-376c	0,09	0,08	0,08
miR-487b	-0,02	0,01	0,07
miR-154	0,00	0,02	0,07
miR-134	-0,01	0,09	0,17
miR-410	-0,03	0,06	0,18
miR-409-3p	-0,04	0,02	0,05

**Tableau 12.** Coefficients de corrélation entre l'expression des trois gènes *N-MYC*, *TWIST1*, *TWIST2* et l'expression des microARN primaires des clusters C14MC et C19MC dans la cohorte entière. Les cases grisées représentent des résultats significatifs ( $p < 0.05$ ).

	<i>N-MYC</i>	<i>TWIST 1</i>	<i>TWIST 2</i>
<b>Cohorte entière (n=183)</b>			
pri-miR-516a	0,65	0,86	0,63
pri-miR-380	0,35	0,64	0,65
pri-miR-487b	0,26	0,51	0,68

i) Corrélation entre TWIST1 et TWIST2 (Tableau 10)

A une seule exception, les expressions de *TWIST1* et *TWIST2* sont toujours corrélées que l'on considère la cohorte totale ou les différents groupes de risque définis selon les critères clinico-biologiques standards, soit la combinaison de l'expression des deux microARN, miR-516a-5p et miR-487b. De manière surprenante, le seul groupe dans lequel les expressions de *TWIST1* et *TWIST2* ne sont pas corrélées est le groupe des tumeurs amplifiées en *N-MYC*.

ii) Corrélation entre TWIST1 et N-MYC (Tableau 10)

Lorsque l'ensemble des tumeurs est considéré, l'expression de *N-MYC* est corrélée à celle de *TWIST1*. Il en est de même pour l'ensemble des groupes classés en fonction des critères clinico-biologiques classiques, à l'exception du groupe de bon pronostic comprenant les stades métastatiques du très jeune enfant (stades 4S et stades 4 <18 mois). En revanche, lorsque la classification est faite sur la base de l'expression de miR-516a-5p et miR-487b, c'est le groupe de haut risque (miR-516a-5p<sup>fort</sup>/miR-487b<sup>faible</sup>) qui présente la plus faible corrélation entre *N-MYC* et *TWIST1*.

iii) Corrélation entre N-MYC et TWIST2 (Tableau 10)

Comme pour *TWIST1*, l'expression de *TWIST2* est corrélée à celle de *N-MYC* dans la population globale. De même, aucune corrélation n'est retrouvée dans le groupe classique de bon pronostic comprenant les stades 4S et les stades 4 <18 mois. Par contre, à la différence de *TWIST1*, l'expression de *TWIST2* n'est pas corrélée à l'expression de *N-MYC* dans les tumeurs amplifiées en *N-MYC*.

iv) Corrélation entre les microARN et les gènes *N-MYC*, *TWIST1* et *TWIST2* (Tableau 11)

Les résultats obtenus à partir de la cohorte globale ne montrent aucune corrélation entre l'expression des trois gènes et des huit microARN du cluster C14MC ou du microARN miR-516a-5p du cluster C19MC. Ainsi, malgré la présence de séquences cibles pour les miR-516a-5p et miR-487b dans les régions 3' non traduites de ces trois gènes, aucune corrélation négative n'est retrouvée au niveau des taux d'ARN messagers. Ceci conduit à l'hypothèse que, dans le cas d'une interaction directe entre les microARN et ces régions 3' non traduites, les microARN agiraient par l'inhibition de la traduction et non

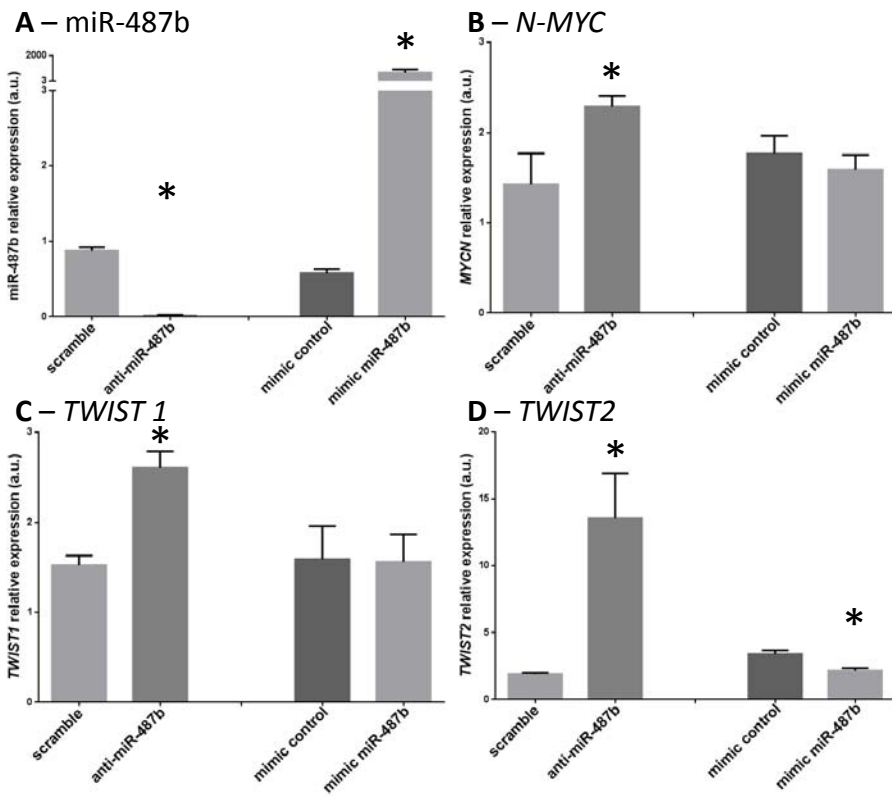


par déstabilisation des ARNm. Pour valider cette hypothèse, il faudrait avoir quantifié le taux des protéines en question dans cette population de tumeurs.

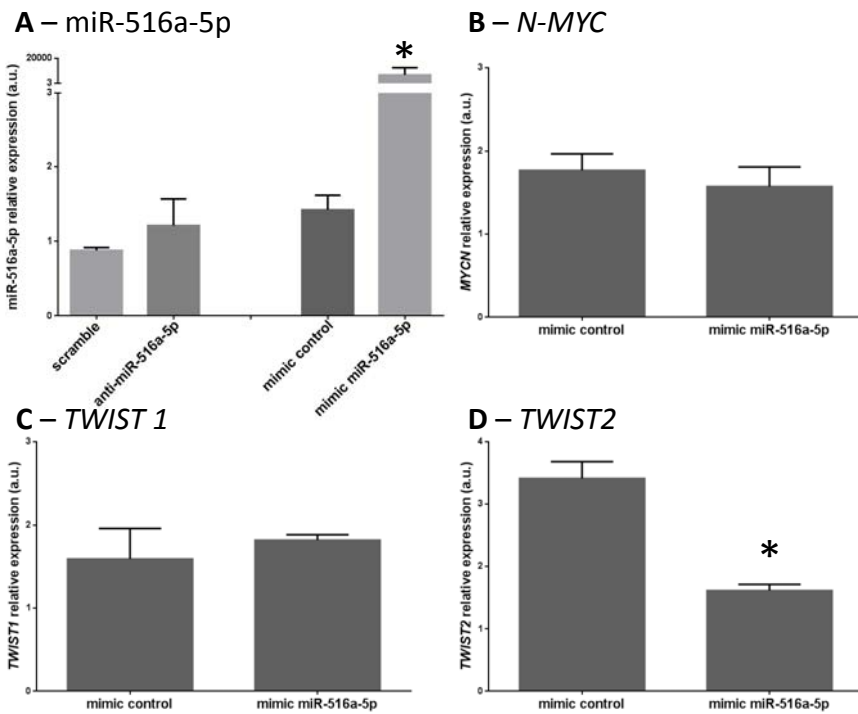
v) Corrélation entre les transcrits primaires des microARN et les gènes N-MYC, TWIST1 et TWIST2 (Tableau 12)

Contrairement aux microARN matures, une corrélation positive est retrouvée avec les pri-miR-516a, pri-miR-380 et pri-miR-487b, suggérant de nouveau l'intervention de mécanismes de maturation dans la régulation des taux intracellulaires des miRNA matures. Un mécanisme hypothétique additionnel serait que *N-MYC*, seul ou combiné aux gènes *TWIST1* et *TWIST2* (tous les trois facteurs de transcription), exerce un rétrocontrôle positif ou négatif direct sur la transcription de ces microARN primaires.





**Figure 41.** Expression de (A) miR-487b et des gènes (B) *N-MYC*, (C) *TWIST1* et (D) *TWIST2*, de la lignée IGR-N-91, après inhibition (anti-miR-487b) ou sur-expression de miR-487b (mimic miR-487b)



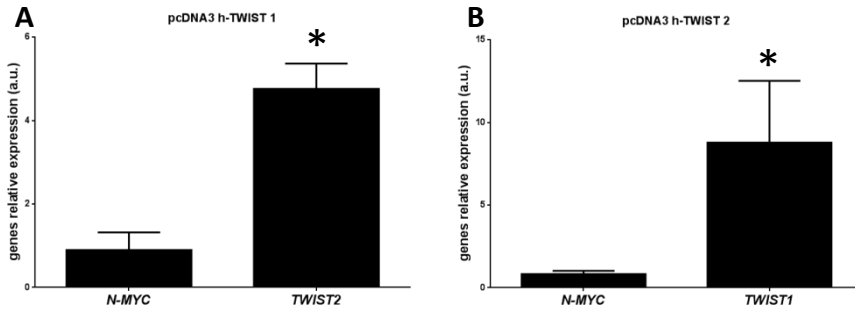
**Figure 42.** Expression de (A) miR-516a-5p et des gènes (B) *N-MYC*, (C) *TWIST1* et (D) *TWIST2*, de la lignée IGR-N-91, après inhibition (anti-miR-516a-5p) ou sur-expression de miR-516a-5p (mimic miR-516a-5p)

### 3.3. *N-MYC*, *TWIST1* et *TWIST2* : gènes cibles des miR-487b et miR-516a-5p

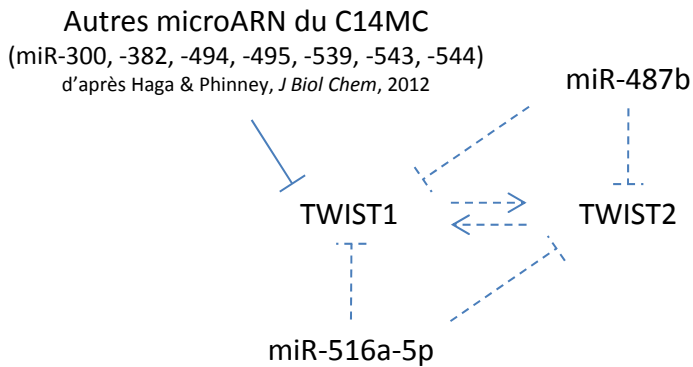
Les cellules de la lignée IGR-N-91 de phénotype « N » ont été transfectées avec 20nM d'une série d'oligonucléotides : i) contrôles négatifs (« scramble » et « mimic » control), ii) inhibiteurs (anti-miR-487b et anti-miR-516a-5p) et iii) précurseurs (« mimic » miR-487b et « mimic » miR-516a-5p). Après 48h de transfection, l'expression des microARN, miR-487b et miR-516a-5p, et des gènes, *N-MYC*, *TWIST1* et *TWIST2*, est mesurée par RT-PCR quantitative. Les figures 41A et 42A montrent que les deux microARN sont bien surexprimés dans les cellules transfectées avec les mimics des microARN (Figure 41A et 42A) et que la transfection de l'anti-miR-487b inhibe complètement l'expression de miR-487b (Figure 41A). En revanche, aucune inhibition de miR-516a-5p n'étant observée en réponse à la transfection de l'anti-miR-516-5p, son effet sur l'expression de *N-MYC*, *TWIST1* et *TWIST2* n'a pas été mesuré (Figure 42A).

Suite à la transfection de l'anti-miR-487b, l'expression de *N-MYC*, *TWIST1* et *TWIST2* est augmentée respectivement de 1.6, 1.7 et 7.2 fois (Figure 41B, C et D). En revanche, tandis que la sur-expression de miR-487b ne provoque pas de diminution du taux d'ARNm de *N-MYC* et *TWIST1*, l'expression de *TWIST2* est diminuée de 40% (Figure 41D). Ce dernier résultat, allant dans le même sens que celui obtenu par transfection de l'anti-miR-487b (stimulation d'un facteur de 7,2 de l'expression de miR487b) montre que, dans ces cellules, le taux intracellulaire d'ARN messenger de *TWIST2* est sous le contrôle de miR-487b, du moins, en partie. La sur-expression de miR-516a-5p n'entraîne qu'une diminution de 2 fois de l'expression de *TWIST2* ; elle est sans effet sur *TWIST1* et *N-MYC* (Figure 42B, C et D).

Les quantifications des protéines *N-MYC*, *TWIST1* et *TWIST2* par western-blot dans les mêmes conditions de transfection sont nécessaires pour valider ces résultats, ces derniers n'excluant pas la possibilité d'identifier une éventuelle inhibition de la traduction de ces ARN messagers par miR-487b et miR-516a-5p, sans déstabilisation de l'ARN messenger. De plus, des expériences de co-transfection des anti-microARN et/ou « mimic » avec des plasmides codant un gène de fusion luciférase-séquence 3'UTR des gènes *N-MYC* ou *TWIST1* ou *TWIST2*, permettraient de confirmer la régulation directe de ces gènes par miR-487b et miR-516a-5p.



**Figure 43.** Expression des gènes (A) *N-MYC* et *TWIST2* après sur-expression de *TWIST1* et (B) *N-MYC* et *TWIST1* après sur-expression de *TWIST2*, dans la lignée IGR-N-91



**Figure 44.** Modèle hypothétique des interactions moléculaires entre les miR-487b et miR-516a-5p et les gènes *N-MYC*, *TWIST1* et *TWIST2*

trait plein : action établie  
trait pointillé : action à valider

Les résultats obtenus en transfection pour *TWIST2* paraissent contradictoires à ceux des tumeurs qui montraient une absence complète de corrélation du taux d'ARN messager *TWIST2* avec l'expression des différents microARN, et en particulier avec miR-487b et miR-516a-5p. Une des explications possibles serait un effet indirect, les microARN régulant l'expression d'un ARN messager codant pour une protéine régulant le taux de transcription de *TWIST2*.

Les résultats présentés dans la figure 43 montrent une augmentation du taux d'ARN messager *TWIST2* dans les cellules IGR-N-91 transfectées avec un plasmide codant pour *TWIST1* (Figure 43A). Vice-versa, la transfection d'un vecteur codant pour *TWIST2* entraîne une augmentation du taux intracellulaire d'ARN messager *TWIST1* (Figure 43B). En revanche, la surexpression de *TWIST1* ou *TWIST2* est sans effet sur les taux intracellulaires de l'ARN messager codant pour *N-MYC* (Figure 43).

Un modèle hypothétique des interactions moléculaires impliquant les miR-487b et miR-516a-5p et les gènes *N-MYC*, *TWIST1* et *TWIST2* est présenté dans la Figure 44.

Cette hypothèse peut être validée par quantification des niveaux protéiques des gènes par western-blot. D'autre part, il serait intéressant de reproduire ces résultats dans d'autres lignées neuroblastiques de type « N » ou « S ».



## DISCUSSION DE LA SECONDE PARTIE

Afin d'explorer la spécificité des variations d'expression des microARN soumis à empreinte parentale des clusters C14MC et C19MC, les analyses ont été étendues à neuf microARN des deux clusters C14MC et C19MC, de trois transcrits primaires de ces microARN (pri-miR-380, pri-miR-487b, pri-miR-516a), de cinq gènes des deux loci 14q32 (*BEGAIN*, *DLK1*, *MEG3* et *DIO3*) et 19q13 (*ZNF331*) et de huit autres gènes soumis à empreinte parentale (*TP73*, *PLAGL1*, *GRB10*, *H19*, *IGF2*, *KCNQ1*, *CDKN1C* et *ANO1*).

Tout d'abord, l'analyse de l'expression huit microARN du cluster C14MC a conduit à spéculer l'existence de plusieurs transcrits primaires alternatifs. Les résultats obtenus ont appelé à suggérer, pour cette région de 50kb, l'existence d'au moins deux sous-domaines, C14MC-SC1 et C14MC-SC2, sous le contrôle de promoteur distinct pouvant ainsi expliquer les différences d'expression des microARN matures relevées. L'analyse de l'expression des transcrits primaires de ces deux sous-domaines (pri-miR-380 et pri-miR-487b) n'ayant révélé aucune différence d'expression dans chaque échantillon analysé, a donc fait avorter cette hypothèse. Ces résultats laissent donc suggérer l'existence de processus de maturation post-transcriptionnelle spécifique de chaque microARN ou sous-cluster considéré.

En revanche, il semblerait bien établi que les variations d'expression observées pour les microARN des clusters C14MC et C19MC entre les différents groupes de risque des neuroblastomes, ne se généraliserait pas au niveau de l'empreinte parentale elle-même. En effet, des analyses effectuées, il ressort que l'empreinte parentale n'apparaît pas dérégulée de façon générale dans les neuroblastomes ; sur les deux loci 14q32 et 19q13, la dérégulation serait circonscrite aux deux clusters de microARN, C14MC et C19MC, et ainsi qu'aux deux gènes *DLK1* et *MEG3*. Les différences d'expression des microARN des deux clusters C14MC et C19MC et des gènes *DLK1* et *MEG3* permettent de stratifier le risque encouru par les patients en trois groupes de tumeurs : bas, intermédiaire (inter1 et inter2) et haut risque.



A la recherche de l'origine de la dérégulation d'expression affectant les deux loci soumis à empreinte parentale 14q32 et 19q13, il apparait que le contenu génomique des microARN d'intérêt ne soit pas affecté. Pour confirmer une absence de dérégulation liée à des altérations génomiques, il reste à analyser d'autres anomalies potentielles, comme des micro-délétions ou des pertes d'hétérozygotie.

Au final, la dérégulation de l'expression des microARN relèverait principalement de la transcription elle-même. Compte tenu du contexte d'empreinte parentale des deux loci, l'analyse du taux de méthylation sur les îlots CpG des loci apparait comme incontournable. Les résultats préliminaires obtenus par PCR spécifique de la méthylation pour le cluster C14MC sur une petite série de tumeurs neuroblastiques valident une association forte entre le niveau d'expression des microARN et le taux de méthylation. Ces analyses doivent maintenant être étendues à une cohorte tumorale plus importante ; de plus, disposant des ADN constitutionnels parentaux, des analyses de polymorphismes présents dans ces régions génomiques permettraient d'identifier l'origine parentale des différents transcrits, et, *in fine*, de mieux comprendre la régulation en jeu dans les tumeurs neuroblastiques.

A l'aide de lignées cellulaires de neuroblastome, la dérégulation des mécanismes canoniques assurant le maintien de l'empreinte, c'est-à-dire la méthylation de l'ADN et l'acétylation des histones, a été investiguée par le traitement des cellules à la 5-aza-2'-déoxycytidine et l'acide phényl-butyrique afin d'étayer notamment l'hypothèse de l'altération de la méthylation au niveau du locus 14q expliquant ainsi les variations d'expression observées des microARN et des gènes. L'action des deux drogues entraîne séparément une augmentation significative de l'expression des microARN et des gènes de façon lignées- (type neuronal / type schwannien) et drogues-dépendante, confirmant donc la disparité des mécanismes de régulation de l'expression au sein des deux loci étudiés. Notons également les disparités des résultats au sein du cluster de microARN C14MC tant au niveau des microARN que des transcrits primaires, confirmant également l'existence de régulations complexes de l'expression des transcrits primaires et de leurs maturations et la possible présence des deux sous-domaines « C14MC-SC1 » et « C14MC-SC2 ».





Cette levée spécifique d'expression des microARN du cluster C14MC et des gènes *DLK1* et *MEG3* dans les lignées de type neuronal, sans pour autant modifier l'expression des microARN du cluster C19MC, incite à rechercher, aux concentrations les plus faibles possibles et à plus long terme, l'effet de la 5-aza-2'-déoxycytidine et l'acide phénylbutyrique sur la viabilité, la prolifération, l'apoptose et la différenciation de ces lignées cellulaires. En effet, il s'agirait d'une nouvelle approche thérapeutique potentielle.

*In vivo*, des xéno greffes de lignées neuroblastiques sur souris nude sont envisageables pour comparer l'effet cytotoxique de ces drogues à celui de la chimiothérapie utilisée dans le traitement des neuroblastomes (cisplatine, adryamycine, doxorubicine).

L'identification de la dérégulation de l'expression des microARN des clusters C14MC et C19MC dans les neuroblastomes conduit inexorablement à rechercher leurs gènes cibles, éléments clés des voies de signalisation mises en jeu. Les gènes *N-MYC*, *TWIST1* et *TWIST2* ont été les premiers à être recherchés à partir des bases de données prédictives, compte tenu de leur importance dans l'oncogenèse des neuroblastomes. Ces trois gènes apparaissent comme des cibles potentielles d'une dizaine de microARN de chacun des clusters C14MC et C19MC, dont les miR-487b et miR-516a-5p. Néanmoins, à partir de la cohorte tumorale neuroblastique étudiée (n=193), la mesure d'expression de ces trois gènes n'a débouché ni sur un impact pronostic d'intérêt, ni sur une corrélation inverse de l'expression des microARN et des gènes. L'absence de corrélation inverse suggère, si les microARN interagissent bien directement avec la séquence 3'UTR de ces trois gènes, une régulation non pas sur la stabilité de leur ARNm mais sur leur traduction en protéine. Des analyses additionnelles par western-blot, et co-transfection des 3'UTR en aval du gène rapporteur luciférase sont nécessaires afin de valider ces gènes cibles. En outre, des analyses transcriptomiques et protéomiques pourront identifier de façon plus globale les gènes cibles directs ou indirects et donc les voies de signalisation régulées par ces microARN.



De plus, les gènes *DLK1*, impliqué dans la différenciation cellulaire de plusieurs tissus, et *MEG3*, interagissant également avec les voies de signalisation de l'angiogenèse et de la survie cellulaire, ont été montrés dérégulés dans plusieurs types de cancers, outre le neuroblastome ici. L'implication de ces gènes dans l'oncogenèse des neuroblastomes mériterait également d'être étudiée.

En conclusion, les microARN des clusters C14MC et C19MC et les gènes *DLK1* et *MEG3* apparaissent non seulement être des marqueurs pronostiques de la maladie mais également des acteurs importants des processus oncogéniques dans le neuroblastome.



## **CONCLUSIONS & PERSPECTIVES**

Mon travail de thèse contribue à affirmer l'importance des microARN pour le neuroblastome tant pour son pronostic que pour la compréhension de son oncogénèse.

Concernant le pronostic, si au diagnostic d'un neuroblastome, la combinaison de l'expression des deux microARN, miR-516a-5p et miR-487b, prédit mieux le risque encouru par l'enfant que l'algorithme standard (stade, âge au diagnostic et amplification de *N-MYC*) utilisé en routine hospitalière, il reste à valider ces données sur des cohortes tumorales multi-institutionnelles et à évaluer leur apport à la stratification génomique (CGH-array) en passe d'être retenue comme examen standard.

Dans cette perspective et en pratique, non seulement la faible quantité du matériel tumoral recueilli au diagnostic de la maladie mais aussi de la grande hétérogénéité d'une tumeur neuroblastique, nécessitent d'obtenir du même prélèvement l'ADN et l'ARN total. Ainsi, en quantifiant miR-516a-5p et miR-487b dans le sérum/plasma des jeunes patients et dans la moelle osseuse, site électif des métastases, ces analyses permettraient de suivre la maladie au cours du traitement, sans effectuer de prélèvement invasif.

Concernant l'oncogénèse, nos expériences réalisées ont révélé le caractère potentiel de suppresseur de tumeur de miR-487b et plus largement des microARN du cluster C14MC soumis à empreinte parentale ainsi que le rôle modulateur du miR-516a-5p appartenant au cluster C19MC. Des expériences additionnelles de pertes ou gains de fonction de ces deux microARN sur des modèles cellulaires adéquats vont préciser la fonction biologique de ces deux microARN dans le neuroblastome ; elles pourraient aussi révéler l'interaction biologique entre les microARN de ces deux clusters.

Mis en évidence par traitement au bisulfite et PCR spécifique de la méthylation, le statut anormal de la méthylation de l'ADN tumoral apparaît comme l'élément central de la dérégulation de l'expression des microARN des clusters C14MC et C19MC et des gènes *DLK1* et *MEG3*. La levée de l'expression des microARN du cluster C14MC et des gènes *DLK1* et *MEG3*, sous l'action de la 5-aza-2'-désoxycytidine et restreinte aux lignées de phénotype neuronal de plus forte malignité, conforte l'hypothèse d'une méthylation



altérée de ces régions dans le neuroblastome. Outre le mécanisme mis à jour, il y a là une approche thérapeutique nouvelle qui mériterait d'être explorée à l'aide de modèles de xénogreffes de lignées cellulaires neuroblastiques sur souris nude.

Des anomalies d'expression des microARN des clusters C14MC et C19MC ont été décrites dans un grand nombre de maladies humaines et plus particulièrement dans de nombreux cancers (voir Introduction, Section 3.4.2). Les microARN de ces deux clusters doivent donc réguler/moduler d'importantes voies de signalisation essentielles au maintien de l'intégrité cellulaire. Les anomalies d'expression observées sont très majoritairement une faible expression des microARN de C14MC et une forte expression des microARN de C19MC dans les formes les plus agressives de ces cancers, reflétant ainsi les résultats retrouvés dans le neuroblastome. Il s'agit non seulement d'autres tumeurs embryonnaires de l'enfant telles que les tumeurs neuro-ectodermiques primitives, mais aussi des adénomes thyroïdiens et de plusieurs cancers de l'adulte qu'ils soient d'origine épithéliale ou mésenchymateuse, notamment les carcinomes ovariens, les carcinomes mammaires, les carcinomes hépatiques, les tumeurs stromales gastro-intestinales, etc.

Les loci 14q32 et 19q13 en cause appartiennent aux sites fragiles du génome mis en évidence il y a près de cinquante ans. En l'occurrence ici, ces sites seraient d'autant plus « fragiles » qu'ils portent des éléments génétiques soumis à empreinte parentale. En effet, l'expression mono-allélique des gènes et des microARN de ces loci peut représenter un « maillon faible » fonctionnel.

A partir de la mesure quantitative de ces microARN, ces derniers pourraient être utilisés comme biomarqueurs pour le diagnostic, la progression et le pronostic des cancers permettant ainsi une meilleure prise en charge thérapeutique. Le fait que ces microARN soient sur-régulés lors de traitement à la 5-aza-2'-déoxycytidine et l'acide phényl-butyrique dans les lignées cellulaires pourrait expliquer en partie les effets thérapeutiques synergiques de ces traitements dans les syndrômes myélodysplasiques. En effet, une ré-expression de microARN sous-exprimé conduirait donc à une sous-régulation des oncogènes cibles.





Vraisemblablement les microARN des clusters C14MC et C19MC, corrélant séparément la malignité de ces tumeurs, joueraient un rôle majeur dans l'oncogenèse en général. Les analyses à haut débit de l'expression de ces microARN appliquées aux RNAtèques de ces tumeurs et de leur tissu originel, à disposition dans d'autres équipes de recherche de *l'Institut de cancérologie Gustave Roussy*, pourraient permettre de généraliser l'interaction pronostique et biologique de ces deux clusters de microARN en oncologie. Enfin, une meilleure compréhension de l'implication de ces deux clusters de microARN dans la biologie générale de la cellule et du tissu environnant permettra de mieux comprendre les mécanismes à l'origine de la transformation des cellules malignes et conduira à l'émergence de nouvelles stratégies thérapeutiques.



## ***Matériels et méthodes***

**Tableau 13.** Caractéristiques des lignées cellulaires neuroblastiques

<b>Statut</b>	<b>SH-SY5Y</b>	<b>SH-EP</b>	<b>IGR-N-91</b>	<b>SK-N-AS</b>
Type	neuronal	schwannien	neuronal	schwannien
p53	wild-type	wild-type	mutée	mutée
Amplification <i>N-MYC</i> (nombre de copie/génome haploïde)	1	1	60	1
Expression ARNm <i>N-MYC</i>	1	1	50	1
Protéine N-Myc	-	-	+	-

# 1. MATÉRIELS BIOLOGIQUES : TUMEURS ET LIGNÉES CELLULAIRES NEUROBLASTIQUES

## 1.1. Patients, échantillons tumoraux et cryosections

Les échantillons tumoraux provenant d'une cohorte rétrospective de 231 patients répondent aux critères du système international de stratification du neuroblastome (stade *INSS*) (Maris et Matthay, 1999). Ces tissus ont été recueillis entre 1987 et 2009 à l'*Institut de cancérologie Gustave Roussy* (n=219) et au *Centre Léon Bérard* (n=12) avec l'approbation des comités d'éthique appropriés et conformément à la loi nationale sur la protection des personnes participant à une recherche biomédicale. Les tumeurs primaires, obtenues à partir de patients par biopsie ou après chirurgie, ont été immédiatement congelées avant d'être stockées dans l'azote liquide jusqu'à l'extraction des acides nucléiques. Les première et dernière cryosections ont été utilisées pour sélectionner les tissus tumoraux présentant une teneur en cellules malignes supérieure ou égale à 60% [Ambros et al., 2003; Benard et al., 2008].

## 1.2. Lignées cellulaires neuroblastiques et conditions de culture

Les lignées neuroblastiques SH-SY5Y, SH-EP, IGR-N-91 et SK-N-AS (Tableau 13) ont été cultivés dans du milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) (*Invitrogen*) supplémenté par 10% de sérum de veau fœtal préalablement décomplémenté 30 minutes à 56°C, 5mM de L-Glutamine (*Invitrogen*), 5mM de Penicilline/Streptomycine (*Invitrogen*) et 10mM d'HEPES (*Invitrogen*). Les quatre lignées sont cultivées à 37°C dans une atmosphère humide contenant 5% de CO<sub>2</sub>.



## 2. EXTRACTION DES ACIDES NUCLEIQUES

### 2.1. Extraction des ARN totaux

L'ARN total a été isolé en utilisant du TRIzol® (*Invitrogen*) selon le protocole du fabricant. Brièvement, les cryosections tumorales sont broyées dans 1mL de TRIzol® à l'aide du *TissuRuptor* (*Qiagen*). Une fois le broyat tissulaire bien homogène, 200µl de chloroforme sont ajoutés à la solution. Après inversion 15 fois, les échantillons sont incubés 15min à température ambiante avant d'être centrifugés pendant 15min à 4°C à une vitesse de 12 000g. La phase aqueuse est prélevée dans un nouveau tube auquel de l'isopropanol est ajouté volume à volume. Après une incubation de 10min à température ambiante et une centrifugation pendant 10min à 4°C à une vitesse de 12 000g, le culot contenant l'ARN total est lavé deux fois avec 900µL d'éthanol 70%, centrifugé pendant 5min à 4°C à une vitesse de 12 000g, et, enfin, resuspendu dans 20 à 50µL d'eau RNase-free.

Concernant les lignées cellulaires neuroblastiques, les cellules sont récupérées directement dans le TRIzol®, l'extraction des ARN totaux suivant le même protocole que les tumeurs, à l'exception du broyage qui n'est pas nécessaire.

Les concentrations en ARN totaux et leur pureté ont été déterminées en utilisant le Nanodrop® ND-1000, tandis que leur qualité a été vérifiée avec le Bioanalyser 2100 (*Agilent*).

### 2.2. Extraction des ADN génomiques

L'ADN génomique des échantillons tumoraux et des lignées cellulaires neuroblastiques est isolé à l'aide du Kit Dneasy Blood and Tissue kit selon le protocole du fabricant (*Qiagen*).





### 3. ANALYSES PAR MICRO-ARRAY

Chaque échantillon d'ARN a été préparé selon le protocole du système de puces à microARN d'*Agilent*. L'ARN total (100 ng) a été étiqueté par la Cyanine 3 et hybridé sur des puces microARN humains d'*Agilent* de résolution 8x16k contenant 851 microARN humains et 88 microARN viraux humains. Les lames de verre d'*Agilent* intègrent 8 puces individuelles. Chaque puce contient environ 15 sondes de chaque microARN provenant de la base de données publique miRBase, version 13.0. Les sondes sont des oligonucléotides de 40 à 60-mer directement synthétisés sur le tableau avec un design spécial tenant compte de la petite taille des microARN. En effet, chaque sonde a été composée de trois éléments: la séquence d'hybridation (10 à 20 nucléotides), un résidu guanine à l'extrémité 5' de la séquence d'hybridation qui se complètent à l'extrémité 3' et une épingle à cheveux se repliant sur à l'extrémité de la région sonde-cible pour augmenter la spécificité des microARN. La paire GC supplémentaire dans la région d'interaction sonde-cible stabilise le microARN cible par rapport à d'autres ARN homologues. La puce contient également un ensemble de contrôles positifs et négatifs répétés. Toutes les méthodes de transformation utilisées pour les analyses de microARN ont été effectuées sur le signal médian Cyanine 3 obtenu par l'extraction des fichiers *Agilent Feature* dans le logiciel *R*, en utilisant les fonctions de *Bioconductor* [Gentleman et al., 2004]. Les données d'intensités ont été transformées par la fonction  $\log_2$ . Une normalisation quantile a ensuite été réalisée en utilisant la fonction *normalizeBetweenArray* du programme « *limma* » de *Bioconductor* de *R* [Smyth et al., 2005]. La médiane de chaque sonde pour un microARN donné a été calculée et la valeur correspondante a été affectée au microARN. Les données ont été ensuite filtrées en fonction du nombre maximum de valeurs manquantes autorisé pour chaque microARN, soit 30%.

Les clusters hiérarchiques non supervisés ont été calculés à l'aide de la fonction « *dist* » de *R*, en utilisant la distance euclidienne. La classification hiérarchique a été réalisée avec la fonction « *hclust* » de *R* en utilisant la matrice de distance calculée précédemment et la méthode de Ward.

Pour évaluer les différences d'expression des microARN, les facteurs de variation et les erreurs standard entre les deux groupes d'échantillons (bas risque et haut risque) ont été estimés en ajustant un modèle linéaire pour chaque microARN avec la fonction



« *lmFit* » du programme « *limma* » [Smyth et al., 2005]. Un lissage empirique de Bayes a été appliqué pour les erreurs standard au modèle linéaire précédemment calculée avec la fonction « *eBayes* » de « *limma* ». La fonction « *topTable* » de « *limma* » a été utilisé pour extraire le tableau des gènes exprimés de manière différente.

#### 4. PCR GENOMIQUE QUANTITATIVE

L'ADN génomique (20ng) est combiné avec (i) le Taqman® Copy Number Assay (*Applied Biosystems*), (ii) le Taqman® RNase P Copy Number Reference Assay (4403326, *Applied Biosystems*), et (iii) le FastStart Universal Probe Master (ROX) (*Roche Diagnostics*). Les réactions sont effectuées sur le système 96-well Real-Time StepOnePlus™ PCR (*Applied Biosystems*) en accord avec les "MIQE guidelines" [Bustin et al., 2009] sur un volume final de 20 µl, en duplicat, et amplifiées à 50°C - 2 min, 95°C - 10 min et 40 cycles de [95°C - 15s ; 60°C - 60s]. Le nombre de copie de la séquence cible dans chaque échantillon sont déterminés par quantification en temps réel en utilisant la méthode comparative  $2^{-\Delta\Delta CT}$  [Livak and Schmittgen, 2001]. L'ADN génomique humain (*Promega*) est utilisé comme calibrateur. Le nombre de copies de la cible par génome cellulaire est égal à deux fois la quantité relative.

#### 5. MESURE D'EXPRESSION DES MICROARN PAR RT-PCR

L'ARN total (10 ng) subit une transcription inverse sur le PTC-100™ (MJ Research, Inc) en utilisant le système de rétro-transcription inverse tige-boucle (TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit, *Applied Biosystems*), pour chacun des microARN analysés et pour RNU-44 (petit ARN nucléaire) utilisé comme normalisateur. Les amplifications PCR en temps réel sont exécutées en duplicat à l'aide du Kit FastStart Universal Probe Master Mix (*Roche*) et ont été réalisées sur le système de PCR en temps réel StepOnePlus (*Applied Biosystems*) selon les « MIQE Guidelines » (Bustin et al., 2009). L'expression relative de chaque microARN a été calculée selon la méthode  $2^{-\Delta\Delta CT}$  [Livak and Schmittgen, 2001]. RNU-44 a été utilisé comme normalisateur et la lignée cellulaire IGR-N-835 [Bettan-Renaud et al., 1989] comme calibrateur.

