



Etude des petits ARNs extracellulaires pour le diagnostic de cancer du rein à cellules claires

An Zhao

► To cite this version:

An Zhao. Etude des petits ARNs extracellulaires pour le diagnostic de cancer du rein à cellules claires. Médecine humaine et pathologie. Ecole Nationale Supérieure des Mines de Saint-Etienne, 2013. Français. NNT : 2013STET007T . tel-00999237

HAL Id: tel-00999237

<https://theses.hal.science/tel-00999237>

Submitted on 24 Jun 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.

THESE

Présentée devant l'Université Jean Monnet – Saint-Etienne
École Doctorale - Sciences, Ingénierie, Santé

Pour l'obtention du
DIPLOME DE DOCTORAT

Discipline : Recherche clinique Innovation technologique Santé publique

Par **An ZHAO**

**ETUDE DES PETITS ARNs EXTRACELLULAIRES
POUR LE DIAGNOSTIC DE CANCER DU
REIN A CELLULES CLAIRES**

Présentée et soutenue le 05 juillet 2013

Jury :

Dr. Bernard ESCUDIER	Président du Jury
Dr. Alain DOUCET	Rapporteur
Pr. Jean-Jacques PATARD	Rapporteur
Pr. Guorong LI	Examineur
Pr. Nicolas MOTTET	Examineur
Pr. Christian GENIN	Directeur de Thèse

REMERCIEMENTS

Je remercie le Professeur Christian GENIN pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et pour avoir encadré ce travail.

Je remercie vivement le Docteur Bernard ESCUDIER pour sa disponibilité et pour avoir accepté d'être le président du jury de ma thèse.

J'adresse mes remerciements à l'ensemble des membres du jury pour l'intérêt qu'ils ont porté à ce travail, le Docteur Alain DOUCET et le Professeur Jean-Jacques PATARD pour avoir accepté la charge de rapporteur.

Je remercie également le Professeur Nicolas MOTTET et le Professeur Guorong LI pour leurs conseils et leur appui dans la rédaction de cette thèse.

Je remercie le Professeur Michel PEOC'H et les Pathologistes pour m'avoir fourni les résultats des examens anatomo-pathologiques des tumeurs.

Je remercie les techniciennes et techniciens, notamment David LAURENT pour son aide et sa gentillesse, et Françoise DUPLAT et Pascale SABY pour leur disponibilité constante envers des étudiants.

Je remercie également le Comité de la Loire de la Ligue Nationale Contre le Cancer pour son soutien financier.

Et pour finir, je remercie mes parents, ma famille et mes amis qui m'ont toujours encouragé et soutenu moralement.

ABBREVIATIONS

ADN: Acide Désoxyribonucléique

ADNc: ADN complémentaire

AKT: Protein Kinase B

ARN: Acide Ribonucléique

ARNm: ARN messenger

BAK1: Bcl2 Antagonist/Killer 1

BET: Bromure d'éthidium

CA: Anhydrase Carbonique

CXCR4: Chemokine Receptor type 4

CHU: Centre Hospitalier Universitaire

ccRCC: carcinome Rénal à Cellules Conventionnelles (cellules claires)

chRCC: carcinome Rénal Chromophile

cpRCC: carcinome rénal tubulo-papillaire:

ZEB1,2: Zinc finger E-box Binding homeobox 1,2

FCM: Cytométrie en flux

FNA: Fine Needle Aspiration (Aspiration à l'aiguille fine)

GAPDH: Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

HIF: Hypoxia Inducible Factor

IRM: résonance magnétique nucléaire

miARN: microARN:

mTOR: The mammalian target of rapamycin

PCR: Polymerase Chain Reaction

PDCD4: Programmed cell death 4

pVHL: von Hippel Lindau protein

PKCz: The z isotype of protein kinase C

PI3: Phosphatidylinositide 3-kinases

PTEN: Phosphatase and tensin homologue

RISC: Le complexe RNA-induced silencing

RT: Transcription inverse

SDF-1: Stromal cell derived factor-1

TNM: Tumeur primitive (T), ganglions lymphatiques régionaux (N), Métastases à distance (M)

TEM: Epithélio-mésenchymateuse

TPM1: tropomyosin 1

TGFb: Transforming growth factor beta

UIV: Urographie Intraveineuse

VHL: Von Hippel-Lindau

VEGF: Vascular Endothelial Growth Factor

VEGFR: Vascular Endothelial Growth Factor Receptor

RCC: carcinome à cellules rénales

ROC: Receive Operating characteristic Curve

TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS	1
ABREVIATIONS	2
PARTIE BIBLIOGRAPHIQUE.....	7
INTRODUCTION	8
LE CANCER DU REIN.....	10
1. <i>Epidémiologie.....</i>	<i>10</i>
A. Fréquence.....	10
B. Facteurs de risque	11
2. <i>Anatomie pathologique</i>	<i>13</i>
A. Les carcinomes à cellules rénales (RCC) de l'adulte.....	13
B. Les autres tumeurs du rein	15
3. <i>Pronostic.....</i>	<i>17</i>
A. Le type histologique	17
B. Le stade pTNMx.....	17
C. Le grade de Führman.....	17
D. Ploïdie et prolifération cellulaire	18
E. L'infiltration vasculaire.....	18
LES MARQUEURS	19
1. <i>Les gènes marqueurs connus</i>	<i>19</i>
A. VEGF.....	19
B. CA.....	21
C. CXCR4.....	23
2. <i>Les nouveaux marqueurs : les microARNs.....</i>	<i>24</i>
A. La biog�nese des miARN.....	24
B. Les MiARNs et le Cancer	25
C. Les miARNs : marqueurs potentiels.....	26
3. <i>La signification clinique des miARNs.....</i>	<i>29</i>

A.	Les MiARNs comme marqueur biologique	29
B.	Le potentiel thérapeutique des miARNs	30
LA RECHERCHE DE MARQUEURS MOLECULAIRES CIRCULANTS		32
1.	<i>La source des molécules circulantes</i>	<i>32</i>
A.	ARN circulants	32
B.	MicroARNs circulants.....	32
2.	<i>La valeur diagnostique et pronostique des miARNs circulants pour les cancers.....</i>	<i>35</i>
A.	Les MiARNs circulants dans le RCC	35
B.	Les MiARNs circulants dans les autres cancers	35
PARTIE EXPERIMENTALE		37
MATERIELS ET METHODES		38
1.	<i>Matériels.....</i>	<i>38</i>
A.	Patients et témoins sains	38
B.	Collecte des échantillons	38
2.	<i>Méthodes.....</i>	<i>39</i>
A.	Extraction de l'ARN (Protocole RNeasy Mini Kit).....	39
B.	Extraction de l'ARN et du miARN (Protocole miRNeasy micro Kit).....	39
C.	Transcription inverse (Protocole MiScript)	40
D.	RT-PCR one-step	40
E.	PCR traditionnelle.....	40
F.	PCR quantitative (protocole SYBR Green)	41
G.	Electrophorèse	41
H.	Étude de la stabilité de l'ARN circulant dans les urines.	41
I.	Mesure de l'intégrité de l'ARN circulant dans les urines	42
J.	Analyse statistique	42
RESULTATS		44
ARTICLE 1		44
ARTICLE 2		51
ARTICLE 3		75

DISCUSSION.....	102
1. <i>MiARNs.....</i>	<i>102</i>
2. <i>ARNm</i>	<i>106</i>
3. <i>L'intérêt d'un marqueur biologie dans le cancer du rein.....</i>	<i>109</i>
CONCLUSION.....	111
PERSPECTIVE	112
REFERENCES	115
ANNEXES	129
ANNEXE 1	130

Partie bibliographique

INTRODUCTION

Le cancer du rein (CR) est en augmentation croissante dans les pays développés. Il est au 7^{ème} rang chez l'homme et au 9^{ème} rang chez la femme soit 2% de l'ensemble des cancers. L'incidence en Europe est de 12/100.000 chez l'homme et de 5,7/100.000 chez la femme. En France, le nombre est passé de 17,9 cas pour 100 000 habitants, soit 8300 nouveaux cas par an. Sur l'ensemble des patients, deux tiers d'entre eux sont des hommes. Le cancer rénal n'est plus considéré comme une maladie univoque. C'est une pathologie qui est hétérogène du point de vue morphologique et histologique. Sur des bases anatomopathologiques, on définit l'existence de différents types de cancer du rein : tout d'abord, le carcinome à cellules conventionnelles (environ 80%), le CR papillaire (15%), le CR chromophile (5%) et l'oncocytome rénal (5%). La CR à cellule claire (ccRCC) est la forme la plus agressive, mais aussi la plus fréquente.

Le diagnostic de tumeur rénale repose actuellement sur l'imagerie (TDM rénal) et sur l'histologie (biopsie pré-opératoire). Dans de nombreux cas, en particulier chez les patients de moins de 70 ans et sans co-morbidités majeures, il n'est pas réalisé de biopsie et la décision opératoire est prise sur la seule base de l'imagerie. Ceci est dû au fait que d'une part, une tumeur bénigne peut croître en taille et compromettre la possibilité d'une chirurgie conservatrice et d'autre part que, dans les volumineuses tumeurs hyper-vascularisées au scanner, la probabilité que la tumeur soit maligne est proche de 100%. Il en est de même en cas d'extension locorégionale ou de métastases à distance. On réserve donc la biopsie aux seules situations où on pense qu'elle est de nature à changer la décision thérapeutique. Il devrait en être de même pour tout test diagnostique car l'imagerie est de toute façon indispensable avant la chirurgie (stratégie chirurgicale) ou avant un traitement général (bilan d'extension, définition des cibles). Cependant, l'imagerie n'est pas capable de faire la distinction entre les tumeurs bénignes et les tumeurs malignes et entre les sous-types histologiques de carcinome à cellules claires qui est le plus fréquent. Il n'existe pas dans le cancer rénal de marqueur comme la PSA dans le cancer de la prostate ou la Foetoprotéine et l'HCG dans le cancer du testicule.

Les marqueurs moléculaires et/ou génétiques sont utilisables en pratique diagnostique et thérapeutique. En ce qui concerne le cancer rénal, de nombreux groupes dont le nôtre ont décrit des marqueurs moléculaires, comme VEGF, CA9 et CXCR4 (Furusato *et al*, 2010; Jacobsen *et al*,

2000; Li *et al*, 2006). Cependant, l'identification d'un marqueur utilisable en pratique clinique est toujours une mission difficile malgré l'avancée de la biologie moléculaire. Un marqueur tumoral idéal devrait être détecté facilement, être fiable, peu coûteux, et peu invasif avec de bonnes sensibilités et spécificités.

Les miARNs sont considérés comme des régulateurs des cellules, et ils jouent un rôle important dans le développement des tumeurs (Cho, 2007). Dans le cancer du rein, il a été établi que de nombreux miARNs sont induits par l'hypoxie comme miR-21, miR-210, miR-155 etc. (Giannakakis *et al*, 2008). Il a été montré aussi que certains miRNAs comme miR-200 et miR-141 sont sous-régulés dans le cancer rénal (Park *et al*, 2008). Ces miARNs à effet oncogène ou suppresseur sont des marqueurs potentiels pour diagnostiquer le cancer rénal.

La présence d'acides nucléiques extracellulaires dans le flux circulatoire a été rapportée pour la première fois par Mandel et Métais en 1948. Ils ont montré que les acides nucléiques pouvaient être détectés dans le sang périphérique de sujets malades et sains. Pour la suite, Mitchel et al (Mitchell et al, 2008), ont rapporté que les miRNAs existent dans le sang périphérique, et sont à l'origine du cancer. Plus récemment, il a été démontré que la détection des acides nucléiques libres dans les urines est possible (Casadio *et al*, 2012). Un diagnostic ou un suivi basé sur un simple examen sanguin (sérum/plasma) ou urinaire recherchant ou dosant un marqueur spécifique de tumeur serait de très loin préférable pour les patients et les spécialistes du cancer.

Dans cette thèse, je me suis concentré sur la recherche des marqueurs mARNs ou miARNs dans les liquides biologiques (sérum, plasma, urine) pour le cancer du rein à cellules claires. Cette étude est divisée en deux parties: (1) la mesure de l'expression des mARNs et miARNs sélectifs dans le sérum de patients avec ccRCC et de sujets contrôle. (2) la recherche de la stabilité et de l'intégrité des mARNs et miARNs dans l'urine, et c'est la première étude qui présente la détection significative des miARNs dans l'urine de patients avec ccRCC.

Le cancer du rein

1. *Epidémiologie*

A. *Fréquence*

Il s'agit du troisième cancer urologique après ceux de la prostate et de la vessie. Son incidence est en constante augmentation (2% à 4% par an). Chaque année dans le monde, 200000 nouveaux cas de cancer du rein sont diagnostiqués et le nombre de décès est estimé à 100000 selon les données statistiques les plus récentes (Clark, 2007). Le sexe ratio est de 2 hommes pour 1 femme, et si les taux d'incidence sont respectivement de 11,9 pour 100000 chez l'homme et 5,1 pour 100000 chez la femme, ils varient considérablement d'un pays à l'autre dans les pays industrialisés (Levi *et al*, 2008). En Europe, par exemple, le taux d'incidence varie de 21,7 pour 100000 chez les hommes et 10,3 chez les femmes en République tchèque, contre 6,8 pour 100000 chez les hommes et 4,2 pour 100000 chez les femmes en Suède (Levi *et al*, 2008). Aux Etats-Unis, où les taux d'incidence sont très élevés, on estime qu'il y a eu 40430 nouveaux cas en 2013 chez l'homme et 24720 nouveaux cas chez la femme (Siegel *et al*).

En France, on estime qu'il y a eu 7949 nouveaux cas en 2005 dont 64 % chez l'homme. Le cancer du rein représente 3% de l'ensemble des tumeurs malignes de l'adulte et se situe par sa fréquence au 7^{ème} rang chez l'homme et au 9^{ème} rang chez la femme. Ce cancer se situe au 13^{ème} rang des décès par cancer en France (3607 décès dont 65 % chez l'homme) et représente 2,4 % de l'ensemble des décès par cancer. Les taux français sont proches de ceux observés en Europe du nord. L'Irlande présente des taux notablement inférieurs à ceux des autres pays européens. L'Italie et la Suisse ont un taux d'incidence supérieur. Sur les différents continents, la tendance générale est à l'augmentation de l'incidence quelque soit les régions, les groupes ethniques ou le sexe. Les progrès de l'imagerie médicale peuvent expliquer ce type d'évolution.

B. Facteurs de risque

B.1) Facteurs de risque génétiques

La très grande majorité des cancers du rein à cellules claires sont des formes sporadiques. La forme familiale la plus fréquente est la maladie de Von-Hippel-Lindau (VHL). Cependant, ces formes familiales sont rares et représentent un pourcentage faible des cancers à cellules claires diagnostiqués chaque année. Elles sont plus précoces que les formes sporadiques. Dans cette maladie autosomique dominante, la genèse des tumeurs rénales est liée à une ou des mutations du gène VHL, localisé sur le chromosome 3 (Mathew *et al*, 2002).