**Table 14.** Références des amorces d'*Applied Biosystems*

<b>Taqman Copy Number Assays</b>	
14q	hs03886666
19q	hs07124022
<i>MYCN</i>	hs00201049
<b>Taqman Pri-miRNA Assays</b>	
hsa-pri-miR-380	hs03303552
hsa-pri-miR-487b	hs03303545
hsa-pri-miR-516a-1	hs03295838
<b>Taqman miRNA Assays</b>	
hsa-miR-380-5p	hs000570
hsa-miR-494	hs002365
hsa-miR-376c	hs002122
hsa-miR-487b	hs001285
hsa-miR-134	hs001186
hsa-miR-154	hs000477
hsa-miR-409-3p	hs002332
hsa-miR-410	hs001274
hsa-miR-516a-5p	hs002416
<b>Taqman Gene Assays</b>	
<i>TFRC1</i>	hs00174609
<i>DLK1</i>	hs00171584
<i>GTL2</i>	hs00292028
<i>ZNF331</i>	hs00367929
<i>DIO3</i>	hs00956431
<i>BEGAIN</i>	hs00221221
<i>TP73</i>	hs01056230
<i>PLAGL1</i>	hs00414677
<i>GRB10</i>	hs00959286
<i>H19</i>	hs00262142
<i>IGF2</i>	hs01005970
<i>KCNQ1</i>	hs00923522
<i>CDKN1C</i>	hs00175938
<i>ANO1</i>	hs00216121
<i>MYCN</i>	hs00232074
<i>TWIST1</i>	hs01675818
<i>TWIST2</i>	hs02379973

Les références des amorces d'*Applied Biosystems* utilisées sont notées dans le tableau 14.

## 6. MESURE D'EXPRESSION DES GENES PAR RT-PCR

Pour l'analyse de l'expression des gènes par RT-PCR quantitative, 200ng d'ARN totaux sont incubés, sur un volume total de 10µL, avec 50pmol de random hexamer (*Applied biosystem*) et 0.5µL de Rnase Inhibitor (*Roche*) pendant 5 min à 65°C, puis 5 min sur glace. Sont ajoutés alors 10µL de pré-mix contenant du DTT à 200nM, les quatre nucléotides, 200 unités de Superscript II (*Invitrogen*) et du tampon First Strand Buffer à 1X. Le volume réactionnel final est de 20µL. Des contrôles négatifs sont réalisés dans les mêmes conditions mais en absence d'enzyme. Le mélange réactionnel est alors incubé 1h à 42°C, puis l'enzyme est inactivée 5min à 95°C. Les ADNc obtenus sont conservés à -20°C. Les amplifications PCR en temps réel, exécutées en duplicat à l'aide du Kit FastStart Universal Probe Master Mix (*Roche*), ont été réalisées sur le système de PCR en temps réel StepOnePlus (*Applied Biosystems*) selon les « MIQE Guidelines » (Bustin et al., 2009). L'expression relative de chaque gène a été calculée selon la méthode  $2^{-\Delta\Delta CT}$  [Livak and Schmittgen, 2001]. Le gène *TFRC1* a été utilisé comme normalisateur et la lignée cellulaire IGR-N-835 [Bettan-Renaud et al., 1989] comme calibrateur.

Les références des amorces d'*Applied Biosystems* utilisées sont notées dans le tableau 14.

## 7. ANALYSES STATISTIQUES DES DONNEES DE PCR QUANTITATIVE

Les données de PCR quantitative ont été analysées à l'aide du logiciel *GraphPadPrism* pour générer les graphes. Le t-test de Student bilatéral a été utilisé pour comparer les différents groupes de neuroblastome. Les analyses de corrélation ont été effectuées à l'aide du test de corrélation de Pearson. L'association entre les diverses caractéristiques cliniques et les niveaux d'expression des microRNA ont été examinés par le test exact bilatéral de Fisher.



Pour déterminer si les expressions des microARN étaient liées de manière significative à la survie globale et sans maladie des patients (critère de la mort et de la rechute, respectivement spécifique au cancer), des courbes de survie de Kaplan-Meier et des analyses multivariées de Cox univariées et multivariées ont été réalisées avec le logiciel SAS. Pour générer les courbes de survie, les niveaux d'expression des microARN continues mesurées par RT-PCR quantitative ont été convertis en variable dichotomique, en utilisant le niveau d'expression de la lignée IGR-N-835 comme seuil [Bettan-Renaud et al., 1989]. Cette lignée cellulaire présente des niveaux d'expression très proches des seuils statistiques discriminant les patients pour la survie. Cette procédure a permis la division des échantillons en deux groupes de forte et faible expression (respectivement supérieure et inférieure au seuil fixé par la lignée IGR-N-835).

La survie globale se définit par le temps du diagnostic à la date de la dernière nouvelle ou du décès. La survie sans maladie se définit par le temps du diagnostic à la date de la première apparition de rechute. Les courbes de survie ont été comparées grâce au test du log-rank et jugées significatives lorsque  $p < 0,05$ .

L'effet conjoint des différentes variables a été analysé dans des modèles de régression de Cox à risques proportionnels pour déterminer si les microARN analysés sont des facteurs pronostiques indépendants. L'âge a été dichotomisée en deux groupes : moins de 18 mois et plus de 18 mois. Le stade *INSS* a été dichotomisé sur la base de la progression métastatique, stades 1, 2 et 3, d'un côté, et stade 4 de l'autre. Les stades 4S ont été inclus dans le groupe de stades 1, 2 et 3 parce que ces patients présentent de très bonnes évolutions. Pour tous les microARN, les patients ont été répartis en groupes à haut et faible expression, comme décrit précédemment. Toutes les variables, avec  $p < 0,05$ , en analyse univariée, ont été sélectionnés dans le modèle multivarié.



**Table 15.** Références des "mimics" et inhibiteurs de microARN de *Thermo Scientific*

Mimic hsa-miR-487b, 5nmol	C-300862-01-0005
Mimic hsa-miR-516a-5p, 5nmol	C-301104-01-0005
Mimic Negative Control #1, 5nmol	IN-001005-01-05
Hairpin inhibitor hsa-miR-487b, 5nmol	IH-301104-02-0005
Hairpin inhibitor hsa-miR-516a-5p, 5nmol	IH-300862-03-0005
Hairpin inhibitor Negative Control, 5nmol	CN-001000-01-05

## 8. BIOLOGIE CELLULAIRE

### 8.1. Transfections des mimic ou inhibiteur de microARN

Les cellules sontensemencées la veille de la transfection à raison de 100 000 cellules par puits de plaques 12 puits.

Pour un puits, les mimics ou anti-microARN sont ajoutés à 1mL de DMEM à une concentration finale de 20nM. Pour cela, 2µL de Lipofectamine 2000 (*Invitrogen*) sont dilués dans 98µL de DMEM puis est ajouté, après 5min d'incubation à température ambiante, à une solution de 100µL de DMEM contenant le mimic ou l'anti-microARN en concentration suffisante pour 20nM finale. La solution d'un volume total de 200µL est incubée 20min à température ambiante avant d'être ajoutée dans le puits contenant préalablement 800µL de DMEM. Après 48h, les cellules sont directement récupérées dans 1mL de Trizol (*Invitrogen*) en vue de l'extraction de l'ARN.

Les références des « mimic » et anti-microARN utilisés sont notées dans le tableau 15.

### 8.2. Transfections de plasmide

Les plasmides pcDNA3 h-TWIST1 et pcDNA3 h-TWIST2 ont été fournis gracieusement par le Dr Maestro de l'Unité d'Oncologie Expérimentale de l'Institut National du Cancer d'Aviano en Italie.

Les cellules sontensemencées la veille de la transfection à raison de 500 000 cellules par puits de plaques à 6 puits. Pour un puits, 4µg de plasmides sont ajoutés à 250µL de DMEM. Ensuite, 7,5µL de Lipofectamine 2000 (*Invitrogen*) sont dilués dans 250µL de DMEM et ce mélange est ajouté, après 5min d'incubation à température ambiante, à l'ADN. La solution de 500µL est alors incubée 20min à température ambiante avant d'être ajoutée dans le puits contenant préalablement 1,5mL de DMEM. Après 48h, les cellules sont directement récupérées dans 1mL de Trizol (*Invitrogen*) en vue de l'extraction de l'ARN.



### 8.3. Traitements des cellules

Les solutions de 5-aza-2'-déoxycytidine (AZA) et d'acide phényl-butyrique (PBA) (*Sigma*) ont été préparées dans du DMSO (diméthylsulfoxyde) à des concentrations respectives de 10mM et 5M, aliquotées et conservées à l'abri de la lumière à -80°C.

En vue du traitement, les cellules sontensemencées à raison de 500 000 cellules par puits de plaques à 6 puits. Le lendemain, la ou les drogues sont ajoutées au milieu de culture à des concentrations finales de 10µM pour l'AZA et 5mM pour le PBA. Pour contrôle, des cellules sont traitées en parallèle avec une quantité équivalente de DMSO. Le milieu de culture contenant les drogues est changé tous les jours afin de maintenir un niveau constant de drogue dans le milieu. Après 72h de traitements, les cellules sont directement récupérées dans 1mL de Trizol (*Invitrogen*) en vue de l'extraction de l'ARN.



## **PUBLICATIONS & COMMUNICATIONS**

### **Publications relatives au travail de thèse**

**Gattolliat CH**, Le Teuff G, Valteau-Couanet D, Busson P, May E, Bénard J, Douc-Rasy S. The expression of two parental imprinted miRNAs identifies a new neuroblastoma risk-stratification. (en soumission *Clinical Cancer Research*)

**Gattolliat CH**, Thomas L, Ciafrè SA, Meurice G, Le Teuff G, Job B, Richon C, Combaret V, Dessen P, Valteau-Couanet D, May E, Busson P, Douc-Rasy S, Bénard J. Expression of miR-487b and miR-410 encoded by 14q32.31 locus is a prognostic marker in neuroblastoma. *Br J Cancer*. 2011 Oct; 105(9):1352-61.

### **Communications relatives au travail de thèse**

**Gattolliat CH** et al. Interaction between two imprinted microARN clusters, C14MC and C19MC, is a powerful prognostic indicator and contribute to malignancy of neuroblastoma. 1<sup>er</sup> *Symposium du Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon*, 2013, Lyon, France.

**Gattolliat CH** et al. Expression of 14q32.31 microRNA cluster is a new biomarker of relapse in favourable neuroblastoma. POT042, *Advances in Neuroblastoma Research*, 2012, Toronto, Canada.

**Gattolliat CH** et al. Distinctive expression patterns of microRNA in neuroblastoma tumors of opposite outcomes. POB045, *Advances in Neuroblastoma Research*, 2010, Stockholm, Suède.

---

### **Publications non relatives au travail de thèse**

Samy M, **Gattolliat CH**, Pendino F, Hillion J, Nguyen E, Bombard S, Douc-Rasy S, Benard J, Segal-Bendirdjian E. Loss of the malignant phenotype of human neuroblastoma cells by a catalytically inactive dominant-negative hTERT mutant. *Mol Cancer Ther*. 2012 Nov; 11(11):2384-93.

Berois N<sup>#</sup>, **Gattolliat CH**<sup>#</sup>, Barrios E, Capandeguy L, Douc-Rasy S, Valteau-Couanet D, Bénard J, Osinaga E. *GALNT9* gene expression is a novel prognostic marker in neuroblastoma patients. *Clin Chem*. 2013 Jan; 59(1):225-33. <sup>#</sup>equal contribution

Gourzones C, Ferrand FR, Amiel C, Vérillaud B, Barat A, Guérin M, **Gattolliat CH**, Gelin A, Klibi J, Chaaben AB, Schneider V, Guemira F, Guigay J, Lang P, Jimenez-Pailhes AS, Busson P. Consistent high concentration of the viral microRNA BART17 in plasma samples from nasopharyngeal carcinoma patients - evidence of non-exosomal transport. *Virology*. 2013 Apr 16;10(1):119.

### **Communications non relatives au travail de thèse**

Ferrand FR, **Gattolliat CH** et al. Specific detection of Epstein-Barr virus micro-RNAs in plasma samples from nasopharyngeal carcinoma patients: lack of correlation with tumor mass assessed by MRI. *ASCO Annual Meeting*, 2013, Chicago, États-Unis



## Loss of the Malignant Phenotype of Human Neuroblastoma Cells by a Catalytically Inactive Dominant-Negative hTERT Mutant

Mona Samy<sup>1,2,3</sup>, Charles-Henry Gattolliat<sup>4</sup>, Frédéric Pendino<sup>1,2</sup>, Josette Hillion<sup>1,2</sup>, Eric Nguyen<sup>1,2</sup>, Sophie Bombard<sup>1,2</sup>, Sétha Douc-Rasy<sup>4</sup>, Jean Bénard<sup>4</sup>, and Evelyne Ségal-Bendirdjian<sup>1,2</sup>

### Abstract

Telomerase, a ribonucleoprotein complex mainly composed of the reverse transcriptase catalytic subunit (human telomerase reverse transcriptase, hTERT) and the RNA component (hTR), is a key enzyme of cancer progression. That aggressive stage 4-neuroblastoma expressed high levels of telomerase activity, whereas favorable tumors had no or little telomerase expression and activity, prompted us to investigate the role of this enzyme in this tumor model of altered proliferation, neuronal differentiation, and apoptosis. A human *MYCN*-amplified neuroblastoma cell line (IGR-N-91) was engineered to stably express either the normal hTERT protein (WT-hTERT) or a catalytically inactive dominant-negative mutant of this protein (DN-hTERT). We showed that DN-hTERT expression inhibited the endogenous hTERT in the malignant neuroblasts without telomere shortening nor loss of *in vitro* proliferative capacity. Importantly, DN-hTERT expression induced major changes in cell morphology of neuroblasts that switched them from a neuronal to a substrate adherent phenotype, which was more prone to apoptosis and lost their tumorigenic properties in nude mice. These biologic effects arose from modifications in the expression of genes involved in both apoptosis and neuroblastoma biology. Taken together these results highlighted the functional relevance of noncanonical functions of hTERT in the determination of neuroblast cell fate. Therefore, our results envision new therapeutic strategies for metastatic neuroblastoma therapeutic management. *Mol Cancer Ther*; 11(11); 2384–93. ©2012 AACR.

### Introduction

Human neuroblastic tumors are embryonal tumors, which derive from cells that migrate from the neural crest tissue and give rise to the sympathetic nervous system (1). These tumors are heterogeneous and display a wide spectrum of differentiation stages from benign ganglioneuroma and well-differentiated tumors to undifferentiated malignant neuroblastoma. Neuroblastoma, the most frequent solid tumor of early childhood, is diagnosed as a disseminated disease (stage 4) in about 60% of the cases. Unlike other malignant diseases, stage 4 in neuroblastoma elicits distinct clinical patterns based on disease distribution and patient's age. A particular subset of metastatic neuroblastoma, called stage 4S, is defined by a localized dissemina-

tion of the primary tumor to liver, skin or bone marrow, in infants under 1 year. These 4S neuroblastomas are characterized by their ability to regress spontaneously or differentiate in benign ganglioneuroma, and show an excellent outcome. In contrast, stages 4 in children older than 1 year, with dissemination of tumors to lymph node, bone, bone marrow, liver or other organs, have a dismal outcome despite the use of high dose chemotherapy, showing a need of new therapeutic approaches in these patients (1).

The *MYCN* oncogene plays a pivotal role in the progression of neuroblastoma to advanced malignancy, and its amplification is correlated with poor clinical outcome (2). At a cytogenetic level, *MYCN* amplicons are present in nuclei as either extrachromosomal double minutes or intrachromosomal structures known as homogeneous staining regions (HSR). Expulsion of amplified *MYCN* from either double minutes or HSR has been observed in both neuroblastoma cell lines and tumor samples (3, 4). Caspase-8 plays a crucial role as a mediator of death receptor-triggered apoptosis. It also contributes to various nonapoptotic cellular functions. Indeed, caspase-8 deficiency can participate to tumor development (5). It is frequently inactivated, especially in *MYCN*-amplified neuroblastoma (6). This inactivation has been responsible for the resistance of neuroblastoma cells to death receptor-induced apoptosis (7, 8). Unlike other human cancers, the p53 tumor-suppressor protein encoded by *TP53* gene is

**Authors' Affiliations:** <sup>1</sup>INSERM UMR-S 1007, Homéostasie Cellulaire et Cancer, <sup>2</sup>Université Paris-Descartes, Paris; <sup>3</sup>Université Paris-Sud 11, Orsay; and <sup>4</sup>Signalisation, Noyaux et Innovations Thérapeutiques en Cancérologie CNRS-UMR 8126, Institut Gustave Roussy, Villejuif, France

**Note:** Supplementary data for this article are available at Molecular Cancer Therapeutics Online (<http://mct.aacrjournals.org/>).

**Corresponding Author:** Evelyne Ségal-Bendirdjian, INSERM UMR-S 1007, Université Paris-Descartes, 45 rue des Saints-Pères, 75006 Paris, France. Phone: 33-1-42-86-22-46; Fax: 33-1-42-86-21-62; E-mail: [evelyne.segal-bendirdjian@inserm.fr](mailto:evelyne.segal-bendirdjian@inserm.fr)

doi: 10.1158/1535-7163.MCT-12-0281

©2012 American Association for Cancer Research.





rarely mutated in neuroblastoma primary tumors (9). However, when mutations occurred, they were found in neuroblastoma with drug resistance acquired over the course of chemotherapy.

*In vitro*, human malignant neuroblasts can be committed to distinct neural crest lineages: neuroblastic (N-type), substrate-adherent non-neuronal (S-type), or intermediate (I-type) cells that can be distinguished by morphologic and biochemical traits and can undergo transdifferentiation either spontaneously or after chemical induction (10, 11). This conversion process itself is not well understood but appears to be clinically relevant and might be involved in the ability of stage 4S to regress. Therefore the possibility to drive malignant neuroblastoma cells towards a nontumorigenic phenotype remains a real challenge for the development of new therapeutic strategies.

Telomerase is a ribonucleoprotein composed at least of an RNA template (human telomerase RNA, hTR) and a catalytic protein subunit (human telomerase reverse transcriptase, hTERT), responsible for *de novo* synthesis and elongation of telomeric repeats at chromosomal ends (12). By maintaining telomere length, telomerase controls cell survival. Besides its canonical role, telomerase elicits other functions in several essential cell signaling pathways, including apoptosis (13–15), differentiation (16), DNA damage responses (17), and regulation of gene expression (16, 18). Telomerase activity is absent or poorly detected in most human somatic cells, whereas it is high in germ and tumor cells, including neuroblastoma. Because of its high activity in cancer cells, telomerase is an attractive anti-cancer therapeutic target (19–22). That aggressive stage 4 neuroblastoma expressed high levels of telomerase activity, whereas favorable tumors had no or little telomerase expression and activity (23, 24), prompted us to investigate the role of this enzyme in the biology of malignant neuroblastoma cells and their response to chemotherapy.

In this study, we characterized the phenotypic and molecular changes linked to telomerase activity modulation in the stage 4 *MYCN*-amplified neuroblastoma IGR-N-91 cell line (25), used as a canonical model. Established *in vitro*, IGR-N-91 malignant neuroblasts displayed stable HSR of *MYCN*, loss of chromosome 1p (26), a mutated *TP53* by insertion of exons 7, 8, 9 in tandem (27) and loss of caspase-8 expression (28). In nude mice, these cells are highly tumorigenic and able to metastasize (25). We found that telomerase inhibition due to the stable expression of a dominant-negative variant of hTERT induced, in the original IGR-N-91 cell population, a switch from N to S phenotype with increased ability to undergo drug-induced apoptosis and loss of tumorigenic properties *in vivo*.

## Materials and Methods

### Cell cultures

The human *MYCN*-amplified IGR-N-91 cell line was established from an infiltrated bone marrow collected from a stage 4-neuroblastoma belonging to an 8-year-old boy after unsuccessful adriamycin-vincristine chemotherapy (25). The cells were authenticated by checking for *MYCN*

amplification by real-time quantitative PCR and for the presence of the mutant *TP53* carrying exons 7 to 9 duplication (27). Cells were cultured in DMEM/F12 supplemented with 10% FBS, penicillin (50 IU/mL), streptomycin (50 µg/mL), and L-glutamine (2 mmol/L, PAA Laboratories), and incubated at 37°C at 5% CO<sub>2</sub> atmosphere.

### Drugs

Cisplatin was purchased from Sigma, staurosporine from Roche Diagnostics and TRAIL from Enzo Life Sciences.

### Vector constructions and cell infections

Cells were transduced with retroviral vectors, which drive expression of both transgenes and GFP from a single bicistronic message as previously described (29, 30).

### Reverse transcriptase PCR experiments

Total cellular RNA was collected from samples using TRIzol reagent (Invitrogen). RT reaction was carried out using Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche Diagnostics) according to the manufacturer's instructions with oligo(dT)<sub>8</sub> primers. The cDNA samples were amplified in a 25 µL reaction mixture containing 50 µmol/L each of the 4 deoxynucleotide triphosphates, 0.5 U Taq DNA polymerase (Promega), and 0.4 µmol/L specific primers. Primer sequences are shown in Supplementary Table S1. The cDNA samples were amplified for 30 cycles (94°C for 30 s, 56°C for 30 s and 72°C for 45 s). For the internal control GAPDH, the annealing temperature was 62°C. The PCR products were fractionated on a 2% agarose gel and visualized under UV light.

### Quantitative reverse transcriptase PCR analysis of WT-hTERT and DN-hTERT expression

The expression of ectopic WT-hTERT and DN-hTERT transcripts was quantified by real-time reverse transcriptase (RT)-PCR using the LightCycler technology and the LightCycler FastStart DNA MasterPLUS SYBR Green Kit (Roche Diagnostics) according to the manufacturer's instructions. Primer sequences are shown in Supplementary Table S1. The primers allowed the detection of both endogenous hTERT and exogenous WT- or DN-hTERT transcripts. WT-hTERT and DN-hTERT levels were normalized to the expression of GAPDH and to the expression of endogenous hTERT in empty vector control cells.

### Quantification of *MYCN* copy number by real-time quantitative PCR

Genomic DNA (20 ng) was combined with (i) the Taqman *MYCN* Copy Number Assay (4400292, Applied Biosystems), (ii) the Taqman RNase P Copy Number Reference Assay (4403326, Applied Biosystems), and (iii) the FastStart Universal Probe Master (ROX, Roche Diagnostics). Reactions were run on a 96-well Real-Time StepOnePlus PCR System (Applied Biosystems) and amplified at 50°C for 2 minutes, 95°C for 10 minutes and 40 cycles of 95°C for 15 s and 60°C for 60 s. The number of



copies of the target sequence in each sample was determined by relative quantification using the comparative  $C_T$  ( $\Delta\Delta C_T$ ) method.

#### Telomerase activity and telomere length assay

Telomerase activity was measured using the telomerase PCR-ELISA kit (Roche Diagnostics) according to the manufacturer's instructions and expressed as a percentage of activity detected in empty vector transduced cells. Telomere lengths were determined as described previously (31), using a chemoluminescent assay (Roche Diagnostics).

#### WST-1 assay for cell viability and clonogenic assays

For cell viability measurement, IGR-N-91 cells were seeded and cultivated for 24 hours, before drug addition. After incubation with the drugs, WST-1 labeling mixture (Roche Diagnostics) was added and the cells incubated for 3 hours. The absorbance of the samples was measured at 550 nm using a microtiter plate reader (Dynex). For bidimensional clonogenic assays, cells were plated in tissue culture plates. Colonies were then fixed and stained using May-Grünwald-Giemsa staining after 2 weeks of incubation at 37°C at 5% CO<sub>2</sub> atmosphere.

#### Apoptosis assay

Apoptosis was assessed by the TUNEL technology using *In Situ* Cell Death Detection Kit, TMR red (Roche Diagnostics), according to the manufacturer's instructions. After labelling, cells were mounted in Vectashield mounting medium containing 4',6-diaminidino-2-phenylindole (DAPI Vector Laboratories) to counterstain nuclei. TMR red labeled apoptotic cells were detected by fluorescent microscopy (Leica DMRD, equipped with  $\times 63$  objective).

#### Immunofluorescence

Cells, fixed and permeabilized as previously described (32), were blocked with 2% bovine serum albumin (BSA) in PBS overnight at 4°C. Then, they were incubated with anti-hTERT primary antibody (Epitomics) overnight, washed twice in PBS and incubated with Alexa Fluor 594-conjugated anti-rabbit secondary antibody (Molecular Probes, Invitrogen) for 1 hour at room temperature. Subsequently, cells were washed 3 times in PBS and mounted in Vectashield mounting medium with DAPI to counter stain nuclei. Cells were observed by conventional fluorescence microscopy.

#### Immunoblots

Total cellular proteins were extracted with SDS lysis buffer (SDS 8%, Tris-HCl 250 mmol/L pH 6.8, 2.5 mmol/L NaF, 0.2 mmol/L sodium orthovanadate, protease inhibitor cocktail from Sigma), separated by SDS-PAGE (10% to 15%) and transferred onto a PVDF membrane. The membranes were saturated with 5% non-fat dry milk powder and 0.5% Tween-20 in TBS 0.5% for 1 hour and probed overnight with the primary antibody. Mouse monoclonal, N-Myc (NCM II 100, Santa Cruz), caspase-8 (551242, BD

Pharmingen), CD44 (MEM-263, Abcam), caspase 3 (AM-20, Calbiochem), p53 (554293, BD Pharmingen), NSE (Ab-1, Labvision), and rabbit monoclonal hTERT (Epitomics) were used as primary antibodies. After washing, blots were then incubated with the appropriate horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody for 1 hour and then developed by enhanced chemiluminescence (Perkin Elmer Life Sciences). Rabbit polyclonal HRP-conjugated anti-GAPDH (Ab9385, Abcam) was used as a control for equal loading.

#### DNA fingerprints analysis

DNAs were purified as previously described (31), digested with restriction enzyme (*Bst*NI, *Hae*II), submitted to electrophoresis through a 1.1% agarose gel and transferred to a Hybond-N nylon membrane (GE Healthcare Europe GmbH Branch). The membrane was dried and baked at 80°C for 30 minutes and the DNA cross-linked onto the membrane by UV radiation. Prehybridization was carried out for 3 hours at 60°C in 7% SDS, 1 mmol/L EDTA (pH 8), 263 mmol/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> and 1% BSA. Hybridization with the <sup>32</sup>P-labeled single-strand M13 DNA probe was carried out at 60°C overnight. The membrane was then washed in trisodium citrate, 30 mmol/L, NaCl, 300 mmol/L, pH 7.0, 0.1% SDS twice at room temperature and once at 60°C, and exposed to X-ray film.

#### *In vivo* xenograft experiments

All animal experiments were carried in compliance with European directive 86 of 609, French laws and regulations and were approved by the local Ethics Committee (CEEA IRCIV/IGR n°26, registered with the French Ministry of Research). The IGR-N-91 tumor cells ( $5 \times 10^6$ ) derived from empty vector, WT-hTERT or DN-hTERT at days 135 and 180 postinfection, in a volume of 80  $\mu$ L of growth medium were mixed with the same volume of BD Matrigel Matrix (BD Biosciences) and subcutaneously injected into each flank of 6-week-old female nude mice. Experiments were conducted in 3 groups of 10 mice. Each tumor, considered as ellipsoid, was measured in 2 dimensions with a caliper for volume assessment according to the  $(\text{length} \times \text{width}^2)/2$  formula. In accordance with animal legal requirements, mice were euthanized once tumors reached 20 mm in diameter.

## Results

### DN-hTERT expression exerts a dominant-negative effect on endogenous telomerase activity in the IGR-N-91 neuroblasts

To study the effects of long-term expression of the catalytically inactive dominant-negative (DN)-hTERT, we introduced by retroviral infection the wild-type (WT)-hTERT, the DN-hTERT or the control empty (EV) vector expressing GFP alone into the human IGR-N-91 neuroblastoma cells. The expression of the transgenes was assessed by real-time RT-PCR, telomerase activity assay, Western blot, and immunofluorescence analyses and compared with the GFP-control cells (Fig. 1A–D). Ectopic DN-hTERT

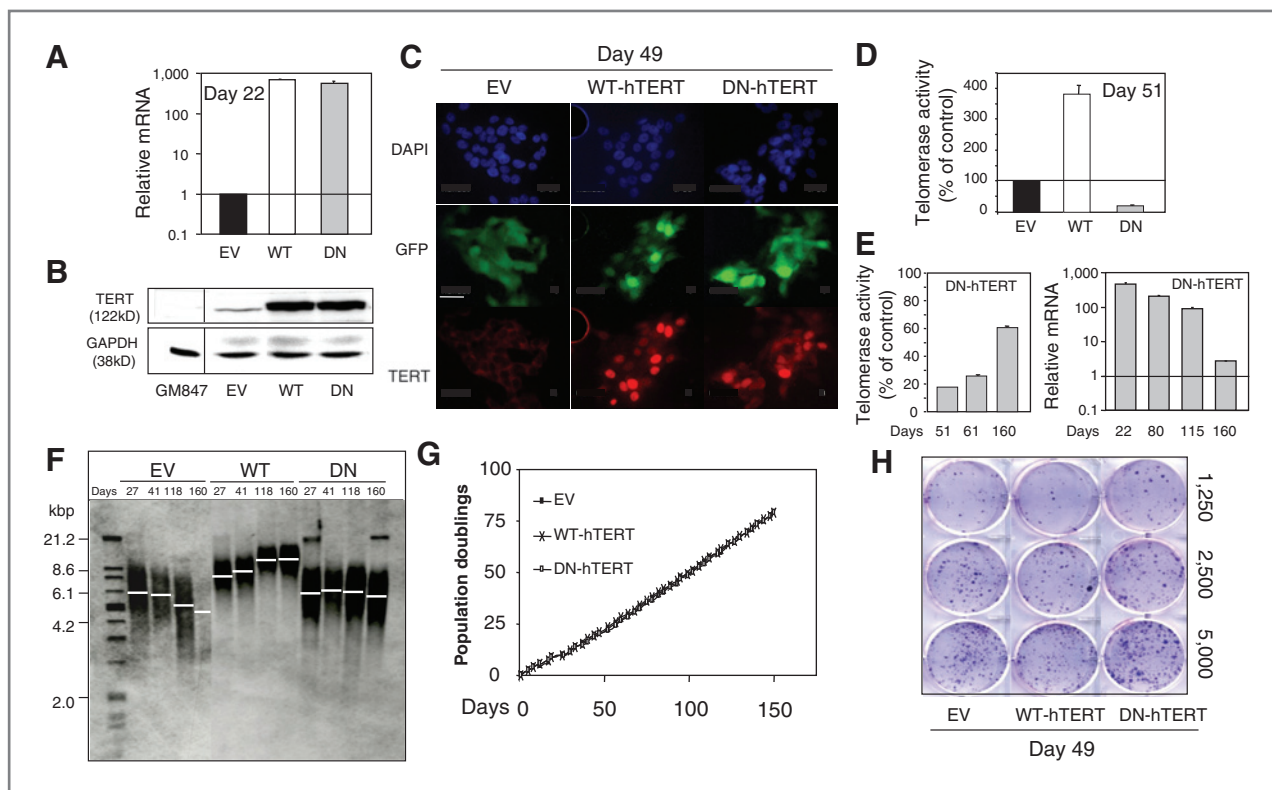


and WT-hTERT transcripts were highly expressed in the transduced cells (Fig. 1A). Western blot (Fig. 1B) and immunofluorescence (Fig. 1D) analyses revealed a high expression of these transgenes and showed that both DN-hTERT and WT-hTERT are mainly nuclear. To investigate whether DN-hTERT exerted a dominant-negative effect on endogenous telomerase enzyme, TRAP assay was carried out to assess telomerase activity of cell extracts. DN-hTERT cells showed a dramatically reduced endogenous telomerase activity (more than 80%), whereas WT-hTERT cells exhibited almost a 4-fold increase level of telomerase activity compared with the control vector transduced cells (Fig. 1D). Although in DN-hTERT cells, telomerase activity was successfully downregulated in early cell passages, it gradually recovered in late passages up to 60% of the control cells by day 160 (Fig. 1E, left). This recovery resulted from the progressive decline in DN-hTERT mRNA levels (Fig. 1E, right). Despite the partial loss of DN-hTERT expression, no change in GFP expression was observed during the long-term culture. Genomic PCR showed the specific and

progressive loss of the *DN-hTERT* sequence while the *GFP* sequence of the transgene was still present (Supplementary Fig. S1). Of note *DN-hTERT* sequence was still observed 118 days postinfection in accordance with the detection of DN-hTERT transcripts 115 days postinfection. In contrast, no loss of the transgene was observed in WT-hTERT cells during the period of cellular expansion (Supplementary Fig. S2).

#### DN-hTERT expression does not affect telomere length of the IGR-N-91 cells

We next investigated whether telomerase activity inhibition influenced telomere length in the IGR-N-91 cells. Despite the telomerase activity inhibition, telomere length was unchanged (Fig. 1F). As expected, WT-hTERT cells exhibited longer telomeres as compared with control cells. As decreased telomerase activity is generally associated with cell growth arrest and loss of viability, the effect of the DN-hTERT transgene on cell proliferation rate was evaluated by regularly counting cell during more than 150



**Figure 1.** Transduction of hTERT-DN in the IGR-N-91 cells inhibits telomerase activity but has no effect on telomere length. **A**, the levels of DN- and WT-hTERT exogenous transcripts, analyzed by real-time quantitative PCR at day 22 posttransduction, were normalized to the expression of the GAPDH and to the empty vector control cells (EV). **B**, hTERT expression was analyzed by immunoblot using an anti-hTERT antibody at day 39 posttransduction. A similar expression pattern was observed at day 73 posttransduction (data not shown). **C**, hTERT expression and localization analyzed by immunofluorescence at day 49 posttransduction. WT-hTERT and DN-hTERT were detected using anti-hTERT antibody as the primary antibody and Alexa Fluor 594-conjugated anti-rabbit antibody as the secondary antibody (lower panel). The transduced cells were visualized by GFP fluorescence (middle panel). Nuclei are stained in blue with DAPI (upper panel). Scale bar, 25  $\mu$ m. **D**, telomerase activity was expressed as a percentage of that detected in untreated cells at day 51 posttransduction. TA, telomerase activity. **E**, telomerase activity (left) and of DN-hTERT expression levels (right) were analyzed at different time points after transduction. **F**, telomere lengths of cells were measured at the indicated days after infection. Size markers are indicated on the side of a representative gel. **G**, IGR-N-91 cell proliferation was assessed as population doublings during more than 150 days after retroviral transduction. **H**, for 2D clonogenic assays, single cells were plated 49 days after transduction; colonies were fixed and stained after 14 days of culture. Graphs in A, B, D, and E represent averages  $\pm$  SEM of at least 3 experiments.



days. The growth kinetics of the DN-hTERT cells did not differ from the WT-hTERT cells or the control vector cells even in the early passages when telomerase activity inhibition was high (Fig. 1G). This lack of effects on growth proliferation and viability was confirmed by bidimensional clonogenic assays (Fig. 1H). Altogether, these data indicate that telomerase inhibition *via* the expression of DN-hTERT leads neither to telomere shortening nor to loss of *in vitro* proliferative capacity.

### DN-hTERT expression induces *in vitro* S-type morphology in the IGR-N-91 N-type cells

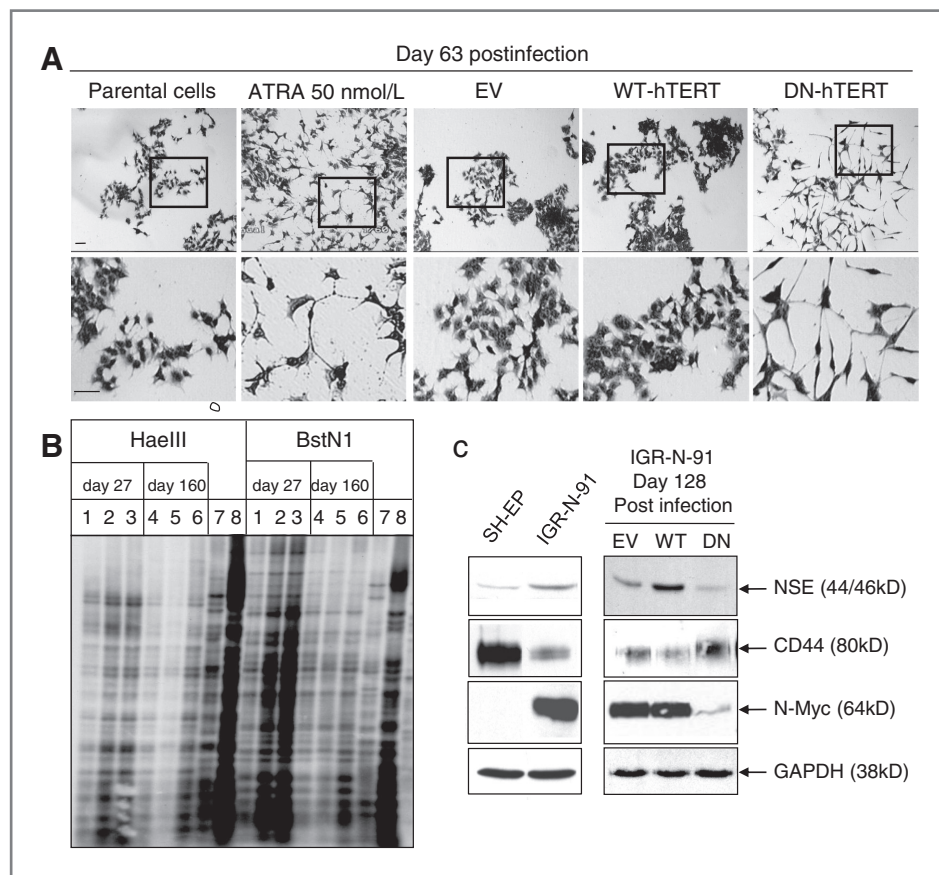
Importantly, DN-hTERT expression in the IGR-N-91 N-type cells induced major changes in cell morphology (Fig. 2A), by developing substrate-adherent or S phenotype with enlarged and flattened nuclei and cytoplasm resembling epithelial morphology. This morphology differed from the neurone-like phenotype of ATRA-treated cells, which presented a small, rounded, loosely adherent cell body, numerous neurite-like processes, and after longer periods of exposure cellular clustering. Note that neither the morphology of WT-hTERT cells nor empty vector expressing cells differed from the N-type parental cells. DNA fingerprint analysis carried out all along the experiment (Fig. 2B) pointed out a common origin for the 3 transduced sublines and excluded a cross-contaminated

subline putatively selected throughout *in vitro* passages of the cell culture. Of note plating the parental IGR-N-91 cells at a clonal density always give rise only to N-type cells and never generate S-type cell colonies. Interestingly, S-type cell features were observed as soon as 39 days after DN-hTERT transduction and remained stable during all the 160 days of cellular expansion culture.