Par ailleurs, des mutations de ce gène sont également retrouvées dans une proportion importante des patients développant une forme sporadique de cancer rénal à cellules claires. Cependant, selon les experts, les facteurs de risque d'origine génétique responsables de ces formes restent à identifier.

B.2) Facteurs de risque liés aux comportements individuels

A l'heure actuelle, en dehors de ces formes familiales et en dehors de l'âge et du sexe masculin, quatre facteurs de risque peuvent être considérés comme présentant un lien de causalité avec la survenue d'un cancer du rein.

a) Le tabac

Le tabac est considéré comme une cause de risque du carcinome à cellules claires par l'Agence International de la Recherche sur le cancer. Ce facteur étiologique ne concerne que l'homme. Par rapport aux personnes n'ayant jamais fumé, le risque est augmenté approximativement de 50% chez l'homme fumeur et 20% chez la femme fumeuse. L'arrêt du tabac s'accompagne d'une diminution linéaire du risque de cancer du rein, mais vingt ans paraissent nécessaires pour la récupération du risque normal (Dhote *et al*, 2000; Kume *et al*, 2001).

b) L'obésité

L'excès de poids est considéré comme une cause pour plus de 40% de carcinomes à cellules claires aux États-Unis et plus de 30% en Europe (Chow *et al*, 1996). L'influence du surpoids et de

l'obésité semble se confirmer tant chez l'homme que chez la femme avec une majoration du risque relatif essentiellement chez la femme qui est trois fois plus élevé chez la femme obèse. Les cancers du rein de l'obèse ne sont cependant pas diagnostiqués à des stades plus avancés que dans la population de poids normal (Chow *et al*, 1996).

c) L'hypertension

L'hypertension serait une cause de certains types de tumeur rénale. L'hypertension artérielle ne serait pas un facteur étiologique indépendant du cancer du rein, souvent il existe un lien entre l'index de la masse corporelle et l'élévation des chiffres de la tension. Lorsque ces deux éléments sont présents, le risque relatif du cancer du rein est estimé à 1,9 chez l'homme et de 3,2 chez la femme (Flaherty *et al*, 2005). Le mécanisme par lequel l'hypertension est responsable du carcinome à cellules claires n'est pas connu.

2. Anatomie pathologique

A. Les carcinomes à cellules rénales (RCC) de l'adulte

Les cancers du rein sont des proliférations tumorales malignes du parenchyme rénal dont la forme la plus fréquente est le carcinome à cellules rénales qui représente 85% des cas. Il est le plus souvent sporadique. Il existe aussi des formes familiales. Le carcinome à cellules rénales est un adénocarcinome. Il peut naître à partir des cellules épithéliales du tube contourné ou du tube collecteur, donnant des expressions histologiques différentes. (Figure 1)

A.1) Carcinome rénal à cellules conventionnelles ou cellules claires (ccRCC)

Il représente 60 % à 80 % des cancers du rein. L'origine des cellules tumorales est l'épithélium du tube contourné proximal. Il touche deux hommes pour une femme et survient avec un pic d'incidence entre 60 et 70 ans. Il s'associe à une délétion du bras court du chromosome 3p25-26 (la maladie de VHL) et même dans les formes sporadiques, les altérations génétiques concernent le plus souvent le chromosome 3p (Dimopoulos *et al*, 1996).

Il s'agit le plus souvent de tumeurs de taille volumineuse (8 cm en moyenne). Cette tumeur se répartit uniformément au sein du parenchyme rénal sans localisation préférentielle. La tumeur est typiquement sphérique et comporte parfois de petits nodules satellites en contiguïté ou à distance de la tumeur principale. La surface de la tumeur est lisse, brillante, souvent parcourue par un fin lacis veineux. A la coupe, la couleur jaune-chamois est caractéristique. La tumeur peut être de nature kystique avec un contenu clair ou hémorragique, elle peut atteindre la capsule rénale voire envahir la graisse péri-rénale. La tumeur peut s'étendre à l'artère rénale, plus rarement à la veine cave inférieure.

Sur le plan histologique, il s'agit d'un adénocarcinome constitué d'une prolifération acineuse de cellules au cytoplasme clair, optiquement vide. La cellule claire qui constitue la prolifération est de grande taille, de forme polygonale, avec un noyau central et un cytoplasme chargé de glycogène et de lipides à l'examen ultra-structural. Certains carcinomes à cellules claires sont composés de plusieurs types cellulaires: cellules claires, éosinophiles, voire fusiformes. Les

carcinomes à cellules claires sont les plus fréquents. Le type cellulaire a une valeur pronostique. En effet, les tumeurs constituées de plus de 75% de cellules claires ont un meilleur pronostic à stade et à grade identiques, que les tumeurs à cellules éosinophiles ; les tumeurs à cellules fusiformes ayant un pronostic encore plus péjoratif.

A.2) Carcinome tubulo-papillaire (cpRCC)

Il s'agit de tumeurs développées à partir du tube contourné distal représentant 10 à 15% des cancers du rein. Les altérations génétiques les plus fréquemment observées dans ce groupe de tumeurs sont la perte du chromosome Y et une trisomie des chromosomes 7 et 17. Il est composé de 2 types: type I (75 %) souvent multifocal et de bas grade, constitué de petites cellules basophiles et le type II unifocal et de haut grade, constitué de grandes cellules éosinophiles.

A.3) Carcinome à cellules rénales chromophobes (chRCC)

Il représente 4 à 7 % des cancers du rein. Il est caractérisé par une perte des chromosomes 1, 2 ou 13 et par une perte du bras court du chromosome 3 dans 50% des cas. Il se développe à partir des cellules intercalaires de type B du tube collecteur.

A.4) Oncocytomes

Il représente 5% des carcinomes à cellules rénales. Cette tumeur se développe à partir des cellules intercalaire de type A du tube collecteur. Il existe peu d'anomalies génétiques rapportées, à l'exception des pertes des chromosomes 1, 14 et 19. En fait, le développement de l'oncocytome serait associé à un anome caractéristique de la structure de l'ADN mitochondon.

A.5) Carcinome des tubes collecteurs (Bellini) et carcinome médullaire du rein (tcRCC)

Il s'agit de tumeurs de très mauvais pronostic représentant moins de 1 % des cancers du rein et touchant l'homme jeune. D'un point de vue génétique, les monosomies 18 et 21 et la perte du chromosome Y sont les anomalies prédominantes. Des délétions au niveau du bras long du

chromosome 1 et du bras court du chromosome 8 ont été décrites. C'est un diagnostic d'exclusion.

A.6) Carcinome à cellules rénales inclassables:

5 % des CCR que l'analyse morphologique seule ne peut typer.

B. Les autres tumeurs du rein

B.1) Les tumeurs malignes

a) Les tumeurs primitives neuro-ectodermiques

Il s'agit de tumeurs rares incluant les tumeurs carcinoïdes et les carcinomes à petites cellules que l'on regroupe actuellement sous le terme de Primitive Neuro Ectodermic Tumor (PNET).

b) Les sarcomes

Il s'agit de tumeurs malignes mésenchymateuses qui représentent environ 1% de l'ensemble des tumeurs malignes du rein chez l'adulte.

c) Les lymphomes

Le diagnostic ne peut être établi qu'après avoir exclu un envahissement rénal et rétropéritonéal par un lymphome malin non Hodgkinien.

d) Les tumeurs de l'enfant chez l'adulte

Il s'agit essentiellement du néphroblastome, de la tumeur rhomboïde et du sarcome à cellules claires.

e) Les tumeurs secondaires du rein

Il s'agit le plus souvent de métastases bilatérales (70%). Les cancers primitifs responsables de métastases rénales sont les carcinomes bronchiques, digestif, mammaire, du col utérin, du pancréas, de la prostate, du testicule et le mélanome.

B.2) Les tumeurs bénignes

a) Les tumeurs bénignes épithéliales

Ce sont les adénomes et les tumeurs de l'appareil juxta-glomérulaire.

b) *Les tumeurs bénignes mésenchymateuses*

Il s'agit de tumeurs conjonctives qui sont peu différentes de celles observées dans les tissus mous.

c) *L'angiomyolipome*

C'est la plus fréquente des tumeurs solides bénignes du rein. Il s'agit d'une lésion pluritissulaire qui contient en proportions variables des vaisseaux anormaux, des cellules musculaires lisses et du tissu adipeux mature. La présence de graisse qui n'est pas habituelle est évocatrice d'un choristome et non d'un halartome. Cette lésion intéresse la femme jeune avec une tumeur unique et isolée dans 90% des cas.

d) *Le fibrome de la médullaire rénale*

Il est de couleur blanchâtre et se développe sous forme de petits nodules au niveau des papilles.

e) *Le léiomyome*

Il est de couleur blanchâtre également, de consistance ferme, situé en position sous-capsulaire.

f) *Le lipome*

g) *L'hémangiome*

h) *Le lymphangiome*

i) *Le néphrome mésoblastique*

3. *Pronostic*

A. *Le type histologique*

Le pronostic du cancer du rein dépend du type histologique de la tumeur: le carcinome à cellules chromophobes est de meilleur pronostic que le carcinome à cellules claires. Les tumeurs sarcomatoïdes et les carcinomes des tubes collecteurs de Bellini ont un pronostic péjoratif.

B. *Le stade pTNMx*

Ce système de classification, établi par l'International Union Against Cancer, est à l'heure actuelle le plus couramment utilisé et l'un des plus fiables et précis pour déterminer les facteurs de pronostic de survie des patients atteints de RCC. Appelé p (pour pathological) Tumor Node Metastasis (TNM), il est établi à partir de l'examen anatomopathologique qui permet de classer les tumeurs en stade allant de pT1 à pT4, où le T correspond à la tumeur primaire (taille de l'envahissement), N (Nx, N0, N1, N2) au nombre de ganglions régionaux et M (M0, M1) à l'existence ou non de métastases à distance.(Edge & Compton, 2010). (Tableau 1)

C. *Le grade de Führman*

Il s'agit d'un grade histologique pronostique indépendant du stade clinique basé sur l'atypie des noyaux du contingent cellulaire le plus atypique de la tumeur. Dans le grade de Führman, le type cellulaire et l'architecture tumorale ne sont pas pris en compte. Le grade de Führman dépend de 4 paramètres : la taille des noyaux (10-15-20 µm), les contours des noyaux (réguliers, irréguliers), la présence de nucléoles à différents grossissements (x 400, x 100) et la présence de cellules monstrueuses (grade IV). Le grade I est identifié par des noyaux ronds d'environ 10µm, réguliers avec un nucléole absent ou peu visible. Le grade II décrit des noyaux ronds d'environ 15 µm, peu réguliers avec un nucléole visible mais petit. Dans le grade III, les noyaux de 20 µm sont

irréguliers et possèdent un nucléole large et visible. Finalement, le grade IV est caractérisé par des noyaux de forme variable, multilobés, de plus de 20 µm avec un nucléole très visible. Le grade de Fuhrman possède une forte valeur pronostique. (Fuhrman *et al*, 1982). (Tableau 2)

D. Ploïdie et prolifération cellulaire

Plusieurs études ont évalué la ploïdie en cytométrie en flux dans le cancer du rein. La ploïdie est corrélée au grade de la tumeur mais pas à la survie des patients atteints d'un cancer localisé. Ces résultats sont expliqués par l'hétérogénéité des tumeurs rénales. Les marqueurs de prolifération cellulaire (Ki-67, AgNOR ou Mib-1) apparaissent corrélés au grade nucléaire et à la survie des patients dans des études rétrospectives (de Riese *et al*, 1993). Pour certains auteurs, le marqueur de prolifération Mib-1 serait un facteur pronostique supérieur au grade tumoral (Tannapfel *et al*, 1996).

E. L'infiltration vasculaire

L'infiltration vasculaire influence le pronostic du cancer du rein. En présence d'une infiltration vasculaire microscopique, la survie à 5 ans sans récurrence est de 35% et elle est de 90 % en l'absence d'infiltration vasculaire. Au stade métastatique, l'infiltration vasculaire microscopique est présente chez 80% des patients.

Les marqueurs

1. Les gènes marqueurs connus

A. VEGF

A.1) Structure

L'induction de l'angiogénèse est un mécanisme indispensable au développement des tumeurs au-delà de 1 à 2 cm de diamètre. Le VEGF (vascular endothelial growth factor) ou VEGF-A et les molécules apparentées (VEGF-C et le VEGF-D) sont de puissants facteurs pro-angiogéniques impliqués dans la croissance tumorale et la survenue de métastases. Leur voie de signalisation cellulaire, relayée par des récepteurs spécifiques (VEGFRs) à activité tyrosine kinase, est une des cibles principales des traitements anti-angiogéniques, une nouvelle stratégie thérapeutique qui connaît actuellement un essor majeur en cancérologie (Escudier; Escudier & Albiges, 2011; Patard *et al*, 2007).

Le VEGF (VEGF-A) est une glycoprotéine homodimérique dont le gène, cloné en 1989 (Keck *et al*, 1989; Leung *et al*, 1989) comprend 8 exons et code une forme longue de 206 acides aminés. Par épissage alternatif des exons 6 et 7, plusieurs transcrits sont générés et les peptides produits diffèrent par leur capacité de liaison à l'héparine et aux protéoglycanes de type héparine sulfate, composant de la matrice extra-cellulaire. On distingue les isoformes 189, 183, 165, 148, 145, 121, d'après le nombre d'acides aminés de la protéine mature prédite, auxquels s'est ajouté récemment le VEGF 162 (Lange *et al*, 2003). Une isoforme particulière, le VEGF 165b ne possède pas d'exon 8, remplacé par un 9^{ème} exon probable (Bates *et al*, 2002). (Figure 2)

A.2) Fonctions

Dans les carcinomes à cellules rénales de type conventionnel, la perte de fonction du gène VHL est un mécanisme-clé de l'angiogénèse tumorale potentialisant les effets de l'hypoxie sur le VEGF. Les conséquences des altérations du gène VHL sont de deux ordres: une activation de la

transcription du gène VEGF due à l'expression constitutive du facteur HIF, la levée de l'inhibition du facteur de transcription Sp1 (Mukhopadhyay *et al*, 1997) et une stabilisation des transcrits VEGF (Levy *et al*, 1996). Une étude très récente suggère que l'association de VHL à la protéine HuR favoriserait la dégradation des transcrits. A l'inverse, l'absence de VHL entraînerait comme l'hypoxie la stabilisation de l'ARN messager par fixation de HuR au 3'UTR (Datta *et al*, 2005).

A côté de la perte de fonction du gène suppresseur de tumeur, l'activation de l'oncogène ras, telle qu'elle a été montrée dans les cancers du rein (Fujita *et al*, 1988; Uchida *et al*, 1994) pourrait stimuler la production de VEGF. Ras induirait la transcription du gène VEGF par la voie de la protéine kinase C α (PKC α). Raf aussi bien que la PI3-kinase pourrait conduire à l'activation de la PKC α (Pal *et al*, 2001). Dans les tumeurs rénales, l'hypoxie, la perte de fonction de gènes suppresseurs de tumeurs comme VHL mais aussi PTEN (Brenner *et al*, 2002) et l'activation oncogénique de voies de signalisation cellulaires sont impliquées dans la surexpression du VEGF. Les deux voies Raf-MAPK et PI3-AKT/mTOR seraient impliquées dans l'activation du VEGF, en coopérant avec HIF, dont l'activité est elle-même augmentée par ces voies de signalisation et l'hypoxie (Mukhopadhyay & Datta, 2004). Il est toutefois important de considérer que ces mécanismes, démontrés *in vitro*, ne sont pas forcément fonctionnels *in vivo* au même stade du développement tumoral, ni dans les cellules elles-mêmes.

A.3) VEGF : un marqueur

Peu d'études de l'expression du VEGF dans les RCC sont disponibles; elles portent sur les isoformes solubles 121 et 165 du VEGF. Une alternative consisterait à doser les récepteurs VEGF2 solubles (Ebos *et al*, 2004). La concentration sérique du VEGF apparaît corrélée au pronostic dans des groupes prédéfinis par le grade et le stade (Jacobsen *et al*, 2000). La même équipe a montré une corrélation inverse entre le taux des transcrits et la concentration sérique de VEGF, avec une diminution des transcrits VEGF 121 dans les formes localement avancées par rapport aux formes métastatiques d'une part et aux formes localisées d'autre part (Ljungberg *et al*, 2003). Une telle diminution des taux de transcrits avait été également observée dans des carcinomes à cellules rénales à fort index mitotique (Hemmerlein *et al*, 2001). Ce phénomène

pourrait être lié à une activation de la traduction des formes 121 et 165 diminuant de moitié. L'intérêt actuel pour le VEGF circulant vient également de l'observation inattendue, chez la souris portant une tumeur implantée, d'une augmentation du VEGF plasmatique après traitement par un anticorps anti-VEGF2 à une dose préalablement déterminée comme optimale. Bien que le mécanisme en soit non précisé, cette élévation rapide et transitoire pourrait servir de marqueur afin de déterminer les doses optimales de tels traitements ciblés chez les patients (Bocci *et al*, 2004).

B. CA

B.1) Structure

Le CA, l'anhydrase carbonique, a été purifiée à partir de globules rouges en 1933 (Meldrum & Roughton, 1933). Jusqu'en 1994, cinq anhydrases carboniques ont été purifiées à partir de cellules procaryotes (Smith *et al*, 1999).

Il y a trois familles distinctes d'anhydrase carbonique (α , β et γ). Seule la famille α d'anhydrase carbonique se trouve dans les cellules de mammifères. La localisation cellulaire de la famille α de l'anhydrase carbonique se situe dans le cytosol (CA1, CA2, CA3, CA7, CA13), sur la membrane (CA4, CA9, CA12, CA14, CA15, CA16), dans les mitochondries (CA5) et elle peut être sécrétée (CA6).

B.2) Fonction-physiologie des CAs

L'anhydrase carbonique est une protéine enzymatique qui catalyse la réaction réversible d'hydratation du CO₂/ déshydratation de l'acide carbonique H₂CO₃: $\text{H}_2\text{O} + \text{CO}_2 \leftrightarrow \text{H}_2\text{CO}_3$ ($\text{HCO}_3^- + \text{H}^+$). CA9 et CA12 sont des protéines transmembranaires qui jouent un rôle dans la régulation de la prolifération cellulaire en réponse à des conditions hypoxiques et sont impliquées dans l'oncogenèse et la progression tumorale (Badger & Price, 1989). (Figure 3)

B.3) Détection de CA9 dans les cellules et les tissus

La protéine CA9 n'est pas exprimée dans le rein adulte normal, alors que la protéine CA12 est exprimée dans le tube contourné distal et les cellules intercalées du canal collecteur. Les protéines CA9 et CA12 sont exprimées dans les cellules rénales de CRCC. A l'inverse de CA12, CA9 n'est pas exprimée dans les cellules de CRCH et dans l'oncocytome rénal. La co-expression CA9-CA12 est parfois observée dans les cellules de CRTP. L'utilisation combinée de cette expression en immunohistochimie permettrait d'identifier ces sous-types de RCC (Ivanov *et al*, 2001).

La cytométrie en flux utilisant des anticorps monoclonaux peut détecter l'expression des antigènes de surface des cellules. Notre groupe a utilisé l'anticorps monoclonal G250 pour détecter cet antigène dans les lignées cellulaires humaines et dans les tissus rénaux normaux et malins. Les résultats ont montré que l'antigène G250/MN/CA9 est exprimé dans 100% des ccRCC, alors qu'il n'est pas exprimé dans les cellules de chRCC, le tissu rénal normal, et le sang de témoins sains (Li *et al*, 2001).

L'ARNm CA9 traduit l'activité du gène CA9. Sa détection se fait en biologie moléculaire par la méthode de « reverse transcription polymerase chain reaction » (RT-PCR). Notre groupe a mesuré l'ARNm CA9 dans le tissu tumoral de 50 patients présentant une tumeur rénale (30 ccRCCs, 9 cpRCCs, 5 chRCCs et 6 oncocytomes rénaux), dans 10 tissus rénaux normaux, et dans le sang de 10 témoins sains. Les résultats montrent la détection d'ARNm CA9 chez 97% des patients atteints de CRCC et chez 56% des patients atteints de cpRCC. L'ARNm CA9 n'est pas trouvé chez les patients atteints de chRCC et d'oncocytome rénal. De plus, l'ARNm CA9 n'est pas trouvé dans les tissus rénaux normaux et le sang de témoins sains (Li *et al*, 2003).

La cytologie par aspiration à l'aiguille fine (FNA, fine needle aspiration) des tumeurs rénales sous échographie ou tomодensitométrie est parfois utilisée pour le diagnostic préopératoire. Notre groupe a étudié 28 échantillons de FNA de patients présentant une tumeur rénale (19 ccRCCs, 7 cpRCCs, 2 chRCCs et 7 oncocytomes). La cytologie conventionnelle avait une sensibilité de 53% et une spécificité de 71%. Par la méthode RT-PCR, l'ARNm CA9 était trouvé dans 16/19 échantillons de patients atteints de ccRCC et dans 3/7 échantillons de patients atteints de cpRCC. L'ARNm CA9 n'était pas trouvé dans les échantillons de patients atteints de chRCC ou d'oncocytome rénal. La sensibilité de la RT-PCR était de 68% et la spécificité de 100 % pour

détecter la nature maligne de la tumeur rénale (Li *et al*, 2006). L'ARNm CA9 était plus performante que la cytologie pour le diagnostic pré-opératoire de ccRCC.

Li *et al* ont mesuré le niveau d'ARNm CA9 dans les tissus tumoraux de patients atteints de ccRCC. Les patients atteints de ccRCC de stade T1-T2 et / ou de grade Fühman I-II avaient un niveau d'ARNm CA9 plus élevé que ceux de stade T3 et / ou de grade Fühman III-IV. Les patients avec métastases viscérales et/ou ganglionnaires avaient un niveau d'ARNm CA9 moindre que les patients avec ccRCC localisé. L'ARNm CA9 peut compléter le stade TNM et le grade Fühman dans l'évaluation du risque métastatique du ccRCC (Li *et al*, 2007).

c. CXCR4

CXCR4 est un récepteur membranaire couplé aux protéines G de la famille des récepteurs de chimiokines. Il joue un rôle central dans plusieurs pathologies dont le cancer. Le récepteur CXCR4 est surexprimé dans un grand nombre de cancers dont ceux du colon, du sein, de la prostate, du poumon, de l'ovaire, du pancréas, du rein, du cerveau, des lymphomes, leucémies et dans le myélome multiple. Le ligand du récepteur CXCR4, Stromal-Derived Factor-1 (SDF-1) ou CXCL12 est sécrété en grande quantité par les cellules des ganglions lymphatiques, de la moelle osseuse, du foie, du poumon (Furusato *et al*, 2010; Richard & Blay, 2008).

Une étude de Wang (Wang *et al*, 2009b), prolongeant ses travaux sur lignées cellulaires par l'étude de tumeurs primitives et métastatiques de type adénocarcinome rénal à cellules claires, a retrouvé un marquage nucléaire qu'au sein des métastases. Une des hypothèses était que, après la fixation membranaire déclenchant une cascade rapide de signalisation, l'internalisation du complexe SDF-1-CXCR4, permettrait à la cellule d'acquérir de nouvelles propriétés favorisant sa migration.

2. Les nouveaux marqueurs: les microARNs

Les microARNs (miARNs) sont des molécules simple-brin d'environ 22 nucléotides qui ne codent pas de protéine mais jouent un rôle dans la régulation des ARNs (Lagos-Quintana *et al*, 2001) . Le premier miARN a été découvert en 1993 par Lee *et al*, qui ont trouvé qu'un ARN de 22 paires de bases (lin-4) peut se lier à la région 3' non traduite (3-UTR) de l'ARN messager (ARNm) et contrôler la transcription de l'ARNm dans *C. élégans*. Ils n'ont attiré l'attention qu'en 2001, lorsque le deuxième miARN (let-7) a été identifié. Ces petits ARNs moléculaires agissent de plusieurs façons dans la régulation de l'expression génique, par exemple en accélérant la dégradation des ARNm ou en bloquant leur traduction (Lagos-Quintana *et al*, 2001; Lau *et al*, 2001; Lee & Ambros, 2001; Ruvkun, 2001). Ensuite, l'étude de l'identification et de la fonction des miARNs a été appliquée au modèle humain. Actuellement, environ 600 miARNs humains ont été identifiés, mais on estime qu'il existe approximativement 1000 miARNs (Berezikov *et al*, 2005). Environ 8900 miARNs ont été publiés dans la database PubMed. Environ 3000 concernent le domaine de la cancérologie.

A. La biogenèse des miARN

La biogenèse des miARNs implique certains processus qui ne sont pas très clairs. Le processus essentiel est présenté dans la Figure 4, mais pour plus de détails, il faut se référer aux revues récentes (Pillai *et al*, 2007; Tang *et al*, 2008). Les miARNs sont transcrits dans le noyau des cellules par l'enzyme ARN polymérase II. Les transcrits appelés pri-miARNs comprennent une coiffe en 5', une queue poly-A et ont la forme d'une tige-boucle dont la structure est propice au clivage par des nucléases. Ils peuvent être transcrits seuls ou en groupe. Une fois que le miARN est transcrit, il est digéré par la nucléase Drosha et le produit intermédiaire appelé pré-miARN, molécule d'environ 70 nucléotides. Le pré-microARN a certaines caractéristiques typiques dont une séquence simple-brin de 1 à 4 nucléotides à son extrémité 3', une double hélice d'environ 30 nucléotides et des cycles internes de petite dimension. Le pré-microARN est ensuite transporté dans le cytoplasme par la molécule Exportine-5, molécule qui se lie seulement

aux pré-microARNs qui ont été correctement clivés. Dans le cytoplasme, le pré-miARN est reconnu par l'enzyme Dicer, une enzyme de la famille des RNases III. Cette dernière clive le pré-microARN en 20 nucléotides du site de clivage de l'enzyme Drosha et produit une molécule double-brins ayant une région simple-brin de 1 à 4 nucléotides à l'une ou l'autre de ses extrémités. Ce miARN mature interagit avec une protéine de la famille Argonaute (Ago1 ou Ago2) pour créer le complexe RNA-induced silencing complex (RISC). Au cours de la formation du RISC, il se produit un passage d'un miARN double-brins (miARNdb) à un miARN simple-brin (miARNsb). Seul le brin spécifique de l'ARNm cible du miARN est gardé au sein du complexe. L'ARNm-cible est chargé au sein du complexe RISC. Deux voies sont possibles: soit la dégradation de l'ARNm-cible si le complexe contient la protéine Ago2, soit la répression de la traduction de ce dernier si le complexe contient la protéine Ago1.

B. Les MiARNs et le Cancer

Les cancers se développent par étapes successives qui résultent de la croissance excessive de clones cellulaires dans un tissu. Ces étapes ont une origine génétique, liée à l'action de deux types de gènes, les oncogènes et les gènes suppresseurs de tumeur. Ces gènes contrôlent respectivement de manière positive et négative l'ensemble des réactions métaboliques impliquées dans la progression du cycle cellulaire. La caractéristique principale des cellules cancéreuses est d'être dépendante du profil d'expression génique anormal. Les progrès importants réalisés récemment dans la connaissance de ces altérations génétiques présentes dans les cellules cancéreuses ont été possibles par le développement de techniques telles que la cytogénétique et la biologie moléculaire. (Figure 5)

C. Les miARNs : marqueurs potentiels

C.1) Les onco-miARNs

Les miARNs induits par l'hypoxie

Il a été établi que de nombreux miARNs sont induits par la réponse HIF. Par exemple, l'expression de miR-210 est augmentée en condition d'hypoxie et peut réguler la protéine fer-soufre (Fe-S) qui est impliquée dans la chaîne respiratoire mitochondriale. Cela suggère un mécanisme potentiel de régulation de la respiration anaérobie dans les tumeurs (Chen *et al*, 2010; White & Yousef, 2010). MiR-210, qui est un puissant marqueur pronostique dans les carcinomes mammaires, peut aussi réguler l'hypoxie et le cycle cellulaire dans le cancer en agissant sur le facteur de transcription E2F (Giannakakis *et al*, 2008). La surexpression de miR-210 a aussi été démontrée dans le cancer du poumon, du sein et de la prostate (Camps *et al*, 2008; Puissegur *et al*; Quero *et al*). L'immunoprécipitation de la chromatine par l'anticorps HIF-1 α , a aussi montré que miR-26 peut directement réduire l'activité de HIF par le promoteur dans l'hypoxie. Il a été confirmé que le gène pré-apoptotique BAK1 est la cible directe de miR-26a. De plus, la surrégulation de miR-210, 106a, 21, et 27a induit la croissance de tumeurs en hypoxie, ce qui suggère que la répression de leurs gènes-cibles a un impact sur la survie et/ou la prolifération cellulaires (Cho, 2007). La voie de HIF a aussi été activée par la perte des miARNs des familles miR-200 (miR-141, 200a, 200b et 200c). Par exemple, l'expression de HIF-2 α et de son gène-cible (VEGF, TGF- β , etc.) n'est pas corrélée avec les familles miR-200. Le signal de HIF peut-être activé par la répression des familles miR-200 (Liu *et al*, 2010).

miR-185

De nombreux miARNs ciblant les gènes suppresseurs de tumeur ont été décrits. Par exemple, la surexpression de miR-185 dans le ccRCC a été trouvée et l'expression de miR-185 n'est pas corrélée avec l'expression du gène suppresseur PTEN, ce qui suggère que le miR-185 inhibe l'expression du gène PTEN dans le ccRCC (Tamura *et al*, 1999). Dans les cancers avancés, la perte de l'expression du gène PTEN va activer la voie PI3K/Akt ainsi que la signalisation du mTOR qui est impliqué dans le développement et le traitement du cancer rénal (Hara *et al*, 2005;

Pantuck *et al*, 2007; Zundel *et al*, 2000).

miR-34

La surexpression de miR-34a a aussi été trouvée dans les tumeurs, associée à la prolifération cellulaire (Dutta *et al*, 2007). Liu *et al*. ont découvert que miR-34a est surexprimé dans le ccRCC, avec inhibition du gène suppresseur SFRP1 qui contrôle la signalisation de la voie Wnt (Liu *et al*, 2010). La perte de l'expression du gène suppresseur Wnt a été observée chez les patients avec ccRCC (Gumz *et al*, 2007).