N-type cells express high levels of neuron specific enolase (NSE), an early neuronal progenitor marker but not CD44, in contrast to S-type cells expressing high levels of CD44 but not NSE. Analysis of these 2 markers showed that DN-hTERT cells expressed a high level of CD44 protein and exhibited an important reduction of NSE protein, whereas WT-hTERT cells displayed an increase in NSE and a decrease in CD44 proteins compared with the parental and empty vector transduced cells (Fig. 2C). These results indicated that the level of telomerase activity can actively modulate neuroblastoma cell phenotype.

### Long term DN-hTERT expression induces a progressive loss of MYCN genomic content

IGR-N-91 cells showed MYCN-amplification with approximately 60 copies/haploid genome and subsequently elicited a high N-MYC protein level (Fig. 2C, left). Transduction of WT-hTERT did not modify N-MYC protein level (Fig. 2C, right). In contrast, DN-hTERT cells



**Figure 2.** hTERT-DN expression in the IGR-N-91 cells promotes a switch from N (neuronal) to S (substrate-adherent) phenotype. **A**, the IGR-N-91 cell morphology was analyzed after May-Grünwald-Giemsa staining 63 days after transduction and compared with neuronal differentiation observed after treatment of the cells with 50 nmol/L all-*trans* retinoic acid (ATRA) for 14 days. The lower panels show a higher magnification view of the boxed area in the upper panels. Scale bar, 25  $\mu$ m. **B**, DNA fingerprints of transduced cell populations. DNAs from EV control (1, 4), WT-hTERT (2, 5) and DN-hTERT (3, 6) cells, 27 days (1, 2, 3) and 160 days (4, 5, 6) after infection were digested with either BstNI or HaeIII and analyzed by Southern blot after  $^{32}$ P-labeled single-strand M13 DNA hybridization. DNAs from 2 chronic myeloid leukemia cell lines were used as unrelated DNA controls (7, 8). **C**, NSE and CD44, marker proteins for N and S-type, respectively, as well as N-MYC protein were analyzed by Western blot at 128 days after infection. S-type cells (SH-EP) and N-type cells (parental IGR-N-91 cells) served as controls. GAPDH was used as a control for equal loading.





**Table 1.** hTERT regulates the *MYCN* copy content in the IGR-N-91 cell line.

Days postinfection	27			118			160			180		
	EV	WT	DN	EV	WT	DN	EV	WT	DN	EV	WT	DN
MYCN copy number	66.7	69.8	69.3	59.6	58.7	42.3	63	85.3	4.3	62.8	81.8	0.5
% (EV)	100	104	103	100	98	71	100	135	6.8	100	130	0.8

NOTE: At the indicated times after infection, genomic copy number of *MYCN* was measured by real-time using Taqman Copy Number Assay (Applied Biosystems) as described in Materials and Methods. The *MYCN* copy number was determined by calculating the CT difference ( $\Delta$ CT) between *MYCN* and RNase P sequences, and then comparing the  $\Delta$ CT values to a calibrator sample known to have 2 copies of the *MYCN* sequence. Top line, *MYCN* copy number per haploid genome. Bottom line, *MYCN* copy number expressed as a percentage normalized to empty vector transduced cells.

showed a progressive loss of N-MYC protein, which became undetectable by 170 days after transduction. Table 1 shows a progressive and dramatic loss of *MYCN* copy number in DN-hTERT cells from 70 to 0.5. In contrast, an increase of *MYCN* copy number was observed in WT-hTERT cells from 70 to 82.

#### DN-hTERT causes a progressive sensitization of IGR-N-91 cells to drug-induced apoptosis

Previous studies have established increased sensitivity to chemotherapeutic drugs after telomerase inhibition in a variety of tumor cell lines, whereas ectopic hTERT expression resulting in an increased telomerase activity is able to protect cells from death through its anti-apoptotic function (14, 33–36). Therefore, we examined cell survival rate in transduced IGR-N-91 cells when treated with drugs such as cisplatin, a DNA damaging agent, staurosporine, a protein kinase inhibitor, or TRAIL, a death receptor ligand. The WST-1 proliferation assay, carried out at both 24 and 48 hours of treatment, showed that DN-hTERT cells exhibited a greater sensitivity to all tested drugs (Fig. 3A). Despite a partial late telomerase activity recovery, the inhibition of proliferation was most striking at day 169 after transduction than at day 35 (Fig. 1E). As expected, a protective effect of WT-hTERT was noticeable after long-term transgene expression and this effect was more pronounced in TRAIL-treated cells.

To determine if the decrease in cell viability caused by DN-hTERT was due to an increase in apoptosis, floating and adherent cells were collected for apoptosis analysis by TUNEL assay (Fig. 3B). Neither GFP control nor WT-hTERT cells revealed significant apoptotic nuclei. In contrast, drug treatments produced significantly high levels of apoptosis in the DN-hTERT cells and sensitization to apoptosis was higher at day 135 after transduction, thus confirming and extending the results obtained with the WST-1 proliferation assays.

#### DN-hTERT cells express wild-type p53 and high level of caspase-8

To investigate the mechanisms by which hTERT-DN expression sensitizes cells to drug-induced apoptosis, we analyzed the expression pattern of p53 and caspase-8, 2

key functional proteins involved in apoptosis, DNA damage pathways and/or differentiation.

IGR-N-91 cells expressed both the wild-type *TP53* and the mutant form carrying exons 7 to 9 duplication (27). Transcript analysis by RT-PCR confirmed the insertion of exons 7, 8, 9 in tandem; amplicons spanning from exon 1 to 11 showed a 1,432 bp and a 1,750 bp band, corresponding to the wild-type and mutant isoform, respectively as confirmed by sequence analysis (Fig. 4A). The mutant p53 amplicon was predominantly detected in the control, WT-hTERT, and DN-hTERT cells up to 21 days posttransduction (Fig. 4A). Interestingly, by day 80 posttransduction, the amount of the p53 mutated form markedly diminished in DN-hTERT cells, whereas the amplicon with a size corresponding to the wild-type transcript increased (Fig. 4A). Finally, the mutant amplicon disappeared over time. When transduction is prolonged to 115 and 160 days, only the wild-type form was detected.

Western blot analysis confirmed that the transduction of DN-hTERT selected for a loss of mutated p53 at the benefit of a wild-type p53 content (Fig. 4B). PCR experiments conducted on DNA samples from DN-hTERT cells at different postinfection times confirmed that this loss of exon 7 to 9 duplication occurred at the genomic level. The amplification of the 1,350 bp DNA fragment spanning the tandem duplication was progressively lost (Supplementary Fig. S3).

Caspase-8, a key mediator of death receptor-induced apoptosis, is frequently inactivated by epigenetic silencing in neuroblastoma cell lines and *MYCN* amplified tumors (6). This silencing has been shown to be involved in the resistance of neuroblastoma cells to TRAIL-mediated apoptosis (7, 8) and to enhance the metastasis process. Figure 4 shows that in WT-hTERT cells a significant decrease of caspase-8 mRNA was detected compared with empty vector-transduced cells. This decline in expression was marked at the protein level (Fig. 4B). In contrast, in DN-hTERT cells, an increase in caspase-8 mRNA levels is detected as soon as 80 days after transduction (Fig. 4A) and associated with a large increase in protein levels (Fig. 4B). Note that in all transduced cells, the levels of caspase-3 remained similar over time. Importantly, the specific increase of caspase-8 expression by



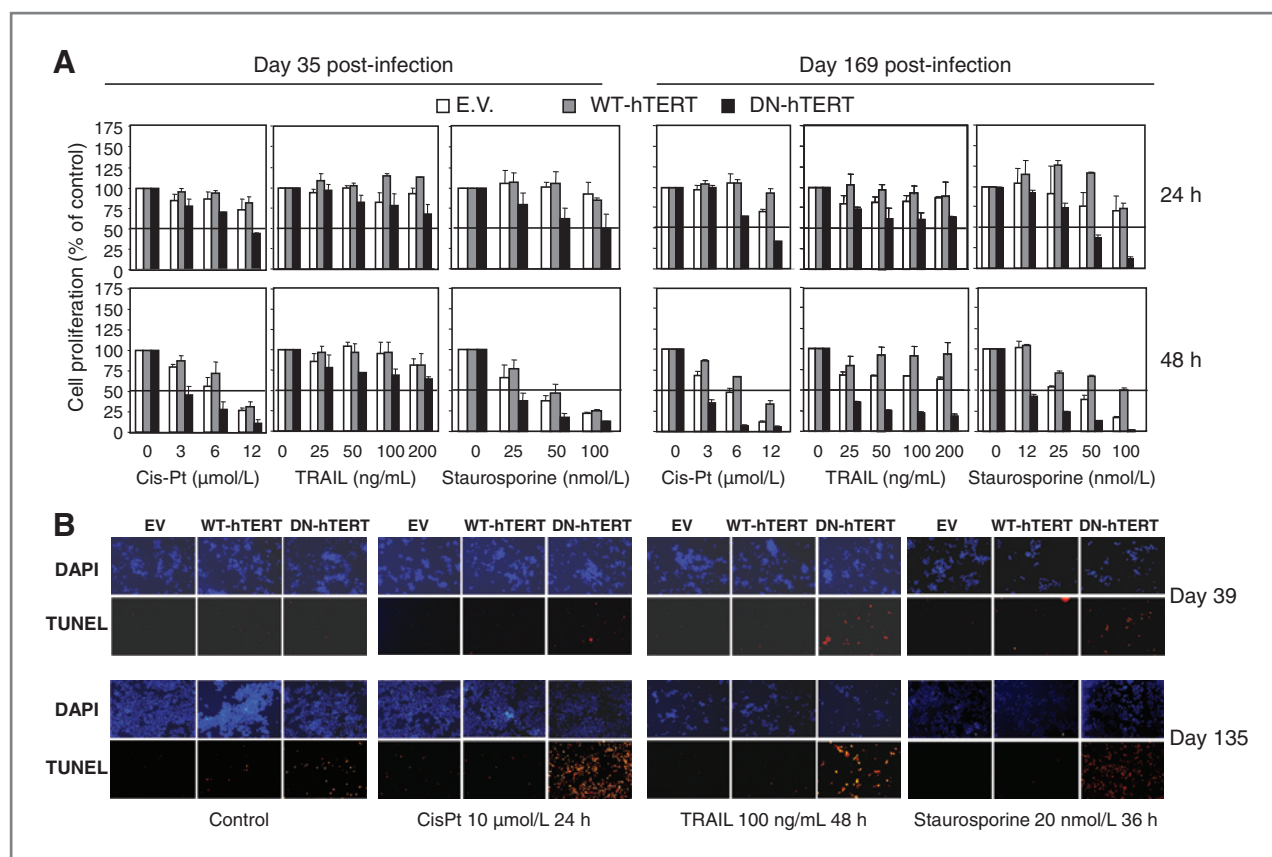


Figure 3. DN-hTERT sensitizes the IGR-N-91 cells to drug-induced apoptosis. A, the IGR-N-91 cells were exposed to various concentrations of cisplatin, staurosporine, or TRAIL at days 35 and 169 postinfection. Cell proliferation was determined by WST-1 assay. Graphs represent averages  $\pm$  SEM of at least 3 experiments. B, apoptotic cells were detected by TUNEL staining.

DN-hTERT has been also shown in another stage-4 neuroblastoma cell line (SK-N-BE2) suggesting that this modulation of caspase-8 expression by hTERT is not cell line specific (Supplementary Fig. S4). These results indicate a direct link between hTERT and caspase-8 signaling.

#### DN-hTERT cells lack their tumorigenicity in nude mice

Complete loss of *MYCN* as well as the acquisition of a differentiated S-type phenotype led us to investigate tumorigenic properties of DN-hTERT cells. Experimental tumors generated in female nude mice after 135 days of culture posttransduction showed a significant increase in tumor growth in animal xenografted with WT-hTERT cells compared with empty vector transduced cells. Animals xenografted with DN-hTERT cells showed palpable nodules up to day 15, and the nodules started slowly growing (Fig. 5). This results in a tumor growth rate dramatically decreased compared with animals inoculated with the empty vector transduced cells. After 180 days postinfection, DN-hTERT cells lose their ability to generate tumor, as no tumor growth could be observed within the 28 days of the experiment. These results showed that the tumorigenic properties of DN-hTERT neuroblasts were lost *in vivo*.

#### Discussion

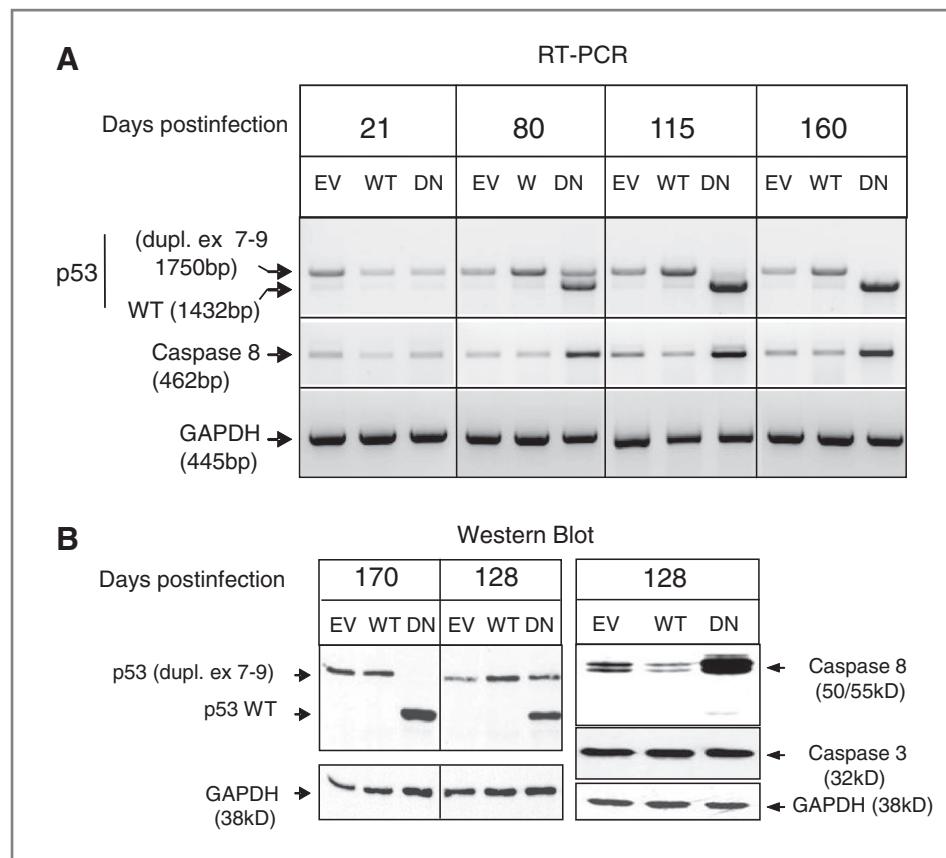
That undifferentiated aggressive stage 4-neuroblastoma expressed high levels of telomerase activity, whereas favorable differentiated or regressing tumors had no or little telomerase expression and activity, prompted us to investigate the role of this enzyme in the biology of malignant neuroblastoma cells and their response to chemotherapy.

DN-hTERT expression induced major morphologic changes that switched the transduced cell population from a neuronal (N) to a substrate-adherent (S) phenotype, whereas WT-hTERT cells conserved the N-type morphology of the parental cells. These morphologic changes were associated with a modified expression of specific lineage markers (CD44, NSE) and an increase of caspase-8 protein level in DN-hTERT cells, compared with control cells, whereas WT-hTERT expression had the reverse effect. The resulting S-type cell population showed major genomic changes with a dramatic loss of *MYCN* copy number leading to the disappearance of N-MYC protein and a progressive restoration of wild-type p53. Therefore, both morphologic and molecular evidence show that telomerase impacts malignant neuroblastoma cell fate.

That DN-hTERT and WT-hTERT transductions evoked opposite effects on CD44, NSE, caspase-8 expression, and



**Figure 4.** Molecular analysis of DN-hTERT expression in the IGR-N-91 cells. A, following transduction, p53 and caspase-8 expressions were analyzed by RT-PCR at the indicated period of culture. B, immunoblots documenting protein levels of caspase-8 and caspase-3, p53, and GAPDH in the IGR-N-91 transduced cells.



on *MYCN* copy number favors a model in which DN-hTERT drives N- to S-type cell population whereas modulating the expression of key genes involved in neuroblastoma biology. This hypothesis is in agreement with previous reports providing functional evidence that hTERT indirectly or directly modulates gene expression (18, 37). To support this cellular conversion, the growth curves showed no modifications in the proliferation rate and all attempts to observe the emergence of S-type cell colonies after plating of the parental IGR-N-91 cell population at a clonal density, failed. Nevertheless, if the DN-hTERT has induced the selection of a subset of S-type cells resident in the N-type IGR-N-91 cell population, that will suggest that DN-hTERT would have selectively induced cell death in N-type cells and/or provided S-type cells a selective growth advantage, whereas WT-hTERT would have pulled the population to a more N-type differentiated phenotype. This supports the idea that DN-hTERT and WT-hTERT exerts cell-specific dependent functions. Of note even though the S-type phenotype was clearly observed by day 39 after transduction, it is possible that the cell population continued to evolve during long-term culture as shown by *MYCN* copy number changes, the p53 genomic structure and the elimination of DN-hTERT sequence of the transgene without alteration of the GFP sequence as already reported (38, 39). Elimination of *MYCN* copies was previously reported in neuroblastoma,

promoting a tumoral reversion phenotype (3, 4). The restoration of the wild-type sequence of *TP53* could result from the deletion of 1 copy of the duplication in DN-hTERT cells as tandem duplications of exons are known to be relatively unstable (40). The reversal of a p53 gene mutation restoring a wild-type p53 function has already been described in a TPA-resistant K562 cell subline established from a K562 cell line that expressed a truncated p53 due to the loss of 1 allele and an insertion mutation in exon 5 of the other allele (41). Of major interest is that the molecular alterations observed in DN-hTERT cells are maintained despite the restoration of telomerase activity after long-term culture and could account for the progressive changes in sensitivity to drug-induced apoptosis, as well as the development of an attenuated malignant phenotype. Therefore, these results dramatically differ from those already reported (38, 39) showing that increased sensitivity to drug in DN-hTERT expressing cells requires telomere shortening and that the recovery of telomerase activity is accompanied by the reversion of telomerase inhibition effects (i.e., re-induction of cell proliferation, telomere lengthening and resistance to apoptosis). Therefore, our results highlighted the functional relevance of noncanonical functions of hTERT in neuroblastoma, independent of its role on telomere maintenance. Keeping with this notion, the DN-hTERT IGR-N-91 cell line provide an efficient tool to gain further insights



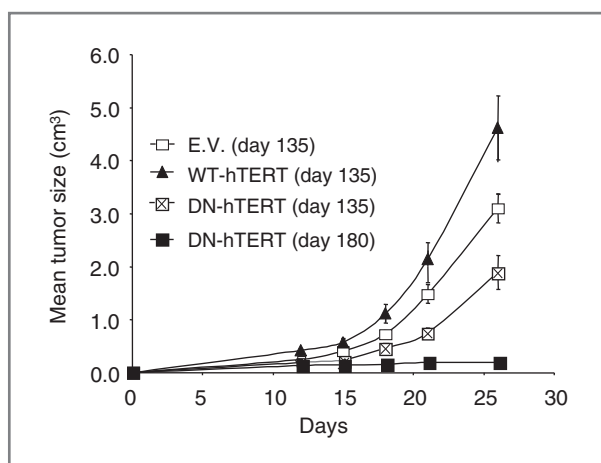


Figure 5. *In vivo* growth of IGR-N-91 cells following either DN-hTERT or WT-hTERT transduction. IGR-N-91 cells were subcutaneously injected into the flanks of 6- to 8-week-old female nude mice and size of tumor nodules was measured. Tumor sizes were plotted as mean  $\pm$  SEM for 10 mice per groups. Tumors grew faster in mice inoculated with the WT-hTERT cells, 135 days in culture posttransduction, compared with those inoculated with EV cells. Tumors in mice inoculated with the DN-hTERT cells elicited a significant growth delay. No tumor growth occurred in mice inoculated with the DN-hTERT cells, 180 days in culture posttransduction.

into several important questions on both the noncanonical functions of telomerase and neuroblastoma biology.

Because S phenotype in neuroblastoma cell lines is considered as a phenotype of low malignancy, this *in vitro* switch from N-type to an S-type could represent a process of cell reversion leading to *in vivo* tumor regression. In neuroblastoma tumors, *MYCN* amplification is a marker of dismal outcome and represents the cornerstone of risk-based classification of this disease. The absence of *MYCN* amplification and the high expression of CD44 are potent markers of a better prognosis (1). Moreover, the loss of caspase-8 expression in neuroblastoma contributes to an aggressive disease resistant to anticancer therapy and a metastatic phenotype (42, 43) while spontaneous regressing tumors (including stage 4S neuroblastoma) frequently express caspase-8. Therefore, we showed here, for the first time, a direct link between hTERT, CD44 and caspase-8, and the copy content of *MYCN* that can influence the selection process of tumors with a more or less aggressive behavior. This finding is strongly supported by *in vivo* xenograft experiments in nude mice showing that DN-hTERT cells lose their tumorigenic properties where-

as WT-hTERT cells accelerate tumor growth as compared with mock cells.

In conclusion, our major finding is the discovery of a new link between telomerase biology and malignant neuroblast cell fate. Indeed, we showed that through the manipulation of telomerase activity, it can be possible to regulate key genes, leading to the loss of the malignant behavior of neuroblasts, whereas sensitizing them to anticancer drugs results in more effective treatments. This finding has therefore important implications in the development of novel strategies for neuroblastoma therapeutic management.

#### Disclosure of Potential Conflicts of Interest

No potential conflicts of interest were disclosed.

#### Authors' Contributions

**Conception and design:** M. Samy, E. Ségal-Bendirdjian  
**Development of methodology:** M. Samy, S. Douc-Rasy, J. Bénard, E. Ségal-Bendirdjian  
**Acquisition of data (provided animals, acquired and managed patients, provided facilities, etc.):** M. Samy, C.-H. Gattolliat, S. Douc-Rasy, J. Bénard, E. Ségal-Bendirdjian  
**Analysis and interpretation of data (e.g., statistical analysis, biostatistics, computational analysis):** M. Samy, C.-H. Gattolliat, S. Bombard, S. Douc-Rasy, J. Bénard, E. Ségal-Bendirdjian  
**Writing, review, and/or revision of the manuscript:** M. Samy, S. Bombard, S. Douc-Rasy, J. Bénard, E. Ségal-Bendirdjian  
**Administrative, technical, or material support (i.e., reporting or organizing data, constructing databases):** M. Samy, F. Pendino, J. Hillion, E. Nguyen, E. Ségal-Bendirdjian  
**Study supervision:** E. Ségal-Bendirdjian

#### Acknowledgments

We are grateful to Dr. R. Weinberg (Massachusetts Institute of Technology) for provision of the pBABE-puro-WT-hTERT and pBABE-puro-DN-hTERT constructs. We thank Dr. G. Kellermann (INSERM UMR-S 1007), Dr. P. Forgez (INSERM UMR-S 938), and Dr. N. Insdorf for their critical reading of the manuscript. We thank Pr J. R. Lillehaug (University of Bergen, Norway) for providing access to the cell transduction facilities.

#### Grant Support

This work was supported by grants from the Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale (INSERM), the Association pour la Recherche contre le Cancer (E. Ségal-Bendirdjian), the Fondation de France (E. Ségal-Bendirdjian), the Ligue Nationale Contre le Cancer (Comité Ile de France, M. Samy; Comité Montbéliard, J. Bénard) and the Fédération Enfants et Santé & Société Française de Lutte contre les Cancers et les Leucémies de l'Enfant et de l'Adolescent, France (J. Bénard).

The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked *advertisement* in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

Received March 16, 2012; revised July 5, 2012; accepted August 12, 2012; published OnlineFirst August 28, 2012.

#### References

- Brodeur GM. Neuroblastoma: biological insights into a clinical enigma. *Nat Rev Cancer* 2003;3:203-16.
- Brodeur GM, Seeger RC, Schwab M, Varmus HE, Bishop JM. Amplification of N-myc in untreated human neuroblastomas correlates with advanced disease stage. *Science* 1984;224:1121-4.
- Ambros IM, Rumpler S, Luegmayr A, Hattinger CM, Strehl S, Kovar H, et al. Neuroblastoma cells can actively eliminate supernumerary *MYCN* gene copies by micronucleus formation—sign of tumour cell reversion? *Eur J Cancer* 1997;33:2043-9.
- Prochazka P, Hrabeta J, Vicha A, Eckschlager T. Expulsion of amplified *MYCN* from homogeneously staining chromosomal regions in neuroblastoma cell lines after cultivation with cisplatin, doxorubicin, hydroxyurea, and vincristine. *Cancer Genet Cytogenet* 2010;196:96-104.





5. Krelin Y, Zhang L, Kang TB, Appel E, Kovalenko A, Wallach D. Caspase-8 deficiency facilitates cellular transformation in vitro. *Cell Death Differ* 2008;15:1350–5.
6. Teitz T, Wei T, Valentine MB, Vanin EF, Grenet J, Valentine VA, et al. Caspase 8 is deleted or silenced preferentially in childhood neuroblastomas with amplification of MYCN. *Nat Med* 2000;6:529–35.
7. Eggert A, Grotzer MA, Zuzak TJ, Wiewrodt BR, Ho R, Ikegaki N, et al. Resistance to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced apoptosis in neuroblastoma cells correlates with a loss of caspase-8 expression. *Cancer Res* 2001;61:1314–9.
8. Hopkins-Donaldson S, Bodmer JL, Bourlout KB, Brognara CB, Tschopp J, Gross N. Loss of caspase-8 expression in neuroblastoma is related to malignancy and resistance to TRAIL-induced apoptosis. *Med Pediatr Oncol* 2000;35:608–11.
9. Moll UM, LaQuaglia M, Benard J, Riou G. Wild-type p53 protein undergoes cytoplasmic sequestration in undifferentiated neuroblastomas but not in differentiated tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1995;92:4407–11.
10. Ross RA, Spengler BA, Biedler JL. Coordinate morphological and biochemical interconversion of human neuroblastoma cells. *J Natl Cancer Inst* 1983;71:741–7.
11. Ciccarone V, Spengler BA, Meyers MB, Biedler JL, Ross RA. Phenotypic diversification in human neuroblastoma cells: expression of distinct neural crest lineages. *Cancer Res* 1989;49:219–25.
12. Blackburn EH. Telomeres and telomerase: their mechanisms of action and the effects of altering their functions. *FEBS Lett* 2005;579:859–62.
13. Gorbunova V, Seluanov A, Pereira-Smith OM. Expression of human telomerase (hTERT) does not prevent stress-induced senescence in normal human fibroblasts but protects the cells from stress-induced apoptosis and necrosis. *J Biol Chem* 2002;277:38540–9.
14. Dudognon C, Pendino F, Hillion J, Saumet A, Lanotte M, Segal-Bendirdjian E. Death receptor signaling regulatory function for telomerase: hTERT abolishes TRAIL-induced apoptosis, independently of telomere maintenance. *Oncogene* 2004;23:7469–74.
15. Lee J, Sung YH, Cheong C, Choi YS, Jeon HK, Sun W, et al. TERT promotes cellular and organismal survival independently of telomerase activity. *Oncogene* 2008;27:3754–60.
16. Choi J, Southworth LK, Sarin KY, Venteicher AS, Ma W, Chang W, et al. TERT promotes epithelial proliferation through transcriptional control of a Myc- and Wnt-related developmental program. *PLoS Genet* 2008;4:e10.
17. Masutomi K, Possemato R, Wong JM, Currier JL, Tothova Z, Manola JB, et al. The telomerase reverse transcriptase regulates chromatin state and DNA damage responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:8222–7.
18. Smith LL, Collier HA, Roberts JM. Telomerase modulates expression of growth-controlling genes and enhances cell proliferation. *Nat Cell Biol* 2003;5:474–9.
19. Pendino F, Tarkanyi I, Dudognon C, Hillion J, Lanotte M, Aradi J, et al. Telomeres and telomerase: pharmacological targets for new anticancer strategies? *Curr Cancer Drug Targets* 2006;6:147–80.
20. Hahn WC, Stewart SA, Brooks MW, York SG, Eaton E, Kurachi A, et al. Inhibition of telomerase limits the growth of human cancer cells. *Nat Med* 1999;5:1164–70.
21. Nguyen BN, Elmore LW, Holt SE. Mechanism of dominant-negative telomerase function. *Cell Cycle* 2009;8:3227–33.
22. Poynter KR, Sachs PC, Bright AT, Breed MS, Nguyen BN, Elmore LW, et al. Genetic inhibition of telomerase results in sensitization and recovery of breast tumor cells. *Mol Cancer Ther* 2009;8:1319–27.
23. Hiyama E, Hiyama K, Yokoyama T, Matsuura Y, Piatyszek MA, Shay JW. Correlating telomerase activity levels with human neuroblastoma outcomes. *Nat Med* 1995;1:249–55.
24. Reynolds CP, Zuo JJ, Kim NW, Wang H, Lukens JN, Matthay KK, et al. Telomerase expression in primary neuroblastomas. *Eur J Cancer* 1997;33:1929–31.
25. Ferrandis E, Da Silva J, Riou G, Bénard J. Coactivation of MDR1 and MYCN genes in human neuroblastoma cells during the metastatic process in thye nude mouse. *Cancer Res* 1994;54:2256–61.
26. Valent A, Venuat AM, Danglot G, Da Silva J, Duarte N, Bernheim A, et al. Stromal cells and human malignant neuroblasts derived from bone marrow metastasis may share common karyotypic abnormalities: the case of the IGR-N-91 cell line. *Med Pediatr Oncol* 2001;36:100–3.
27. Goldschneider D, Horvilleur E, Plassa LF, Guillaud-Bataille M, Million K, Wittmer-Dupret E, et al. Expression of C-terminal deleted p53 isoforms in neuroblastoma. *Nucleic Acids Res* 2006;34:5603–12.
28. Raguenez G, Muhlethaler-Mottet A, Meier R, Duros C, Benard J, Gross N. Fenretinide-induced caspase-8 activation and apoptosis in an established model of metastatic neuroblastoma. *BMC Cancer* 2009;9:97.
29. Pendino F, Flexor M, Delhommeau F, Buet D, Lanotte M, Segal-Bendirdjian E. Retinoids down-regulate telomerase and telomere length in a pathway distinct from leukemia cell differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:6662–7.
30. Deville L, Hillion J, Pendino F, Samy M, Nguyen E, Segal-Bendirdjian E. hTERT promotes imatinib resistance in chronic myeloid leukemia cells: therapeutic implications. *Mol Cancer Ther* 2011;10:711–9.
31. Segal-Bendirdjian E, Jacquemin-Sablon A. Cisplatin resistance in a murine leukemia cell line is associated with a defective apoptotic process. *Exp Cell Res* 1995;218:201–12.
32. Wu YL, Dudognon C, Nguyen E, Hillion J, Pendino F, Tarkanyi I, et al. Immunodetection of human telomerase reverse-transcriptase (hTERT) re-appraised: nucleolin and telomerase cross paths. *J Cell Sci* 2006;119:2797–806.
33. Misawa M, Tauchi T, Sashida G, Nakajima A, Abe K, Ohyashiki JH, et al. Inhibition of human telomerase enhances the effect of chemotherapeutic agents in lung cancer cells. *Int J Oncol* 2002;21:1087–92.
34. Nakamura M, Masutomi K, Kyo S, Hashimoto M, Maida Y, Kanaya T, et al. Efficient inhibition of human telomerase reverse transcriptase expression by RNA interference sensitizes cancer cells to ionizing radiation and chemotherapy. *Hum Gene Ther* 2005;16:859–68.
35. Ward RJ, Autexier C. Pharmacological telomerase inhibition can sensitize drug-resistant and drug-sensitive cells to chemotherapeutic treatment. *Mol Pharmacol* 2005;68:779–86.
36. Cerone MA, Londono-Vallejo A, Autexier C. Telomerase inhibition enhances the response to anticancer drug treatment in human breast cancer cells. *Mol Cancer Ther* 2006;5:1669–75.
37. Li S, Crothers J, Haqq CM, Blackburn EH. Cellular and gene expression responses involved in the rapid growth inhibition of human cancer cells by RNA interference-mediated depletion of telomerase RNA. *J Biol Chem* 2005;280:23709–17.
38. Delhommeau F, Thierry A, Feneux D, Lauret E, Leclercq E, Courtier MH, et al. Telomere dysfunction and telomerase reactivation in human leukemia cell lines after telomerase inhibition by the expression of a dominant-negative hTERT mutant. *Oncogene* 2002;21:8262–71.
39. Brassat U, Balabanov S, Bali D, Dierlamm J, Braig M, Hartmann U, et al. Functional p53 is required for effective execution of telomerase inhibition in BCR-ABL-positive CML cells. *Exp Hematol* 2011;39:66–76 e1–2.
40. Bichara M, Wagner J, Lambert IB. Mechanisms of tandem repeat instability in bacteria. *Mutat Res* 2006;598:144–63.
41. Usuda J, Inomata M, Fukumoto H, Iwamoto Y, Suzuki T, Kuh HJ, et al. Restoration of p53 gene function in 12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate-resistant human leukemia K562/TPA cells. *Int J Oncol* 2003;22:81–6.
42. Stupack DG, Teitz T, Potter MD, Mikolon D, Houghton PJ, Kidd VJ, et al. Potentiation of neuroblastoma metastasis by loss of caspase-8. *Nature* 2006;439:95–9.
43. Teitz T, Lahti JM, Kidd VJ. Aggressive childhood neuroblastomas do not express caspase-8: an important component of programmed cell death. *J Mol Med* 2001;79:428–36.



## *GALNT9* Gene Expression Is a Prognostic Marker in Neuroblastoma Patients

Nora Berois,<sup>1\*†</sup> Charles-Henry Gattolliat,<sup>2†</sup> Enrique Barrios,<sup>3</sup> Laura Capandeguy,<sup>1</sup> Sétha Douc-Rasy,<sup>2</sup> Dominique Valteau-Couanet,<sup>4</sup> Jean Bénard,<sup>2,5\*</sup> and Eduardo Osinaga<sup>1,6</sup>

**BACKGROUND:** The enzymes encoded by the *GALNT* [UDP-*N*-acetyl- $\alpha$ -D-galactosamine:polypeptide *N*-acetylgalactosaminyltransferase (GALNAC-T)] gene family catalyze the first step of O-glycosylation. Little is known about the link between expression of the genes encoding GALNAC-T enzymes and tumor progression in neuroblastoma, a pediatric cancer that can be classified as either low or high risk. We assessed the expression of genes in the *GALNT* family in a large cohort of neuroblastoma patients and characterized members of this family that might be used as new prognostic markers.

**METHODS:** Reverse-transcription PCR analysis of 14 *GALNT* genes with a panel of neuroblastoma cell lines identified the *GALNT9* gene as playing a potential role in disease progression. We used the log-rank test and the multivariable Cox proportional hazards model with a cohort of 122 neuroblastoma patients to analyze the relationship between *GALNT9* expression and overall survival or disease-free survival.

**RESULTS:** In the high-risk neuroblastoma experimental model IGR-N-91, *GALNT9* expression was present in neuroblasts derived from primary tumors but not in neuroblasts from metastatic bone marrow. Moreover, *GALNT9* in neuroblastoma cell lines was expressed in substrate adherent (S)-type cell lines but not in neuronal (N)-type lines. In the tumor cohort, *GALNT9* expression was associated with high overall survival, independent of the standard risk-stratification covariates. *GALNT9* expression was significantly associated with disease-free survival for patients currently classified as at low risk ( $P < 0.0007$ ).

**CONCLUSIONS:** *GALNT9* expression correlates with both improved overall survival in low- and high-risk groups and an improved clinical outcome (overall and disease-free survival) in low-risk patients. Thus, the *GALNT9* expression may be a prognostic marker for personalized therapy.

© 2012 American Association for Clinical Chemistry

Neuroblastoma, the most common malignant solid tumor diagnosed during infancy (median age at diagnosis, 17 months), accounts for 10% of all childhood cancers (1). Its biology may be extremely variable: Certain tumors regress spontaneously, whereas others are highly aggressive. The combination of age at diagnosis, tumor burden, histopathology, DNA index, and *MYCN*<sup>7</sup> [v-myc myelocytomatosis viral related oncogene, neuroblastoma derived (avian)] gene status is used to stratify risk categories (2). The low-risk group consists of non-*MYCN*-amplified tumors that exist either as localized forms (stages 1, 2, and 3) or as metastatic forms in children younger than 18 months (stage 4S). The high-risk group comprises all *MYCN*-amplified neuroblastomas, regardless of stage and age of the child, plus non-*MYCN*-amplified stage 4 neuroblastomas for children older than 18 months. The low-risk group has a survival rate of up to 90%, but the high-risk group consists of aggressive tumors that more frequently lead to death (5-year survival rate, approximately 35%).