Les miARNs associés aux tumeurs invasives et métastatiques.

Parmi les miARN impliqués dans les tumeurs invasives et métastatiques, la sur-régulation de miR-21 cible des gènes codant les protéines de la matrice extracellulaire comme le collagène, ce qui associe les oncogènes aux processus invasifs et métastatiques (Sengupta *et al*, 2008). La surrégulation de miR-21 est fréquente dans les tumeurs solides et elle intervient pour que la tumeur soit invasive et métastatique par la régulation des gènes comme la tropomyosine 1 (TPM1) qui est l'autre gène suppresseur de tumeurs impliqué dans la migration cellulaire (Zhu *et al*, 2008). En outre, le miR-21 est impliqué directement comme oncogène dans le mécanisme de répression d'un gène suppresseur de tumeur, le PDCD4, en favorisant la transformation cellulaire (Lu *et al*, 2008).

C.2) Les miARNs suppresseurs de tumeur

La transition TEM (épithélio-mésenchymateuse) est un processus morphogénique fondamental au cours duquel les cellules perdent un nombre important de leurs caractéristiques épithéliales pour présenter des propriétés de cellules mésenchymateuses. Les mécanismes mis en jeu sont fréquemment réactivés au cours de la progression tumorale, générant des cellules douées de capacités de mobilité et d'invasion cellulaires. Ainsi, de nombreuses observations *in vitro* et *in vivo* tendent aujourd'hui à démontrer le rôle de la TEM dans le processus de dissémination métastatique des tumeurs d'origine épithéliale, dont le ccRCC (Slaby *et al*). Récemment, certains groupes ont étudié le rôle des familles de miR-200 dans le TEM (Korpál *et al*, 2008; Park *et al*, 2008). MiR-200 et miR-141 ont induit le phénomène de TEM par régulation des gènes de ZEB1, ZEB2 et TGF- β . L'inhibition de l'expression de miR-200 a induit l'expression de E-cadhérine,

ce qui active la surexpression de ZFHX1B en aval de la TEM (Liu *et al*, 2010; Park *et al*, 2008). A la suite de ces résultats, miR-200 peut avoir un effet suppresseur de tumeur dans le ccRCC, et il semble possible d'utiliser miR-200 pour le traitement de ce cancer. (Figure 6)

3. La signification clinique des miARNs

A. Les MiARNs comme marqueur biologique

A la suite de l'utilisation de l'expression des ARNms en pathologie, certaines équipes ont posé la question de savoir si des miARNs peuvent devenir un marqueur biologique pour le diagnostic, le pronostic et le traitement du cancer (Calin & Croce, 2006; Calin *et al*, 2002; Lu *et al*, 2005). Comme présenté dans ma thèse, l'expression des miARNs dans les tissus néoplastiques est très différente de celle dans les tissus normaux. Les miARNs reflètent souvent le degré de différenciation de la tumeur. Par conséquent, dans le domaine du diagnostic, l'expression des miARNs peut aider :

1. Pour distinguer le tissu normal et le tissu cancéreux.
2. Pour classer les tumeurs agressives ou mal différenciées quand la tumeur est classée comme indéterminée par les méthodes classiques histologiques et immunohistochimiques.
3. Pour différencier les tumeurs d'un même organe avec histologies différentes.

Les classifications actuelles des tumeurs sont peu fiables pour prédire le pronostic des patients en ce qui concerne le risque de récurrence tumorale, la survie et la réponse thérapeutique. De nombreuses études ont montré qu'un marqueur moléculaire seul ou en combinaison avec une approche conventionnelle peut améliorer cette situation. Les études sur la signature des mRNA dans l'expression des gènes depuis plus de 10 ans, dans la recherche sur le cancer, ont conduit à recommander des tests d'étude de l'expression des gènes pour améliorer la classification du risque et la prédiction des récurrences. Pour l'expression des miARNs, les études sont encore à un stade très précoce. Cependant, les premiers résultats sont prometteurs. L'étude de l'expression des miARNs a été montrée efficace pour prédire le pronostic de survie et les résultats thérapeutiques des patients atteints de cancer du côlon (Schetter *et al*, 2008), la réponse clinique à l'utilisation de gefitinib dans le cancer du poumon (Weiss *et al*, 2008), ou la résistance à la chimiothérapie dans les cellules cancéreuses (Blower *et al*, 2008).

A part l'utilisation de l'expression de base au niveau des tissus, l'intérêt de la mesure des

miARNs dans le sang et l'urine pourrait être étudié à l'avenir. La première étude a montré que des miARNs circulants dans le plasma de patients avec cancer ont une stabilité remarquable et une résistance à la dégradation par les Rnases endogènes. On peut supposer que les miARNs libres circulants dans les liquides biologiques peuvent être libérés par le tissu cancéreux, ce qui pourrait permettre la détection non invasive de tumeurs par les miARNs circulants.

B. Le potentiel thérapeutique des miARNs

L'altération de l'expression des miARN et l'identification de leurs cibles dans le cancer offrent la possibilité de développer de nouvelles stratégies thérapeutiques. Il existe plusieurs approches :

1. L'inhibition des miARNs qui fonctionnent comme des oncogènes.
2. L'amélioration du clivage de l'oncogène par les miARNs synthétiques complémentaires de l'oncogène.
3. La stimulation des miARNs qui activent les gènes suppresseurs de tumeur.
4. La modulation épigénétique de l'expression des miARNs.

Plusieurs recherches sur la signification thérapeutique de la régulation de l'expression des miARNs ont montré des résultats encourageants. Les antisens complémentaires des miARNs peuvent réduire spécifiquement l'expression des miARNs (Weiler *et al*, 2006). Un type d'oligonucléotides a été nommé « antagomir » (Krutzfeldt *et al*, 2005). Actuellement, la preuve de concept du traitement du cancer par l'antagomir a été démontrée (Fontana *et al*, 2008). Dans un modèle de souris avec neuroblastome, la croissance tumorale pourrait être diminuée par l'injection d'antagomir-17-5p. Une alternative aux oligonucléotides antisens plus efficace semble être l'utilisation d'un miARN synthétique appelé « agomir ». Il réprime l'expression de l'oncogène par une forte liaison compétitive avec le gène cible. D'un autre côté, la stimulation de l'expression de miARNs agissant comme les suppresseurs de tumeur présente un intérêt théorique pour le traitement du cancer. Par exemple, la stimulation de la surexpression de miR-let-7 dans les cellules de cancer du poumon a été réalisée par la transfection de la construction (plasmide) de l'expression de miR-let-7, ce qui entraîne la suppression de la croissance des cellules tumorales (Takamizawa *et al*, 2004).

Le miARN peut influencer la fonction de l'épigénétique, au contraire, son expression peut être contrôlée par l'épigénétique. Par conséquent, les médicaments contre l'épigénétique comme des méthyltransférases d'ADN et d'histones désacétylases peuvent influencer l'expression des miARNs. Par exemple, le miR-127 est sous-exprimé dans les carcinomes cellulaires de la vessie par la méthylation des sites CpG dans les promoteurs et l'acétylation des histones. La combinaison de ces deux médicaments a conduit à la surrégulation de miR-127 et par conséquent l'activation de l'inhibition de la prolifération cellulaire par miR-127 (Saito *et al*, 2006).

Comme mentionné ci-dessus, toutes ces nouvelles stratégies thérapeutiques sont basées sur l'intérêt prometteur des miARNs. Cependant, plusieurs fonctions cellulaires des miARNs et leur effet dans les différentes voies de signalisation sont encore largement inconnus. L'utilisation clinique des miARNs n'est pas encore envisageable pour les prochaines années.

La recherche de marqueurs moléculaires circulants

1. La source des molécules circulantes

A. ARN circulants

Bien que la présence d'ARN circulants ait été rapportée dès les années 70 (Kamm & Smith, 1972; Stroun *et al*, 1977), l'idée que l'ARN extracellulaire pouvait résister aux ribonucléases du sérum/plasma n'a pas été aisément acceptée. Mais, l'ARN extracellulaire était détecté dans le plasma à des taux de 25,4 à 144 ng/L (Blinov *et al*, 1981) ce qui suggère que l'ARN dans le plasma/sérum est protégé par certains mécanismes. Sisco a suggéré une liaison entre l'ARN et l'ADN circulants, avec un ADN-ARN hybride qui serait résistant à l'activité RNase et DNase (Sisco, 2001). D'autres groupes, dont notre équipe, ont démontré aussi la présence d'ARN circulant dans le sérum/plasma (Feng *et al*, 2008; Ng *et al*, 2002), mais le mécanisme de protection de l'ARN dans le sang périphérique n'est toujours pas clair.

B. MicroARNs circulants

Dans un article récent, Mitchell *et al* (Mitchell *et al*, 2008), ont démontré la présence de miARNs endogènes circulants dans le plasma. Les auteurs ont incubé des plasmas à la température ambiante pendant 24 h, avec des cycles répétés de congélations/décongélations, et ont ensuite évalué l'expression de miR-15b, miR-16, miR-24 par PCR quantitative. Les miRNAs circulants ont une stabilité remarquable (Tsui *et al*, 2002; Weber *et al*, 2010) et une résistance à la dégradation par les Rnases endogènes (Wang *et al*, 2009a). En revanche, la dégradation dans le plasma des miARNs synthétiques a été observée en quelques minutes. Ainsi, les miRNAs nus sont sensibles à la Rnase avec une dégradation rapide dans le plasma, tandis que les miARNs circulants sont protégés par des mécanismes inconnus et résistants à l'activité de la Rnase. Il a été proposé que les miARNs circulants puissent résider dans des microvésicules (exosome, microparticules, corps apoptotiques), ce qui expliquerait leur protection contre l'activité RNase et l'exfoliation des miARNs dans la circulation. D'autres études ont démontré qu'après la purification des

microvésicules par centrifugation à grande vitesse, les miARNs étaient encore détectables, ce qui suggère en plus l'existence de miARNs non-vésiculaires (complexes miARN-protéine) dans les liquides extracellulaires. (Figure 7)

B.1) MiARNs dans les exosomes

Les exosomes sont de petites vésicules (50-90 nm) qui se forment à l'intérieur des compartiments, les corps multivésiculaires, après endocytose, et qui sont sécrétés lors de leur fusion avec la membrane plasmique (Camussi *et al*, 2010; Thery *et al*, 2002). Les exosomes présentent la même orientation membranaire que la cellule elle-même, avec quelques nanolitres de cytosol dans leur lumière, et le domaine extracellulaire des protéines transmembranaires exposé à leur surface (Johnstone, 2006). Les exosomes contiennent de l'ARN (à la fois des mARNs et des miARNs) (Valadi *et al*, 2007). Actuellement, 121 miARNs ont été identifiés dans les exosomes des mastocytes et l'expression de certains miARNs est plus élevée dans les microvésicules que dans les cellules entières (Pigati *et al*, 2010).

B.2) MiARNs dans les microparticules

Les microparticules sont des structures vésiculaires complexes qui sont libérées par les cellules au cours des processus d'activation ou d'apoptose et qui contiennent aussi les miARNs (Hunter *et al*, 2008; Morel *et al*, 2006). Les connaissances sur les mécanismes de formation des microparticules reposent essentiellement sur des expériences effectuées *in vitro*, après des stimuli. Ainsi, les principaux mécanismes de génération des microparticules *in vivo* restent à déterminer. La formation des microparticules est associée à un remaniement de la membrane plasmique. L'asymétrie phospholipidique qui caractérise les cellules quiescentes est maintenue par les activités combinées de la translocase/flippase, de la floppase et de la scramblase (Fadok *et al*, 2000; Hugel *et al*, 2005). L'activation cellulaire et l'apoptose sont associées à une élévation du taux de calcium intracellulaire qui, d'une part, dérégule ces protéines membranaires et, d'autre part, participe au clivage des éléments du cytosquelette. Tous ces événements conduisent à l'externalisation de la phosphatidylsérine et au bourgeonnement de la cellule qui libérera ensuite les microparticules dans l'espace extracellulaire. La présence de miARNs dans

les microparticules a été rapportée dans certains types cellulaires tels que les mastocytes, les plaquettes, les cellules endothéliales et les monocytes. Des stimulations diverses des microparticules peuvent altérer la libération des miARNs, ce qui suggère qu'ils peuvent jouer un rôle dans les microparticules (Zhang *et al*, 2010).

B.3) MiARNs dans les corps apoptotiques:

La taille des corps apoptotiques (CA) est plus grande que celle des microparticules. Les CAs sont généralement produits en réponse à une stimulation apoptotique (Beyer & Pisetsky, 2009). Les CAs ont été impliqués dans la réparation et de l'angiogénèse des tissus durant leur endocytose par des phagocytes qui déclenche la sécrétion de cytokines ou de facteurs de croissance (Hristov *et al*, 2004). L'étude du profil d'expression des miARNs dans les CAs endothéliales a montré que le miR-126 est le plus abondant et que c'est un régulateur du facteur VEGF (Fish *et al*, 2008; Wang *et al*, 2008).

B.4) Complexes miARN-protéines

L'Ago2 est une partie du complexe RISC. Le complexe Ago2/miARN a été trouvé dans des surnageants de culture cellulaire (Turchinovich *et al*, 2011). Après précipitation de plasma, des complexes Ago2-miARNs circulants ont été retrouvés, ce qui montre qu'ils n'étaient pas associés aux microvésicules (Arroyo *et al*, 2011). Ces complexes stables ont ensuite été caractérisés plus précisément par chromatographie pour exclure une contamination par des microvésicules, la majorité des miARNs était associée aux complexes Ago2. Certains miARN, tels que le miR-16 et le miR-92a sont associés à des microvésicules. La protéine Ago2 n'est pas la seule protéine associée à des miARNs. Douze protéines complexées ont été identifiées par spectrométrie des fibroblastes humains (Wang *et al*, 2010), dont la nucléophosmine, qui est complexée avec des miARNs pour les protéger de la dégradation. Le rôle des autres protéines est toujours confus mais elles n'ont aucun effet contre la dégradation de miR-122 in vitro.

2. La valeur diagnostique et pronostique des miARNs circulants pour les cancers

A. Les MiARNs circulants dans le RCC

Peu d'études sur l'expression des miARNs circulants dans le RCC sont disponibles.