Alterations in glycan profiles are a hallmark of cancer development linked to the expression of tumor-associated carbohydrate antigens (3). Abnormal O-glycans produced by cancer cells contribute to the malignant phenotype and play an impor-

<sup>1</sup> Laboratorio de Glicobiología e Inmunología Tumoral, Institut Pasteur de Montevideo, Montevideo, Uruguay; <sup>2</sup> CNRS UMR 8126, Université Paris-Sud 11, Institut Gustave Roussy, Villejuif, France; <sup>3</sup> Departamento de Métodos Cuantitativos, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay; Département de <sup>4</sup> Pédiatrie Oncologique and <sup>5</sup> Biologie et Pathologie Médicales, Institut Gustave Roussy, Villejuif, France; <sup>6</sup> Departamento de Inmunobiología, Universidad de la República, Montevideo, Uruguay.

\* Address correspondence to: N.B. at Laboratorio de Glicobiología e Inmunología Tumoral, Institut Pasteur de Montevideo, Mataojo 2020, Montevideo CP 11400, Uruguay. Fax +598-25-22-41-85; e-mail nberois@pasteur.edu.uy. J.B. at Dé-

partement de Biologie et Pathologie Médicales, Institut Gustave Roussy, 39 rue Camille Desmoulines, 94805 Villejuif Cedex, France. Fax +33-1-42-11-54-94; e-mail jean.benard@igr.fr.

<sup>†</sup> These authors contributed equally to this work.

Received July 6, 2012; accepted October 15, 2012.

Previously published online at DOI: 10.1373/clinchem.2012.192328

<sup>7</sup> Human genes: *MYCN*, v-myc myelocytomatosis viral related oncogene, neuroblastoma derived (avian); *GALNT3*, UDP-*N*-acetyl- $\alpha$ -D-galactosamine:polypeptide *N*-acetylgalactosaminyltransferase 3 (GALNAC-T3); *B2M*,  $\beta_2$ -microglobulin.



tant functional role in cell adhesion, invasion, and metastasis (4). The most abundant form of O-linked glycosylation in higher eukaryotes, termed “mucin-type,” is initiated in the Golgi apparatus by the covalent linkage of an  $\alpha$ -N-acetylgalactosamine (GalNAc)<sup>8</sup> residue to the hydroxyl group of Ser and Thr residues (5), a reaction catalyzed by the UDP-GalNAc:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferases (GALNAC-Ts) (EC 2.4.1.41) (6). These enzymes are a complex family of isoenzymes, with 20 members having been characterized to date (7). The genes encoding certain isoforms are broadly expressed, whereas other isoforms are restricted in their distributions and activities to certain cells or tissues (6). Individual GALNAC-Ts have distinct activities (8), and the O-glycosylation process in a given cell is regulated by the repertoire of the isoenzyme genes expressed in that cell (4).

The various genes encoding GALNAC-Ts are differentially expressed in malignant tissue, compared with normal tissue (9–11). Overexpression of the *GALNT3* [UDP-N-acetyl- $\alpha$ -D-galactosamine: polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 3 (GALNAC-T3)] gene promotes the growth of pancreatic cancer cells (12), whereas somatic and germline mutations in *GALNT12* that encode a nonfunctional enzyme are associated with colon cancer development (13). Increasing evidence suggests that GALNAC-Ts might be useful tumor markers. GALNAC-T3 enzyme production, for example, has been shown to correlate with prognosis in patients with colorectal and gall bladder cancer (14, 15). The gene encoding GALNAC-T6 is expressed in breast cancer but not in normal breast epithelium, and this difference is apparent at both the mRNA (16) and protein (17) levels. In previous work, we used a reverse-transcription PCR (RT-PCR) assay to identify an association between GALNAC-T6 production in bone marrow samples and poor clinical outcome in lymph node–negative breast cancer patients (16). We have also shown that *GALNT13*, the gene encoding the GALNAC-T13 isoenzyme (18), might be a novel molecular marker of bone marrow involvement in neuroblastoma patients (19). When we applied microarray gene expression analysis to the xenograft-derived cell model of human neuroblastoma [the so-called IGR-N-91 cell line (20)], we also found that *GALNT13* was the gene most strongly upregulated in metastatic malignant neuroblasts, compared with a

primary-tumor xenograft (19). In the same study, we measured tyrosine hydroxylase, ganglioside D2 synthase, DOPA decarboxylase, and *GALNT13* transcripts in bone marrow aspirates from the same neuroblastoma patients to evaluate whether *GALNT13* might be useful for detecting disseminated disease. We found that *GALNT13* expression in bone marrow at diagnosis was the strongest predictor of a poor clinical outcome. This evidence prompted the present study, in which we analyzed the expression of 14 *GALNT* genes at the mRNA level in a panel of neuroblastoma cell lines, including the IGR-N-91 model. Because we found the brain-specific isoform, encoded by *GALNT9* (21), to be produced primarily in neuroblasts displaying a low aggressive behavior, we assessed the production of this enzyme in a cohort of 122 primary neuroblastoma tumors. Our findings indicate that *GALNT9* gene expression is associated with a better clinical outcome in neuroblastoma patients.

## Materials and Methods

### PATIENTS AND CLINICAL SAMPLES

Tumor samples from a retrospective cohort of patients (n = 122) who had been staged according to the International Neuroblastoma Staging System (22) were collected between 1987 and 2009 at the Institut Gustave Roussy with the approval of the appropriate ethics committees and according to the national law applicable to people taking part in biomedical research. Primary-tumor tissues obtained from patients either via Tru-Cut (CareFusion Corporation) biopsy or after surgery were immediately snap-frozen and stored in liquid nitrogen until nucleic acid extraction. The main clinical features of the patients and the tumor characteristics are described in Table 1 in the Data Supplement that accompanies the online version of this article at <http://www.clinchem.org/content/vol59/issue1>.

### TUMOR CRYOSECTIONS AND EXTRACTION OF TOTAL RNA

The first and last cryosections were used to select tumor tissues with a malignant tumor cell content of >60% (23, 24). Total RNA was isolated with TRIzol Reagent (Invitrogen) according to the manufacturer's protocols. Nucleic acid concentration and purity were measured with a Nanodrop ND-1000 spectrophotometer (NanoDrop/Thermo Scientific), and nucleic acid quality was checked with a 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies).

### CELL LINES

The neuroblastoma metastatic-cell model, IGR-N-91, was derived from a high-risk neuroblastoma through in vitro culture of malignant neuroblasts that had been collected from the bone marrow of an 8-year-old boy and then xenografted into nude mice, as has been de-

<sup>8</sup> Nonstandard abbreviations: GalNAc,  $\alpha$ -N-acetylgalactosamine; GALNAC-T, UDP-GalNAc:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase; RT-PCR, reverse-transcription PCR; PTX, primary-tumor xenograft; BM, bone marrow metastasis; N, neuronal; S, substrate-adherent; dNTP, deoxynucleoside triphosphate; Apo2L/TRAIL, apolipoprotein 2 ligand/tumor necrosis factor–related apoptosis-inducing ligand.



scribed (20). Derived sublines were established from the primary-tumor xenograft (PTX) and bone marrow metastasis (BM) in nude mice. Other neuroblastoma cell lines [IMR-32, SH-SY5Y, SK-N-AS, SK-N-BE (2), LAN-1, and LAN-5] showing the typical phenotypes of established malignant neuroblasts [i.e., neuronal (N) and substrate-adherent (S)] were obtained from various sources (25). The cells were maintained in DMEM at 37 °C in a 5% CO<sub>2</sub> humidified atmosphere. Total RNA was isolated with TRIzol Reagent according to the manufacturer's protocols.

#### RT-PCR ANALYSIS

Total RNA (1 μg) prepared from cell lines and primary tumors was reverse transcribed by Moloney murine leukemia virus reverse transcriptase (Amersham/GE Healthcare Life Sciences). The reaction mixture consisted of 200 U enzyme, 2 μL of 10 mmol/L of each deoxynucleoside triphosphate (dNTP), and 1 μL of 250 ng random hexamers in a 20-μL total reaction volume. Different RT-PCR reactions were run with the appropriate negative controls to amplify *GALNT* family members. The primer sequences are shown in Table 2 in the online Data Supplement. The *B2M* ( $\beta_2$ -microglobulin) gene was amplified to verify cDNA quality. We added 1 μL cDNA to a final 25-μL PCR reaction volume containing 1× provided enzyme buffer, 2 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 200 μmol/L dNTPs, 400 nmol/L of each primer, and 1 U *Taq* DNA polymerase (Fermentas). The amplification conditions consisted of 35 cycles of 30 s at 95 °C, 30 s at the annealing temperature, and 1 min at 72 °C. The annealing temperature was 60 °C for *GALNT1*, 2, 4, 5, 6, 7, 9, and 15; 56 °C for *GALNT3*, 10, 11, 12, and 14; and 62 °C for *GALNT13*. The PCR products (15 μL) were analyzed by electrophoresis on 2% agarose gels and by direct visualization after ethidium bromide staining.

#### STATISTICAL ANALYSIS

We performed several analyses to determine whether the expression levels of the *GALNT* genes of interest were significantly related to overall and disease-free survival of the patients (end points of cancer-specific death and relapse, respectively). Overall survival was defined as the time from diagnosis to the date of death or last follow-up; disease-free survival was defined as the time from diagnosis to the date of death or the first appearance of relapse. SAS software (SAS Institute) was used to construct Kaplan–Meier survival curves and to perform univariate and multivariable Cox proportional hazards analyses. To generate survival curves, we stratified patients into groups of *GALNT* gene expression (i.e., expression, +; lack of expression, –). Survival curves were compared by the log-rank test and judged significantly different at *P* values <0.05. We

undertook univariate Cox proportional hazards regression analyses with SAS software and defined statistical significance as *P* values <0.05. To ascertain whether expression of the *GALNT* genes of interest were independent prognostic factors, we used Cox proportional hazards regression analyses to examine the joint effects of covariates. Patients were dichotomized by age into patients younger than 18 months and patients 18 months of age and older. Stage was dichotomized for the entire neuroblastoma cohort with respect to metastatic progression (i.e., stage 1, 2, and 3 vs stage 4. Stage 4S was included with stages 1, 2, and 3, because the prognosis for these patients is usually considered good. For the *GALNT* gene of interest, patients were categorized into groups as described above. All variables with *P* values <0.05 in univariate analyses were selected for inclusion in the multivariable model.

## Results

#### EXPRESSION OF THE *GALNT* GENE FAMILY IN HUMAN NEUROBLASTOMA CELL LINES

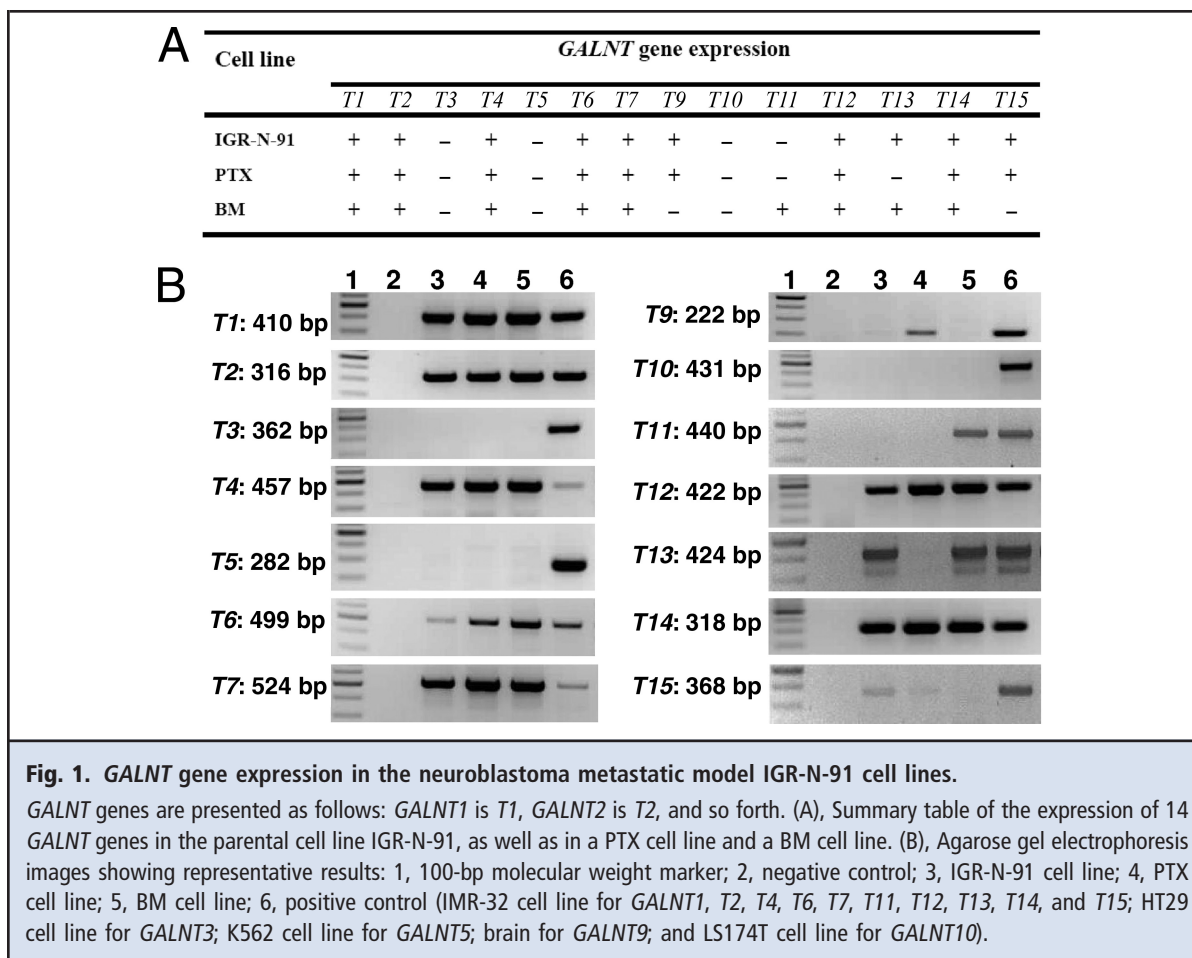
We investigated the production of GALNAC-Ts in the IGR-N-91 neuroblastoma experimental model, which offered the opportunity to compare neuroblastoma cell lines established from a primary tumor (PTX) and matched metastatic neuroblasts (BM). An RT-PCR assay was designed for 14 members of the *GALNT* gene family (*GALNT1* to *GALNT15* except *GALNT8*). In comparing the 2 cell sublines, we found that several *GALNT* genes were expressed in both, (PTX and BM neuroblasts expressed *GALNT1*, 2, 4, 6, 7, 12, and 14), but the expression of 3 genes (*GALNT3*, 5, and 10) were undetectable in these 2 cell lines. We found a marked difference between PTX and BM malignant neuroblasts in the expression *GALNT9*, 11, 13, and 15. The *GALNT11* and *GALNT13* genes were expressed in the BM cell line but not in the PTX cell line, and conversely, *GALNT9* and *GALNT15* genes were expressed in the PTX line but not in the BM cell line (Fig. 1). Consequently, we measured the expression of these genes in a panel of 6 neuroblastoma cell lines. *GALNT11*, 13, and 15 were found in almost all the cells lines and hence were broadly expressed. In sharp contrast, *GALNT9* displayed a very restricted expression pattern, being found only in SK-N-AS and SK-N-BE (2) cell lines (Fig. 2). These results led us to choose *GALNT9* gene for further evaluation of clinical samples.

#### *GALNT9* EXPRESSION IN PRIMARY HUMAN NEUROBLASTOMA TUMORS

On the basis of the in vitro results, we used RT-PCR to assess *GALNT9* expression in samples of primary neu-







**Fig. 1.** GALNT gene expression in the neuroblastoma metastatic model IGR-N-91 cell lines.

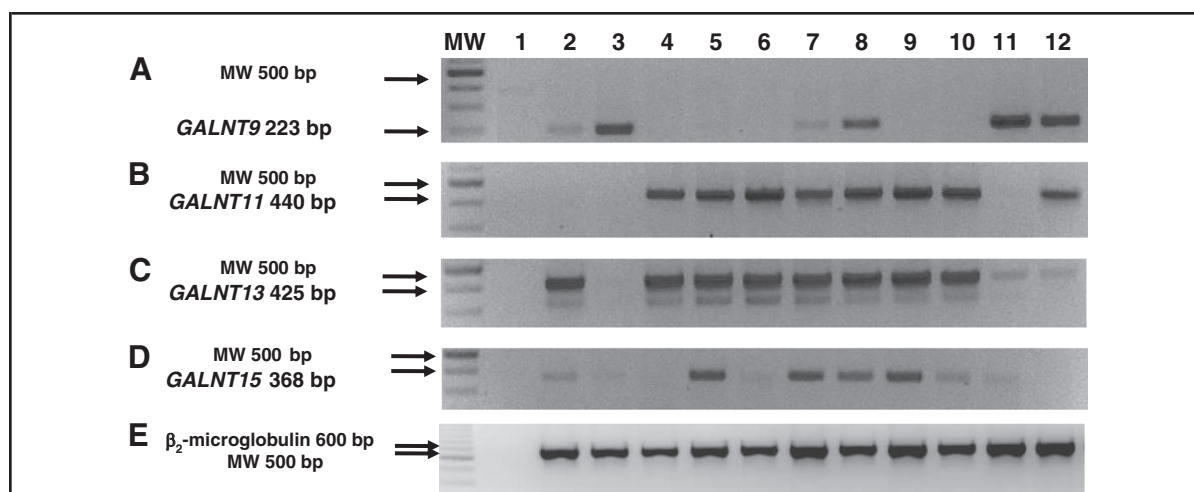
GALNT genes are presented as follows: GALNT1 is T1, GALNT2 is T2, and so forth. (A), Summary table of the expression of 14 GALNT genes in the parental cell line IGR-N-91, as well as in a PTX cell line and a BM cell line. (B), Agarose gel electrophoresis images showing representative results: 1, 100-bp molecular weight marker; 2, negative control; 3, IGR-N-91 cell line; 4, PTX cell line; 5, BM cell line; 6, positive control (IMR-32 cell line for GALNT1, T2, T4, T6, T7, T11, T12, T13, T14, and T15; HT29 cell line for GALNT3; K562 cell line for GALNT5; brain for GALNT9; and LS174T cell line for GALNT10).

roblastoma tumors from a tumor cohort from 122 patients (Table 1; see Table 1 in the online Data Supplement). We found GALNT9 expression in 77 (63%) of the 122 tumors. We then investigated whether the lack of GALNT9 expression was associated with various clinical features (Table 2). The relationship between disease stage and GALNT9 was not significant ( $P = 0.0596$ ). GALNT9 was expressed not only in most patients with localized and 4S stages (47 of 66 patients, 71%) but also in 30 (54%) of 56 patients with stage 4 disease. GALNT9 was expressed in most patients with no MYCN amplification (66 of 96 patients, 69%) and in patients younger than 18 months at diagnosis (42 of 56 patients, 75%); however, GALNT9 expression occurred in only 42% of patients (11 of 26) with MYCN amplification and 53% of patients (35 of 66)  $\geq 18$  months. Thus, the lack of GALNT9 expression was associated with MYCN amplification ( $P = 0.0209$ ) and age at diagnosis ( $P = 0.0147$ ), indicating a link between lack of GALNT9 expression and the high-risk phenotype.

#### EXPRESSION OF GALNT9 AS A PROGNOSTIC MARKER OF PATIENT SURVIVAL

Statistical analyses were performed to determine the significance of GALNT9 expression as a prognostic factor for the entire cohort ( $n = 122$ ). Disease outcome (survival and relapse events) was documented for all patients. The final follow-up date was February 2011, with a median follow-up period of 51 months. An event (death or relapse) was registered for 54 patients (44%), with death recorded for 42 patients (34%). A univariate Cox proportional hazards regression analysis showed that patients with a lack of GALNT9 expression in their tumors had an overall and disease-free survival rate significantly lower than patients whose tumors expressed that gene (Table 3). Consistent with the results of the univariate Cox regression analysis, the Kaplan–Meier survival analysis highlighted that patients with GALNT9 expression displayed a better prognosis than patients with no expression, in terms of both overall survival and disease-free survival ( $P < 0.0001$ , and  $P = 0.0004$ , respectively; Fig. 3A). Analyses with the multivariable Cox pro-





**Fig. 2.** Representative results of *GALNT* RT-PCR analyses of neuroblastoma cell lines and tumors.

RT-PCR for *GALNT9* (A), *GALNT11* (B), *GALNT13* (C), *GALNT15* (D), and  $\beta_2$ -microglobulin ("housekeeping" gene control) (E). MW, molecular weight marker (100 bp); 1, negative control; 2, IGR-N-91 cell line; 3, PTX cell line; 4, BM cell line; 5, IMR-32 cell line; 6, SH-SY5Y cell line; 7, SK-N-AS cell line; 8, SK-N-BE (2) cell line; 9, LAN-1 cell line; 10, LAN-5 cell line; 11, neuroblastoma primary tumor 1; 12, neuroblastoma primary tumor 2.

portional hazards model assessed whether *GALNT9* expression was an independent prognostic factor (Table 3) and found it to be an independent prognostic factor for overall survival (hazard ratio, 2.066; 95% CI, 1.078–

3.963;  $P = 0.0290$ ) but not for disease-free survival (hazard ratio, 1.446; 95% CI, 0.824–2.538;  $P = 0.1986$ ).

**GALNT9 EXPRESSION PREDICTS SURVIVAL FOR BOTH HIGH- AND LOW-RISK NEUROBLASTOMA PATIENTS**

We first investigated the association of *GALNT9* expression with survival in the group of high-risk patients ( $n = 58$ ). Kaplan–Meier curves showed a significant association of *GALNT9* expression with overall survival ( $P = 0.0391$ ) but not with disease-free survival ( $P = 0.4178$ ) (Fig. 3B).

**Table 1.** Characteristic of patients and tissues.

	Patients/tissues, n (%)
No. of tissues	122
Stage	
1, 2, 3, 4S	66 (54)
4	56 (46)
Age at diagnosis	
<18 months	56 (46)
≥18 months	66 (54)
MYCN status	
Not amplified	96 (79)
Amplified	26 (21)
No. of patients	122
Present status	
Alive	80 (66)
Death from disease	42 (34)
Disease-free status	
Disease free	68 (56)
Disease	54 (44)

**Table 2.** Analysis of the relationship between various clinical characteristics, survival, and *GALNT9* expression with the 2-sided Fisher exact test ( $n = 122$ ).

Characteristics	Cases	<i>GALNT9</i> (+)	<i>GALNT9</i> (–)	<i>P</i>
Stage				
1, 2, 3, 4S	66	47	19	0.0596
4	56	30	26	
MYCN status				
Not amplified	96	66	30	0.0209
Amplified	26	11	15	
Age at diagnosis				
<18 months	56	42	14	0.0147
≥18 months	66	35	31	



**Table 3. Univariate and multivariable Cox regression analysis of survival in all neuroblastoma patients (n = 122).**

	Univariate analysis		Multivariable analysis	
	Hazard ratio (95% CI)	P	Hazard ratio (95% CI)	P
<b>Overall survival</b>				
Age at diagnosis				
<18 months	1.0 (reference)	<0.0001	1.0 (reference)	0.0100
>18 months	5.757 (2.550–12.998)		3.061 (1.307–7.168)	
Stage				
1, 2, 3, 4S	1.0 (reference)	<0.0001	1.0 (reference)	0.0005
4	8.683 (3.822–19.723)		4.565 (1.939–10.751)	
MYCN status				
Not amplified	1.0 (reference)	<0.0001	1.0 (reference)	0.0013
Amplified	3.867 (2.080–7.190)		2.912 (1.521–5.576)	
GALNT9 expression				
(+)	1.0 (reference)	<0.0001	1.0 (reference)	0.0290
(–)	3.857 (2.064–7.208)		2.066 (1.078–3.963)	
<b>Disease-free survival</b>				
Age at diagnosis				
<18 months	1.0 (reference)	<0.0001	1.0 (reference)	0.0035
≥18 months	4.577 (2.351–8.911)		2.901 (1.418–5.933)	
Stage				
1, 2, 3, 4s	1.0 (reference)	<0.0001	1.0 (reference)	0.0027
4	5.011 (2.691–9.333)		2.777 (1.424–5.415)	
MYCN status				
Nonamplified	1.0 (reference)	<0.0001	1.0 (reference)	0.0010
Amplified	3.314 (1.886–5.823)		2.692 (1.489–4.869)	
GALNT9 expression				
(+)	1.0 (reference)	0.001	1.0 (reference)	0.1986
(–)	2.548 (1.190–4.357)		1.446 (0.824–2.538)	

Finally, we investigated the prognostic value of *GALNT9* expression in low-risk patients (n = 64). Kaplan–Meier survival curves revealed that the clinical outcome (overall and disease-free survival) of patients with *GALNT9* expression was strongly correlated with better survival than patients with no *GALNT9* expression ( $P = 0.0001$ , and  $P = 0.0007$ , respectively) (Fig. 3C).

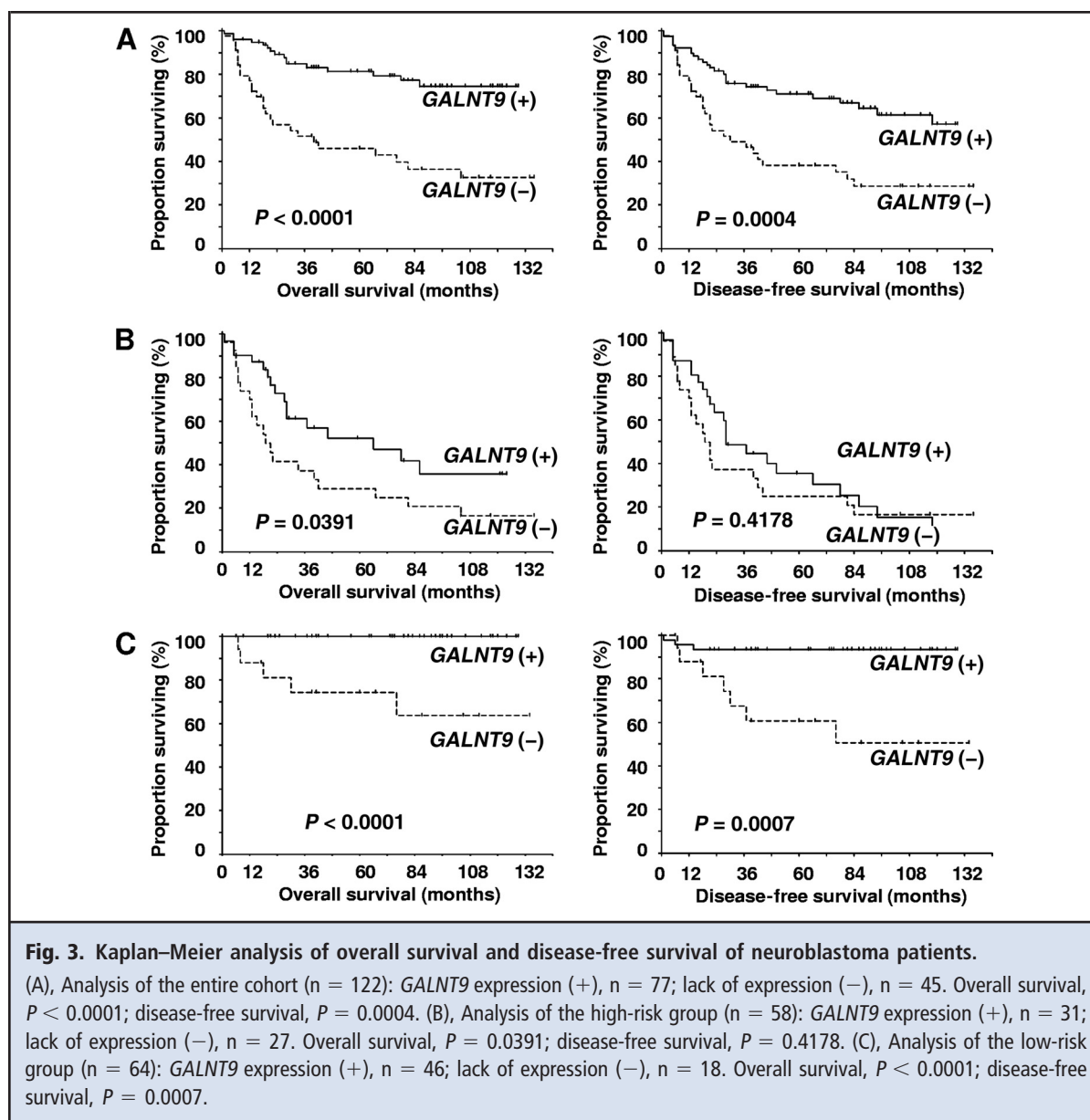
## Discussion

Altered glycosylation is a universal feature of cancer cells, and some glycan structures are well-known markers of tumor progression. Several studies have linked specific ganglioside changes in human neuroblastoma tumors to differences in biological behavior and clinical outcome (26, 27). We previously reported that *GALNT13* is highly expressed (12 times higher) in met-

astatic neuroblasts than in primary tumors (19). The present study has shown that *GALNT9* is expressed in PTX cells but not in BM cells in the IGR-N-91 model. This gene is also expressed in less aggressive S-type neuroblasts (SK-N-AS cell line), but not in N-type neuroblasts (SH-SY5Y, IMR-32, LAN-1, and LAN-5 cell lines). These findings could be of particular importance, because S-type cells have been reported to exhibit weaker invasiveness and metastatic properties, a lower growth capability in vivo (28), and a higher spontaneous apoptosis rate, compared with N-type cells (29).

*GALNT9* expression was initially thought to be exclusive to the brain, with mRNA concentrations being more abundant in the cerebellum than in the cerebral cortex, frontal lobe, temporal lobe, and putamen (21). *GALNT9*, *GALNT8*, *GALNT18*, and *GALNT19* constitute a subfamily that differs markedly in sequence from





the other members of the *GALNT* family (30). Interestingly, the GALNAC-T8, -T9, and -T18 enzymes do not have catalytic activity toward classic peptide substrates, which are derived from mucin 1 (MUC1) variant MUC1/A, MUC5AC, and mono-GalNac/Thr7th-EA2 (a glycopeptide containing 1 GalNac in the threonine at the 7th position, named EA2) (31), suggesting that the GALNAC-T members of this subfamily may glycosylate very specific substrates. Functional analysis has shown that GALNAC-T9 is able to glycosylate a synthetic peptide (SDC284) derived from syndecan-3 (expressed in neuronal cells), but it possesses no activity for the transfer of GalNac to 3 other

peptides (SDC106, SDC155, and SDC165) derived from syndecan-3 (18). These results indicate that GALNT9 displays a very restricted specificity for this acceptor substrate, in contrast to that observed for GALNAC-T13. These functional differences between GALNAC-T9 and GALNAC-T13, and the fact that the genes encoding these 2 enzymes display an opposing expression pattern, lead to the hypothesis that they could be of biological relevance in neuroblastoma behavior.

Our analysis of 122 neuroblastoma primary tumors revealed an association between *GALNT9* gene expression and survival. For the high-risk patients,





*GALNT9* expression was correlated with overall survival but not with disease-free survival. In contrast, the survival analysis of the low-risk neuroblastoma subgroups clearly highlighted the prognostic value of *GALNT9* expression for both overall and disease-free survival of patients. In other words, patients with tumors having *GALNT9* expression displayed higher survival rates than patients with no expression. More specifically, within the low-risk neuroblastoma subgroup, a relapse can be predicted for tumors that lack *GALNT9* expression, whereas a positive outcome can be predicted for tumors with *GALNT9* expression. Therefore, assessment of *GALNT9* gene expression in these patients could provide an additional method of biological classification of tumors. Expression of the *GALNT9* gene therefore appears to have predictive value beyond that for risk stratification based on age, disease stage, and *MYCN* amplification, and its expression in particular may constitute a marker of relapse for neuroblastomas classified as low risk. Very recently, nonrandom chromosomal abnormalities (numerical and segmental changes) have been shown to improve the standard risk stratification (32, 33). In this regard, studies of *GALNT9* gene expression with independent tumor cohorts are necessary to refine the forthcoming risk-stratification algorithm (age, stage, *MYCN* gene status, and genomic changes).

The low expression of the genes encoding some GALNAC-T isoenzymes has been associated with more aggressive tumors. GALNAC-T6 is reportedly produced in fibroblasts, placenta, and normal pancreas cells. The absence of this enzyme in pancreatic tumors was correlated with a poor clinical outcome (34). Similarly, a loss of GALNAC-T3 was correlated with a higher metastatic potential in a mouse colon cancer model (35), and strong GALNAC-T3 protein production, as demonstrated in human colorectal carcinomas with immunochemistry staining, significantly enhanced the likelihood of patient survival (36). One possible explanation for neuroblastoma is that

*GALNT9* expression is a marker for more-mature stages of neuroblastic tumor cells, which are associated with less aggressive tumor cells. In neuroblastoma, S-type cells are more susceptible to apolipoprotein 2 ligand/tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (Apo2L/TRAIL)-mediated apoptosis than N-type cells, owing to their expression of caspase-8 (29). O-glycosylation pathways have been found to play a role in the regulation of cell growth by modifying the rate of apoptosis of cancer cells (37, 38).

In conclusion, our data support the use of *GALNT9* as a prognostic marker that is independent of the conventional risk stratification, and it may be a valuable marker that may be helpful in guiding specific therapy in low-risk patients.

**Author Contributions:** All authors confirmed they have contributed to the intellectual content of this paper and have met the following 3 requirements: (a) significant contributions to the conception and design, acquisition of data, or analysis and interpretation of data; (b) drafting or revising the article for intellectual content; and (c) final approval of the published article.

**Authors' Disclosures or Potential Conflicts of Interest:** Upon manuscript submission, all authors completed the author disclosure form. Disclosures and/or potential conflicts of interest:

**Employment or Leadership:** None declared.

**Consultant or Advisory Role:** None declared.

**Stock Ownership:** None declared.

**Honoraria:** None declared.

**Research Funding:** Comisión Honoraria de Lucha Contra el Cáncer, Montevideo, Uruguay, Programa Grupos de Investigación CSIC, Montevideo, Uruguay, and Société Française des Cancers de l'Enfant, La Ligue contre le Cancer Comité Oise.

**Expert Testimony:** None declared.

**Patents:** None declared.

**Role of Sponsor:** The funding organizations played no role in the design of study, choice of enrolled patients, review and interpretation of data, or preparation or approval of manuscript.

**Acknowledgments:** We thank French surgeons and oncologists for providing material and clinical reports, and Sabrina Cantais for technical assistance.