Wulfken et al (Wulfken *et al*, 2011), a étudié le niveau de sept miARNs (miR-7-1, miR-93, miR-106b, miR-210, miR-320b, miR-1233 et miR-1290) dans le sérum des patients avec RCC et chez les sujets contrôle par PCR quantitative. Ils ont trouvé que le niveau du miR-1233 sérique était augmenté dans le sérum des patients avec RCC. L'aire sous la courbe ROC est de 0.588. La meilleure sensibilité et la meilleure spécificité sont respectivement 77.6% et 37.6%. Mais, il n'y avait pas de corrélation entre le niveau du miR-1233 sérique et les caractéristiques cliniques. La fonction de miR-1233 n'est toujours pas claire. Le logiciel de prédiction (miRWalk) a analysé des cibles potentielles du miR-1233 qui sont quelques gènes du cancer comme le BLCAP (identifié comme un gène suppresseur du cancer de la vessie) ou P53.

Une autre étude en 2012 (Redova *et al*, 2012) a montré la surexpression du miR-378 et la sous-expression de miR-451 dans le sérum des patients avec RCC. La combinaison des deux tests permet d'augmenter la sensibilité à 81% et la spécificité à 83%, L'aire sous la courbe ROC est de 0.588.

B. Les MiARNs circulants dans les autres cancers

Les miARNs circulants originaires des cellules malignes sont candidats pour être des marqueurs diagnostiques. Une étude récente a rapporté que la plupart des miR-451 et miR-1246 dans les cellules épithéliales mammaires malignes étaient libérés dans le sang, mais que la majorité de ces miRNAs dans les cellules épithéliales mammaires non malignes étaient retenues. Ces résultats suggèrent que la libération sélective des miARNs est un argument important pour l'identification de miARN circulants comme marqueur tumoral (Wang *et al*, 2010).

Une étude des miARNs dans le plasma du cancer colorectal a indiqué que le miR-29a et le

miR-92a pourraient discriminer le cancer et le sujet sain, la combinaison de ces deux miARNs a permis d'augmenter la sensibilité et la spécificité. Ces données suggèrent que le miR-29a et le miR-92a dans le plasma ont un fort potentiel d'utilisation comme marqueurs pour la détection invasive du cancer colorectal (Huang *et al*, 2009c). Une autre étude a montré aussi que le miR-92a dans le plasma a une valeur diagnostique pour le cancer colorectal (Ng *et al*, 2009).

De plus, une surexpression du miR-200a/b a été montrée dans le sérum au cours du cancer pancréatique (Li *et al*, 2010). miR-17 (Zhou *et al*, 2010), miR-21, let-7a, miR-106 (Tsujiura *et al*, 2010), ont une valeur diagnostique dans le cancer gastrique. Ces résultats laissent penser que les miARNs circulants sont des molécules très intéressantes comme marqueurs pour diagnostiquer les cancers.

Partie expérimentale

MATERIELS ET METHODES

Nous avons souhaité utiliser ces approches dans le cadre du cancer du rein chez l'adulte. Ceci nous a amené à mettre au point plusieurs techniques:

- ♦ Les techniques d'extraction de l'ARN, des miARNs des tissus, du sérum et des urines.
- ♦ La RT-PCR en temps réel pour la quantification de l'ARN messager CA9 du sérum.
- ♦ La PCR quantitative en temps réel pour la quantification des miARNs des tissus, du sérum et des urines.
- ♦ La PCR quantitative en temps réel pour l'observation de l'intégrité de l'ARN circulant dans les urines.

1. Matériels

A. Patients et témoins sains

Les patients inclus dans l'étude ont été recrutés dans le Service d'Urologie du CHU de Saint-Etienne. Les contrôles sains ont été recrutés à l'Etablissement Français du Sang. Tous les patients atteints de ccRCC ou d'oncocytome rénal ont eu un diagnostic anatomo-pathologique avec détermination du grade de Führman et classification dans le système UICC. Il n'y avait pas de différence statistique d'âge entre les patients atteints de RCC ou d'oncocytome rénal et les contrôles.

B. Collecte des échantillons

Le sang périphérique et les urines ont été recueillis avant l'intervention chirurgicale. Chez certains patients, nous avons recueilli du sang périphérique et des urines 7 jours après l'opération. 5 ml de sang ont été recueillis dans un "Sérum Separator Tube[®]" (BD, plymouth, UK). Les sérums ont été séparés par centrifugation à 1200 g pendant 10 minutes à 4°C (Centrifuge GR412, Jouan, Germany). Les urines ont été centrifugées à 12000 g pendant 10 minutes à 4°C pour éliminer les cellules (Centrifuge 5417R, Eppendorf, Germany). Les sérums et les urines sans cellule ont été congelés immédiatement à - 80°C jusqu'à l'extraction de l'ARN, des miARNs ou de l'ADN.

2. Méthodes

A. Extraction de l'ARN (Protocole RNeasy Mini Kit)

Avant l'extraction de l'ARN, le sérum a été centrifugé à 12000 g pendant 10 minutes à 4°C pour éliminer les résidus cellulaires éventuels. Nous avons utilisé le RNeasy Mini kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) pour extraire l'ARN total du sérum. Le protocole était le suivant : 700 µl de tampon ALT ont été ajoutés à 700 µl de sérum et passés au vortex pour obtenir une distribution homogène. 700 µl d'éthanol à 70% ont été ajoutés au mélange et homogénéisés avec une pipette. 700 µl du mélange ont été déposés sur une colonne et centrifugés 30 secondes à 10000 g à 4°C. La colonne a été lavée avec 700 µl de tampon RW1 et 500 µl de tampon RPE par centrifugation pendant 60 secondes à 10000 g à 4°C. L'ARN a été élué 3 fois dans 30 µl d'eau stérile. L'ARN a été quantifié à l'aide du Nano1000 (Thermo scientific, USA) et congelé immédiatement à - 80°C.

B. Extraction de l'ARN et du miARN (Protocole miRNeasy micro Kit)

Avant l'extraction des ARNs, les sérums et les urines ont été centrifugés à 12000 g pendant 10 minutes à 4°C pour éliminer les résidus cellulaires éventuels. Nous avons utilisé le miRNeasy micro kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) pour extraire les ARNs. Le protocole était le suivant : 700 µl de tampon Qiazol (Qiagen) et 150 µl de chloroforme ont été ajoutés à 700 µl de sérum ou d'urines et passés au vortex. Le mélange a ensuite été centrifugé à 12000g pendant 15 minutes à 4°C. 700 µl de liquide surnageant ont été transférés dans un nouveau tube. 1400 µl d'éthanol à 100% ont été rajoutés aux 700 µl de surnageant et homogénéisés avec une pipette. 700 µl du mélange ont été déposés sur une colonne et centrifugés 30 secondes à 10000 g à 4°C. La colonne a été lavée avec 700 µl de tampon RWT et 700 µl de tampon RPE par centrifugation pendant 60 secondes à 10000 g à 4°C. L'ARN a été élué 3 fois dans 25 µl d'eau stérile. L'ARN a été quantifié par Nano1000 (Thermo scientific, USA) et congelé immédiatement à - 80°C.

C. Transcription inverse (Protocole MiScript)

Le kit MiScript Reverse Transcription (Qiagen) a été utilisé. Le volume total à tester était de 20 µl. Le mélange comprenait 4 µl de tampon 5X miScript RT Buffer, et 1 µl de miScript Reverse Transcriptase Mix. L'étape de RT s'est déroulée à 37°C pendant 60 min, suivie d'une dénaturation à 95°C pendant 5 minutes. L'ADNc a été conservé à -20°C.

D. RT-PCR one-step

Nous avons utilisé le kit SuperScriptTM One-Step RT-PCR avec Platinum[®] Taq kit (Invitrogen, Californie, USA) et le thermocycler MASTER CYCLER gradient. Le volume total à tester était de 50 µl. Le mélange était composé d'une solution de 2X Reaction Mix, de 1 µl de RT/Platinum[®] Taq Mix, de 1 µl de l'amorce de départ, de 1 µl de l'amorce reverse (100 nM de sens et antisens) et de 22 µl d'ARN. L'étape de RT s'est déroulée à 50°C pendant 30 minutes, puis la dénaturation à 94°C pendant 2 minutes. La PCR a été réalisée comme suit : dénaturation à 94°C durant 1 minute, les chaînes d'ADN ont été chauffées à 57°C durant 1 minute puis incubées à 72°C durant 1 minute. Ces trois étapes ont été répétées trente quatre fois. La dernière incubation à 72°C a duré 5 minutes.

E. PCR traditionnelle

Le volume total de préparation pour la PCR traditionnelle était de 25 µl. Le mélange comprenait 2 µl d'ADN, 10 µl de MasterMix (5 PRIME, Hamburg), 1 µl de l'amorce sens, 1 µl de l'amorce anti-sens à 100 nM, 11 µl d'eau stérile et l'ADN. Le thermocycler MASTER CYCLER gradient a été utilisé. La première étape a été la dénaturation à 94°C pendant 2 minutes. Les cycles de PCR ont été les suivants : après dénaturation à 94°C durant 1 minute, les chaînes d'ADN ont été chauffées à 57°C durant 1 minute et incubées à 72°C durant 1 minute. Ces trois étapes ont été répétées trente fois. La dernière incubation à 72°C a duré 1 minute. Pour chaque PCR, un contrôle

positif et un contrôle négatif ont été utilisés. Les produits de PCR ont été séparés et visualisés par électrophorèse sur gel d'agarose (2.0%).

F. PCR quantitative (protocole SYBR Green)

L'appareil Applied Biosystem 7500 permet une manipulation rapide et facile. Le grand intérêt de cet appareil est d'analyser 96 puits en même temps en éliminant les différences entre séries. Les puits sont excités par une longueur d'onde spécifique. La lumière filtrée de la lampe halogène est capable d'exciter le SYBR Green[®]. La longueur d'onde choisie est 494 nm (longueur d'onde maximale d'excitation de l'agent intercalant). Lorsque cette molécule est liée à l'ADN, le SYBR Green[®] émet une forte fluorescence. La lumière sélectionnée est captée par un détecteur photoélectrique. Les signaux électriques sont envoyés au logiciel pour effectuer l'analyse.

G. Electrophorèse

Le gel d'agarose (2.0%) comprend 1 g d'agarose et 50 ml de Tris-Borate-EDTA-Buffer (5.0%). Le voltage de migration a été de 100V et le temps de l'électrophorèse de 25 minutes. Les fragments d'ADN ont été visualisés et photographiés en lumière UV avec coloration par du GelRed[™] (FluoRrobes). Les bandes séquentielles d'ADN standard (Smartladder SF, Eurogentec) ont servi de marqueur. La position des produits de PCR par rapport à la position des bandes séquentielles d'ADN standard a été évaluée.

H. Étude de la stabilité de l'ARN circulant dans les urines.

Un total de 12 urines a été étudié. Les urines ont été divisées en deux séries de 6. Pour la première partie, les urines ont été laissées à température ambiante pendant 0, 6, et 24 h. La deuxième partie a nécessité que les urines soient stockées à 4°C pendant 0, 6 et 24 h. Après cela, les urines ont été centrifugées. Ensuite, les urines ont été recueillies pour l'extraction de l'ARN.

La stabilité de l'ARN circulant dans les urines a été étudiée par ajout d'ARN libre. Nous avons ajouté 1000 ng d'ARNs humains libres de référence (Stratagene, UE) aux urines et incubés

pendant 0, 10, 20, 30 s à température ambiante. Après cette incubation, la solution QIAzol (Qiagen) a été immédiatement ajoutée pour arrêter toute activité ribonucléase.

1. Mesure de l'intégrité de l'ARN circulant dans les urines

L'intégrité de l'ARN circulant dans les urines a été mesurée par PCR quantitative. Cet indice d'intégrité est le ratio de GAPDH 416bp contre GAPDH 106bp. Les amorces ont été synthétisées par la société Sigma-Aldrich. Les deux gènes ont été amplifiés en utilisant la même amorce-sens: 5'-TCACCAGGGCTGCTTTTAAC-3'. L'amorce anti-sens pour 106bp est 5'-TGGGTGGAATCATATTGGA-3' et 5'-GCAGTTGGTGCAGGAGG-3 pour 416bp. L'ARN de référence (Stratagene, UE) a été utilisé comme témoin positif et l'eau sans RNase (Qiagen) a été utilisée comme contrôle négatif dans chaque PCR. L'indice d'intégrité a été calculé de la façon suivante : $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Tous les échantillons ont été analysés anonymement.

J. Analyse statistique

L'ensemble des données administratives, cliniques, biologiques et anatomopathologiques était consigné dans un tableau informatique à l'aide du logiciel Excel (Microsoft®)

Les statistiques ont été effectuées et les graphiques ont été construits en utilisant le logiciel d'analyse SPSS sous Windows (version 16.0, SPSS Inc. Chicago, IL, USA) et GraphPad Prism 5. (GraphPad Software, Inc, La Jolla, CA). $p < 0.05$ a été considéré comme significatif.

Pour l'analyse statistique, les patients ont été séparés en deux groupes de la façon suivante :

- les patients hommes/femmes;
- le stade TNM T1, T2, le stade TNM T3 ;
- le grade Fühman 1, 2, le grade Fühman 3, 4 ;

Les tests de Mann Whitney, de Wilcoxon ou de Fridemen ont été employés pour déterminer la signification statistique du niveau d'expression des gènes des différents groupes. χ^2 a été utilisé pour analyser l'association entre deux variables. Enfin les analyses uni et multi-variées ont été menées selon le modèle de Cox.

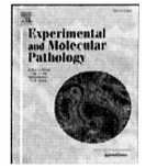
Le Hazard Ratio (HR) peut être interprété comme le risque relatif de survenue d'un événement, à chaque instant, pour un individu présentant un facteur de risque comparé à un individu qui ne le présente pas. Les variables utilisées, étaient dichotomisées afin d'en faciliter l'analyse.

La sensibilité et la spécificité ont été établies selon les résultats de la PCR quantitative. La courbe ROC a été utilisée pour tester la performance diagnostique de cette technique. L'aire sous la courbe ROC est la capacité de différencier les patients avec un ccRCC des sujets sains.