## References

- Kim S, Chung D. Pediatric solid malignancies. Neuroblastoma and Wilms' tumor. *Surg Clin North Am* 2006;86:469–87.
- Maris JM, Hogarty MD, Bagatell R, Cohn SL. Neuroblastoma. *Lancet* 2007;369:2106–20.
- Reis CA, Osorio H, Silva L, Gomes C, David L. Alterations in glycosylation as biomarkers for cancer detection. *J Clin Pathol* 2010;63:322–9.
- Brockhausen I. Mucin-type O-glycans in human colon and breast cancer: glycodynamics and functions. *EMBO Rep* 2006;7:599–604.
- Hanisch F. O-glycosylation of the mucin type. *Biol Chem* 2001;382:143–9.
- Ten Hagen KG, Fritz TA, Tabak LA. All in the family: the UDP-GalNAc:polypeptide *N*-acetylgalactosaminyltransferases. *Glycobiology* 2003;13:1R–16R.
- Bennett EP, Mandel U, Clausen H, Gerken TA, Fritz TA, Tabak LA. Control of mucin-type O-glycosylation: a classification of the polypeptide GalNAc-transferase gene family. *Glycobiology* 2012;22:736–56.
- Pratt M, Hang H, Ten Hagen K, Rarick J, Gerken TA, Tabak LA, Bertozzi CR. Deconvoluting the functions of polypeptide *N*- $\alpha$ -acetylgalactosaminyltransferase family members by glycopeptide substrate profiling. *Chem Biol* 2004;11:1009–16.
- Mandel U, Hassan H, Therikildsen MH, Rygaard J, Jakobsen MH, Juhl BR, et al. Expression of polypeptide GalNAc-transferases in stratified epithelia and squamous cell carcinomas: immunohistological evaluation using monoclonal antibodies to three members of the GalNAc-transferase family. *Glycobiology* 1999;9:43–52.
- Nomoto M, Izumi H, Ise T, Kato K, Takano H, Nagatani G, et al. Structural basis for the regulation of UDP-*N*-acetyl- $\alpha$ -D-galactosamine: polypeptide *N*-acetylgalactosaminyl transferase-3 gene expression in adenocarcinoma cells. *Cancer Res* 1999;59:6214–22.
- Rajpert-De Meyts E, Poll S, Goukasian I, Jeanneau C, Herlihy AS, Bennett EP, et al. Changes in the profile of simple mucin-type O-glycans and polypeptide GalNAc-transferases in human testis and



- testicular neoplasms are associated with germ cell maturation and tumour differentiation. *Virchows Arch* 2007;451:805–14.
12. Taniuchi K, Cerny RL, Tanouchi A, Kohno K, Kotani N, Honke K, et al. Overexpression of GalNAc-transferase GalNAc-T3 promotes pancreatic cancer cell growth. *Oncogene* 2011;30:4843–54.
  13. Guda K, Moinova H, He J, Jamison O, Ravi L, Natale L, et al. Inactivating germ-line and somatic mutations in polypeptide *N*-acetyl-galactosaminyltransferase 12 in human colon cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106:12921–5.
  14. Shibao K, Izumi H, Nakayama Y, Ohta R, Nagata N, Nomoto M, et al. Expression of UDP-*N*-acetyl- $\alpha$ -D-galactosamine-polypeptide galNAc *N*-acetyl-galactosaminyl transferase-3 in relation to differentiation and prognosis in patients with colorectal carcinoma. *Cancer* 2001;94:1939–46.
  15. Miyahara N, Shoda J, Kawamoto T, Furukawa M, Ueda T, Todoroki T, et al. Expression of UDP-*N*-acetyl- $\alpha$ -D-galactosamine-polypeptide *N*-acetyl-galactosaminyltransferase isozyme 3 in the subserosal layer correlates with postsurgical survival of pathological tumor stage 2 carcinoma of the gallbladder. *Clin Cancer Res* 2004;10:2090–9.
  16. Freire T, Berois N, Sónora C, Varangot M, Barrios E, Osinaga E. UDP-*N*-acetyl-D-galactosamine: polypeptide *N*-acetyl-galactosaminyltransferase 6 (ppGalNAc-T6) mRNA as a potential new marker for detection of bone marrow-disseminated breast cancer cells. *Int J Cancer* 2006;119:1383–8.
  17. Berois N, Mazal D, Ubillos L, Trajtenberg F, Nicolas A, Sastre-Garau X, et al. UDP-*N*-acetyl-D-galactosamine: polypeptide *N*-acetyl-galactosaminyltransferase-6 as a new immunohistochemical breast cancer marker. *J Histochem Cytochem* 2006;54:317–28.
  18. Zhang Y, Iwasaki H, Wang H, Kudo T, Kalka TB, Hennet T, et al. Cloning and characterization of a new human UDP-*N*-acetyl- $\alpha$ -D-galactosamine: polypeptide *N*-acetyl-galactosaminyltransferase, designated pp-GalNAc-T13, that is specifically expressed in neurons and synthesizes GalNAc  $\alpha$ -serine/threonine antigen. *J Biol Chem* 2003;278:573–84.
  19. Berois N, Blanc E, Ripoché H, Mergui X, Trajtenberg F, Cantais S, et al. ppGalNAc-T13: a new molecular marker of bone marrow involvement in neuroblastoma. *Clin Chem* 2006;52:1701–12.
  20. Ferrandis E, Da Silva J, Riou G, Bénard J. Coactivation of the MDR1 and MYCN genes in human neuroblastoma during the metastatic process in the nude mouse. *Cancer Res* 1994;54:2256–61.
  21. Toba S, Tenno M, Konishi M, Mikami T, Itoh N, Kurosaka A. Brain-specific expression of a novel human UDP-GalNAc:polypeptide *N*-acetyl-galactosaminyltransferase (GalNAc-T9). *Biochim Biophys Acta* 2000;1493:264–8.
  22. Brodeur GM. Neuroblastoma: biological insights into a clinical enigma. *Nat Rev Cancer* 2003;3:203–6.
  23. Ambros IM, Benard J, Boavida M, Bown N, Caron H, Combaret V, et al. Quality assessment of genetic markers used for therapy stratification. *J Clin Oncol* 2003;21:2077–84.
  24. Benard J, Raguenez G, Kauffmann A, Valent A, Ripoché H, Joulin V, et al. MYCN-non-amplified metastatic neuroblastoma with good prognosis and spontaneous regression: a molecular portrait of stage 4S. *Mol Oncol* 2008;2:261–71.
  25. Thiele C. Neuroblastoma cell lines. In: Masters J, ed. *Human cell culture*. Lancaster, UK: Kluwer Academic Publishers; 1989. p 21–53.
  26. Hettmer S, Malott C, Woods W, Ladisch S, Kaucic K. Biological stratification of human neuroblastoma by complex “B” pathway ganglioside expression. *Cancer Res* 2003;63:7270–6.
  27. Ara T, DeClerck YA. Mechanisms of invasion and metastasis in human neuroblastoma. *Cancer Metastasis Rev* 2006;25:645–57.
  28. Piacentini M, Piredda L, Starace DT, Annicchiarico-Petruzzelli M, Mattei M, Oliverio S, et al. Differential growth of N- and S-type human neuroblastoma cells xenografted into SCID mice. Correlation with apoptosis. *J Pathol* 1996;180:415–22.
  29. Hopkins-Donaldson S, Bodmer JL, Bourlout KB, Brognara CB, Tschopp J, Gross N. Loss of caspase-8 expression in highly malignant human neuroblastoma cells correlates with resistance to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand-induced apoptosis. *Cancer Res* 2000;60:4315–9.
  30. Raman J, Guan Y, Perrine CL, Gerken TA, Tabak LA. UDP-*N*-acetyl- $\alpha$ -D-galactosamine:polypeptide *N*-acetyl-galactosaminyltransferases: completion of the family tree. *Glycobiology* 2012;22:768–77.
  31. Li X, Wang J, Li W, Xu Y, Shao D, Xie Y, et al. Characterization of ppGalNAc-T18, a member of the vertebrate-specific Y subfamily of UDP-*N*-acetyl- $\alpha$ -D-galactosamine: polypeptide *N*-acetyl-galactosaminyltransferases. *Glycobiology* 2012;22:602–15.
  32. Janoueix-Lerosey I, Schliepacher G, Michels E, Mosseri V, Ribeiro A, Lequin D, et al. Overall genomic pattern is a predictor of outcome in neuroblastoma. *J Clin Oncol* 2009;27:1026–33.
  33. Schliepacher G, Janoueix-Lerosey I, Ribeiro A, Klijanienko J, Couturier J, Pierron G, et al. Accumulation of segmental alterations determines progression in neuroblastoma. *J Clin Oncol* 2010;28:3122–30.
  34. Li Z, Yamada S, Inenaga S, Imamura T, Wu Y, Wang KY, et al. Polypeptide *N*-acetyl-galactosaminyltransferase 6 expression in pancreatic cancer is an independent prognostic factor indicating better overall survival. *Br J Cancer* 2011;104:1882–9.
  35. Kato K, Takeuchi H, Kanoh A, Miyahara N, Nemoto-Sasaki Y, Morimoto-Tomita M, et al. Loss of UDP-GalNAc:polypeptide *N*-acetyl-galactosaminyltransferase 3 and reduced O-glycosylation in colon carcinoma cells selected for hepatic metastasis. *Glycoconj J* 2010;27:267–76.
  36. Shibao K, Izumi H, Nakayama Y, Ohta R, Nagata N, Nomoto M, et al. Expression of UDP-*N*-acetyl- $\alpha$ -D-galactosamine-polypeptide galNAc *N*-acetyl-galactosaminyl transferase-3 in relation to differentiation and prognosis in patients with colorectal carcinoma. *Cancer* 2002;94:1939–46.
  37. Valenzuela HF, Pace KE, Cabrera PV, White R, Porvari K, Kaija H, et al. O-glycosylation regulates LNCaP prostate cancer cell susceptibility to apoptosis induced by galectin-1. *Cancer Res* 2007;67:6155–62.
  38. Patsos G, Hebbe-Viton V, Robbe-Masselot C, Masselot D, San Martin R, Greenwood R, et al. O-glycan inhibitors generate aryl-glycans, induce apoptosis and lead to growth inhibition in colorectal cancer cell lines. *Glycobiology* 2009;19:382–98.



RESEARCH

Open Access

# Consistent high concentration of the viral microRNA BART17 in plasma samples from nasopharyngeal carcinoma patients - evidence of non-exosomal transport

Claire Gourzones<sup>1</sup>, François-Régis Ferrand<sup>1,2</sup>, Corinne Amiel<sup>3</sup>, Benjamin Vérillaud<sup>1,4</sup>, Ana Barat<sup>1</sup>, Maryse Guérin<sup>5</sup>, Charles-Henry Gattolliat<sup>1</sup>, Aurore Gelin<sup>1</sup>, Jihène Klibi<sup>1</sup>, Arij Ben Chaaben<sup>6</sup>, Véronique Schneider<sup>3</sup>, Fethi Guemira<sup>6</sup>, Joël Guigay<sup>7</sup>, Philippe Lang<sup>8</sup>, Anne-Sophie Jimenez-Pailhes<sup>1</sup> and Pierre Busson<sup>1\*</sup>

## Abstract

**Background:** Because latent Epstein Barr (EBV)-infection is a specific characteristic of malignant nasopharyngeal carcinoma (NPC), various molecules of viral origin are obvious candidate biomarkers in this disease. In a previous study, we could show in a few clinical samples that it was possible to detect a category of EBV microRNAs called miR-BARTs in the plasma of at least a fraction of NPC patients. The first aim of the present study was to investigate the status of circulating miR-BART17-5p (one of the miR-BARTs hereafter called miR-BART17) and EBV DNA in a larger series of NPC plasma samples. The second aim was to determine whether or not circulating miR-BART17 was carried by plasma exosomes.

**Patients and methods:** Plasma samples were collected from 26 NPC patients and 10 control donors, including 9 patients with non-NPC Head and Neck squamous cell carcinoma and one healthy EBV carrier. Concentrations of miR-BART17 and two cellular microRNAs (hsa-miR-16 and -146a) were assessed by real-time quantitative PCR with spike-in normalization and absolute quantification. In addition, for 2 patients, exosome distributions of miR-BART17 and miR-16 were investigated following plasma lipoprotein fractionation by isopycnic density gradient ultracentrifugation.

**Results:** The miR-BART17 was significantly more abundant in plasma samples from NPC patients compared to non-NPC donors. Above a threshold of 506 copies/mL, detection of miR-BART17 was highly specific for NPC patients (ROC curve analysis: AUC=0.87 with true positive rate = 0.77, false positive rate = 0.10). In this relatively small series, the concentration of plasma miR-BART17 and the plasma EBV DNA load were not correlated. When plasma samples were fractionated, miR-BART17 co-purified with a protein-rich fraction but not with exosomes.

**Conclusions:** Detection of high concentrations of plasma miR-BART17 is consistent in NPC patients. This parameter is, at least in part, independent of the viral DNA load. Circulating miR-BART17 does not co-purify with exosomes.

**Keywords:** Biomarker, DNA load, Epstein-Barr virus, Exosomes, Head and Neck carcinomas, Lipoproteins, miR-BART, microRNA, Nasopharyngeal carcinoma, Plasma

\* Correspondence: [pierre.busson@igr.fr](mailto:pierre.busson@igr.fr)

<sup>1</sup>Université Paris-Sud 11, CNRS-UMR 8126 and Institut de Cancérologie Gustave Roussy, 39 rue Camille Desmoulins, Villejuif 94805, France  
Full list of author information is available at the end of the article



## Background

Nasopharyngeal carcinoma (NPC) is a tumor arising from the epithelium lining the upper part of the pharynx behind the nasal cavities. Its incidence is very high in some highly populated regions of the world, especially Southeast Asia and North Africa [1]. This disease is responsible for the death of 50 000 people each year and hundred others suffer from the consequences of radiotherapy and chemotherapy. Therefore, in these countries, NPC is a major public health problem. In addition, NPC has become relatively frequent in some places of Europe and North America due to large numbers of over-sea immigrants from endemic regions. Major issues to optimize the treatment of this disease are first, to lessen the rate of advanced disease at diagnosis by improving screening tools and policies, secondly, to personalize the treatment and follow up by identifying prognostic or predictive biomarkers.

One remarkable particularity of this disease is its constant association with the Epstein-Barr virus. EBV is one etiological factor of NPC which acts in combination with some forms of genetic susceptibility and/or environmental aggressions. The EBV genome is present in the nuclei of all malignant cells which are in their overwhelming majority latently infected. Despite the absence of viral replication, several viral genes are active in latently infected cells, driving production of a few viral proteins and non coding RNAs, including viral microRNAs. In EBV-infected cells, depending on the host cell background, EBV microRNAs can be transcribed from 3 clusters of viral genes, one located in the BamH1-H region (the BHRF1 cluster) and two located in the BamH1-A region (the BART clusters). In most NPC tumors, the BART clusters are transcribed at a very high level whereas the BHRF1 cluster is silent [2-5].

In a previous report, we have shown that BART miRNAs are secreted by NPC cells *in vitro* and are selectively detected in plasma samples from mice xenografted with NPC tumors but not in plasma samples from mice xenografted with non-NPC, EBV-negative tumors [6]. We have also reported the detection of miR-BART7 in a small series of plasma samples from NPC patients. These data suggested that circulating BART microRNAs could become a novel source of viral biomarkers for NPC population screening and patient monitoring. However, in this small set of patients, the average concentration of miR-BART7 was only moderately increased in the plasma of NPC patients by comparison with non-NPC controls, either healthy EBV-carriers or patients affected by non-NPC tumors. More recently, Wong et al. have confirmed the consistent detection of BART microRNAs in serum samples from NPC patients suggesting a higher specificity of detection for a sub-group of miR-BARTs including miR-BART17-5p (hereafter called miR-BART17) [7].

Therefore, we started this novel study with two aims: 1) to substantiate the notion that miR-BART17 is detectable with high specificity in plasma samples from NPC patients of various geographic origins and 2) to better characterize the vesicular or non-vesicular carriers of miR-BART17 in human plasma. We report that miR-BART17 is detected at a significantly higher concentration in the plasma of NPC patients by comparison with non-NPC donors and that its concentration is apparently not correlated to the EBV DNA load. In addition, we provide substantial evidence that circulating miR-BART17 molecules are associated with a protein-rich fraction of the plasma but not with circulating exosomes.

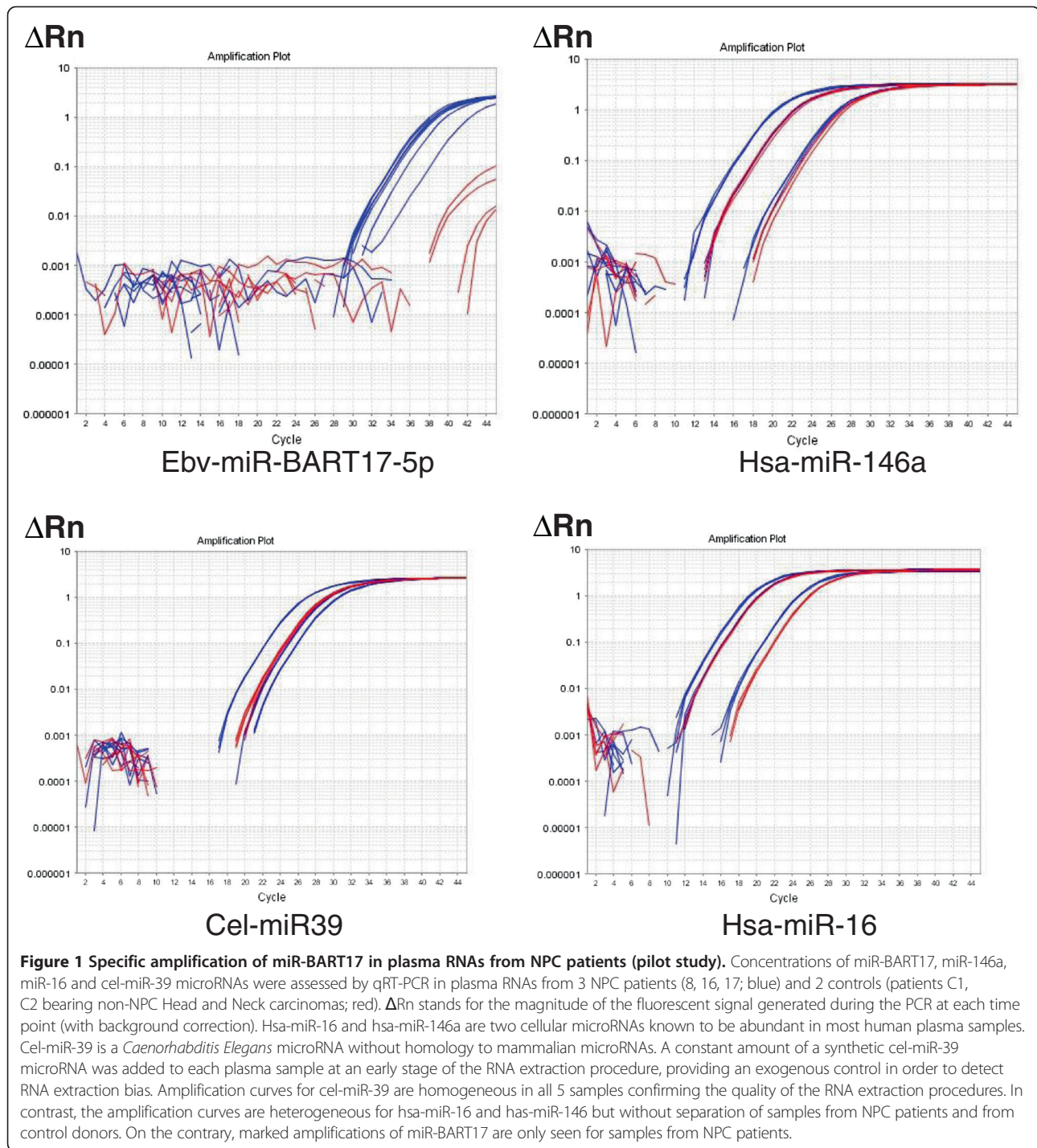
## Results

### High concentrations of miR-BART17 in plasma samples from NPC patients

We first evaluated by RT-qPCR *ebv*-miR-BART17-5p (miR-BART17) and two cellular microRNAs - *hsa*-miR-146a and *hsa*-miR-16 - in a pilot series of plasma samples from 3 NPC patients and 2 control donors bearing non-NPC tumors (Figure 1). A synthetic microRNA from *Caenorhabditis Elegans*, *cel*-miR-39, was used as an exogenous control (it has no homology with mammalian microRNAs). The same amount of *cel*-miR-39 was "spiked-in" in all plasma samples at an early stage of RNA extraction in order to monitor RNA extraction bias. *Hsa*-miR-146a and *hsa*-miR-16 were used as endogenous references. They are known to be abundant in plasma samples from most human subjects although with wide inter-individual variations [8]. As shown in Figure 1, *cel*-miR-39 amplifications were homogeneous in all five plasma samples, reflecting the good quality of RNA extraction. As expected, amplifications of miR-146a and miR-16 were heterogeneous but without specific distribution for the samples from NPC patients or control donors. In contrast, significant amplifications of miR-BART17 were only seen for NPC patients. Therefore, we decided to extend this series to 27 consecutive NPC patients and 10 control donors (9 donors bearing non-NPC tumors and 1 healthy EBV-carrier). NPC patients were of various ethnical origins with a majority from North Africa. They presented either with localized (from stage II to stage IV b; UICC 2009) or metastatic disease at first occurrence or following a tumor relapse (Table 1). Some NPC patients had treatment prior to plasma sample collection but all of them had active disease at the time of blood drawing. Average CT values of the endogenous viral and cellular microRNAs (miR-BART17, miR-16 and miR-146) were normalized according to the CT values obtained for the exogenous control microRNA (miR-*cel*-39) in order to avoid RNA extraction bias (one NPC patient was thus excluded from the beginning because of an unexplained and repeated RNA extraction







failure). Finally, absolute copy numbers of the endogenous microRNAs were deduced from calibration curves made with the corresponding synthetic purified microRNAs. Plasma concentrations of miR-BART17 are presented in Tables 1 (NPC patients) and 2 (control patients) along with patients characteristics. Concentrations of other circulating microRNAs are presented in Additional file 1: Table S1. It is noteworthy that the range of circulating

microRNA concentrations (copy number/mL) was lower by several orders of magnitude for miR-BART17 compared to the cellular microRNAs. In summary, concentrations were in a range of  $1 \times 10^1$  to  $6 \times 10^5$  for miR-BART17 in contrast to a range of  $5 \times 10^5$  to  $3 \times 10^9$  for miR-16 and miR-146 (Additional file 1: Table S1). The median concentration of plasma miR-BART17 was about 100 times higher for NPC patients (3220 copies/ml) than for



**Table 1 Clinico-pathological characteristics, viral DNA load and plasma concentration of miR-BART17 normalized with miR-cel-39 for samples from NPC patients**

Patient	Gender/age	Origin	First occurrence (FO) or Relapse(R)	TNM	Histology	EBV DNA copy number/ml	miR BART17 copy number/ml
1	M/59	France	FO	cT4N2M0	NKUC	1559	26
2	M/43	Morocco	R	rT0N0M1	NKUC	7065	148
3	M/55	Cambodia	FO	cT3N0M0	NKUC	28	1226
4	M/40	Algeria	FO	cT4N1M0	NKUC	325	8014
5	M/61	Algeria	FO	cT2N2M0	NKUC	466	279
6	M/47	China	FO	cT2N0M0	NKUC	0	4501
7	F/34	Sweden	FO	cT2N3aM1	NKUC	67	11087
8	F/47	Tunisia	FO	cT2N1M0	NKDC	0	739
9	M/40	North Africa	FO	cT1N3bM0	NKUC	40	8824
10	M/51	North Africa	FO	cT3N2M1	NKUC	1142	242506
11	M/41	Turkey	R	rTXN1M0	KSCC	79	128426
12	M/49	France	FO	cT3N1M0	NKUC	0	2725
13	M/65	France	R	rT2N3bM0	NKUC	0	448961
14	M/58	Tunisia	FO*	cT2N0M0	NKUC	351	589
15	M/41	Tunisia	FO*	cT3N2M0	NKUC	1475	4889
16	F/49	France	FO	cT2N2M0	NKUC	9	205985
17	F/39	Morocco	FO	cT4N1M0	NKUC	0	1080
18	M/62	Algeria	R*	rT4N0M0	NKUC	328	161
19	M/66	Algeria	R	rT0N2M0	NKUC	31	25788
20	M/47	Cameroon	R	rTXN2M1	NKUC	21	42
21	M/58	Cameroon	R*	cT2bN1M1	NKUC	8	3220
22	M/60	Morocco	R	rT1N2M0	NKUC	136	4401
23	M/59	Algeria	R	rT1NxM0	NKUC	0	2465
24	M/58	Algeria	FO*	cT1N3bM0	NKUC	20	11
25	F/40	France	R	rT0N0M1	NKUC	0	155002
26	M/61	Cameroon	R*	rT4N0M0	NKUC	0	19881

Samples were collected prior to any treatment (FO), without any treatment in the previous last 6 months (R) or from patients under chemotherapy or chemo-radiotherapy (FO\* and R\*). All patients had active disease at the time of blood sample collection. NKUC: non keratinizing undifferentiated carcinoma; NKDC: non-keratinizing differentiated carcinoma; KSCC: keratinizing squamous cell carcinoma.

non-NPC donors (30 copies/ml) ( $p < 0.0001$ ) (Tables 1 and 2) (Figure 2). For optimal separation of NPC patients from control donors, a threshold of 506 copy/mL of plasma was determined by a ROC curve analysis (AUC= 0.87) providing a true positive rate (sensitivity) of 0.77 and a false positive rate (1-specificity) of 0.10 (Figure 3 and Additional file 2: Figure S1).

#### Apparent lack of correlations between miR-BART17 concentrations and EBV-DNA loads in NPC plasma samples

We found no apparent relationships between the plasma concentrations of miR-BART17 and the plasma EBV DNA load (Figure 4). It is noteworthy that among 5 NPC patients with more than  $10^5$  copies of miR-BART17 per mL, four had less than 200 copies of EBV-DNA per mL. Our series

had obviously too much heterogeneity to allow tentative correlations between clinical parameters and miR-BART17 or EBV DNA copy numbers in plasma samples.

#### Changes in plasma concentrations of miR-BART17 according to tumor evolution in one patient

One patient presented in Table 1 (NPC patient n°5) initially classified as T2N2M0 experienced a dramatic tumor progression under therapy with rapidly growing nodal and distant metastases (Figure 5). We could obtain 3 sequential plasma samples from this patient. (1, 7 and 19 weeks following the time of the diagnosis). Real time PCR analyses were performed simultaneously on these 3 samples demonstrating an exponential increase of miR-BART17 plasma concentrations which accompanied the rapid expansion of



**Table 2 Clinico-pathological characteristics, viral DNA load and plasma concentration of miR-BART17 normalized with miR-cel-39 for samples from control donors**

Control donors	Gender/age	Origin	Primary tumor	TNM	Histology	EBV DNA copy number/ml plasma	miR BART17 copy number/ml plasma
C1	M/54	Tunisia	larynx	T3N0M0	SCC	0	12
C2	M/53	Tunisia	larynx	T2N0M0	SCC	0	14
C3	M/59	France	larynx	T3N0M0	SCC	0	783
C4	F/60	France	larynx	T2N0M0	SCC	0	277
C5	M/55	France	larynx	T3N0M0	SCC	0	27
C6	M/448	France	hypopharynx	T3N0M0	SCC	0	30
C7	M/47	France	larynx	T3N0M0	SCC	0	174
C8	M/56	France	no tumor	na	na	0	18
C9	F/226	France	maxillary sinus	T4N1M0	SCC	0	435
C10	M/52	France	hypopharynx	T3N2M0	SCC	0	54

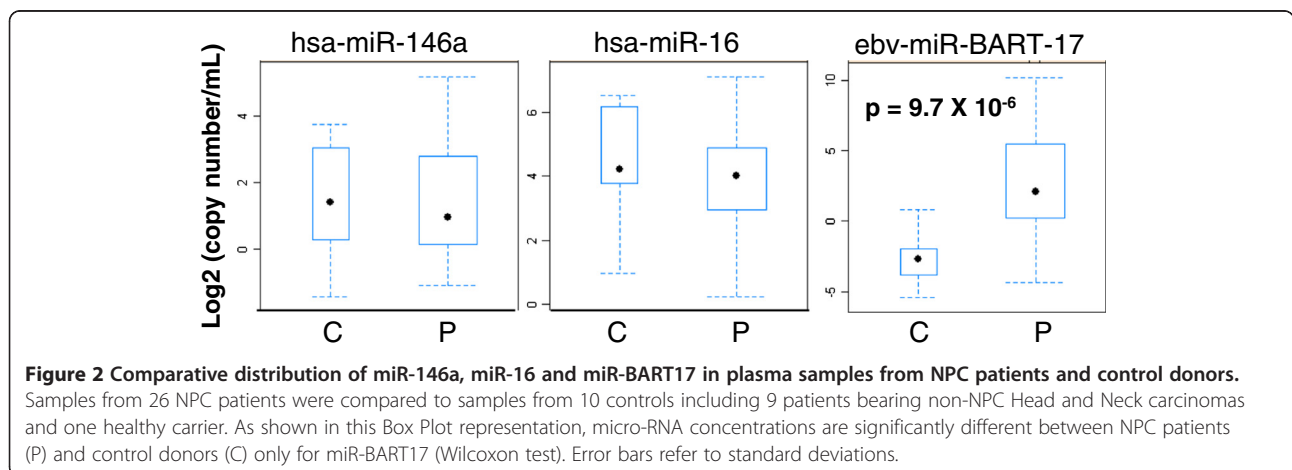
SCC: squamous cell carcinoma. C8 was a healthy donor. All other plasma samples except C10 were collected prior to treatment from patients bearing Head and Neck non-NPC carcinomas. The sample from patient C10 was collected under therapy.

tumor lesions. There was a concomitant increase in the EBV DNA load from 2 555 to 466 396 copies/mL from week 7 to 19.

**Distribution of miR-BART17 and hsa-miR-16 among plasma lipoproteins separated by isopycnic density gradient ultracentrifugation**

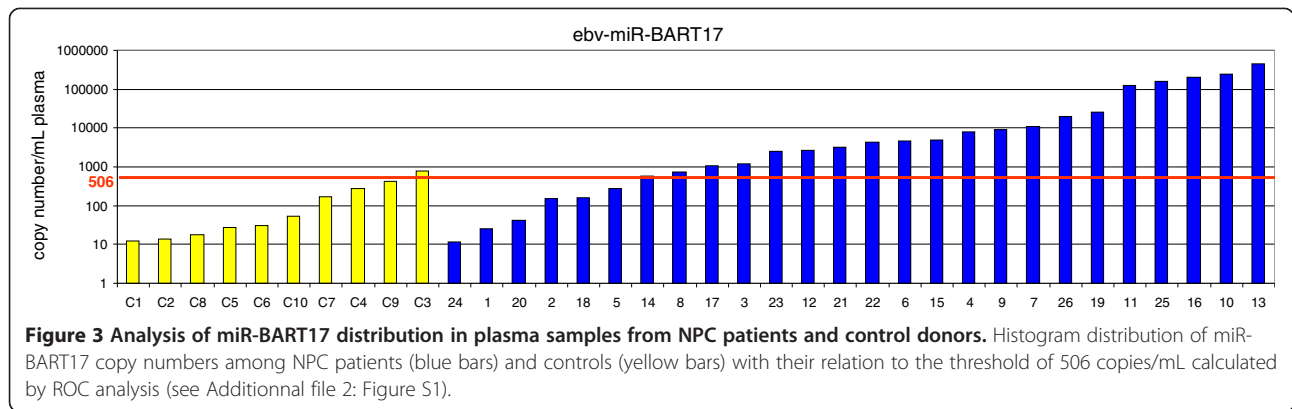
As shown in the Additional file 1: Table S1, concentrations of plasma miR-BART17 are very low by comparison with the circulating cellular microRNAs, miR-16 and miR-146a. In order to increase the sensitivity and specificity of miR-BART17 detection, we attempted to identify specific carrier elements of this microRNA in human plasma samples. According to previous reports, plasma microRNAs can be associated with at least 4 types of plasma carriers: microvesicles, exosomes, high density lipoproteins (HDL) and non-vesicular ribonucleoprotein complexes often containing the argonaute 2 protein [8-11]. Therefore, to get clues about the

relationships between BART microRNAs and these various types of potential plasma carriers, we chose an open experimental approach allowing simultaneous assessment of these various carriers, i.e. flotation of plasma elements on a KBr gradient. This method is commonly used for separation of plasma lipoproteins and is also appropriate for exosome separation [9,10]. Plasma samples from 2 NPC patients were fractionated on KBr gradients. RNAs were purified from several fractions evenly distributed through the gradient (11 to 12 out of 29). Then miR-16 and miR-BART17 were quantified by qRT-PCR. Simultaneously, the fractions corresponding to the various types of lipoproteins were identified by assessment of cholesterol concentration in each fraction. Surprisingly, the cellular and the viral microRNAs did not co-purify with the same fractions (Figure 6). The miR-16 was recovered in two peaks; one small peak centered on fraction 17 and one bigger peak centered on fraction 22 (NPC patient n°19) or 23 (NPC patient n°5). In contrast, miR-BART17 was



**Figure 2 Comparative distribution of miR-146a, miR-16 and miR-BART17 in plasma samples from NPC patients and control donors.** Samples from 26 NPC patients were compared to samples from 10 controls including 9 patients bearing non-NPC Head and Neck carcinomas and one healthy carrier. As shown in this Box Plot representation, micro-RNA concentrations are significantly different between NPC patients (P) and control donors (C) only for miR-BART17 (Wilcoxon test). Error bars refer to standard deviations.





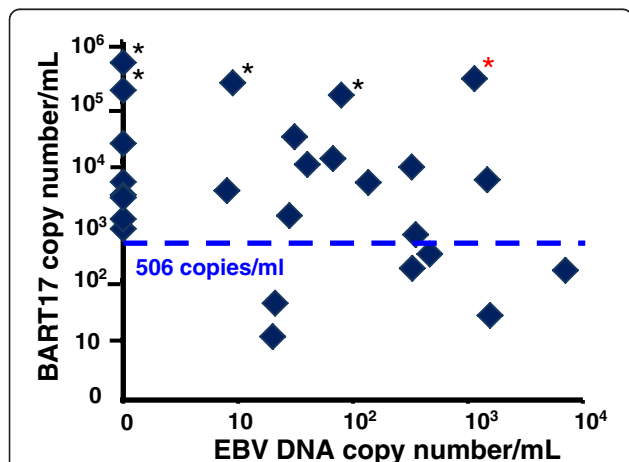
detectable almost exclusively in the fractions 28 and 29, where most proteins were recovered, with the exception of a very small amount detected in fraction 23 for one donor (NPC patient n°5). Exosomes are known to have a density of 1.15 g/mL to 1.19 g/mL and are expected to float deeper than the HDL peak (1.06 to 1.13 g/mL) [9]. To confirm the identity of the fractions containing the exosomes, several bottom fractions of the gradients were analyzed by Western blot for detection of CD63, a classical exosome marker. Consistent with the known density of exosomes most of the CD63 protein was detected in fractions 22 and/or 23, very close to the highest peak of miR-16, indicating that at least a fraction of miR-16 co-purified with exosomes in contrast to miR-BART17.

### Discussion

Investigations of circulating microRNAs in malignant diseases is currently a very active field and a large amount of data have already been published about this subject [8,11-13]. One remarkable characteristic of circulating microRNAs is their stability. To a large extent, it results from their association with various types of carriers. Some of these carriers are vesicular with a relatively large size; the two main categories are microvesicles (100 nm to 1 µm in diameter) and exosomes (30 to 100 nm). There are also non-vesicular carriers of smaller size like the HDL lipoproteins and non-lipid ribonucleoprotein complexes which, to a large extent, remain to be characterized [10,11,14,15].

NPC appears as a privileged model for investigations of circulating tumor microRNAs for two reasons: 1) malignant cells are latently infected by EBV in virtually all NPCs; 2) NPC cells have intense production of microRNAs from the BART cluster in the absence of production from the BHRF1 cluster [2,4,16]. It is not yet clear whether miR-BARTs can be produced in the healthy EBV-carrier or outside tumor tissues in NPC patients. According to *in vitro* models, latently infected B-cells are not expected to produce miR-BARTs but rather BHRF1 microRNAs [2,4,17]. It is known that the EBV lytic-replicative cycle is consistently taking place in the epithelial cells of the oral cavity (including tonsils and may be salivary glands) [18]. We do not know yet whether these lytically infected epithelial cells produce and release EBV miR-BARTs.

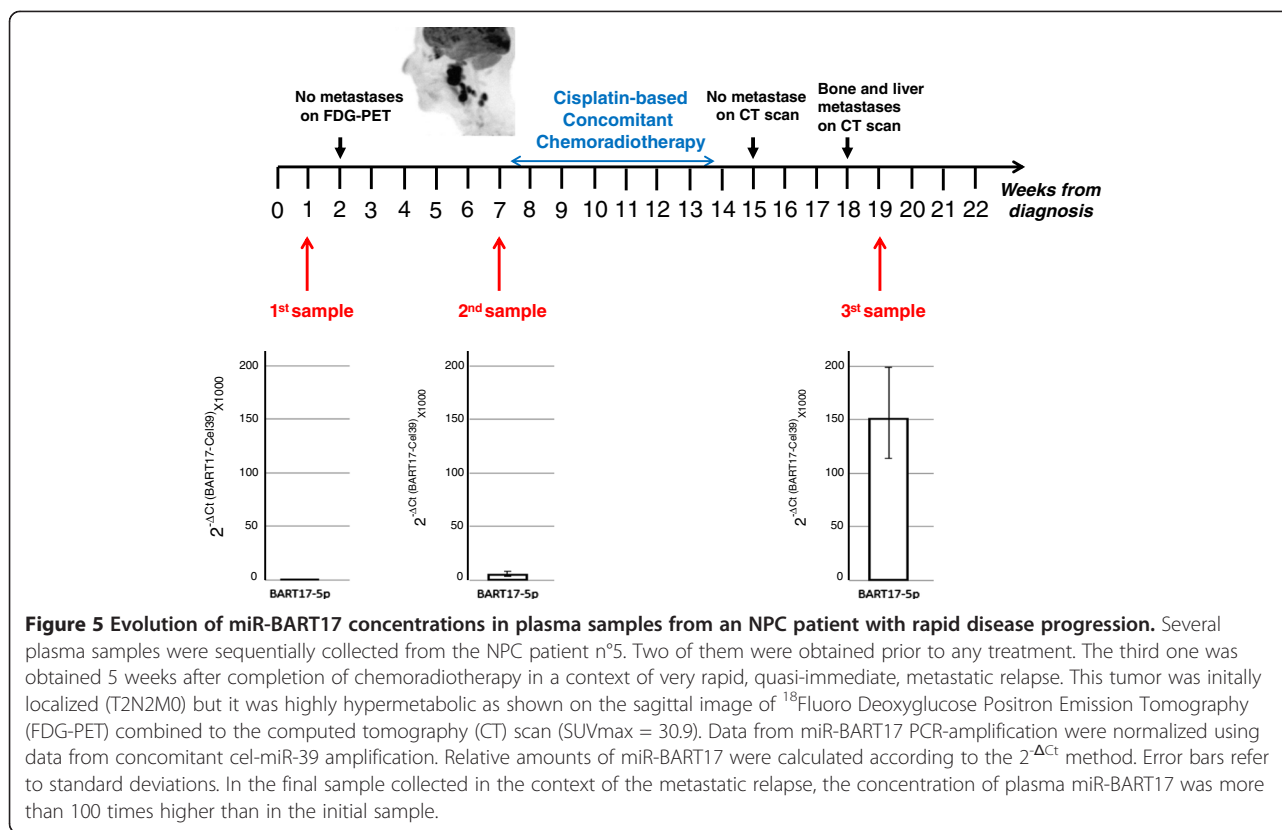
Our data were obtained from NPC plasma samples mainly collected from patients born in France and North Africa. They are consistent with the data reported by Wong *et al.* in a series of serum samples from 15 Chinese patients [7]. Presence of circulating miR-BART17 thus appears as a consistent feature of the disease, regardless of patient origins. Although there are discussions on whether use of serum or plasma samples is optimal for recovery of circulating microRNAs, our detection of miR-BART17 from plasma samples was apparently as efficient as the detection reported by Wong *et al.* who worked with serum



**Figure 4 Comparative distribution of plasmatic EBV DNA load and miR-BART17 copy numbers among NPC patients.** The numbers on the axes are for the EBV DNA (x axis) and miR-BART17 (y axis) copies per mL of plasma (logarithmic scales). The samples from each NPC patient appear as diamond-shaped dots. The horizontal dotted line represents the threshold of 506 copies per mL defined by ROC analysis (see the legend of Figure 3). Five patients (10, 11, 13, 16 and 25) have more than  $10^5$  copies of miR-BART17 per mL (dots with asterisks). Only one of them (patient 10) has an EBV DNA load with more than  $10^2$  copies/mL (one dot on the upper right of the graph marked with a red asterisk).







**Figure 5 Evolution of miR-BART17 concentrations in plasma samples from an NPC patient with rapid disease progression.** Several plasma samples were sequentially collected from the NPC patient n°5. Two of them were obtained prior to any treatment. The third one was obtained 5 weeks after completion of chemoradiotherapy in a context of very rapid, quasi-immediate, metastatic relapse. This tumor was initially localized (T2N2M0) but it was highly hypermetabolic as shown on the sagittal image of  $^{18}$ Fluoro Deoxyglucose Positron Emission Tomography (FDG-PET) combined to the computed tomography (CT) scan (SUVmax = 30.9). Data from miR-BART17 PCR-amplification were normalized using data from concomitant cel-miR-39 amplification. Relative amounts of miR-BART17 were calculated according to the  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method. Error bars refer to standard deviations. In the final sample collected in the context of the metastatic relapse, the concentration of plasma miR-BART17 was more than 100 times higher than in the initial sample.

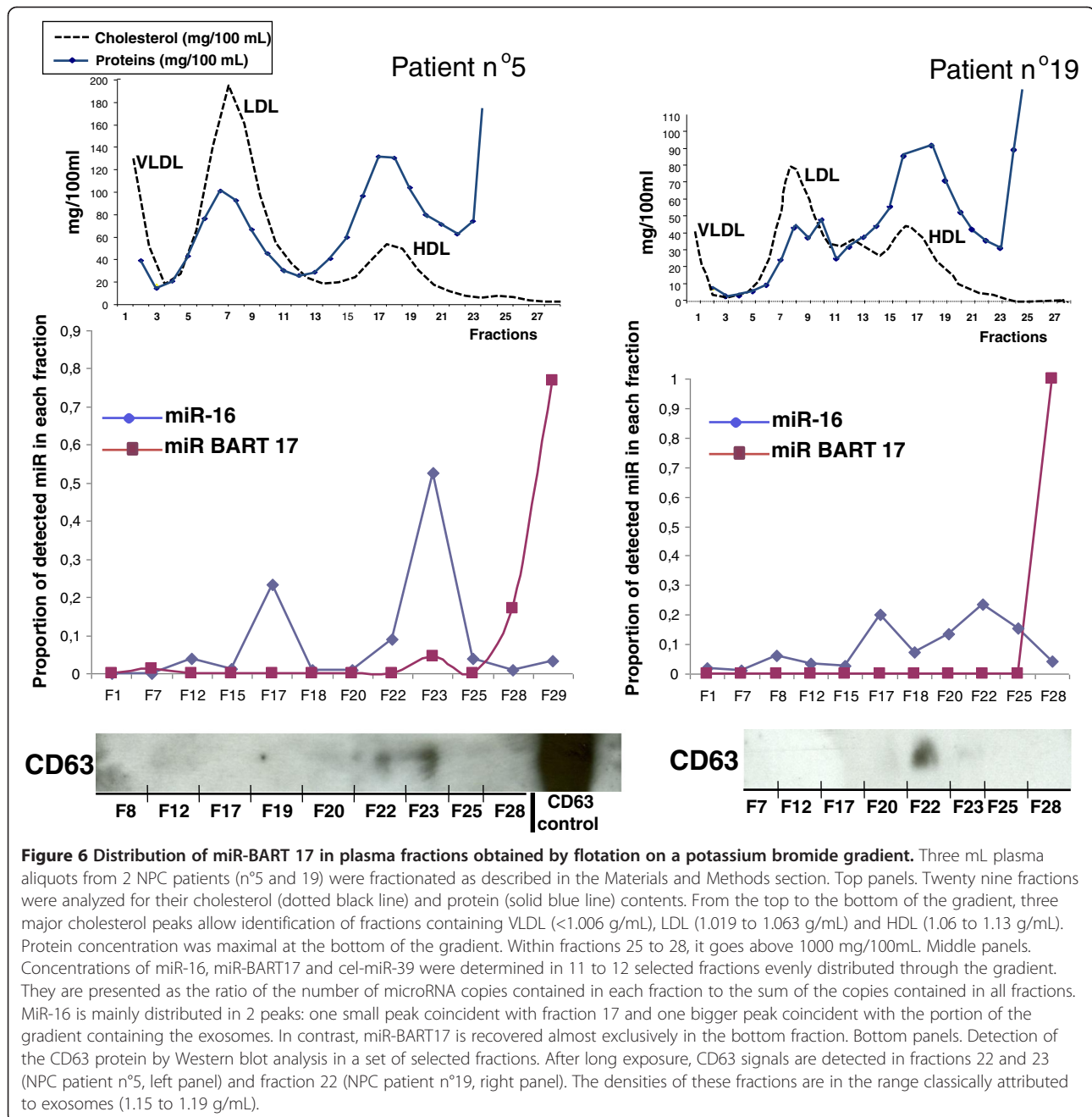
samples [7,19,20]. In contrast with Wong et al., we could detect small amounts of miR-BART17 in plasma samples from non-NPC donors. This might be due to the fact that we took in account samples with very small concentrations of microRNAs, namely those giving Ct values higher than 35, whereas they are automatically classified as negative by many investigators. The presence of miR-BART17 in plasma samples from a few control donors might reflect low-level production of miR-BARTs by non-malignant cells for example in the oral cavity. This should not undermine the main conclusion of our study: detection of the miR-BART17-5p above the threshold of 506 copies/mL appears as a marker of NPC plasma samples with good sensitivity (77%) and high specificity (90%).

To further improve the sensitivity and specificity of miR-BART detection in plasma samples, we attempted to characterize their carriers. On the basis of previous results, we were assuming that there were carried by NPC tumor exosomes [6]. However, fractionation of plasma elements on a KBr gradient showed that the cellular micro-RNA, miR-16, partially co-purified with exosomes whereas miR-BART17 was recovered in a completely distinct fraction. Although it has only been observed for our two samples subjected to gradient fractionation, this observation may be relevant to the design of future studies. On the one hand, the lack of co-purification of miR-BART17 with exosomes is surprising

since we and others have shown that the BART microRNAs are abundant in exosomes released by EBV-infected cells *in vitro* [6,21]. On the other hand, it appears to be consistent with a recent report about liver microRNAs [22]. This report shows that, depending on physiological or pathological conditions, the same microRNAs co-purify either with an exosome-rich or a protein-rich fraction of the plasma. Therefore we should consider the hypothesis that the miR-BARTs are secreted in association with exosomes by NPC cells *in vitro* but not in the tumor context *in vivo*. The concentration of miR-BART17 at the bottom of the KBr gradient suggests that it is associated with non-floating elements, probably ribonucleoprotein complexes of small size and/or devoid of lipids which remained to be characterized. Other groups have reported incorporation of plasma microRNAs in non-vesicular complexes containing the Ago2 (ago2) protein [14]. In future investigations, it will be interesting to know whether plasma ribonucleoprotein complexes containing miR-BART17 can be immunoprecipitated with anti-ago2 antibodies.

Our series of NPC patients was obviously too heterogeneous to attempt correlations between the concentration of plasma miR-BART17 and clinical parameters. However, we were able to collect sequential plasma samples for one patient (Patient n°5) who had a rapidly progressive disease. We observed a dramatic increase in the





concentration of miR-BART17 which was parallel to tumor progression. This suggests that the plasma concentration of miR-BART17 is related, at least in part, to the tumor mass. That point will require further investigations. In this small series, we have found no obvious correlations between the concentrations of plasma miR-BART17 and the plasma EBV DNA loads. One can speculate that both miR-BART and EBV DNA plasma copy numbers are affected by multiple factors: the total tumor burden, the apoptotic index of the malignant cells, their rate of necrosis, the vascularization of tumor

lesions and the rate of degradation of microRNAs and DNA by peripheral nucleases. However, the relative impact of each of these factors is probably different for the miR-BARTs and for the EBV-DNA. This could explain why their plasma concentrations might evolve independently at various stages of the disease. On the other hand, if the concentrations of miR-BARTs and EBV DNA are at least partially independent, they have more chances to provide non-redundant information for assessment of the tumor status and/or prediction of the tumor evolution. In order to substantiate this hypothesis, we currently



investigate: 1) the relationships between the abundance of circulating miR-BARTs and the total tumor mass in a series of non-metastatic NPC patients; 2) the longitudinal evolution of circulating miR-BARTs in connection with the tumor response to the initial treatment. While this study was near completion, Chan *et al.* have reported a consistent detection of miR-BART7 in the plasma of NPC patients [23]. Both studies converge on two important points: 1) EBV BART microRNAs are detectable in the plasma of some non-NPC donors but at a low level in contrast with most NPC patients; 2) the concentration of circulating miR-BARTs seems to be relatively independent of the plasma viral DNA load.

## Conclusions

This study confirms the consistent and specific presence of a circulating miR-BART in plasma samples from NPC patients. We provide evidence that the concentration of plasma miR-BART17 is, at least in part, independent of the plasma viral DNA load. In addition, we show that this microRNA is not bound to plasma exosomes but probably associated to non-vesicular ribonucleoprotein complexes. These observations will provide a basis to address questions about the relationship of plasma miR-BARTs with NPC volumetric characteristics and about their possible role in the prediction of tumor response under treatment.

## Materials and methods

### Collection, separation and storage of human plasma samples

This study was performed with the approval of the Tarnier-Cochin Ethics Committee (project n° 2746 approved on January 27, 2010). Blood samples from 36 donors were collected after signature of written informed consent, from June 2010 to October 2011. Twenty six of these samples were collected from NPC patients admitted to the Institut de Cancérologie Gustave Roussy or Paris hospitals working in collaboration with this Institute (Table 1). All these patients had evidence of active disease, either as a first occurrence or as a recurrence. Blood samples were generally collected before initiation of the treatment (Table 1). Control samples were obtained from 9 consecutive patients admitted to the Department of Head and Neck Oncology at the Institut de Cancérologie Gustave Roussy for non-NPC tumors. All these tumors were squamous cell carcinomas of the upper aero-digestive track. More clinical details are provided in Table 2. One additional control plasma sample was obtained from a healthy EBV-carrier donor. For all donors, plasma was separated from blood collected in EDTA tubes by centrifugation at 1700 g at 20°C for 15 min, aliquoted and frozen at - 80°C. In virtually all cases, plasma separation and freezing was done in less than 2 hours following blood collection.

### Clinical staging and pathological diagnosis

Tumor staging was performed according to UICC 7<sup>th</sup> edition (Union for International Cancer control) guidelines [24]. Histological classification was performed according to the 2005 WHO classification [25]. Except for 4 patients, the histological diagnosis was confirmed by detection of EBV products on tissue sections, either the LMP1 protein detected by immunohistochemistry (3 cases) or the EBERs (Epstein-Barr encoded RNAs) detected by *in situ* hybridization using commercial kits, mainly from Ventana Medical System (Illkirch, France) [26].

### Isolation and chemical analysis of plasma lipoprotein fractions

Plasma lipoproteins were isolated from 2 selected fasting plasma samples (2 to 3 mL) by density gradient ultracentrifugation in a Beckman SW41 Ti rotor at 40 000 rpm for 42 hours in a Beckman XL70 at 15°C as previously described [9]. Plasma density was increased to  $d=1.21$  g/mL by addition of dry, solid KBr. A discontinuous density gradient was constructed as follows: 2 mL of NaCl-KBr solution of  $d=1.24$  g/mL; 3 mL of plasma adjusted to a background density of  $d=1.21$  g/mL; 2 mL of  $d=1.063$  g/mL; 2.5 mL of  $d=1.019$  g/mL; and finally, 2.5 mL of NaCl solution of  $d=1.006$  g/mL. After centrifugation, gradients were collected from the top of the tubes with an Eppendorf precision pipette in 30 fractions corresponding to VLDL (density <1.006 g/mL, fraction number 1), IDL (density from 1.006 g/mL to 1.019 g/mL, fraction number 2), 10 LDL subfractions (density from 1.019 g/mL to 1.063 g/mL, fraction number 3 to 12) and 11 HDL subfractions (density from 1.063 g/mL to 1.179 g/mL, fraction number 13 to 23). Lipoprotein fraction number 13 to 18 corresponded to HDL2 fraction (density from 1.063 to 1.110 g/mL), lipoprotein fraction number 19 to 23 corresponded to HDL3 fraction (density from 1.110 to 1.133 g/mL), and gradient fraction numbers 24 to 30 mostly contain proteins. All fractions were dialyzed in Spectropor membrane tubing against Phosphate Buffer Saline at pH7.4 before analysis for their content in total cholesterol using kit reagents from Roche Diagnostics and in total protein using the bicinchoninic acid assay from Pierce.

### RNA purification from plasma samples and use of "spike-in" controls

Total RNA was purified using the miRVana PARIS kit (Ambion, Austin, TX) according to the manufacturer instructions for total RNA purification from biological fluids. At the beginning of the procedure, 300 µl of plasma were mixed with 300 µl of 2X denaturing buffer and then incubated for 10 minutes on ice. Just before the next step which consisted in acid phenol/chloroform extraction, we added to each sample a synthetic microRNA identical to



the *C.Elegans* cel-miR-39 (7 fmol) (Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Germany).

#### **RNA purification from fractions obtained after plasma fractionation on KBr gradients**

One hundred  $\mu$ l of each fraction (11 to 12 fractions out of 29) were diluted in 200  $\mu$ l of PBS 1X and then mixed with 300  $\mu$ l of 2X denaturing buffer. Total RNA was then purified as described for crude plasma RNA.

#### **CD63 detection by Western Blot after plasma fractionation on KBr gradients**

Four  $\mu$ g of protein were loaded on pre-casted, gradient Acryl/BisAcryl 4-20% SDS gels purchased from Pierce (Thermo Scientific, Brebières, France). Protein migration and separation were performed in non-reducing conditions to allow CD63 detection. CD63 was detected with a mouse monoclonal antibody (TS63) kindly provided by Eric Rubinstein [27].

#### **Determination of the EBV DNA load in plasma samples**

Total DNA was extracted from 200  $\mu$ l plasma aliquots using the QIAmp blood DNA Minikit (Qiagen Inc., Courtaboeuf, France). Viral load was then determined by real-time quantitative PCR using a commercial kit from Argene (EBV R-gene™; France). The copy number of EBV DNA per milliliter of plasma was determined using a calibration curve based on serial dilutions of a standard provided in the kit. To rule out DNA extraction bias, albumin DNA copies were quantified in parallel in the same extracts as previously described [28].

#### **MicroRNA amplification, detection and quantification by quantitative RT-PCR**

Real time RT-PCR analysis of the microRNAs was performed using the Taqman MicroRNA Reverse Transcription Kit and the Taqman MicroRNA Assay (Applied Biosystems, Foster City, CA). For reverse transcription, 5.84  $\mu$ l of a mix containing 3  $\mu$ l of the RT primer solution (final concentration: 50 nM), 0.15  $\mu$ l dNTP (1 mM), 1  $\mu$ l Multiscribe Reverse Transcriptase (3.33 U/ $\mu$ l), 1.50  $\mu$ l of 10X Buffer and 0.19  $\mu$ l RNase inhibitor (0.25 U/ $\mu$ l) were added to 9.16  $\mu$ l of plasma RNA (final volume: 15  $\mu$ l). The mix was then incubated successively at 16°C for 30 minutes, 42°C for 30 min and 85°C for 5 min. After reverse transcription, PCR amplification was performed in 20  $\mu$ l containing 4  $\mu$ l of the final Reverse Transcription reaction mix mixed with 10  $\mu$ l of FastStart Universal Probe Master mix (Roche diagnostics, Basel, Switzerland), 1  $\mu$ l of the primer mix including - for a given microRNA - the universal reverse primer (0.7  $\mu$ M), the specific primer (1.5  $\mu$ M) and the hydrolysis probe (0.2  $\mu$ M) (Taqman microRNA assay, Applied Biosystems) and 5  $\mu$ l of

nuclease free water (Ambion, Austin, TX). The first cycle included one step of 2 min at 50°C and one step of 10 minutes at 95°C. It was followed by 45 cycles including one step of 15 sec at 95°C and one step of 60 sec at 60°C. Multiple negative water blanks were included in every analysis. Amplification was performed in a StepOnePlus Detection System (Applied Biosystems).

Absolute quantification of microRNAs was done by comparison with 10-fold serial dilutions of synthetic double-strand oligonucleotides containing the same sequences (Eurofins MWG Operon, Ebersberg, Germany for ebv-miR-BART17-5p and cel-miR-39 and miRvana miRNA reference Panel v9.1, Ambion for hsa-miR-16a and hsa-miR-146a). The concentration of the first dilution was 0.2 fmol/ $\mu$ l. The following sets of primers and probes were purchased from Applied Biosystems (TaqMan MicroRNA assays): ebv-miR-BART17-5p (assay ID 008216), hsa-miR-16 (000391), hsa-miR-146a (000468) and cel-miR-39 (000200). Calculation of the average "Concentration threshold" (Ct) values from the triplicate was normalized to cel-miR-39 according to the method described by Kroh et al. [29].

#### **Statistical analysis**

Subjects were divided into a "condition" present group, including all patients with NPC and a "condition" absent group which included control subjects. Wilcoxon test was used to compare differences in plasma microRNA ratios between the NPC group and the control group. P-value < 0.05 was considered significant. Receiver-operating-characteristic (ROC) curves and the area under the ROC curve (AUC) were used to assess the feasibility of using plasma miRNAs as diagnostic tools for detecting NPC. The ROC curve, together with a good tradeoff between the true positive rate and the false positive rate was used to determine the cutoff value for the concentrations of plasma microRNAs. A centered and scaled Principal Component Analysis (PCA) was performed to assess variability and the correlations in the multivariate dataset containing clinicopathological characteristics of patients, plasma miRNAs (miR-146, miR-16, miR-BART17) and the viral load. All analyses were performed using the R software for statistical analysis (R version 2.14.1).

#### **Additional files**

**Additional file 1: Table S1.** EBV DNA and miR-copy numbers from plasma samples of NPC patients and controls. (1) UICC staging is specified only for patients with a first occurrence of NPC. (2) MicroRNA and DNA concentrations are expressed in copy number/mL.

**Additional file 2: Figure S1.** Receiver-operating characteristic (ROC) curve analysis for miR-BART 17 copy numbers in plasma samples from 26 NPC patients (see Table 1) compared to 10 controls (see Table 2). From the ROC curve, the AUC (area under the curve) was calculated allowing determination of a cut-off value at 506 copies per mL with a sensitivity of 77% and a specificity of 90%.





## Abbreviations

AUC: Area under curve; EBERS: Epstein-Barr encoded RNAs; EBV: Epstein Barr virus; HDL: High density lipoprotein; LDL: Low density lipoprotein; LMP1: Latent membrane protein1; NPC: Nasopharyngeal carcinoma; ROC: Receiver-operating-characteristic; UICC: Union for International Cancer control; VLDL: Very low density lipoprotein; WHO: World Health Organization.

## Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

## Authors' contributions

CG and FRF made RNA and c-DNA preparations and PCR analyses. They were involved in the design of the study and preparation of the manuscript. FRF, JG, BV, PL, FG, JK and ABC participated in sample collection and their clinical annotation as well as separation and storage of several plasma samples. ASJ and AG participated in the separation and storage of the plasma samples and in RNA extraction. CHG shared his expertise for handling qPCR on microRNAs. CA and VS have assayed the viral DNA load in plasma samples. MG has done plasma fractionations on KBr gradients. AB participated in the statistical analysis. PB participated in the design of the study and its coordination and drafted the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

## Acknowledgements

This study was supported by grants from the Gustave Roussy Foundation (Head and Neck tumors – 2011), the Institut National du Cancer (INCa-DHOS translational grant) and the Ligue Nationale contre le Cancer (comité du Val de Marne). CG was supported by the Association pour la Recherche sur le Cancer. Thanks are also due to the Commission Scientifique des Essais Thérapeutiques and the Centre de Ressources Biologiques of the Institut de Cancérologie Gustave Roussy for their help in the collection of clinical samples.

## Author details

<sup>1</sup>Université Paris-Sud 11, CNRS-UMR 8126 and Institut de Cancérologie Gustave Roussy, 39 rue Camille Desmoulins, Villejuif 94805, France. <sup>2</sup>Ecole du Val de Grâce, 1 place Alphonse Laveran, Paris 75005, France. <sup>3</sup>Virology Department, Hôpital Tenon, 4 rue de la Chine, Paris 75020, France. <sup>4</sup>Head and Neck Department, Hôpital Lariboisière, 2 rue Ambroise Paré, Paris 75010, France. <sup>5</sup>INSERM UMRS 939 - Université Pierre et Marie Curie - Paris6, Hôpital de la Pitié, 83 boulevard de l'Hôpital, Paris 75013, France. <sup>6</sup>Clinical Biology Department, Institut Salah Azaiz, Tunis, Tunisia. <sup>7</sup>Head and Neck Tumors Department, Institut de Cancérologie Gustave Roussy, 39 rue Camille Desmoulins, Villejuif 94805, France. <sup>8</sup>Radiotherapy Department, Hôpital Pitié-Salpêtrière, 47 Boulevard de l'hôpital, Paris 75013, France.

Received: 29 November 2012 Accepted: 2 April 2013

Published: 16 April 2013

## References

1. Feng BJ: Descriptive, environmental and genetic epidemiology of nasopharyngeal carcinoma. In *Nasopharyngeal carcinoma: Keys for Translational Medicine and Biology*. Edited by Bussson P. Austin and New-York: Landes and Springer; 2012:23–41. [Back N, Cohen IR, Lajtha A, Lambris JD, Paoletti R (Series Editor): *Advances in Experimental Medicine and Biology*].
2. Cai X, Schafer A, Lu S, Bilello JP, Desrosiers RC, Edwards R, Raab-Traub N, Cullen BR: Epstein-Barr virus microRNAs are evolutionarily conserved and differentially expressed. *PLoS Pathog* 2006, **2**:e23.
3. Edwards RH, Marquitz AR, Raab-Traub N: Epstein-Barr virus BART microRNAs are produced from a large intron prior to splicing. *J Virol* 2008, **82**:9094–9106.
4. Cosmopoulos K, Pegtel M, Hawkins J, Moffett H, Novina C, Middeldorp J, Thorley-Lawson DA: Comprehensive profiling of Epstein-Barr virus microRNAs in nasopharyngeal carcinoma. *J Virol* 2009, **83**:2357–2367.
5. Zhu JY, Pfuhl T, Motsch N, Barth S, Nicholls J, Grasser F, Meister G: Identification of novel Epstein-Barr virus microRNA genes from nasopharyngeal carcinomas. *J Virol* 2009, **83**:3333–3341.
6. Gourzoules C, Gelin A, Bombik I, Klibi J, Verillaud B, Guigay J, Lang P, Temam S, Schneider V, Amiel C, *et al*: Extra-cellular release and blood diffusion of BART viral micro-RNAs produced by EBV-infected nasopharyngeal carcinoma cells. *Virology* 2010, **7**:271.
7. Wong AM, Kong KL, Tsang JW, Kwong DL, Guan XY: Profiling of Epstein-Barr virus-encoded microRNAs in nasopharyngeal carcinoma reveals potential biomarkers and oncomirs. *Cancer* 2012, **118**:698–710.
8. Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, Pogosova-Agadjanyan EL, Peterson A, Noteboom J, O'Briant KC, Allen A, *et al*: Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2008, **105**:10513–10518.
9. Lesnik P, Vonica A, Guerin M, Moreau M, Chapman MJ: Anticoagulant activity of tissue factor pathway inhibitor in human plasma is preferentially associated with dense subspecies of LDL and HDL and with Lp(a). *Arteriosclerosis and thrombosis: a journal of vascular biology/ American Heart Association* 1993, **13**:1066–1075.
10. Vickers KC, Palmisano BT, Shoucri BM, Shamburek RD, Remaley AT: MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins. *Nature cell biology* 2011, **13**:423–433.
11. Cortez MA, Bueso-Ramos C, Ferdin J, Lopez-Berestein G, Sood AK, Calin GA: MicroRNAs in body fluids—the mix of hormones and biomarkers. *Nature reviews Clinical oncology* 2011, **8**:467–477.
12. Healy NA, Heneghan HM, Miller N, Osborne CK, Schiff R, Kerin MJ: Systemic mirnas as potential biomarkers for malignancy. *International journal of cancer Journal international du cancer* 2012, **131**:2215–2222.
13. Cortez MA, Welsh JW, Calin GA: Circulating microRNAs as noninvasive biomarkers in breast cancer. *Recent results in cancer research Fortschritte der Krebsforschung Progres dans les recherches sur le cancer* 2012, **195**:151–161.
14. Arroyo JD, Chevillet JR, Kroh EM, Ruf IK, Pritchard CC, Gibson DF, Mitchell PS, Bennett CF, Pogosova-Agadjanyan EL, Stirewalt DL, *et al*: Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011, **108**:5003–5008.
15. Turchinovich A, Weiz L, Langheinz A, Burwinkel B: Characterization of extracellular circulating microRNA. *Nucleic Acids Res* 2011, **39**:7223–7233.
16. Gourzoules C, Busson P, Raab-Traub N: Epstein-Barr Virus and the Pathogenesis of Nasopharyngeal Carcinomas. In *Nasopharyngeal Carcinoma: Keys for Translational Medicine and Biology*. Edited by Busson P. Austin/New-York: Landes/Springer; 2012:42–60. [Back N, Cohen IR, Lajtha A, Lambris JD, Paoletti R (Series Editor): *Advances in Experimental Medicine and Biology*].
17. Pratt ZL, Kuzembayeva M, Sengupta S, Sugden B: The microRNAs of Epstein-Barr Virus are expressed at dramatically differing levels among cell lines. *Virology* 2009, **386**:387–397.
18. Hadinoto V, Shapiro M, Sun CC, Thorley-Lawson DA: The dynamics of EBV shedding implicate a central role for epithelial cells in amplifying viral output. *PLoS pathogens* 2009, **5**:e1000496.
19. Wang K, Yuan Y, Cho JH, McClarty S, Baxter D, Galas DJ: Comparing the MicroRNA spectrum between serum and plasma. *PLoS One* 2012, **7**:e41561.
20. Gourzoules C, Jimenez AS, Busson P: Profiling of Epstein-Barr virus-encoded microRNAs in nasopharyngeal carcinoma reveals potential biomarkers and oncomirs. *Cancer* 2012, **118**:4634. author reply 4634–4635.
21. Meekes DG Jr, Shair KH, Marquitz AR, Kung CP, Edwards RH, Raab-Traub N: Human tumor virus utilizes exosomes for intercellular communication. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010, **107**:20370–20375.
22. Bala S, Petrasek J, Mundkur S, Catalano D, Levin I, Ward J, Alao H, Kodys K, Szabo G: Circulating microRNAs in exosomes indicate hepatocyte injury and inflammation in alcoholic, drug-induced, and inflammatory liver diseases. *Hepatology* 2012, **56**:1946–57.
23. Chan JY, Gao W, Ho WK, Wei W, Wong TS: Overexpression of Epstein-Barr virus-encoded microRNA-BART7 in undifferentiated nasopharyngeal carcinoma. *Anticancer Res* 2012, **32**:3201–3210.
24. Chan AT, Felip E: Nasopharyngeal cancer: ESMO clinical recommendations for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* 2009, **20**(Suppl 4):123–125.
25. Nicholls J, Niedobitek G: Histopathological diagnosis of nasopharyngeal carcinoma - Looking beyond the blue book. In *Nasopharyngeal carcinoma: Keys for Translational Medicine and Biology*. Edited by Busson P. Austin/New-York: Landes/Springer; 2012:10–22 [Back N, Cohen IR, Lajtha A, Lambris JD, Paoletti R (Series Editor): *Advances in Experimental Medicine and Biology*].
26. Gourzoules C, Ferrand FR, Verillaud B, Busson P: Biological tools for NPC population screening and disease monitoring. In *Nasopharyngeal Carcinoma: Keys for Translational Medicine and Biology*. Edited by Busson P. Austin and New-York: Landes and Springer; 2012:101–117 [Back N, Cohen IR, Lajtha A, Lambris JD, Paoletti R (Series Editor): *Advances in Experimental Medicine and Biology*].



27. Charrin S, Le Naour F, Oualid M, Billard M, Faure G, Hanash SM, Boucheix C, Rubinstein E: **The major CD9 and CD81 molecular partner. Identification and characterization of the complexes.** *J Biol Chem* 2001, **276**:14329–14337.
28. Dehee A, Asselot C, Piolot T, Jacomet C, Rozenbaum W, Vidaud M, Garbarg-Chenon A, Nicolas JC: **Quantification of Epstein-Barr virus load in peripheral blood of human immunodeficiency virus-infected patients using real-time PCR.** *J Med Virol* 2001, **65**:543–552.
29. Kroh EM, Parkin RK, Mitchell PS, Tewari M: **Analysis of circulating microRNA biomarkers in plasma and serum using quantitative reverse transcription-PCR (qRT-PCR).** *Methods* 2010, **50**:298–301.

doi:10.1186/1743-422X-10-119

**Cite this article as:** Gourzones *et al.*: Consistent high concentration of the viral microRNA BART17 in plasma samples from nasopharyngeal carcinoma patients - evidence of non-exosomal transport. *Virology Journal* 2013 **10**:119.

**Submit your next manuscript to BioMed Central  
and take full advantage of:**

- Convenient online submission
- Thorough peer review
- No space constraints or color figure charges
- Immediate publication on acceptance
- Inclusion in PubMed, CAS, Scopus and Google Scholar
- Research which is freely available for redistribution

Submit your manuscript at  
[www.biomedcentral.com/submit](http://www.biomedcentral.com/submit)





## REFERENCES

- Adida C, Berrebi D, Peuchmaur M, Reyes-Mugica M, Altieri DC (1998) Anti-apoptosis gene, survivin, and prognosis of neuroblastoma. *Lancet* 351: 882-883
- Ahmad K (2003) Folic acid in food prevents neuroblastoma. *Lancet Oncol* 4: 649
- ALLFREY VG, FAULKNER R, MIRSKY AE (1964) ACETYLATION AND METHYLATION OF HISTONES AND THEIR POSSIBLE ROLE IN THE REGULATION OF RNA SYNTHESIS. *Proc Natl Acad Sci U S A* 51: 786-794
- Altura RA, Maris JM, Li H, Boyett JM, Brodeur GM, Look AT (1997) Novel regions of chromosomal loss in familial neuroblastoma by comparative genomic hybridization. *Genes Chromosomes Cancer* 19: 176-184
- Ambros IM, Benard J, Boavida M, Bown N, Caron H, Combaret V, Couturier J, Darnfors C, Delattre O, Freeman-Edward J, Gambini C, Gross N, Hattinger CM, Luegmayr A, Lunec J, Martinsson T, Mazzocco K, Navarro S, Noguera R, O'Neill S, Potschger U, Rumpler S, Speleman F, Tonini GP, Valent A, Van Roy N, Amann G, de Bernardi B, Kogner P, Ladenstein R, Michon J, Pearson AD, Ambros PF (2003) Quality assessment of genetic markers used for therapy stratification. *J Clin Oncol* 21: 2077-2084
- Ambros IM, Zellner A, Roald B, Amann G, Ladenstein R, Printz D, Gadner H, Ambros PF (1996) Role of ploidy, chromosome 1p, and Schwann cells in the maturation of neuroblastoma. *N Engl J Med* 334: 1505-1511
- Arima T, Drewell RA, Arney KL, Inoue J, Makita Y, Hata A, Oshimura M, Wake N, Surani MA (2001) A conserved imprinting control region at the HYMAI/ZAC domain is implicated in transient neonatal diabetes mellitus. *Hum Mol Genet* 10: 1475-1483
- Arima T, Drewell RA, Oshimura M, Wake N, Surani MA (2000) A novel imprinted gene, HYMAI, is located within an imprinted domain on human chromosome 6 containing ZAC. *Genomics* 67: 248-255
- Attiyeh EF, London WB, Mosse YP, Wang Q, Winter C, Khazi D, McGrady PW, Seeger RC, Look AT, Shimada H, Brodeur GM, Cohn SL, Matthay KK, Maris JM (2005) Chromosome 1p and 11q deletions and outcome in neuroblastoma. *N Engl J Med* 353: 2243-2253
- Bandres E, Cubedo E, Agirre X, Malumbres R, Zarate R, Ramirez N, Abajo A, Navarro A, Moreno I, Monzo M, Garcia-Foncillas J (2006) Identification by Real-time PCR of 13 mature microRNAs differentially expressed in colorectal cancer and non-tumoral tissues. *Mol Cancer* 5: 29
- Bar M, Wyman SK, Fritz BR, Qi J, Garg KS, Parkin RK, Kroh EM, Bendoraite A, Mitchell PS, Nelson AM, Ruzzo WL, Ware C, Radich JP, Gentleman R, Ruohola-Baker H, Tewari M (2008) MicroRNA discovery and profiling in human embryonic stem cells by deep sequencing of small RNA libraries. *Stem Cells* 26: 2496-2505
- Barad O, Meiri E, Avniel A, Aharonov R, Barzilai A, Bentwich I, Einav U, Gilad S, Hurban P, Karov Y, Lobenhofer EK, Sharon E, Shibolet Y, Shtutman M, Bentwich Z, Einat P (2004) MicroRNA expression detected by oligonucleotide microarrays: system establishment and expression profiling in human tissues. *Genome Res* 14: 2486-2494



- Bartel DP (2004) MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116: 281-297
- Baylin SB, Jones PA (2011) A decade of exploring the cancer epigenome - biological and translational implications. *Nat Rev Cancer* 11: 726-734
- Benard J, Raguenez G, Kauffmann A, Valent A, Ripoche H, Joulin V, Job B, Danglot G, Cantais S, Robert T, Terrier-Lacombe MJ, Chassevent A, Koscielny S, Fischer M, Berthold F, Lipinski M, Tursz T, Dessen P, Lazar V, Valteau-Couanet D (2008) MYCN-non-amplified metastatic neuroblastoma with good prognosis and spontaneous regression: a molecular portrait of stage 4S. *Mol Oncol* 2: 261-271
- Benetatos L, Hatzimichael E, Londin E, Vartholomatos G, Loher P, Rigoutsos I, Briasoulis E (2013) The microRNAs within the DLK1-DIO3 genomic region: involvement in disease pathogenesis. *Cell Mol Life Sci* 70: 795-814
- Benetatos L, Vartholomatos G, Hatzimichael E (2011) MEG3 imprinted gene contribution in tumorigenesis. *Int J Cancer* 129: 773-779
- Bentwich I, Avniel A, Karov Y, Aharonov R, Gilad S, Barad O, Barzilai A, Einat P, Einav U, Meiri E, Sharon E, Spector Y, Bentwich Z (2005) Identification of hundreds of conserved and nonconserved human microRNAs. *Nat Genet* 37: 766-770
- Berezikov E, Chung WJ, Willis J, Cuppen E, Lai EC (2007) Mammalian mirtron genes. *Mol Cell* 28: 328-336
- Berois N, Blanc E, Ripoche H, Mergui X, Trajtenberg F, Cantais S, Barrois M, Dessen P, Kagedal B, Benard J, Osinaga E, Raguenez G (2006) ppGalNAC-T13: a new molecular marker of bone marrow involvement in neuroblastoma. *Clin Chem* 52: 1701-1712
- Berois N, Gattolliat CH, Barrios E, Capandeguy L, Douc-Rasy S, Valteau-Couanet D, Benard J, Osinaga E (2013) GALNT9 gene expression is a prognostic marker in neuroblastoma patients. *Clin Chem* 59: 225-233
- Berthold F, Boos J, Burdach S, Erttmann R, Henze G, Hermann J, Klingebiel T, Kremens B, Schilling FH, Schrappe M, Simon T, Hero B (2005) Myeloablative megatherapy with autologous stem-cell rescue versus oral maintenance chemotherapy as consolidation treatment in patients with high-risk neuroblastoma: a randomised controlled trial. *Lancet Oncol* 6: 649-658
- Bettan-Renaud L, Bayle C, Teyssier JR, Benard J (1989) Stability of phenotypic and genotypic traits during the establishment of a human neuroblastoma cell line, IGR-N-835. *Int J Cancer* 44: 460-466
- Biedler JL, Helson L, Spengler BA (1973) Morphology and growth, tumorigenicity, and cytogenetics of human neuroblastoma cells in continuous culture. *Cancer Res* 33: 2643-2652
- Bockmeyer CL, Christgen M, Muller M, Fischer S, Ahrens P, Langer F, Kreipe H, Lehmann U (2011) MicroRNA profiles of healthy basal and luminal mammary epithelial cells are distinct and reflected in different breast cancer subtypes. *Breast Cancer Res Treat* 130: 735-745
- Bortolin-Cavaille ML, Dance M, Weber M, Cavaille J (2009) C19MC microRNAs are processed from introns of large Pol-II, non-protein-coding transcripts. *Nucleic Acids Res* 37: 3464-3473