RESULTATS

Article 1

Les microARNs sont des petites molécules d'ARN non codant et simple brin d'environ 21 à 25 nucléotides. Leur expression dans le sérum comme marqueur potentiel de diagnostic de cancer est prometteuse. L'objectif de cette étude était d'étudier le microARN-210 (miR-210) sérique afin d'identifier un nouveau marqueur moléculaire pour la détection des cancers du rein à cellules claires (ARCC). 32 échantillons appariés (tissu tumoral et normal) provenant de sujets traités pour ARCC, 57 échantillons de sérum de patients avec un ARCC, 42 échantillons de sérum de sujets sains et 10 échantillons de sérum prélevés une semaine après la chirurgie ont été inclus. Les microARNs ont été extraits en utilisant un kit commercial. La RT-PCR quantitative a permis de comparer le niveau du miR-210 dans le tissu et dans le sérum en utilisant les amorces spécifiques. Le niveau d'expression était normalisé par la méthode dCT. Le test statistique de Mann-Whitney U ou Wilcoxon a été utilisé pour comparer la différence. La performance pour le diagnostic du miR-210 sérique a été calculée par la courbe ROC. Le niveau moyen du miR-210 était significativement plus élevé dans le tissu tumoral que dans le tissu normal ($p=0,004$). Pour les échantillons de sérum, le niveau moyen du miR-210 était aussi significativement plus élevé chez les patients avec un ARCC que chez les sujets sains ($p<0,001$). Le niveau du miR-210 sérique avait une aire sous la courbe ROC(AUC) de 0,833 avec une sensibilité de 85,4% et une spécificité de 68,4%. Le niveau moyen du miR-210 sérique était significativement réduit une semaine après la chirurgie ($p=0,001$). Cette étude préliminaire a montré la possibilité d'utiliser le miR-210 sérique comme un nouvel outil pour la détection de l'ARCC. Son utilité comme marqueur potentiel de diagnostic doit être explorée sur une plus grande échelle.



Serum miR-210 as a novel biomarker for molecular diagnosis of clear cell renal cell carcinoma

An Zhao¹, Guorong Li^{*,1}, Michel Péoc'h, Christian Genin, Marc Gigante

Department of Urology (GL, MG), Department of Pathology (MP), Clinical Immunology Laboratory (AZ, CG), North Hospital, CHU of Saint-Etienne, University of Jean-Monnet, Saint-Etienne, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 25 June 2012

and in revised form 1 October 2012

Available online 9 October 2012

Keywords:

MicroRNA

Serum

Diagnosis

Clear cell renal cell carcinoma

ABSTRACT

Objective: Our objective was to evaluate the levels of miR-210 in tumor and serum samples of conventional renal cell cancer (cRCC) patients to explore whether circulating miR-210 in serum can be used as a biomarker for the detection of cRCC.

Methods: The paired samples from primary cRCC tumors and adjacent non-tumoral renal parenchyma were collected from 32 patients with cRCC. Serum samples were obtained from 68 patients with a cRCC before surgery, 10 samples after one week of surgery, and 42 healthy individuals were included in this study. Real-time PCR was used to measure the microRNA level. The expression of miRNAs was normalized using the dCT method. Expression levels of miR-210 were compared using the Mann–Whitney U test or Wilcoxon test. Diagnostic performance of serum miR-210 level was calculated by using the receiver operating characteristic (ROC) curve. **Results:** The average miR-210 level was higher in primary cRCC tissues than in normal tissue ($p = 0.004$). For serum samples, the average level of miR-210 was significantly higher in cRCC patients than in controls ($p < 0.001$). The serum miR-210 level yielded an AUC (the areas under the ROC curve) of 0.874 with a sensitivity of 81.0% and a specificity of 79.4%. Furthermore, the average serum level of miR-210 was significantly decreased in the patients one week after the operation ($p = 0.001$).

Conclusion: Serum mi-210 may have a potential as a novel noninvasive biomarker for the detection of cRCC.

© 2012 Elsevier Inc. All rights reserved.

Introduction

Renal cell carcinoma (RCC) is the third most common urological cancer and it has a high mortality. Clear cell or conventional renal cell carcinoma (cRCC) is the most frequent subtype of RCC and accounts for approximately 75–80% of these tumors (Cohen and McGovern, 2005). Recent advances in diagnostic techniques have increased the early detection of cRCC and decreased the mortality rate. However, nearly 30–40% of patients will still metastasize after extended radical resections (Lam et al., 2005). There has been no serum marker for diagnosis and follow-up. Thus, we need new biomarkers to improve diagnosis and to monitor cRCC after resection.

MicroRNAs (miRNAs) are 18–25 nucleotide noncoding RNA molecules that are involved in tumorigenesis and the development of various cancers (Garzon et al., 2009; Inui et al., 2010). Several studies have focused on miRNAs' significance in RCC (Bartels and Tsongalis, 2009; Huang et al., 2009b; Juan et al., 2009). These papers have revealed that miRNAs may be potential diagnostic or prognostic tools for cancer (Esquela-Kerscher and Slack, 2006). More recently,

Mitchell et al. (2008) clearly reported that circulating miRNAs existed in serum/plasma, and were originated from cancer tissue. They also showed the miRNAs can serve as potential biomarkers for detection of prostate cancer.

The majority of cRCCs exhibit VHL mutations which lead to enhanced hypoxia-inducible factor (HIF) action (Cohen and McGovern, 2005). Interestingly, miR-210 is directly regulated by HIF-1 α in a variety of tumor types (Camps et al., 2008; Ho et al., 2010). Therefore, the levels of miR-210 would increase in tumor and serum samples of cRCC patients. We hypothesized that the circulating miR-210 in serum samples may have the potential capacity for the diagnosis of cRCC.

Materials and methods

Tissue samples and serum samples

Tissue samples were obtained from 32 patients with a cRCC. Under the supervision of an experienced pathologist, tumor tissue and adjacent non-tumoral renal parenchyma were collected. All tissue samples were immediately put in liquid nitrogen and stored at -80°C until RNA extraction.

68 serum samples (3.5 ml) were collected before surgery and processed within 5 h. The blood tube was centrifuged at 1200 $\times$ g

* Corresponding author at: Department of Urology and Kidney Transplantation, CHU La Réunion, 97405 Saint Denis Cedex, La Réunion, France. Fax: +33 262905462.

E-mail address: marc.gigante@chu-reunion.fr (M. Gigante).

¹ An Zhao and Guorong Li are co-first authors.

Table 1
Characteristics of study population.

	Tissue samples (n = 33)	Serum samples	
		cRCC (n = 68)	Normal control (n = 42)
Gender			
Male	22	46	22
Female	10	22	20
Age			
Mean $\pm$ SD	60 $\pm$ 13	64 $\pm$ 11	59 $\pm$ 10
Median (range)	60 (22–77)	66 (29–86)	59 (49–64)
TNM stage			
I	7	20	
II	6	11	
III	10	37	
Grade			
G1 + G2	12	41	
G3 + G4	20	27	
Tumor size			
$\leq$ 4CM	10	27	
>4CM	22	41	
Mean $\pm$ SD	6.4 $\pm$ 4	5.1 $\pm$ 2.8	
Median (range)	5.5 (1–14.5)	4.5 (0.8–15.5)	

for 10 min at 4 °C followed by careful separation of serum. Another centrifugation was performed for 10 min at 10,000 $\times$ g at 4 °C to remove the cellular debris. The serum was stored at -80 °C until it was used for RNA extraction. 10 paired serum samples were collected 7 days after surgery. 42 serum samples were also obtained from healthy volunteers as control.

All patients with a renal tumor had a pathological diagnosis. The cRCC was graded and staged according to the UICC system (Fuhrman et al., 1982; Sobin and Wittekind, 2003). The study was approved by the local ethics committee. The patients received the necessary information concerning the study and a consent statement was received from each patient.

RNA extraction

Total RNA was extracted from tissue samples or 700 μ l serum using MicroMini Kit (Qiagen) according to manufacturer's protocol. Briefly, 700 μ l QIAzol solution (Qiagen) was added to each sample for lysis. Total RNA was extracted with acidic phenol:chloroform. The aqueous layer was loaded onto the silica membrane after the addition of 1.5 volume of 100% ethanol. After several washing processes, the RNA was eluted into 30 μ l of RNase-free water. The RNA concentration and purity were controlled by UV spectrophotometry using a Nanodrop ND-1000 (Thermo Scientific). The RNA specimens were stored at -80 °C until reverse transcription.

Reverse transcription

The reverse transcription reaction was carried out with miScript Reverse Transcription Kit (Qiagen) in 20 μ l containing 200 ng of RNA extract, 4 μ l of 5 $\times$ miScript RT Buffer, 1 μ l of miScript Reverse Transcriptase Mix. For synthesis of cDNA, the reaction mixtures were incubated at 37 °C for 60 min, at 95 °C for 5 min and then held at 4 °C. The cDNA specimens were stored at -20 °C until PCR.

MiRNA quantification by real-time quantitative PCR

The amounts of miRNAs were quantified by qPCR using the miScript SYBR Green PCR kit (Qiagen). 1 μ l of cDNA solution was amplified using 12.5 μ l of 2 $\times$ QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix, 1 μ l of 10 $\times$ miScript Universal Primer, 1 μ l of 10 $\times$ miScript Primer Assay and 8.5 μ l of nuclease-free water in a final volume of 25 μ l. A specific primer for miR-210 (Qiagen) or 5s rRNA (Exiqon) was used. Quantitative PCR was run on a 7500 Real-Time PCR system (Applied Biosystems). The reaction mixtures were incubated at 95 °C for 10 min, followed by 40 cycles of 95 °C for 15 s, 56 °C 30 s and 72 °C 35 s. The universal human reference RNA (Stratagene) was used as

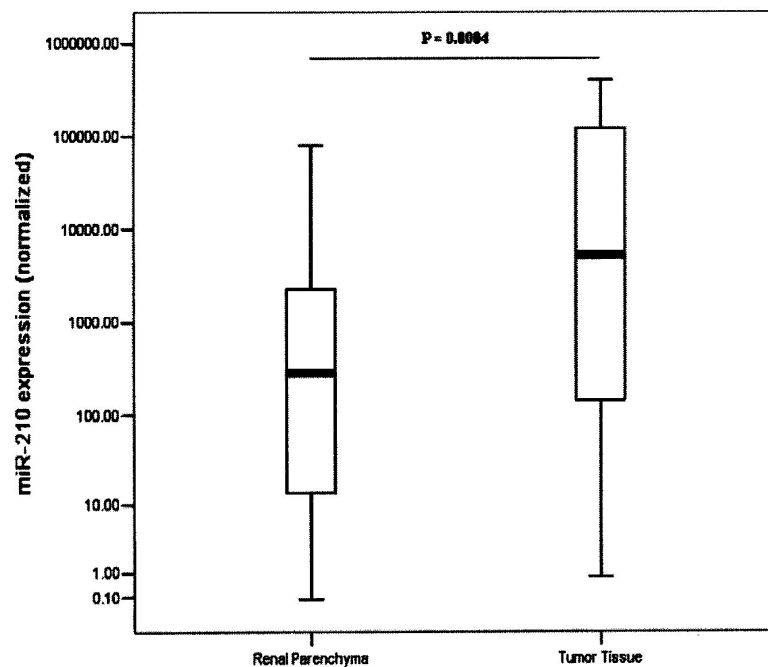


Fig. 1. MiR-210 relative expression level in tumoral tissues and adjacent non-tumoral renal parenchyma. The miR-210 level was significantly higher in the tumoral tissues than in the normal tissues. Expression level of the miR-210 was normalized to 5s rRNA with log10 scale on y axis. The lines inside the boxes represent the median value.

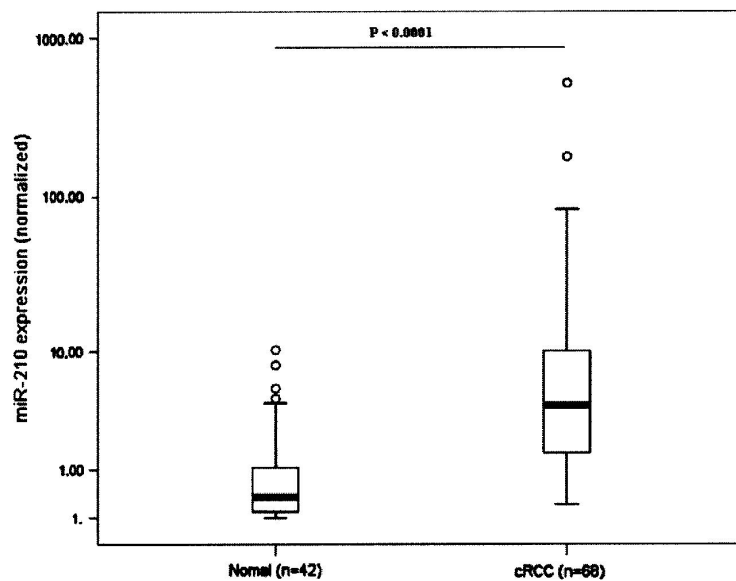


Fig. 2. Serum miR-210 level in cRCC patients and healthy controls. The miR-210 level was significantly higher in the cRCC patients than in healthy controls. Expression level of the miR-210 was normalized to 5s rRNA with log10 scale on y axis. The lines inside the boxes represent the median value.

a positive control and the RNase-free water (Qiagen) was used as a negative control in each PCR assay. The cycle threshold (Ct) values were calculated with the SDS 1.4 software (Applied Biosystems). The Ct value was defined as the number of cycles for the fluorescence to reach a specific threshold level of detection. The Ct value was inversely correlated with the amount of template miRNA present in the reaction. The expression level was determined by the equation $2^{-\Delta Ct}$. The ΔCt value was expressed as $Ct\text{-miR-210}-Ct\text{-5s rRNA}$.

Statistical methods

The expression level of miRNAs from tissue or serum samples was normalized by using the dCt method relative to 5s rRNA. Expression levels were compared by using the Mann-Whitney U test or Wilcoxon test. Receiver-operating characteristics (ROC) curve was established to evaluate the diagnostic value of serum miRNAs for the differentiation between cRCC patients and healthy controls. A p value of less than 0.05 was considered statistically significant. For the multiple comparisons carried out in this study, Bonferroni correction was taken into consideration. According to this correction p value of less than 0.01 was considered statistically significant. All analysis was performed with SPSS 13.0 software.

Results

A total of 132 participants including 32 cRCC patients for paired tumoral and normal tissue, 68 cRCC patient for serum samples, and 42 healthy for control serum samples were included into this study. The characteristics of the study population are summarized in Table 1. No significant differences of age or gender were found between cRCCs and normal controls ($p=0.798$, ANOVA; $p=0.886$, χ^2 test). The mean Ct values (95% confidence interval) of 5s rRNA were 16.99 ± 0.96 (15.8–16.2), 16.16 ± 0.1 (15.95–16.37) in primary tumors and adjacent non-tumoral renal parenchyma. For the serum samples, the mean Ct values of 5s rRNA were 25.91 ± 0.14 (25.6–26.2), 26.18 ± 0.15 (25.88–26.48) in patients with cRCC and in healthy controls, respectively. Therefore, 5s rRNA in tissues and

serum can be used as an internal control to normalize sampling variations in RT-qPCR in our study.

The mean miR-210 level was higher in the tumoral tissues (64714.8 ± 19435.6) than in the normal tissue (4719.9 ± 2557.3) ($p=0.004$; Fig. 1).