Bourhis J, Dominici C, McDowell H, Raschella G, Wilson G, Castello MA, Plouvier E, Lemerle J, Riou G, Benard J, . (1991) N-myc genomic content and DNA ploidy in stage IVS neuroblastoma. *J Clin Oncol* 9: 1371-1375

Braconi C, Kogure T, Valeri N, Huang N, Nuovo G, Costinean S, Negrini M, Miotto E, Croce CM, Patel T (2011) microRNA-29 can regulate expression of the long non-coding RNA gene MEG3 in hepatocellular cancer. *Oncogene* 30: 4750-4756

Bray I, Bryan K, Prenter S, Buckley PG, Foley NH, Murphy DM, Alcock L, Mestdagh P, Vandesompele J, Speleman F, London WB, McGrady PW, Higgins DG, O'Meara A, O'Sullivan M, Stallings RL (2009) Widespread dysregulation of MiRNAs by MYCN amplification and chromosomal imbalances in neuroblastoma: association of miRNA expression with survival. *PLoS One* 4: e7850

Brockhausen I, Benn M, Bhat S, Marone S, Riley JG, Montoya-Peleaz P, Vlahakis JZ, Paulsen H, Schutzbach JS, Szarek WA (2006) UDP-Gal: GlcNAc-R beta1,4-galactosyltransferase--a target enzyme for drug design. Acceptor specificity and inhibition of the enzyme. *Glycoconj J* 23: 525-541

Brodeur GM (2003) Neuroblastoma: biological insights into a clinical enigma. *Nat Rev Cancer* 3: 203-216

Brodeur GM, Maris JM, Yamashiro DJ, Hogarty MD, White PS (1997) Biology and genetics of human neuroblastomas. *J Pediatr Hematol Oncol* 19: 93-101

Brodeur GM, Seeger RC, Schwab M, Varmus HE, Bishop JM (1984) Amplification of N-myc in untreated human neuroblastomas correlates with advanced disease stage. *Science* 224: 1121-1124

Bushati N, Cohen SM (2007) microRNA functions. *Annu Rev Cell Dev Biol* 23: 175-205

Bustin SA, Benes V, Garson JA, Hellemans J, Huggett J, Kubista M, Mueller R, Nolan T, Pfaffl MW, Shipley GL, Vandesompele J, Wittwer CT (2009) The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin Chem* 55: 611-622

Byrne K, Colgrave ML, Vuocolo T, Pearson R, Bidwell CA, Cockett NE, Lynn DJ, Fleming-Waddell JN, Tellam RL (2010) The imprinted retrotransposon-like gene PEG11 (RTL1) is expressed as a full-length protein in skeletal muscle from Callipyge sheep. *PLoS One* 5: e8638

Cai X, Cullen BR (2007) The imprinted H19 noncoding RNA is a primary microRNA precursor. *RNA* 13: 313-316

Calabrese JM, Seila AC, Yeo GW, Sharp PA (2007) RNA sequence analysis defines Dicer's role in mouse embryonic stem cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 18097-18102

Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, Hyslop T, Noch E, Yendamuri S, Shimizu M, Rattan S, Bullrich F, Negrini M, Croce CM (2004) Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 2999-3004

Cao H, Yang CS, Rana TM (2008) Evolutionary emergence of microRNAs in human embryonic stem cells. *PLoS One* 3: e2820

Caron H (1995) Allelic loss of chromosome 1 and additional chromosome 17 material are both unfavourable prognostic markers in neuroblastoma. *Med Pediatr Oncol* 24: 215-221



- Caron H, van Sluis P, Buschman R, Pereira do TR, Maes P, Beks L, De Kraker J, Voute PA, Vergnaud G, Westerveld A, Slater R, Versteeg R (1996) Allelic loss of the short arm of chromosome 4 in neuroblastoma suggests a novel tumour suppressor gene locus. *Hum Genet* 97: 834-837
- Carthew RW, Sontheimer EJ (2009) Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell* 136: 642-655
- Castilla MA, Moreno-Bueno G, Romero-Perez L, Van d, V, Biscuola M, Lopez-Garcia MA, Prat J, Matias-Guiu X, Cano A, Oliva E, Palacios J (2011) Micro-RNA signature of the epithelial-mesenchymal transition in endometrial carcinosarcoma. *J Pathol* 223: 72-80
- Cavaille J, Buiting K, Kieffmann M, Lalande M, Brannan CI, Horsthemke B, Bachellerie JP, Brosius J, Huttenhofer A (2000) Identification of brain-specific and imprinted small nucleolar RNA genes exhibiting an unusual genomic organization. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 14311-14316
- Cavaille J, Seitz H, Paulsen M, Ferguson-Smith AC, Bachellerie JP (2002) Identification of tandemly-repeated C/D snoRNA genes at the imprinted human 14q32 domain reminiscent of those at the Prader-Willi/Angelman syndrome region. *Hum Mol Genet* 11: 1527-1538
- Cavaille J, Vitali P, Basyuk E, Huttenhofer A, Bachellerie JP (2001) A novel brain-specific box C/D small nucleolar RNA processed from tandemly repeated introns of a noncoding RNA gene in rats. *J Biol Chem* 276: 26374-26383
- Chaudhuri S, Messing J (1994) Allele-specific parental imprinting of *dizr1*, a posttranscriptional regulator of zein accumulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 4867-4871
- Cheloufi S, Dos Santos CO, Chong MM, Hannon GJ (2010) A dicer-independent miRNA biogenesis pathway that requires Ago catalysis. *Nature* 465: 584-589
- Chen Y, Stallings RL (2007) Differential patterns of microRNA expression in neuroblastoma are correlated with prognosis, differentiation, and apoptosis. *Cancer Res* 67: 976-983
- Chen Y, Takita J, Choi YL, Kato M, Ohira M, Sanada M, Wang L, Soda M, Kikuchi A, Igarashi T, Nakagawara A, Hayashi Y, Mano H, Ogawa S (2008) Oncogenic mutations of ALK kinase in neuroblastoma. *Nature* 455: 971-974
- Cheunsuchon P, Zhou Y, Zhang X, Lee H, Chen W, Nakayama Y, Rice KA, Tessa Hedley-Whyte E, Swearingen B, Klibanski A (2011) Silencing of the imprinted DLK1-MEG3 locus in human clinically nonfunctioning pituitary adenomas. *Am J Pathol* 179: 2120-2130
- Chiosea S, Jelezcova E, Chandran U, Acquafondata M, McHale T, Sobol RW, Dhir R (2006) Up-regulation of dicer, a component of the MicroRNA machinery, in prostate adenocarcinoma. *Am J Pathol* 169: 1812-1820
- Combaret V, Audouy C, Iacono I, Favrot MC, Schell M, Bergeron C, Puisieux A (2002) Circulating MYCN DNA as a tumor-specific marker in neuroblastoma patients. *Cancer Res* 62: 3646-3648
- Cortez MA, Bueso-Ramos C, Ferdin J, Lopez-Berestein G, Sood AK, Calin GA (2011) MicroRNAs in body fluids--the mix of hormones and biomarkers. *Nat Rev Clin Oncol* 8: 467-477



- Corvi R, Amler LC, Savelyeva L, Gehring M, Schwab M (1994) MYCN is retained in single copy at chromosome 2 band p23-24 during amplification in human neuroblastoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 5523-5527
- Croteau S, Charron MC, Latham KE, Naumova AK (2003) Alternative splicing and imprinting control of the Meg3/Gtl2-Dlk1 locus in mouse embryos. *Mamm Genome* 14: 231-241
- da Rocha ST, Edwards CA, Ito M, Ogata T, Ferguson-Smith AC (2008) Genomic imprinting at the mammalian Dlk1-Dio3 domain. *Trends Genet* 24: 306-316
- Dacic S, Kelly L, Shuai Y, Nikiforova MN (2010) miRNA expression profiling of lung adenocarcinomas: correlation with mutational status. *Mod Pathol* 23: 1577-1582
- de Pontual L, Trochet D, Bourdeaut F, Thomas S, Etchevers H, Chompret A, Minard V, Valteau D, Brugieres L, Munnich A, Delattre O, Lyonnet S, Janoueix-Lerosey I, Amiel J (2007) Methylation-associated PHOX2B gene silencing is a rare event in human neuroblastoma. *Eur J Cancer* 43: 2366-2372
- De Preter K, Mestdagh P, Vermeulen J, Zeka F, Naranjo A, Bray I, Castel V, Chen C, Drozynska E, Eggert A, Hogarty MD, Izycka-Swieszewska E, London WB, Noguera R, Piqueras M, Bryan K, Schowe B, van Sluis P, Molenaar JJ, Schramm A, Schulte JH, Stallings RL, Versteeg R, Laureys G, Van Roy N, Speleman F, Vandesompele J (2011) miRNA expression profiling enables risk stratification in archived and fresh neuroblastoma tumor samples. *Clin Cancer Res* 17: 7684-7692
- De Preter K, Vermeulen J, Brors B, Delattre O, Eggert A, Fischer M, Janoueix-Lerosey I, Lavarino C, Maris JM, Mora J, Nakagawara A, Oberthuer A, Ohira M, Schleiermacher G, Schramm A, Schulte JH, Wang Q, Westermann F, Speleman F, Vandesompele J (2010) Accurate outcome prediction in neuroblastoma across independent data sets using a multigene signature. *Clin Cancer Res* 16: 1532-1541
- Deguchi M, Hata Y, Takeuchi M, Ide N, Hirao K, Yao I, Irie M, Toyoda A, Takai Y (1998) BEGAIN (brain-enriched guanylate kinase-associated protein), a novel neuronal PSD-95/SAP90-binding protein. *J Biol Chem* 273: 26269-26272
- Devor EJ, DE Mik JN, Ramachandran S, Goodheart MJ, Leslie KK (2012) Global dysregulation of the chromosome 14q32 imprinted region in uterine carcinosarcoma. *Exp Ther Med* 3: 677-682
- Dews M, Homayouni A, Yu D, Murphy D, Seignani C, Wentzel E, Furth EE, Lee WM, Enders GH, Mendell JT, Thomas-Tikhonenko A (2006) Augmentation of tumor angiogenesis by a Myc-activated microRNA cluster. *Nat Genet* 38: 1060-1065
- Dixon-Mclver A, East P, Mein CA, Cazier JB, Molloy G, Chaplin T, Andrew LT, Young BD, Debernardi S (2008) Distinctive patterns of microRNA expression associated with karyotype in acute myeloid leukaemia. *PLoS One* 3: e2141
- Douc-Rasy S, Barrois M, Echeynne M, Kaghad M, Blanc E, Raguenez G, Goldschneider D, Terrier-Lacombe MJ, Hartmann O, Moll U, Caput D, Benard J (2002) DeltaN-p73alpha accumulates in human neuroblastic tumors. *Am J Pathol* 160: 631-639
- Edwards CA, Mungall AJ, Matthews L, Ryder E, Gray DJ, Pask AJ, Shaw G, Graves JA, Rogers J, Dunham I, Renfree MB, Ferguson-Smith AC (2008) The evolution of the DLK1-DIO3 imprinted domain in mammals. *PLoS Biol* 6: e135



- Eisenberg I, Eran A, Nishino I, Moggio M, Lamperti C, Amato AA, Lidov HG, Kang PB, North KN, Mitrani-Rosenbaum S, Flanigan KM, Neely LA, Whitney D, Beggs AH, Kohane IS, Kunkel LM (2007) Distinctive patterns of microRNA expression in primary muscular disorders. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 17016-17021
- Enquobahrie DA, Abetew DF, Sorensen TK, Willoughby D, Chidambaram K, Williams MA (2011) Placental microRNA expression in pregnancies complicated by preeclampsia. *Am J Obstet Gynecol* 204: 178-21
- Esquela-Kerscher A, Slack FJ (2006) Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nat Rev Cancer* 6: 259-269
- Evans AE, D'Angio GJ, Randolph J (1971) A proposed staging for children with neuroblastoma. Children's cancer study group A. *Cancer* 27: 374-378
- Fasseu M, Treton X, Guichard C, Pedruzzi E, Cazals-Hatem D, Richard C, Aparicio T, Daniel F, Soule JC, Moreau R, Bouhnik Y, Laburthe M, Groyer A, Ogier-Denis E (2010) Identification of restricted subsets of mature microRNA abnormally expressed in inactive colonic mucosa of patients with inflammatory bowel disease. *PLoS One* 5:
- Feil R, Khosla S, Cappai P, Loi P (1998) Genomic imprinting in ruminants: allele-specific gene expression in parthenogenetic sheep. *Mamm Genome* 9: 831-834
- Flor I, Neumann A, Freter C, Helmke BM, Langenbuch M, Rippe V, Bullerdiek J (2012) Abundant expression and hemimethylation of C19MC in cell cultures from placenta-derived stromal cells. *Biochem Biophys Res Commun* 422: 411-416
- Floridon C, Jensen CH, Thorsen P, Nielsen O, Sunde L, Westergaard JG, Thomsen SG, Teisner B (2000) Does fetal antigen 1 (FA1) identify cells with regenerative, endocrine and neuroendocrine potentials? A study of FA1 in embryonic, fetal, and placental tissue and in maternal circulation. *Differentiation* 66: 49-59
- Fontana L, Fiori ME, Albini S, Cifaldi L, Giovinazzi S, Forloni M, Boldrini R, Donfrancesco A, Federici V, Giacomini P, Peschle C, Fruci D (2008) Antagomir-17-5p abolishes the growth of therapy-resistant neuroblastoma through p21 and BIM. *PLoS One* 3: e2236
- French AE, Grant R, Weitzman S, Ray JG, Vermeulen MJ, Sung L, Greenberg M, Koren G (2003) Folic acid food fortification is associated with a decline in neuroblastoma. *Clin Pharmacol Ther* 74: 288-294
- Gasparotto D, Polesel J, Marzotto A, Colladel R, Piccinin S, Modena P, Grizzo A, Sulfaro S, Serraino D, Barzan L, Doglioni C, Maestro R (2011) Overexpression of TWIST2 correlates with poor prognosis in head and neck squamous cell carcinomas. *Oncotarget* 2: 1165-1175
- Gentleman RC, Carey VJ, Bates DM, Bolstad B, Dettling M, Dudoit S, Ellis B, Gautier L, Ge Y, Gentry J, Hornik K, Hothorn T, Huber W, Iacus S, Irizarry R, Leisch F, Li C, Maechler M, Rossini AJ, Sawitzki G, Smyth G, Tierney L, Yang JY, Zhang J (2004) Bioconductor: open software development for computational biology and bioinformatics. *Genome Biol* 5: R80
- George RE, London WB, Cohn SL, Maris JM, Kretschmar C, Diller L, Brodeur GM, Castleberry RP, Look AT (2005) Hyperdiploidy plus nonamplified MYCN confers a favorable prognosis in children 12 to 18 months old with disseminated neuroblastoma: a Pediatric Oncology Group study. *J Clin Oncol* 23: 6466-6473





George RE, Sanda T, Hanna M, Frohling S, Luther W, Zhang J, Ahn Y, Zhou W, London WB, McGrady P, Xue L, Zozulya S, Gregor VE, Webb TR, Gray NS, Gilliland DG, Diller L, Greulich H, Morris SW, Meyerson M, Look AT (2008) Activating mutations in ALK provide a therapeutic target in neuroblastoma. *Nature* 455: 975-978

Georgiades P, Watkins M, Burton GJ, Ferguson-Smith AC (2001) Roles for genomic imprinting and the zygotic genome in placental development. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 4522-4527

Georgiades P, Watkins M, Surani MA, Ferguson-Smith AC (2000) Parental origin-specific developmental defects in mice with uniparental disomy for chromosome 12. *Development* 127: 4719-4728

Gestblom C, Hoehner JC, Hedborg F, Sandstedt B, Pahlman S (1997) In vivo spontaneous neuronal to neuroendocrine lineage conversion in a subset of neuroblastomas. *Am J Pathol* 150: 107-117

Girardot M, Cavaille J, Feil R (2012) Small regulatory RNAs controlled by genomic imprinting and their contribution to human disease. *Epigenetics* 7: 1341-1348

Glazov EA, McWilliam S, Barris WC, Dalrymple BP (2008) Origin, evolution, and biological role of miRNA cluster in DLK-DIO3 genomic region in placental mammals. *Mol Biol Evol* 25: 939-948

Goh YI, Bollano E, Einarson TR, Koren G (2007) Prenatal multivitamin supplementation and rates of pediatric cancers: a meta-analysis. *Clin Pharmacol Ther* 81: 685-691

Gregory RI, Shiekhattar R (2005) MicroRNA biogenesis and cancer. *Cancer Res* 65: 3509-3512

Gu TJ, Yi X, Zhao XW, Zhao Y, Yin JQ (2009) Alu-directed transcriptional regulation of some novel miRNAs. *BMC Genomics* 10: 563

Guled M, Lahti L, Lindholm PM, Salmenkivi K, Bagwan I, Nicholson AG, Knuutila S (2009) CDKN2A, NF2, and JUN are dysregulated among other genes by miRNAs in malignant mesothelioma - A miRNA microarray analysis. *Genes Chromosomes Cancer* 48: 615-623

Guo C, White PS, Weiss MJ, Hogarty MD, Thompson PM, Stram DO, Gerbing R, Matthay KK, Seeger RC, Brodeur GM, Maris JM (1999) Allelic deletion at 11q23 is common in MYCN single copy neuroblastomas. *Oncogene* 18: 4948-4957

Guo L, Liu Y, Bai Y, Sun Y, Xiao F, Guo Y (2010) Gene expression profiling of drug-resistant small cell lung cancer cells by combining microRNA and cDNA expression analysis. *Eur J Cancer* 46: 1692-1702

Haga CL, Phinney DG (2012) MicroRNAs in the imprinted DLK1-DIO3 region repress the epithelial-to-mesenchymal transition by targeting the TWIST1 protein signaling network. *J Biol Chem* 287: 42695-42707

Hagemann LJ, Peterson AJ, Weilert LL, Lee RS, Tervit HR (1998) In vitro and early in vivo development of sheep gynogenones and putative androgenones. *Mol Reprod Dev* 50: 154-162

Haig D (2004) Genomic imprinting and kinship: how good is the evidence? *Annu Rev Genet* 38: 553-585

Haller F, von Heydebreck A, Zhang JD, Gunawan B, Langer C, Ramadori G, Wiemann S, Sahin O (2010) Localization- and mutation-dependent microRNA (miRNA) expression signatures in



gastrointestinal stromal tumours (GISTs), with a cluster of co-expressed miRNAs located at 14q32.31. *J Pathol* 220: 71-86

Hartmann O, Valteau-Couanet D, Vassal G, Lapierre V, Brugieres L, Delgado R, Couanet D, Lumbroso J, Benhamou E (1999) Prognostic factors in metastatic neuroblastoma in patients over 1 year of age treated with high-dose chemotherapy and stem cell transplantation: a multivariate analysis in 218 patients treated in a single institution. *Bone Marrow Transplant* 23: 789-795

Hatada I, Morita S, Obata Y, Sotomaru Y, Shimoda M, Kono T (2001) Identification of a new imprinted gene, Rian, on mouse chromosome 12 by fluorescent differential display screening. *J Biochem* 130: 187-190

Hayashita Y, Osada H, Tatematsu Y, Yamada H, Yanagisawa K, Tomida S, Yatabe Y, Kawahara K, Sekido Y, Takahashi T (2005) A polycistronic microRNA cluster, miR-17-92, is overexpressed in human lung cancers and enhances cell proliferation. *Cancer Res* 65: 9628-9632

He J, Zhang JF, Yi C, Lv Q, Xie WD, Li JN, Wan G, Cui K, Kung HF, Yang J, Yang BB, Zhang Y (2010) miRNA-mediated functional changes through co-regulating function related genes. *PLoS One* 5: e13558

He L, Thomson JM, Hemann MT, Hernando-Monge E, Mu D, Goodson S, Powers S, Cordon-Cardo C, Lowe SW, Hannon GJ, Hammond SM (2005) A microRNA polycistron as a potential human oncogene. *Nature* 435: 828-833

Hernandez A, Fiering S, Martinez E, Galton VA, St Germain D (2002) The gene locus encoding iodothyronine deiodinase type 3 (Dio3) is imprinted in the fetus and expresses antisense transcripts. *Endocrinology* 143: 4483-4486

Hernandez A, Garcia B, Obregon MJ (2007) Gene expression from the imprinted Dio3 locus is associated with cell proliferation of cultured brown adipocytes. *Endocrinology* 148: 3968-3976

Hernandez A, Martinez ME, Fiering S, Galton VA, St Germain D (2006) Type 3 deiodinase is critical for the maturation and function of the thyroid axis. *J Clin Invest* 116: 476-484

Hernandez A, Park JP, Lyon GJ, Mohandas TK, St Germain DL (1998) Localization of the type 3 iodothyronine deiodinase (DIO3) gene to human chromosome 14q32 and mouse chromosome 12F1. *Genomics* 53: 119-121

Hoehner JC, Gestblom C, Hedborg F, Sandstedt B, Olsen L, Pahlman S (1996) A developmental model of neuroblastoma: differentiating stroma-poor tumors' progress along an extra-adrenal chromaffin lineage. *Lab Invest* 75: 659-675

Hu JF, Ulaner GA, Oruganti H, Ivaturi RD, Balagura KA, Pham J, Vu TH, Hoffman AR (2000) Allelic expression of the putative tumor suppressor gene p73 in human fetal tissues and tumor specimens. *Biochim Biophys Acta* 1491: 49-56

Hunter MP, Ismail N, Zhang X, Aguda BD, Lee EJ, Yu L, Xiao T, Schafer J, Lee ML, Schmittgen TD, Nana-Sinkam SP, Jarjoura D, Marsh CB (2008) Detection of microRNA expression in human peripheral blood microvesicles. *PLoS One* 3: e3694

Hwang-Verslues WW, Chang PH, Wei PC, Yang CY, Huang CK, Kuo WH, Shew JY, Chang KJ, Lee EY, Lee WH (2011) miR-495 is upregulated by E12/E47 in breast cancer stem cells, and promotes



oncogenesis and hypoxia resistance via downregulation of E-cadherin and REDD1. *Oncogene* 30: 2463-2474

Ichimura A, Ruike Y, Terasawa K, Tsujimoto G (2011) miRNAs and regulation of cell signaling. *FEBS J* 278: 1610-1618

Iorio MV, Croce CM (2009) MicroRNAs in cancer: small molecules with a huge impact. *J Clin Oncol* 27: 5848-5856

Irving MD, Buiting K, Kanber D, Donaghue C, Schulz R, Offiah A, Mohammed SN, Oakey RJ (2010) Segmental paternal uniparental disomy (patUPD) of 14q32 with abnormal methylation elicits the characteristic features of complete patUPD14. *Am J Med Genet A* 152A: 1942-1950

Izbicki T, Mazur J, Izbicka E (2003) Epidemiology and etiology of neuroblastoma: an overview. *Anticancer Res* 23: 755-760

Janoueix-Lerosey I, Lequin D, Brugieres L, Ribeiro A, de Pontual L, Combaret V, Raynal V, Puisieux A, Schleiermacher G, Pierron G, Valteau-Couanet D, Frebourg T, Michon J, Lyonnet S, Amiel J, Delattre O (2008) Somatic and germline activating mutations of the ALK kinase receptor in neuroblastoma. *Nature* 455: 967-970

Janoueix-Lerosey I, Penther D, Thioux M, de Cremoux P, Derre J, Ambros P, Vielh P, Benard J, Aurias A, Delattre O (2000) Molecular analysis of chromosome arm 17q gain in neuroblastoma. *Genes Chromosomes Cancer* 28: 276-284

Janoueix-Lerosey I, Schleiermacher G, Michels E, Mosseri V, Ribeiro A, Lequin D, Vermeulen J, Couturier J, Peuchmaur M, Valent A, Plantaz D, Rubie H, Valteau-Couanet D, Thomas C, Combaret V, Rousseau R, Eggert A, Michon J, Speleman F, Delattre O (2009) Overall genomic pattern is a predictor of outcome in neuroblastoma. *J Clin Oncol* 27: 1026-1033

Kagami M, O'Sullivan MJ, Green AJ, Watabe Y, Arisaka O, Masawa N, Matsuoka K, Fukami M, Matsubara K, Kato F, Ferguson-Smith AC, Ogata T (2010) The IG-DMR and the MEG3-DMR at human chromosome 14q32.2: hierarchical interaction and distinct functional properties as imprinting control centers. *PLoS Genet* 6: e1000992

Kaghad M, Bonnet H, Yang A, Creancier L, Biscan JC, Valent A, Minty A, Chalon P, Lelias JM, Dumont X, Ferrara P, McKeon F, Caput D (1997) Monoallelically expressed gene related to p53 at 1p36, a region frequently deleted in neuroblastoma and other human cancers. *Cell* 90: 809-819

Kamiya M, Judson H, Okazaki Y, Kusakabe M, Muramatsu M, Takada S, Takagi N, Arima T, Wake N, Kamimura K, Satomura K, Hermann R, Bonthron DT, Hayashizaki Y (2000) The cell cycle control gene ZAC/PLAGL1 is imprinted--a strong candidate gene for transient neonatal diabetes. *Hum Mol Genet* 9: 453-460

Karube Y, Tanaka H, Osada H, Tomida S, Tatematsu Y, Yanagisawa K, Yatabe Y, Takamizawa J, Miyoshi S, Mitsudomi T, Takahashi T (2005) Reduced expression of Dicer associated with poor prognosis in lung cancer patients. *Cancer Sci* 96: 111-115

Keklikoglou I, Koerner C, Schmidt C, Zhang JD, Heckmann D, Shavinskaya A, Allgayer H, Guckel B, Fehm T, Schneeweiss A, Sahin O, Wiemann S, Tschulena U (2012) MicroRNA-520/373 family functions as a tumor suppressor in estrogen receptor negative breast cancer by targeting NF-kappaB and TGF-beta signaling pathways. *Oncogene* 31: 4150-4163



Killian JK, Buckley TR, Stewart N, Munday BL, Jirtle RL (2001) Marsupials and Eutherians reunited: genetic evidence for the Theria hypothesis of mammalian evolution. *Mamm Genome* 12: 513-517

Killian JK, Byrd JC, Jirtle JV, Munday BL, Stoskopf MK, MacDonald RG, Jirtle RL (2000) M6P/IGF2R imprinting evolution in mammals. *Mol Cell* 5: 707-716

Kim J, Bergmann A, Lucas S, Stone R, Stubbs L (2004) Lineage-specific imprinting and evolution of the zinc-finger gene ZIM2. *Genomics* 84: 47-58

Kim VN (2005) Small RNAs: classification, biogenesis, and function. *Mol Cells* 19: 1-15

Kiss T (2002) Small nucleolar RNAs: an abundant group of noncoding RNAs with diverse cellular functions. *Cell* 109: 145-148

Knudson AG, Jr., Strong LC (1972) Mutation and cancer: neuroblastoma and pheochromocytoma. *Am J Hum Genet* 24: 514-532

Koerner MV, Pauler FM, Huang R, Barlow DP (2009) The function of non-coding RNAs in genomic imprinting. *Development* 136: 1771-1783

Kogner P, Barbany G, Bjork O, Castello MA, Donfrancesco A, Falkmer UG, Hedborg F, Kouvidou H, Persson H, Raschella G, . (1994) Trk mRNA and low affinity nerve growth factor receptor mRNA expression and triploid DNA content in favorable neuroblastoma tumors. *Prog Clin Biol Res* 385: 137-145

Kriegel C, Amiji M (2011) Oral TNF-alpha gene silencing using a polymeric microsphere-based delivery system for the treatment of inflammatory bowel disease. *J Control Release* 150: 77-86

Kumar MS, Lu J, Mercer KL, Golub TR, Jacks T (2007) Impaired microRNA processing enhances cellular transformation and tumorigenesis. *Nat Genet* 39: 673-677

Kushner BH, Gilbert F, Helson L (1986) Familial neuroblastoma. Case reports, literature review, and etiologic considerations. *Cancer* 57: 1887-1893

LaBonne SG, Furst A (1989) Differentiation in vitro of neural precursor cells from normal and Pecanex mutant *Drosophila* embryos. *J Neurogenet* 5: 99-104

Laborda J, Sausville EA, Hoffman T, Notario V (1993) dlk, a putative mammalian homeotic gene differentially expressed in small cell lung carcinoma and neuroendocrine tumor cell line. *J Biol Chem* 268: 3817-3820

Landgraf P, Rusu M, Sheridan R, Sewer A, Iovino N, Aravin A, Pfeffer S, Rice A, Kamphorst AO, Landthaler M, Lin C, Socci ND, Hermida L, Fulci V, Chiaretti S, Foa R, Schliwka J, Fuchs U, Novosel A, Muller RU, Schermer B, Bissels U, Inman J, Phan Q, Chien M, Weir DB, Choksi R, De Vita G, Frezzetti D, Trompeter H, Hornung V, Teng G, Hartmann G, Palkovits M, Di Lauro R, Wernet P, Macino G, Rogler CE, Nagle JW, Ju J, Papavasiliou FN, Benzing T, Lichter P, Tam W, Brownstein MJ, Bosio A, Borkhardt A, Russo JJ, Sander C, Zavolan M, Tuschl T (2007) A mammalian microRNA expression atlas based on small RNA library sequencing. *Cell* 129: 1401-1414

Lavon I, Zrihan D, Granit A, Einstein O, Fainstein N, Cohen MA, Cohen MA, Zelikovitch B, Shoshan Y, Spektor S, Reubinoff BE, Felig Y, Gerlitz O, Ben Hur T, Smith Y, Siegal T (2010) Gliomas display a microRNA expression profile reminiscent of neural precursor cells. *Neuro Oncol* 12: 422-433





- Lee JW, Choi CH, Choi JJ, Park YA, Kim SJ, Hwang SY, Kim WY, Kim TJ, Lee JH, Kim BG, Bae DS (2008) Altered MicroRNA expression in cervical carcinomas. *Clin Cancer Res* 14: 2535-2542
- Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V (1993) The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75: 843-854
- Lehnert S, Van Loo P, Thilakarathne PJ, Marynen P, Verbeke G, Schuit FC (2009) Evidence for co-evolution between human microRNAs and Alu-repeats. *PLoS One* 4: e4456
- Li B, Carey M, Workman JL (2007) The role of chromatin during transcription. *Cell* 128: 707-719
- Li Z, Lu J, Sun M, Mi S, Zhang H, Luo RT, Chen P, Wang Y, Yan M, Qian Z, Neilly MB, Jin J, Zhang Y, Bohlander SK, Zhang DE, Larson RA, Le Beau MM, Thirman MJ, Golub TR, Rowley JD, Chen J (2008) Distinct microRNA expression profiles in acute myeloid leukemia with common translocations. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 15535-15540
- Lim LP, Lau NC, Garrett-Engele P, Grimson A, Schelter JM, Castle J, Bartel DP, Linsley PS, Johnson JM (2005) Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature* 433: 769-773
- Lin RJ, Lin YC, Chen J, Kuo HH, Chen YY, Diccianni MB, London WB, Chang CH, Yu AL (2010a) microRNA signature and expression of Dicer and Drosha can predict prognosis and delineate risk groups in neuroblastoma. *Cancer Res* 70: 7841-7850
- Lin S, Cheung WK, Chen S, Lu G, Wang Z, Xie D, Li K, Lin MC, Kung HF (2010b) Computational identification and characterization of primate-specific microRNAs in human genome. *Comput Biol Chem* 34: 232-241
- Lin SP, Youngson N, Takada S, Seitz H, Reik W, Paulsen M, Cavaille J, Ferguson-Smith AC (2003) Asymmetric regulation of imprinting on the maternal and paternal chromosomes at the *Dlk1-Gtl2* imprinted cluster on mouse chromosome 12. *Nat Genet* 35: 97-102
- Liu DZ, Ander BP, Tian Y, Stamova B, Jickling GC, Davis RR, Sharp FR (2012) Integrated analysis of mRNA and microRNA expression in mature neurons, neural progenitor cells and neuroblastoma cells. *Gene* 495: 120-127
- Liu L, Luo GZ, Yang W, Zhao X, Zheng Q, Lv Z, Li W, Wu HJ, Wang L, Wang XJ, Zhou Q (2010a) Activation of the imprinted *Dlk1-Dio3* region correlates with pluripotency levels of mouse stem cells. *J Biol Chem* 285: 19483-19490
- Liu X, Sempere LF, Ouyang H, Memoli VA, Andrew AS, Luo Y, Demidenko E, Korc M, Shi W, Preis M, Dragnev KH, Li H, Dorenzo J, Bak M, Freemantle SJ, Kauppinen S, Dmitrovsky E (2010b) MicroRNA-31 functions as an oncogenic microRNA in mouse and human lung cancer cells by repressing specific tumor suppressors. *J Clin Invest* 120: 1298-1309
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C(T)}$  Method. *Methods* 25: 402-408
- Lonergan GJ, Schwab CM, Suarez ES, Carlson CL (2002) Neuroblastoma, ganglioneuroblastoma, and ganglioneuroma: radiologic-pathologic correlation. *Radiographics* 22: 911-934



- Look AT, Hayes FA, Nitschke R, McWilliams NB, Green AA (1984) Cellular DNA content as a predictor of response to chemotherapy in infants with unresectable neuroblastoma. *N Engl J Med* 311: 231-235
- Lowery AJ, Miller N, Devaney A, McNeill RE, Davoren PA, Lemetre C, Benes V, Schmidt S, Blake J, Ball G, Kerin MJ (2009) MicroRNA signatures predict oestrogen receptor, progesterone receptor and HER2/neu receptor status in breast cancer. *Breast Cancer Res* 11: R27
- Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, Sweet-Cordero A, Ebert BL, Mak RH, Ferrando AA, Downing JR, Jacks T, Horvitz HR, Golub TR (2005) MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* 435: 834-838
- Luedi PP, Hartemink AJ, Jirtle RL (2005) Genome-wide prediction of imprinted murine genes. *Genome Res* 15: 875-884
- Luk JM, Burchard J, Zhang C, Liu AM, Wong KF, Shek FH, Lee NP, Fan ST, Poon RT, Ivanovska I, Philippar U, Cleary MA, Buser CA, Shaw PM, Lee CN, Tenen DG, Dai H, Mao M (2011) DLK1-DIO3 genomic imprinted microRNA cluster at 14q32.2 defines a stemlike subtype of hepatocellular carcinoma associated with poor survival. *J Biol Chem* 286: 30706-30713
- Lund G, Messing J, Viotti A (1995) Endosperm-specific demethylation and activation of specific alleles of alpha-tubulin genes of *Zea mays* L. *Mol Gen Genet* 246: 716-722
- Luttikhuis ME, Powell JE, Rees SA, Genus T, Chughtai S, Ramani P, Mann JR, McConville CM (2001) Neuroblastomas with chromosome 11q loss and single copy MYCN comprise a biologically distinct group of tumours with adverse prognosis. *Br J Cancer* 85: 531-537
- Ma L, Weinberg RA (2008a) Micromanagers of malignancy: role of microRNAs in regulating metastasis. *Trends Genet* 24: 448-456
- Ma L, Weinberg RA (2008b) MicroRNAs in malignant progression. *Cell Cycle* 7: 570-572
- Maccani MA, Marsit CJ (2009) Epigenetics in the placenta. *Am J Reprod Immunol* 62: 78-89
- Mackay DJ, Coupe AM, Shield JP, Storr JN, Temple IK, Robinson DO (2002) Relaxation of imprinted expression of ZAC and HYMAI in a patient with transient neonatal diabetes mellitus. *Hum Genet* 110: 139-144
- Maestro R, Dei Tos AP, Hamamori Y, Krasnokutsky S, Sartorelli V, Kedes L, Doglioni C, Beach DH, Hannon GJ (1999) Twist is a potential oncogene that inhibits apoptosis. *Genes Dev* 13: 2207-2217
- Mai M, Qian C, Yokomizo A, Tindall DJ, Bostwick D, Polychronakos C, Smith DI, Liu W (1998) Loss of imprinting and allele switching of p73 in renal cell carcinoma. *Oncogene* 17: 1739-1741
- Mann JR, Lovell-Badge RH (1984) Inviability of parthenogenones is determined by pronuclei, not egg cytoplasm. *Nature* 310: 66-67
- Margolin JF, Friedman JR, Meyer WK, Vissing H, Thiesen HJ, Rauscher FJ, III (1994) Kruppel-associated boxes are potent transcriptional repression domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 4509-4513
- Maris JM, Hogarty MD, Bagatell R, Cohn SL (2007) Neuroblastoma. *Lancet* 369: 2106-2120