Among the 110 serum samples including 68 cRCC and 42 normal controls, the mean miR-210 level was significantly higher in cRCC patients (18.4 ± 8.1) than in normal controls (1.6 ± 0.5) ($p<0.0001$;

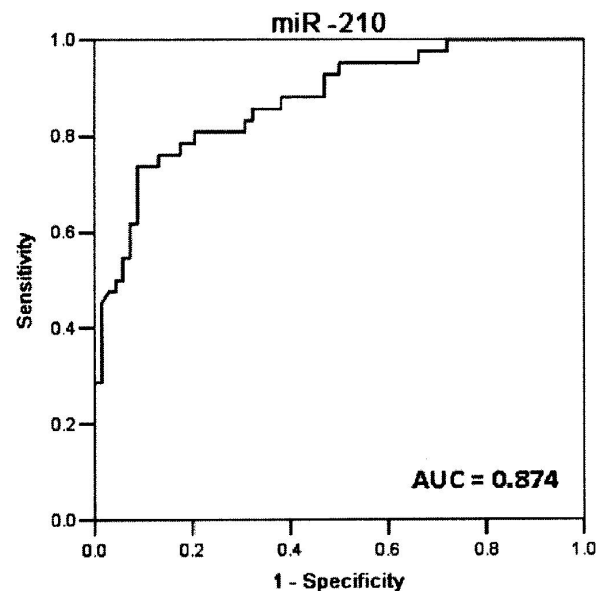


Fig. 3. Receiver operating characteristic (ROC) curve analysis using serum miR-210 for discriminating cRCC patients. Serum miR-210 yielded an AUC (the areas under the ROC curve) of 0.874 (95% CI: 0.806–0.941) with a sensitivity of 81.0% and a specificity of 79.4% for discrimination between the cRCC patients and the healthy controls.

Table 2
Serum miR-210 expression levels according to clinicopathological variables.

	N0.	Mean $\pm$ SD	p value
Gender			0.108
Male	46	24.6 $\pm$ 11.9	
Female	22	5.3 $\pm$ 1.6	
Age			0.278
60 or Younger	24	24.4 $\pm$ 7.3	
61 or Older	44	12.4 $\pm$ 2.7	
TNM stage			0.201
I + II	31	8.6 $\pm$ 2.9	
III	37	26.8 $\pm$ 14.7	
Grade			0.17
G1 + G2	41	35.2 $\pm$ 7.6	
G3 + G4	27	19.9 $\pm$ 2.2	
Tumor size			0.048 ^a
$\leq$ 4CM	27	12.4 $\pm$ 1.8	
>4CM	41	25.1 $\pm$ 6.5	

SD means standard deviation.

^a Difference not significant after application of the Bonferroni correction as p value is > 0.01 .

Fig. 2). Analyses of the ROC curves for serum miRNAs showed that the serum miR-210 level could differentiate the cRCC patients from the normal controls (AUC = 0.874, 95% CI: 0.806–0.941) with a sensitivity of 81.0% and a specificity of 79.4% in discriminating cRCC (Fig. 3).

We examined the correlation between the serum levels of miR-210 with patient clinical parameters (Table 2). No significant association was found between the levels of miR-210 and sex, age, tumor grade and stage, except for the tumor size ($p = 0.048$). However, the difference was not statistically significant for the tumor size when the Bonferroni correction for multiple comparisons was taken into consideration. We compared the serum miR-210 level of normal controls with cRCC patients with the different TNM stage (20 stage I, 11 stage II, 37 stage III) (Fig. 4). Each of the 3 stages including stage I patients had significantly elevated serum miR-210 levels when compared with the controls ($p < 0.001$). No significant difference was observed between the different TNM stages. Furthermore, the level of miR-210 in serum was measured in paired pre- and

post-operative samples from 10 cRCC patients of 7 days after surgery (Fig. 5). The mean miR-210 level was significantly reduced in the post-operative samples (4.0 ± 1.1) compared to the preoperative samples (16.9 ± 7.9) ($p = 0.001$).

Discussion

Tumor-derived miRNAs was firstly described in plasma by Mitchell et al. (2008). They found that circulating miRNAs have the potential to be new biomarkers in patients with prostate cancers. They also showed the high stability of plasma miRNAs after prolonged incubation at room temperature and/or multiple freezing–thawing processes. These findings stimulate the search for circulating miRNAs in the detection of patients with a cancer.

MiR-210 is one of the most studied miRNAs in cancer. MiR-210 was over-expressed in various types of human malignancy (Camps et al., 2008; Ho et al., 2010), suggesting its important role in tumorigenesis. In this study, we examined expression of miR-210 in tumoral tissues compared with those in adjacent normal tissues from the 32 cRCC patients. All the miRNAs obtained had a good quality for amplification. MiR-210 level was higher in primary cRCC tissues than in normal tissues. This result is in agreement with previous findings. Neal et al. (2010) also showed that the miR-210 was increased in renal cancer patients and levels correlated with patient survival. The mechanism of upregulation of miR-210 is not completely clear. Recent data suggest that over-expression of miR-210 was related with HIF pathway. Camps et al. (2008) showed that miR-210 in human breast cancer are not only a marker of tumor hypoxia in vivo but also an indicator regulated by HIF-1 α in variety of tumor types through a hypoxia-responsive element. The accumulation of HIF is a key event in cRCC due to mutation in VHL gene (Cohen and McGovern, 2005). Therefore, miR-210 may be overexpressed due to the accumulation of HIF-1 α in cRCC. Its exact mechanism and its implication in cRCC tumorigenesis need to be further studied. Nevertheless, its diagnostic value should be explored.

Our objective was to evaluate the potential capacity of circulating miR-210 in serum samples for the detection of cRCC. Our results

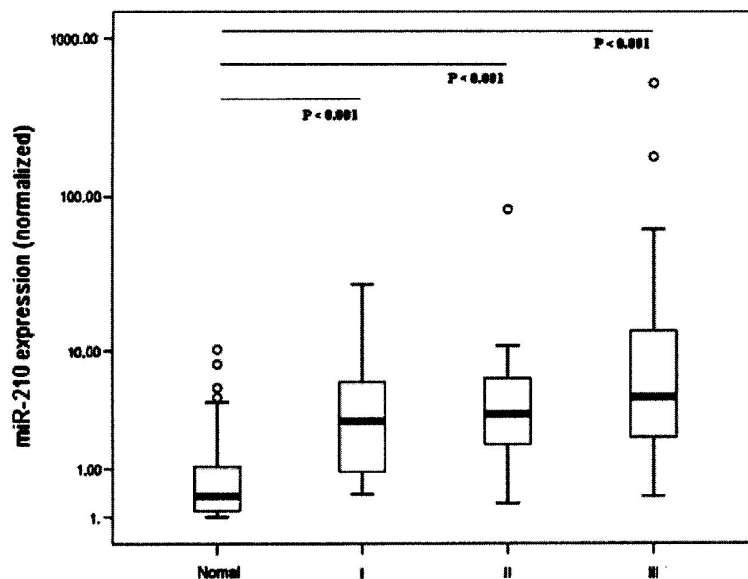


Fig. 4. Serum levels of miR-210 in normal subjects and cRCC patients with the different TNM stage. The serum level of miR-210 in each stage was significantly higher than in the control subjects. No significant difference was observed between the different TNM stages. Expression level of the miR-210 was normalized to 5s rRNA with log10 scale on y axis. The lines inside the boxes denote the medians.

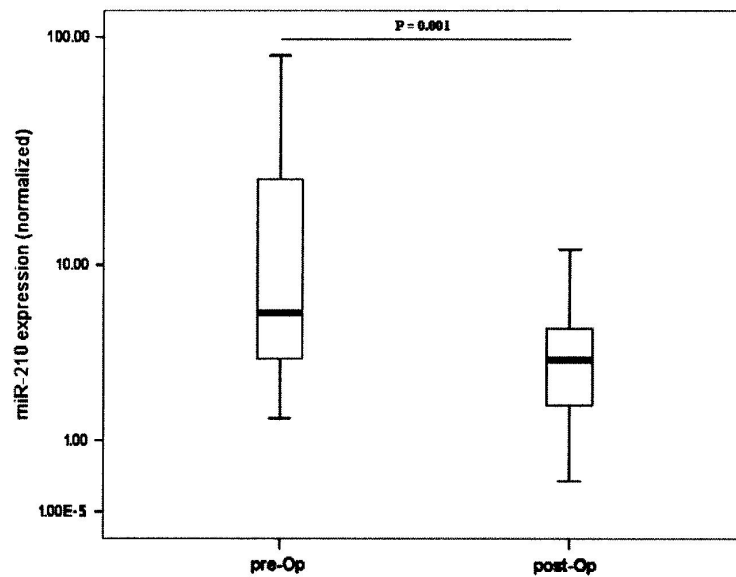


Fig. 5. Comparison of serum level of miR-210 between pre-operation and 7 days after the surgical removal of tumor. Expression level of miR-210 was significantly reduced in the post-operative samples compared to the preoperative samples. Expression level of the miR-210 was normalized to 5s rRNA with log10 scale on y axis. The lines inside the box represent the median value.

showed that the level of miR-210 was significantly higher in cRCC patients than in controls, and this change could discriminate cRCC from healthy controls with a high specificity and sensitivity. Importantly, the circulating miR-210 was significantly elevated in patients with TNM stage 1 cRCC as well as the other stages compared with healthy controls although there was no difference among the different stages. In addition, the expression level of miR-210 was significantly reduced postoperatively, suggesting that the serum miR-210 could be released partially from the primary renal tumors. Results from recent studies revealed that the circulating miR-210 or the other miRNAs are potential diagnostic biomarkers in cancer. Huang et al. (2009a) measured the levels of 12 miRNAs in plasma samples from patients with colorectal cancer, and found that plasma miR-29a (AUC=0.844) and miR-92a (AUC=0.838) had significant diagnostic value for advanced cancer patients. Tsujiura et al. (2010) also demonstrated that the plasma concentrations of miRNAs (miR-17-5p, miR-21, miR-106a and miR-106b) were significantly higher in gastric cancer patients than controls ($p=0.05$, 0.006 , 0.008 and <0.001 respectively), whereas let-7a ($p=0.002$) was lower in gastric cancer patients. More recently, a few of reports have been published in studying circulating miRNA in RCC. Sanders et al. (in press) compared some reference genes for the quantification of serum miRNA in patients of urinary cancers. They found that SNORD43 was a suitable reference gene for the analysis of circulating miRNAs in patients with urological cancer. In our study, we found that 5s rRNA was a relatively stable reference gene. Some researchers (Redova et al., 2012) found that circulating miR-378 in serum was a promising biomarker in RCC while the others (Hauser et al., 2012) showed that serum miR-378 level was unlikely to provide diagnostic information in RCC. Wulfken et al. (2011) found that the miR-1233 was significantly increased in patients with RCC compared to healthy controls ($p=0.022$). The ROC analysis showed a sensitivity of 90.9% and a specificity of 50% (AUC=0.669, 95%CI: 0.531–0.807). In that study, the diagnostic value of serum mi-210 was not found. The different technique and the method of calculation may explain the different results. In addition, we used 5s rRNA (121nt) as a reference that was induced owing to their purported expression stability. 5s rRNA was used in

several published miRNA RT-qPCR studies as a reference (Choong et al., 2007; Petillo et al., 2009). The study of the serum miRNAs in cRCC is just at the beginning. As far as the technique is standardized the serum mi-210 may be a novel avenue for the diagnosis of cRCC.

In conclusion, serum miR-210 level appears to be a novel biomarker for detection of cRCC. Further studies are needed to confirm our results.

Conflict of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Acknowledgment

This research was supported by la Ligue Nationale contre le Cancer du Comité de la Loire, France. We thank Pr. J Tostain for his scientific advice during this work.

References

- Bartels, C.L., Tsongalis, G.J., 2009. MicroRNAs: novel biomarkers for human cancer. *Clinical Chemistry* 55, 623–631.
- Camps, C., et al., 2008. hsa-miR-210 is induced by hypoxia and is an independent prognostic factor in breast cancer. *Clinical Cancer Research* 14, 1340–1348.
- Choong, M.L., et al., 2007. MicroRNA expression profiling during human cord blood derived CD34 cell erythropoiesis. *Experimental Hematology* 35, 551–564.
- Cohen, H.T., McGovern, F.J., 2005. Renal-cell carcinoma. *The New England Journal of Medicine* 353, 2477–2490.
- Esquela-Kerscher, A., Slack, F.J., 2006. Oncomirs – microRNAs with a role in cancer. *Nature Reviews Cancer* 6, 259–269.
- Fuhrman, S.A., et al., 1982. Prognostic significance of morphologic parameters in renal cell carcinoma. *The American Journal of Surgical Pathology* 6, 655–663.
- Garzon, R., et al., 2009. MicroRNAs in cancer. *Annual Review of Medicine* 60, 167–177.
- Hauser, S., et al., 2012. Analysis of serum microRNAs (miR-26a-2', miR-191, miR-33' 3p and miR-378) as potential biomarkers in renal cell carcinoma. *Cancer Epidemiology* 36, 391–394.
- Ho, A.S., et al., 2010. Circulating miR-210 as a novel hypoxia marker in pancreatic cancer. *Translational Oncology* 3, 109–113.
- Huang, X., et al., 2009a. Hypoxia-inducible miR-210 regulates normoxic gene expression involved in tumor initiation. *Molecular Cell* 35, 856–867.
- Huang, Y., et al., 2009b. Microarray analysis of microRNA expression in renal clear cell carcinoma. *European Journal of Surgical Oncology* 35, 1119–1123.

- Inui, M., et al., 2010. MicroRNA control of signal transduction. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 11, 252–263.
- Juan, D., et al., 2009. Identification of a microRNA panel for clear-cell kidney cancer. *Urology* 75, 835–841.
- Lam, J.S., et al., 2005. Role of molecular markers in the diagnosis and therapy of renal cell carcinoma. *Urology* 66, 1–9.
- Mitchell, P.S., et al., 2008. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105, 10513–10518.
- Neal, C.S., et al., 2010. The VHL-dependent regulation of microRNAs in renal cancer. *BMC Medicine* 8, 64.
- Petillo, D., et al., 2009. MicroRNA profiling of human kidney cancer subtypes. *International Journal of Oncology* 35, 109–114.
- Redova, M., et al., 2012. Circulating miR-378 and miR-451 in serum are potential biomarkers for renal cell carcinoma. *Journal of Translational Medicine* 10, 52.
- Sanders, I., et al., in press. Evaluation of reference genes for the analysis of serum miR patients with prostate cancer, bladder cancer and renal cell carcinoma. *International Journal of Urology*. <http://dx.doi.org/10.1111/j.14422042.2012.03082.x> (Epub ahead of print).
- Sobin, L., Wittekind, C., 2003. *TNM classification of malignant tumors*, 6th edition. International Union Against Cancer, 193. Wiley-Liss, New York.
- Tsujiura, M., et al., 2010. Circulating microRNAs in plasma of patients with gastric cancers. *British Journal of Cancer* 102, 1174–1179.
- Wu, L.M., et al., 2011. MicroRNAs in renal cell carcinoma: diagnostic implications of serum miR-1233 levels. *PLoS One* 6, e25787.