- Maris JM, Weiss MJ, Mosse Y, Hii G, Guo C, White PS, Hogarty MD, Mirensky T, Brodeur GM, Rebbeck TR, Urbanek M, Shusterman S (2002) Evidence for a hereditary neuroblastoma predisposition locus at chromosome 16p12-13. *Cancer Res* 62: 6651-6658
- Martin RM, Gunnell D, Owen CG, Smith GD (2005) Breast-feeding and childhood cancer: A systematic review with metaanalysis. *Int J Cancer* 117: 1020-1031
- Matthay KK, Villablanca JG, Seeger RC, Stram DO, Harris RE, Ramsay NK, Swift P, Shimada H, Black CT, Brodeur GM, Gerbing RB, Reynolds CP (1999) Treatment of high-risk neuroblastoma with intensive chemotherapy, radiotherapy, autologous bone marrow transplantation, and 13-cis-retinoic acid. Children's Cancer Group. *N Engl J Med* 341: 1165-1173
- Mattick JS (2009) The genetic signatures of noncoding RNAs. *PLoS Genet* 5: e1000459
- McGrath J, Solter D (1984) Maternal Thp lethality in the mouse is a nuclear, not cytoplasmic, defect. *Nature* 308: 550-551
- McLaren RJ, Montgomery GW (1999) Genomic imprinting of the insulin-like growth factor 2 gene in sheep. *Mamm Genome* 10: 588-591
- Medina PP, Nolde M, Slack FJ (2010) OncomiR addiction in an in vivo model of microRNA-21-induced pre-B-cell lymphoma. *Nature* 467: 86-90
- Melo SA, Esteller M (2011) A precursor microRNA in a cancer cell nucleus: get me out of here! *Cell Cycle* 10: 922-925
- Mestdagh P, Bostrom AK, Impens F, Fredlund E, Van Peer G, De Antonellis P, von Stedingk K, Ghesquiere B, Schulte S, Dews M, Thomas-Tikhonenko A, Schulte JH, Zollo M, Schramm A, Gevaert K, Axelson H, Speleman F, Vandesompele J (2010) The miR-17-92 microRNA cluster regulates multiple components of the TGF-beta pathway in neuroblastoma. *Mol Cell* 40: 762-773
- Miura K, Miura S, Yamasaki K, Higashijima A, Kinoshita A, Yoshiura K, Masuzaki H (2010) Identification of pregnancy-associated microRNAs in maternal plasma. *Clin Chem* 56: 1767-1771
- Modak S, Cheung NK (2007) Disialoganglioside directed immunotherapy of neuroblastoma. *Cancer Invest* 25: 67-77
- Moll UM, LaQuaglia M, Benard J, Riou G (1995) Wild-type p53 protein undergoes cytoplasmic sequestration in undifferentiated neuroblastomas but not in differentiated tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92: 4407-4411
- Monk D, Wagschal A, Arnaud P, Muller PS, Parker-Katiraei L, Bourc'his D, Scherer SW, Feil R, Stanier P, Moore GE (2008) Comparative analysis of human chromosome 7q21 and mouse proximal chromosome 6 reveals a placental-specific imprinted gene, TFPI2/Tfpi2, which requires EHMT2 and EED for allelic-silencing. *Genome Res* 18: 1270-1281
- Mosakhani N, Lahti L, Borze I, Karjalainen-Lindsberg ML, Sundstrom J, Ristamaki R, Osterlund P, Knuutila S, Sarhadi VK (2012) MicroRNA profiling predicts survival in anti-EGFR treated chemorefractory metastatic colorectal cancer patients with wild-type KRAS and BRAF. *Cancer Genet* 205: 545-551
- Mosse YP, Laudenslager M, Khazi D, Carlisle AJ, Winter CL, Rappaport E, Maris JM (2004) Germline PHOX2B mutation in hereditary neuroblastoma. *Am J Hum Genet* 75: 727-730



Muralidhar B, Goldstein LD, Ng G, Winder DM, Palmer RD, Gooding EL, Barbosa-Morais NL, Mukherjee G, Thorne NP, Roberts I, Pett MR, Coleman N (2007) Global microRNA profiles in cervical squamous cell carcinoma depend on Drosha expression levels. *J Pathol* 212: 368-377

Noguer-Dance M, Abu-Amero S, Al Khtib M, Lefevre A, Coullin P, Moore GE, Cavaille J (2010) The primate-specific microRNA gene cluster (C19MC) is imprinted in the placenta. *Hum Mol Genet* 19: 3566-3582

O'Donnell KA, Wentzel EA, Zeller KI, Dang CV, Mendell JT (2005) c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression. *Nature* 435: 839-843

Oberthuer A, Berthold F, Warnat P, Hero B, Kahlert Y, Spitz R, Ernestus K, Konig R, Haas S, Eils R, Schwab M, Brors B, Westermann F, Fischer M (2006) Customized oligonucleotide microarray gene expression-based classification of neuroblastoma patients outperforms current clinical risk stratification. *J Clin Oncol* 24: 5070-5078

Oberthuer A, Hero B, Berthold F, Juraeva D, Faldum A, Kahlert Y, Asgharzadeh S, Seeger R, Scaruffi P, Tonini GP, Janoueix-Lerosey I, Delattre O, Schleiermacher G, Vandesompele J, Vermeulen J, Speleman F, Noguera R, Piqueras M, Benard J, Valent A, Avigad S, Yaniv I, Weber A, Christiansen H, Grundy RG, Schardt K, Schwab M, Eils R, Warnat P, Kaderali L, Simon T, Decarolis B, Theissen J, Westermann F, Brors B, Fischer M (2010) Prognostic impact of gene expression-based classification for neuroblastoma. *J Clin Oncol* 28: 3506-3515

Okutsu T, Kuroiwa Y, Kagitani F, Kai M, Aisaka K, Tsutsumi O, Kaneko Y, Yokomori K, Surani MA, Kohda T, Kaneko-Ishino T, Ishino F (2000) Expression and imprinting status of human PEG8/IGF2AS, a paternally expressed antisense transcript from the IGF2 locus, in Wilms' tumors. *J Biochem* 127: 475-483

Olaru AV, Ghiaur G, Yamanaka S, Luvsanjav D, An F, Popescu I, Alexandrescu S, Allen S, Pawlik TM, Torbenson M, Georgiades C, Roberts LR, Gores GJ, Ferguson-Smith A, Almeida MI, Calin GA, Mezey E, Selaru FM (2011) MicroRNA down-regulated in human cholangiocarcinoma control cell cycle through multiple targets involved in the G1/S checkpoint. *Hepatology* 54: 2089-2098

Olshan AF, Smith J, Cook MN, Grufferman S, Pollock BH, Stram DO, Seeger RC, Look AT, Cohn SL, Castleberry RP, Bondy ML (1999) Hormone and fertility drug use and the risk of neuroblastoma: a report from the Children's Cancer Group and the Pediatric Oncology Group. *Am J Epidemiol* 150: 930-938

Paulsen M, Takada S, Youngson NA, Benchaib M, Charlier C, Segers K, Georges M, Ferguson-Smith AC (2001) Comparative sequence analysis of the imprinted Dlk1-Gtl2 locus in three mammalian species reveals highly conserved genomic elements and refines comparison with the Igf2-H19 region. *Genome Res* 11: 2085-2094

Perri P, Longo L, Cusano R, McConville CM, Rees SA, Devoto M, Conte M, Ferrara GB, Seri M, Romeo G, Tonini GP (2002) Weak linkage at 4p16 to predisposition for human neuroblastoma. *Oncogene* 21: 8356-8360

Peuchmaur M, d'Amore ES, Joshi VV, Hata J, Roald B, Dehner LP, Gerbing RB, Stram DO, Lukens JN, Matthay KK, Shimada H (2003) Revision of the International Neuroblastoma Pathology Classification: confirmation of favorable and unfavorable prognostic subsets in ganglioneuroblastoma, nodular. *Cancer* 98: 2274-2281





- Plantaz D, Mohapatra G, Matthay KK, Pellarin M, Seeger RC, Feuerstein BG (1997) Gain of chromosome 17 is the most frequent abnormality detected in neuroblastoma by comparative genomic hybridization. *Am J Pathol* 150: 81-89
- Poaty H, Coullin P, Peko JF, Dessen P, Diatta AL, Valent A, Leguern E, Prevot S, Gombe-Mbalawa C, Candelier JJ, Picard JY, Bernheim A (2012) Genome-wide high-resolution aCGH analysis of gestational choriocarcinomas. *PLoS One* 7: e29426
- Pritchard J, McElwain TJ, Graham-Pole J (1982) High-dose melphalan with autologous marrow for treatment of advanced neuroblastoma. *Br J Cancer* 45: 86-94
- Redman CW (1991) Current topic: pre-eclampsia and the placenta. *Placenta* 12: 301-308
- Reik W, Walter J (2001) Genomic imprinting: parental influence on the genome. *Nat Rev Genet* 2: 21-32
- Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rougvie AE, Horvitz HR, Ruvkun G (2000) The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 403: 901-906
- Ren J, Jin P, Wang E, Marincola FM, Stroncek DF (2009) MicroRNA and gene expression patterns in the differentiation of human embryonic stem cells. *J Transl Med* 7: 20
- Rippe V, Belge G, Meiboom M, Kazmierczak B, Fusco A, Bullerdiek J (1999) A KRAB zinc finger protein gene is the potential target of 19q13 translocation in benign thyroid tumors. *Genes Chromosomes Cancer* 26: 229-236
- Rippe V, Dittberner L, Lorenz VN, Drieschner N, Nimzyk R, Sendt W, Junker K, Belge G, Bullerdiek J (2010) The two stem cell microRNA gene clusters C19MC and miR-371-3 are activated by specific chromosomal rearrangements in a subgroup of thyroid adenomas. *PLoS One* 5: e9485
- Rosivatz E, Becker I, Specht K, Fricke E, Lubert B, Busch R, Hofler H, Becker KF (2002) Differential expression of the epithelial-mesenchymal transition regulators snail, SIP1, and twist in gastric cancer. *Am J Pathol* 161: 1881-1891
- Rother S, Meister G (2011) Small RNAs derived from longer non-coding RNAs. *Biochimie* 93: 1905-1915
- Royo H, Bortolin ML, Seitz H, Cavaille J (2006) Small non-coding RNAs and genomic imprinting. *Cytogenet Genome Res* 113: 99-108
- Salvatore D, Low SC, Berry M, Maia AL, Harney JW, Croteau W, St Germain DL, Larsen PR (1995) Type 3 Iodothyronine deiodinase: cloning, in vitro expression, and functional analysis of the placental selenoenzyme. *J Clin Invest* 96: 2421-2430
- Satge D, Sasco AJ, Carlsen NL, Stiller CA, Rubie H, Hero B, de Bernardi B, De Kraker J, Coze C, Kogner P, Langmark F, Hakvoort-Cammel FG, Beck D, von der WN, Parkes S, Hartmann O, Lippens RJ, Kamps WA, Sommelet D (1998) A lack of neuroblastoma in Down syndrome: a study from 11 European countries. *Cancer Res* 58: 448-452
- Savelyeva L, Corvi R, Schwab M (1994) Translocation involving 1p and 17q is a recurrent genetic alteration of human neuroblastoma cells. *Am J Hum Genet* 55: 334-340



- Schleiermacher G, Michon J, Huon I, d'Enghien CD, Kljanienko J, Brisse H, Ribeiro A, Mosseri V, Rubie H, Munzer C, Thomas C, Valteau-Couanet D, Auvrignon A, Plantaz D, Delattre O, Couturier J (2007) Chromosomal CGH identifies patients with a higher risk of relapse in neuroblastoma without MYCN amplification. *Br J Cancer* 97: 238-246
- Schmidt JV, Matteson PG, Jones BK, Guan XJ, Tilghman SM (2000) The Dlk1 and Gtl2 genes are linked and reciprocally imprinted. *Genes Dev* 14: 1997-2002
- Schmidt ML, Lal A, Seeger RC, Maris JM, Shimada H, O'Leary M, Gerbing RB, Matthay KK (2005) Favorable prognosis for patients 12 to 18 months of age with stage 4 nonamplified MYCN neuroblastoma: a Children's Cancer Group Study. *J Clin Oncol* 23: 6474-6480
- Schramm A, Schulte JH, Klein-Hitpass L, Havers W, Sieverts H, Berwanger B, Christiansen H, Warnat P, Brors B, Eils J, Eils R, Eggert A (2005) Prediction of clinical outcome and biological characterization of neuroblastoma by expression profiling. *Oncogene* 24: 7902-7912
- Schulte JH, Horn S, Otto T, Samans B, Heukamp LC, Eilers UC, Krause M, Astrahantseff K, Klein-Hitpass L, Buettner R, Schramm A, Christiansen H, Eilers M, Eggert A, Berwanger B (2008) MYCN regulates oncogenic MicroRNAs in neuroblastoma. *Int J Cancer* 122: 699-704
- Schulte JH, Marschall T, Martin M, Rosenstiel P, Mestdagh P, Schlierf S, Thor T, Vandesompele J, Eggert A, Schreiber S, Rahmann S, Schramm A (2010) Deep sequencing reveals differential expression of microRNAs in favorable versus unfavorable neuroblastoma. *Nucleic Acids Res* 38: 5919-5928
- Schuster-Gossler K, Simon-Chazottes D, Guenet JL, Zachgo J, Gossler A (1996) Gtl2lacZ, an insertional mutation on mouse chromosome 12 with parental origin-dependent phenotype. *Mamm Genome* 7: 20-24
- Schwab M, Varmus HE, Bishop JM, Grzeschik KH, Naylor SL, Sakaguchi AY, Brodeur G, Trent J (1984) Chromosome localization in normal human cells and neuroblastomas of a gene related to c-myc. *Nature* 308: 288-291
- Seitz H, Royo H, Bortolin ML, Lin SP, Ferguson-Smith AC, Cavaille J (2004) A large imprinted microRNA gene cluster at the mouse Dlk1-Gtl2 domain. *Genome Res* 14: 1741-1748
- Seitz H, Youngson N, Lin SP, Dalbert S, Paulsen M, Bachellerie JP, Ferguson-Smith AC, Cavaille J (2003) Imprinted microRNA genes transcribed antisense to a reciprocally imprinted retrotransposon-like gene. *Nat Genet* 34: 261-262
- Sekita Y, Wagatsuma H, Nakamura K, Ono R, Kagami M, Wakisaka N, Hino T, Suzuki-Migishima R, Kohda T, Ogura A, Ogata T, Yokoyama M, Kaneko-Ishino T, Ishino F (2008) Role of retrotransposon-derived imprinted gene, Rtl1, in the feto-maternal interface of mouse placenta. *Nat Genet* 40: 243-248
- Shabalina SA, Spiridonov NA (2004) The mammalian transcriptome and the function of non-coding DNA sequences. *Genome Biol* 5: 105
- Shih KK, Qin LX, Tanner EJ, Zhou Q, Bisogna M, Dao F, Olvera N, Viale A, Barakat RR, Levine DA (2011) A microRNA survival signature (MiSS) for advanced ovarian cancer. *Gynecol Oncol* 121: 444-450



- Shimada H, Ambros IM, Dehner LP, Hata J, Joshi VV, Roald B (1999a) Terminology and morphologic criteria of neuroblastic tumors: recommendations by the International Neuroblastoma Pathology Committee. *Cancer* 86: 349-363
- Shimada H, Ambros IM, Dehner LP, Hata J, Joshi VV, Roald B, Stram DO, Gerbing RB, Lukens JN, Matthay KK, Castleberry RP (1999b) The International Neuroblastoma Pathology Classification (the Shimada system). *Cancer* 86: 364-372
- Skalsky RL, Cullen BR (2011) Reduced expression of brain-enriched microRNAs in glioblastomas permits targeted regulation of a cell death gene. *PLoS One* 6: e24248
- Slack FJ (2010) Stem cells: Big roles for small RNAs. *Nature* 463: 616
- Slack FJ, Weidhaas JB (2006) MicroRNAs as a potential magic bullet in cancer. *Future Oncol* 2: 73-82
- Smit MA, Tordoir X, Gyapay G, Cockett NE, Georges M, Charlier C (2005) BEGAIN: a novel imprinted gene that generates paternally expressed transcripts in a tissue- and promoter-specific manner in sheep. *Mamm Genome* 16: 801-814
- Smyth GK, Michaud J, Scott HS (2005) Use of within-array replicate spots for assessing differential expression in microarray experiments. *Bioinformatics* 21: 2067-2075
- Song CX, Szulwach KE, Fu Y, Dai Q, Yi C, Li X, Li Y, Chen CH, Zhang W, Jian X, Wang J, Zhang L, Looney TJ, Zhang B, Godley LA, Hicks LM, Lahn BT, Jin P, He C (2011) Selective chemical labeling reveals the genome-wide distribution of 5-hydroxymethylcytosine. *Nat Biotechnol* 29: 68-72
- Song CX, Yi C, He C (2012) Mapping recently identified nucleotide variants in the genome and transcriptome. *Nat Biotechnol* 30: 1107-1116
- Spitz R, Hero B, Ernestus K, Berthold F (2003) Gain of distal chromosome arm 17q is not associated with poor prognosis in neuroblastoma. *Clin Cancer Res* 9: 4835-4840
- Squire JA, Thorner P, Marrano P, Parkinson D, Ng YK, Gerrie B, Chilton-Macneill S, Zielenska M (1996) Identification of MYCN Copy Number Heterogeneity by Direct FISH Analysis of Neuroblastoma Preparations. *Mol Diagn* 1: 281-289
- Stadtfeld M, Apostolou E, Akutsu H, Fukuda A, Follett P, Natesan S, Kono T, Shioda T, Hochedlinger K (2010) Aberrant silencing of imprinted genes on chromosome 12qF1 in mouse induced pluripotent stem cells. *Nature* 465: 175-181
- Stark B, Jeison M, Glaser-Gabay L, Bar-Am I, Mardoukh J, Ash S, Atias D, Stein J, Zaizov R, Yaniv I (2003) der(11)t(11;17): a distinct cytogenetic pathway of advanced stage neuroblastoma (NBL) - detected by spectral karyotyping (SKY). *Cancer Lett* 197: 75-79
- Sugito N, Ishiguro H, Kuwabara Y, Kimura M, Mitsui A, Kurehara H, Ando T, Mori R, Takashima N, Ogawa R, Fujii Y (2006) RNASEN regulates cell proliferation and affects survival in esophageal cancer patients. *Clin Cancer Res* 12: 7322-7328
- Surani MA, Barton SC, Norris ML (1984) Development of reconstituted mouse eggs suggests imprinting of the genome during gametogenesis. *Nature* 308: 548-550



- Suzuki T, Yokota J, Mugishima H, Okabe I, Ookuni M, Sugimura T, Terada M (1989) Frequent loss of heterozygosity on chromosome 14q in neuroblastoma. *Cancer Res* 49: 1095-1098
- Swarbrick A, Woods SL, Shaw A, Balakrishnan A, Phua Y, Nguyen A, Chanthery Y, Lim L, Ashton LJ, Judson RL, Huskey N, Belloch R, Haber M, Norris MD, Lengyel P, Hackett CS, Preiss T, Chetcuti A, Sullivan CS, Marcusson EG, Weiss W, L'Etoile N, Goga A (2010) miR-380-5p represses p53 to control cellular survival and is associated with poor outcome in MYCN-amplified neuroblastoma. *Nat Med* 16: 1134-1140
- Taft RJ, Simons C, Nahkuri S, Oey H, Korbie DJ, Mercer TR, Holst J, Ritchie W, Wong JJ, Rasko JE, Rokhsar DS, Degnan BM, Mattick JS (2010) Nuclear-localized tiny RNAs are associated with transcription initiation and splice sites in metazoans. *Nat Struct Mol Biol* 17: 1030-1034
- Takada S, Paulsen M, Tevendale M, Tsai CE, Kelsey G, Cattanach BM, Ferguson-Smith AC (2002) Epigenetic analysis of the Dlk1-Gtl2 imprinted domain on mouse chromosome 12: implications for imprinting control from comparison with Igf2-H19. *Hum Mol Genet* 11: 77-86
- Takada S, Tevendale M, Baker J, Georgiades P, Campbell E, Freeman T, Johnson MH, Paulsen M, Ferguson-Smith AC (2000) Delta-like and gtl2 are reciprocally expressed, differentially methylated linked imprinted genes on mouse chromosome 12. *Curr Biol* 10: 1135-1138
- Takahashi N, Okamoto A, Kobayashi R, Shirai M, Obata Y, Ogawa H, Sotomaru Y, Kono T (2009) Deletion of Gtl2, imprinted non-coding RNA, with its differentially methylated region induces lethal parent-origin-dependent defects in mice. *Hum Mol Genet* 18: 1879-1888
- Takeda O, Homma C, Maseki N, Sakurai M, Kanda N, Schwab M, Nakamura Y, Kaneko Y (1994) There may be two tumor suppressor genes on chromosome arm 1p closely associated with biologically distinct subtypes of neuroblastoma. *Genes Chromosomes Cancer* 10: 30-39
- Takita J, Hayashi Y, Kohno T, Yamaguchi N, Hanada R, Yamamoto K, Yokota J (1997) Deletion map of chromosome 9 and p16 (CDKN2A) gene alterations in neuroblastoma. *Cancer Res* 57: 907-912
- Tang H, Liu X, Wang Z, She X, Zeng X, Deng M, Liao Q, Guo X, Wang R, Li X, Zeng F, Wu M, Li G (2011) Interaction of hsa-miR-381 and glioma suppressor LRRC4 is involved in glioma growth. *Brain Res* 1390: 21-32
- Tang XX, Zhao H, Kung B, Kim DY, Hicks SL, Cohn SL, Cheung NK, Seeger RC, Evans AE, Ikegaki N (2006) The MYCN enigma: significance of MYCN expression in neuroblastoma. *Cancer Res* 66: 2826-2833
- Thomson JM, Newman M, Parker JS, Morin-Kensicki EM, Wright T, Hammond SM (2006) Extensive post-transcriptional regulation of microRNAs and its implications for cancer. *Genes Dev* 20: 2202-2207
- Tollervey D, Kiss T (1997) Function and synthesis of small nucleolar RNAs. *Curr Opin Cell Biol* 9: 337-342
- Tombol Z, Eder K, Kovacs A, Szabo PM, Kulka J, Liko I, Zalatnai A, Racz G, Toth M, Patocs A, Falus A, Racz K, Igaz P (2010) MicroRNA expression profiling in benign (sporadic and hereditary) and recurring adrenal pheochromocytomas. *Mod Pathol* 23: 1583-1595
- Tricoli JV, Jacobson JW (2007) MicroRNA: Potential for Cancer Detection, Diagnosis, and Prognosis. *Cancer Res* 67: 4553-4555





Trochet D, Bourdeaut F, Janoueix-Lerosey I, Deville A, de Pontual L, Schleiermacher G, Coze C, Philip N, Frebourg T, Munnich A, Lyonnet S, Delattre O, Amiel J (2004) Germline mutations of the paired-like homeobox 2B (PHOX2B) gene in neuroblastoma. *Am J Hum Genet* 74: 761-764

Tryndyak VP, Ross SA, Beland FA, Pogribny IP (2009) Down-regulation of the microRNAs miR-34a, miR-127, and miR-200b in rat liver during hepatocarcinogenesis induced by a methyl-deficient diet. *Mol Carcinog* 48: 479-487

Tsai KW, Kao HW, Chen HC, Chen SJ, Lin WC (2009) Epigenetic control of the expression of a primate-specific microRNA cluster in human cancer cells. *Epigenetics* 4: 587-592

Valent A, Le Roux G, Barrois M, Terrier-Lacombe MJ, Valteau-Couanet D, Leon B, Spengler B, Lenoir G, Benard J, Bernheim A (2002) MYCN gene overrepresentation detected in primary neuroblastoma tumour cells without amplification. *J Pathol* 198: 495-501

Valentijn LJ, Koster J, Haneveld F, Aissa RA, van Sluis P, Broekmans ME, Molenaar JJ, van Nes J, Versteeg R (2012) Functional MYCN signature predicts outcome of neuroblastoma irrespective of MYCN amplification. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109: 19190-19195

Valleley EM, Cordery SF, Bonthron DT (2007) Tissue-specific imprinting of the ZAC/PLAGL1 tumour suppressor gene results from variable utilization of monoallelic and biallelic promoters. *Hum Mol Genet* 16: 972-981

Valsesia-Wittmann S, Magdeleine M, Dupasquier S, Garin E, Jallas AC, Combaret V, Krause A, Leissner P, Puisieux A (2004) Oncogenic cooperation between H-Twist and N-Myc overrides failsafe programs in cancer cells. *Cancer Cell* 6: 625-630

Valteau-Couanet D (2005) Event-free survival of patients with high-risk neuroblastoma treated with an N6-like induction treatment. *J Clin Oncol* 23: 6262-6263

Vandesompele J, Baudis M, De Preter K, Van Roy N, Ambros P, Bown N, Brinkschmidt C, Christiansen H, Combaret V, Lastowska M, Nicholson J, O'Meara A, Plantaz D, Stallings R, Brichard B, Van den BC, De Bie S, De Paepe A, Laureys G, Speleman F (2005) Unequivocal delineation of clinicogenetic subgroups and development of a new model for improved outcome prediction in neuroblastoma. *J Clin Oncol* 23: 2280-2299

Vasudevan S, Tong Y, Steitz JA (2007) Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation. *Science* 318: 1931-1934

Veronese A, Lupini L, Consiglio J, Visone R, Ferracin M, Fornari F, Zanesi N, Alder H, D'Elia G, Gramantieri L, Bolondi L, Lanza G, Querzoli P, Angioni A, Croce CM, Negrini M (2010) Oncogenic role of miR-483-3p at the IGF2/483 locus. *Cancer Res* 70: 3140-3149

Vissing H, Meyer WK, Aagaard L, Tommerup N, Thiesen HJ (1995) Repression of transcriptional activity by heterologous KRAB domains present in zinc finger proteins. *FEBS Lett* 369: 153-157

WADDINGTON CH (1952) Selection of the genetic basis for an acquired character. *Nature* 169: 625-626

Wang K, Diskin SJ, Zhang H, Attiyeh EF, Winter C, Hou C, Schnepf RW, Diamond M, Bosse K, Mayes PA, Glessner J, Kim C, Frackelton E, Garris M, Wang Q, Glaberson W, Chiavacci R, Nguyen L, Jagannathan J, Saeki N, Sasaki H, Grant SF, Iolascon A, Mosse YP, Cole KA, Li H, Devoto M,



- McGrady PW, London WB, Capasso M, Rahman N, Hakonarson H, Maris JM (2011) Integrative genomics identifies LMO1 as a neuroblastoma oncogene. *Nature* 469: 216-220
- Wang Q, Diskin S, Rappaport E, Attiyeh E, Mosse Y, Shue D, Seiser E, Jagannathan J, Shusterman S, Bansal M, Khazi D, Winter C, Okawa E, Grant G, Cnaan A, Zhao H, Cheung NK, Gerald W, London W, Matthay KK, Brodeur GM, Maris JM (2006) Integrative genomics identifies distinct molecular classes of neuroblastoma and shows that multiple genes are targeted by regional alterations in DNA copy number. *Cancer Res* 66: 6050-6062
- Warnecke PM, Biniszkiwicz D, Jaenisch R, Frommer M, Clark SJ (1998) Sequence-specific methylation of the mouse H19 gene in embryonic cells deficient in the Dnmt-1 gene. *Dev Genet* 22: 111-121
- Watrin F, Le Meur E, Roeckel N, Ripoche MA, Dandolo L, Muscatelli F (2005) The Prader-Willi syndrome murine imprinting center is not involved in the spatio-temporal transcriptional regulation of the Necdin gene. *BMC Genet* 6: 1
- Weiss MJ, Guo C, Shusterman S, Hii G, Mirensky TL, White PS, Hogarty MD, Rebbeck TR, Teare D, Urbanek M, Brodeur GM, Maris JM (2000) Localization of a hereditary neuroblastoma predisposition gene to 16p12-p13. *Med Pediatr Oncol* 35: 526-530
- Weiss WA, Aldape K, Mohapatra G, Feuerstein BG, Bishop JM (1997) Targeted expression of MYCN causes neuroblastoma in transgenic mice. *EMBO J* 16: 2985-2995
- White PS, Thompson PM, Seifried BA, Sulman EP, Jensen SJ, Guo C, Maris JM, Hogarty MD, Allen C, Biegel JA, Matise TC, Gregory SG, Reynolds CP, Brodeur GM (2001) Detailed molecular analysis of 1p36 in neuroblastoma. *Med Pediatr Oncol* 36: 37-41
- Wilkins-Haug L (2009) Epigenetics and assisted reproduction. *Curr Opin Obstet Gynecol* 21: 201-206
- Witzgall R, O'Leary E, Leaf A, Onaldi D, Bonventre JV (1994) The Kruppel-associated box-A (KRAB-A) domain of zinc finger proteins mediates transcriptional repression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 4514-4518
- Wright JH (1910) NEUROCYTOMA OR NEUROBLASTOMA, A KIND OF TUMOR NOT GENERALLY RECOGNIZED. *J Exp Med* 12: 556-561
- Wu H, Zhang S, Qiu W, Zhang G, Xia Q, Xiao C, Huang X, Huang M, Agen P, Fan T, Yang J, Milunsky A (2001) Isolation, characterization, and mapping of a novel human KRAB zinc finger protein encoding gene ZNF463. *Biochim Biophys Acta* 1518: 190-193
- Yan LX, Huang XF, Shao Q, Huang MY, Deng L, Wu QL, Zeng YX, Shao JY (2008) MicroRNA miR-21 overexpression in human breast cancer is associated with advanced clinical stage, lymph node metastasis and patient poor prognosis. *RNA* 14: 2348-2360
- Yang J, Mani SA, Donaher JL, Ramaswamy S, Itzykson RA, Come C, Savagner P, Gitelman I, Richardson A, Weinberg RA (2004) Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. *Cell* 117: 927-939
- Yang Q, Olshan AF, Bondy ML, Shah NR, Pollock BH, Seeger RC, Look AT, Cohn SL (2000) Parental smoking and alcohol consumption and risk of neuroblastoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 9: 967-972



Ye G, Fu G, Cui S, Zhao S, Bernaudo S, Bai Y, Ding Y, Zhang Y, Yang BB, Peng C (2011) MicroRNA 376c enhances ovarian cancer cell survival by targeting activin receptor-like kinase 7: implications for chemoresistance. *J Cell Sci* 124: 359-368

Yevtodiyenko A, Carr MS, Patel N, Schmidt JV (2002) Analysis of candidate imprinted genes linked to Dlk1-Gtl2 using a congenic mouse line. *Mamm Genome* 13: 633-638

Zhang C, Wang C, Chen X, Yang C, Li K, Wang J, Dai J, Hu Z, Zhou X, Chen L, Zhang Y, Li Y, Qiu H, Xing J, Liang Z, Ren B, Yang C, Zen K, Zhang CY (2010) Expression profile of microRNAs in serum: a fingerprint for esophageal squamous cell carcinoma. *Clin Chem* 56: 1871-1879

Zhang L, Volinia S, Bonome T, Calin GA, Greshock J, Yang N, Liu CG, Giannakakis A, Alexiou P, Hasegawa K, Johnstone CN, Megraw MS, Adams S, Lassus H, Huang J, Kaur S, Liang S, Sethupathy P, Leminen A, Simossis VA, Sandaltzopoulos R, Naomoto Y, Katsaros D, Gimotty PA, DeMichele A, Huang Q, Butzow R, Rustgi AK, Weber BL, Birrer MJ, Hatzigeorgiou AG, Croce CM, Coukos G (2008a) Genomic and epigenetic alterations deregulate microRNA expression in human epithelial ovarian cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 7004-7009

Zhang R, Wang YQ, Su B (2008b) Molecular evolution of a primate-specific microRNA family. *Mol Biol Evol* 25: 1493-1502

Zhang Y, Reinberg D (2001) Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails. *Genes Dev* 15: 2343-2360

Zhou Y, Cheunsuchon P, Nakayama Y, Lawlor MW, Zhong Y, Rice KA, Zhang L, Zhang X, Gordon FE, Lidov HG, Bronson RT, Klibanski A (2010) Activation of paternally expressed genes and perinatal death caused by deletion of the Gtl2 gene. *Development* 137: 2643-2652

Zhu XM, Han T, Sargent IL, Yin GW, Yao YQ (2009) Differential expression profile of microRNAs in human placentas from preeclamptic pregnancies vs normal pregnancies. *Am J Obstet Gynecol* 200: 661-667

Zhu Y, Parada LF (2002) The molecular and genetic basis of neurological tumours. *Nat Rev Cancer* 2: 616-626



## **RESUME**

Le neuroblastome, tumeur embryonnaire d'origine neuro-ectodermique, représente, après les tumeurs cérébrales, la tumeur maligne la plus préoccupante de l'oncologie pédiatrique. L'extrême hétérogénéité des tumeurs neuroblastiques conduit d'une part, à rechercher les mécanismes de son oncogenèse, d'autre part, à améliorer la prédiction du risque de gravité, au diagnostic de la maladie.

Le travail de thèse a consisté, à l'aide d'une cohorte tumorale de patients et de lignées de neuroblastome, à rechercher les microARN impliqués dans la progression tumorale. En comparant des tumeurs de bas risque à celles de haut risque, plusieurs microARN du cluster C14MC, situés au locus 14q32.31, ont été identifiés. L'expression de ces microARN corrèle le pronostic ; les tumeurs de haut risque présentant une perte d'expression différentielle. Ainsi, l'expression de miR-487b et miR-410 s'est révélée être un facteur pronostique supérieur à l'algorithme de risque standard actuel (âge, stade, statut de l'amplification de l'oncogène *N-MYC*). Le contexte d'empreinte génomique parentale du cluster C14MC a conduit à rechercher d'autres microARN d'intérêt sur le second cluster de microARN du génome, C19MC, lui aussi soumis à empreinte. Dans les tumeurs de haut risque, une hyper-expression relative du miR-516a-5p est significativement associée au pronostic. La combinaison des niveaux d'expression de miR-487b et miR-516a-5p se révèle être un facteur pronostique supérieur aux seuls microARN du cluster C14MC : elle offre une nouvelle stratification de risque.

Dans les tumeurs neuroblastiques, la dérégulation d'expression serait circonscrite aux microARN des deux clusters C14MC et C19MC ainsi qu'aux gènes vicinaux *DLK1* et *MEG3* du locus 14q 32.31, elle résulterait d'anomalies de méthylation. Le traitement de lignées de neuroblastome de phénotype neuronal par des modulateurs de l'épigénome (5-Azacytidine et acide phényl-butyrique) lève l'expression des microARN du C14MC et des gènes *DLK1* et *MEG3*. Quant aux gènes cibles des miR-487b et miR-516a-5p, les recherches désignent les gènes *N-MYC*, *TWIST1* et *TWIST2* comme candidats directs ou indirects. Ces résultats et la littérature – rapportant, dans les formes agressives de plusieurs types de cancers de l'adulte, des anomalies d'expression des microARN des clusters C14MC (hypo-expression) et C19MC (hyper-expression) – suggèrent très fortement l'implication de ces deux clusters dans la carcinogenèse humaine.

## **MOTS-CLEFS**

neuroblastome / microARN / empreinte parentale / pronostic / progression tumorale

---

## **ABSTRACT**

Neuroblastoma, an embryonal tumour of neuro-ectodermal origin, stands up with brain tumours as the most worrying cancer of paediatric oncology. The huge heterogeneity of neuroblastic tumours has led i) to find oncogenic mechanisms, and ii) to refine risk stratification of the disease.

In using a tumour cohort of patients as well as human NB lines, we sought for microRNA involved in neuroblastoma tumour progression. Comparison of tumours of low-risk to those of high-risk resulted to identifying several microRNA composing the C14MC cluster (located within the 14q32.31 locus), whose expression was associated with prognosis; high risk tumours having a differential lower transcript level. Expression of miR-487b and miR-410 was a better prognostic factor than the standard algorithm based on age, stage, and *N-MYC* genomic content status. As the C14MC cluster belongs to a imprinted locus, the second cluster of microRNAs so far described in the human genome as imprinted, *i.e.*, the C19MC, was analysed: in high-risk neuroblastoma, miR-516a-5p transcript level was differentially up-regulated (contrasting to microRNAs from C14MC) and was also associated with prognosis. Combination of transcript levels of miR-487b and miR-516a-5p provides a powerful prognostic factor better than only miR expression from C14MC. Therefore, new risk stratification has been proposed.

In neuroblastoma, tumour expression deregulation found to be restricted to C14MC and C19MC as well as the *DLK1* et *MEG3* harboured by the 14q32.31 locus, should result from methylation anomalies. Epigenetic modulators (5-AZA and PBA) resulted in a significant increase of miR from C14MC as well as *DLK1* and *MEG3* genes. With regards to target genes, our results point out *N-MYC*, *TWIST1* and *TWIST2* as direct or indirect targets of miR-487b & miR-516a-5p. Our data and literature – indicating relative under-expression of C14MC microRNAs and hyper-expression of C19MC microRNAs in aggressive forms of various adult cancers – thus stress the potential involvement of the two clusters in human carcinogenesis.

## **KEY WORDS**

neuroblastoma / microARN / parental imprinting / prognosis / tumor progression