Article 2

Il a été montré que l'ARN libre circulant sérique/plasmatique est une bonne technique pour diagnostiquer un cancer. Cependant, il existe peu d'études de l'expression de l'ARN libre circulant dans l'urine des patients cancéreux. Le but de cette étude a été d'étudier la stabilité et l'intégrité de l'ARN libre circulant dans l'urine au cours du cancer du rein à cellules claires (ccRCC). 95 échantillons d'urine de patients avec un ccRCC, 45 échantillons d'urine de sujets sains et 15 échantillons d'urine d'une semaine après la chirurgie ont été inclus. L'intégrité de l'ARN libre circulant a été analysée sur 106 paires de base (pb) et 416 pb de GAPDH. Nous avons montré que l'ARN libre circulant était stable et détectable dans l'urine. Le niveau moyen du ratio d'intégrité de l'ARN libre circulant était significativement plus bas dans l'urine des patients avec un ccRCC que chez les sujets contrôle ($p < 0,001$). Le niveau du ratio d'intégrité de l'ARN libre circulant avait une aire sous la courbe ROC(AUC) de 0,86 avec une sensibilité de 73,3% et une spécificité de 92,6%. Le niveau moyen du ratio d'intégrité de l'ARN libre circulant urinaire était significativement réduit une semaine après la chirurgie ($p = 0,001$). De plus, le VEGF 98 pb a été détecté dans la majorité des urines des patients avec un ccRCC tandis que le VEGF 420 pb a été détecté difficilement. Ces résultats ont suggéré que le microARN libre circulant est détectable dans l'urine des patients avec un ccRCC. La mesure de l'ARN libre circulant dans l'urine peut fournir un test simple et économique pour la détection du ccRCC.

Cell-free RNA in urine as a possible molecular diagnostic tool for clear cell renal cell carcinoma

(Revision submitted to International Journal of Cancer)

An Zhao^{1,3}, Michel Péoc'h², Christian Genin³, Nicolas Mottet¹, Guorong Li¹

¹Department of Urology, North Hospital, CHU of Saint-Etienne, University of Jean-Monnet, Saint-Etienne, France

²Department of Pathology, North Hospital, CHU of Saint-Etienne, University of Jean-Monnet, Saint-Etienne, France

³Clinical Immunology Laboratory, North Hospital, CHU of Saint-Etienne, University of Jean-Monnet, Saint-Etienne, France

The corresponding author: Dr An ZHAO, Department of Urology/ Clinical Immunology Laboratory, North Hospital, CHU of Saint-Etienne, 42055 Saint-Etienne cedex 2, France. Tél: 0033-477828814; Fax: 0033-477828464. E-mail: an.zhao@univ-st-etienne.fr

Novelty & Impact Statements

Our paper is the first report on the integrity and stability of cell-free RNA (cf-RNA) in the urine of cancer patients. Our results indicated that the urinary small-sized cf-RNA was stable under different conditions. We found that urinary cf-RNA integrity index of patients with renal cell carcinoma was significantly lower in comparison to that in control subject. Small-sized cf-RNA was more abundant in urine of cancer patients. Moreover, we found that the tumor related gene VEGF could be detected in cell-free urine of patients with renal cell carcinoma. These results may provide a new way for diagnosis of clear cell renal cell carcinoma. Further studies should be carried out to define the usefulness of this assay for potential clinical application.

Abstract

Cell-free RNA (cf-RNA) in serum/plasma has been shown to be a promising method for diagnosis of cancer. However, a little has been known about cf-RNA in urine of cancer patients. The present study was performed to detect the cf-RNA in urine of clear cell renal cell carcinoma (ccRCC). 95 ccRCC patients and 45 urine samples from healthy control subjects were analyzed. The cf-RNA integrity index was calculated by using quantitative real-time PCR assays of a 106 bp and 416 bp in GAPDH. The initial analysis showed that cf-RNA was stable and detectable in the urine. The mean cf-RNA integrity index was significantly lower in the urine of RCC patients, 0.07 (95%CI: 0.05-0.10), when compared to urine from the healthy control subjects, 0.25 (95%CI: 0.16-0.35), ($P < 0.001$). The value of the area under the receiver-operating characteristic curve for cf-RNA integrity index was 0.86 with a sensitivity of 73.3% and a specificity of 92.6%. Moreover, a 98 bp VEGF was detected in majority of urine samples of cancer patients while a 420 bp VEGF was difficult to detect. Our findings suggest that small-sized RNA is detectable in cf-urine of cancer patients. The measurement of urinary cf-RNA may provide a simple and inexpensive assay for renal cell carcinoma detection.

Key words: Urine, cf-RNA integrity index, diagnosis, renal cell carcinoma.

Introduction

Renal cell carcinoma (RCC) is the third most common urological cancer and it has a high mortality. Clear cell or conventional renal cell carcinoma (ccRCC) is the most frequent subtype of RCC and accounts for approximately 75-80% of these tumors, and this subtype is responsible for the majority of deaths caused by the disease.(Capitanio *et al*, 2009) Recent advances in diagnostic techniques have increased the early detection of ccRCC and decreased the mortality rate. However, nearly 30-40% of patients will still metastasize after extended radical resections and the fact that ccRCC attains an annual incidence greater than 30,000 cases per year in United States.(Motzer *et al*, 1996; Skolarikos *et al*, 2007) The development of a simple molecular assay for RCC detection is appealing. Circulating Nucleic acid (NA) can appear in the blood and other biological fluids.(Bryzgunova *et al*, 2006; Lo, 2001)

The existence of cell-free RNA (cf-RNA) is a remarkable finding because RNA is more labile than DNA and ribonuclease is known to be present in biological fluid.(Reddi & Holland, 1976) Our group has been found that the cf-RNA concentrations increased significantly in RCC patients.(Feng *et al*, 2008) Certain articles reported that the cf-RNA may possibly be complexes to lipids, proteins, lipoproteins, or phospholipids(Masella *et al*, 1989; Rosi *et al*, 1988; Stroun *et al*, 1978; Wieczorek *et al*, 1985); bound with DNA in nucleosomes(Sisco, 2001); or protected within apoptotic bodies(Halicka *et al*, 2000) or other vesicular structures(Hasselmann *et al*, 2001). Therefore, cf-RNA in the urine may not be as fragile as it was previously assumed to be, and the cf-RNA fragments may be with different lengths between the cancer patient and normal because of the different protect mechanism. However, whether cell-free RNA exists in urine of cancer patients is completely unknown.

In this report, we describe a study on the cf-RNA in the urine of patient with ccRCC. The stability and integrity of urinary cf-RNA was tested in a total of 160 urine samples from ccRCC patients and normal volunteers. The glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) gene is suitable reference gene often used in research.(Barber *et al*, 2005) We designed two sizes (106 and 416bp) of GAPDH primers and used quantitative real-time PCR for the measurement of urinary cf-RNA integrity to see if it could serve as an effective tool for the detection of ccRCC and whether the urinary cf-RNA integrity could change after surgery of ccRCC patients. We also measured the tumor-related gene VEGF in the cf-urine of ccRCC patient compared to the normal

controls.

Material and Methods

Patients

Urine samples from ninety five patients with ccRCC were collected in this study. All patients with a renal tumor had a pathological diagnosis. The ccRCC was graded according to the Fuhrman criteria and staged according to the UICC system(Fuhrman *et al*, 1982; Sobin & Wittekind, 2003). The study was approved by the local ethics committee. The patients received the necessary information concerning the study and a consent statement was received from each patient. The control urine samples were collected from 29 healthy volunteers and 16 renal disease patients without carcinoma. Lastly, the urine samples from 15 patients were collected 7 days after the tumor resection, and these samples were used to determine whether cf-RNA integrity in cancer urine were changed after the tumor resection.

Processing of urine samples

In this study, all cell-free urines (cf-urine) were obtained by the initial centrifugation of the whole urine samples at 1200g for 10 min at 4 °C to spin down the cells (Centrifuge 5417R; Eppendorf, Germany). Supernatants were collected and further centrifuged at 12 000g for 10 min at 4 °C to completely remove cellular components (Centrifuge 5417R; Eppendorf). The cf-urines were then stored at -80 °C until RNA isolation. Urine samples were processed and cf-urine was frozen within 4 hr of the urine draw.

The stability evaluation of cf-RNA in the urine

A total of 12 cf-urine samples were used in this part.

Delayed urine processing. The cf-urine samples were divided into two portions, each portion with 6 samples. For the first portion, whole urine was left at room temperature for 0, 6, and 24 h. The second portion was that the whole urine was left at 4°C for 0, 6, and 24 h. Cf-urine was then collected for RNA extraction.

Freezing and thawing of urine. Each cf-urine samples was divided into three parts. One-third was snap-frozen in liquid nitrogen and then thawed at room temperature immediately. One-third was snap-frozen and thawed, after which the thawed urine was left at room temperature for 2h. Cf-urine was then collected for RNA extraction.

Liability of free added RNA in cf-urine. We added 1000 ng of commercially available human reference RNA (Stratagene, EU) to a randomly selected cf-urine sample and incubated for 0, 10, 20, 30 s at room temperature. After incubation, QIAzol solution (Qiagen) was immediately added to stop any ribonuclease activity.

RNA extraction

Total RNA was extracted from 350 µl cf-urine using MicroMini Kit (Qiagen, Germany) according to manufacturer's protocol. In brief, 700 µl QIAzol solutions (Qiagen) were added to each sample for lysis. Total RNA was extracted after the addition of 5.6×10^8 copies of the synthetic miRNA cel-miR-39 (Qiagen, Germany) as an internal control; RNA was eluted in 25 µl by RNase-free water. The RNA concentration and purity were controlled by UV spectrophotometry using a Nanodrop ND-1000 (Thermo Scientific, USA). The RNA specimens were stored at -80°C until reverse transcription.

Reverse Transcription

Complementary DNA (cDNA) was synthesized from total RNA using oligo-dT and random primer according to miScript Reverse Transcription Kit (Qiagen). For RT reactions 10 µl of RNA extract, 4 µl of 5 X miScript RT Buffer, 1 µl of miScript Reverse Transcriptase Mix were used. Reaction mixture were incubated at 37°C for 60 min, at 95°C for 5min and then held at 4°C. The cDNA specimens were stored at -20°C until PCR.

Cf-RNA integrity analysis

The f-RNA integrity was measured by quantitative PCR using the 7500 Real-Time PCR system (Applied Biosystems, USA) to determine the integrity index, which was defined as the ratio in relative abundance of 416 versus 106 bp PCR products of a housekeeping gene, the GAPDH. To control whether the DNA contamination in the source RNA, the primers were designed to span exon by Oligo 6.0 primer analysis software and manufactured by Sigma-Aldrich. Both 106- and 416-bp PCR fragments were amplified using the same forward primer: 5'-TCACCAGGGCTGCTTTTAAC-3'. The nested reverse primer for the 106-bp product was 5'-TGGGTGGAATCATATTGGA-3' and for 416-bp was 5'-GCAGTTGGTGCAGGAGG-3'. PCR amplifications were carried out in a buffer containing: 2 µl of cDNA, 12.5 µl of 2 X QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix (Qiagen) and 8.5 µl of RNase-free water (Qiagen) in a final volume of 25µl. The reaction mixtures were incubated at 95°C for 10 min, followed by 40

cycles of 95°C for 15 s, 56°C 30 s and 72°C 35 s. The universal human reference RNA (Stratagene, EU) was used as a positive control and the RNase-free water (Qiagen) was used as a negative control in each PCR assay. The cycle threshold (Ct) values were calculated with the SDS 1.4 software (Applied Biosystems). Each sample was run in duplicates for analysis. The Ct value for the 416-bp product for a sample was subtracted from that for the reference control to obtain the normalized Ct value for the 416-bp product ($\Delta\text{Ct-416}$). Likewise, The Ct value for the 106-bp product for a sample was subtracted from that for the reference control to obtain the normalized Ct value for the 106-bp product ($\Delta\text{Ct-106}$). The normalized Ct value for the 416-bp product was then subtracted from that for the 106-bp product to obtain a final $\Delta\Delta\text{Ct}$ value. The integrity index was calculated as exponential of ($2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$). All samples were analyzed blindly without prior knowledge of the specimen identity.

The preliminary study of tumor related gene: Vascular endothelial growth factor (VEGF)

The 98 bp and 420 bp PCR fragments of VEGF was amplified by quantitative PCR. Both 106- and 416-bp PCR fragments were amplified using the same forward primer: 5'-CAGAAGGAGGAGGGCAGAAT-3'. The nested reverse primer for the 98 bp product was 5'-GAAGATGTCCACCAGGGTCT-3' and for 416-bp was. 5'-TCGGCTTGTCACATACGCTC-3'. The forward primer and the nested reverse primer were designed to span exon by Oligo 6.0 primer analysis software and manufactured by Sigma-Aldrich. The detection of amplified product was electrophoresed through a 2% agarose gel in 0.5× TBE buffer (pH 8.0) at 100 V for 20 minute and stained with ethidium bromide.

Statistical Methods

Expression levels were compared by using the Mann-Whitney U test, Friedman, ~~or~~ Wilcoxon and Chi-square test. Receiver-operating characteristics (ROC) curve was established to evaluate the diagnostic value of urinary cf-RNA for the differentiation between RCC patients and controls. Bonferroni correction was taken into consideration because of the multiple comparisons carried out in this study. According to this correction P value < 0.025 was considered statistically significant. All analysis was performed with SPSS 13.0 and GraphPad prism 5.0 software.

Results

Patient population

A total of 130 participants including 95 RCC patients and 45 normal subjects were recruited into this study (Supporting Information Table. S1). No significant differences of age or gender were found between RCCs and normal controls ($p = 0.089$, ANOVA: $p = 0.683$, χ^2 test).

Stability of cf-RNA in urine

To determine whether delayed urine processing would lead to degradation of urinary cf-RNA, we measured the cf-RNA integrity index left for 0, 6 and 24h. At two portions of room temperature and 4°C, urinary cf-RNA integrity index were no significant difference at three incubation time points ($P=0.082$ for room temperature incubation and $P=0.568$ for 4°C incubation) (Supporting Information Fig. S1).

We also tested the RNA concentrations in freeze-thawed cf-urine. Liquid nitrogen was used in the process to minimize the time of achieving the frozen state. No significant difference was found for total RNA concentrations among untreated urine, freeze-thawed urine, and freeze-thawed urine that had been left for 2 h at room temperature ($P=0.920$; Fig. S2).

The change was found in quantity of total RNA extraction after a commercially RNA sample was added into urine is shown in Fig. S3. In the first 10 s, the total RNA extraction decreased dramatically, from 1100 ng to 249 ng. After a 20 s incubation time, >99% of the commercially RNA sample was degraded and became non detectable.

Urinary cf-RNA integrity index as a diagnostic tool in ccRCC

Mean cf-RNA integrity index was significantly lower in urine from patients with ccRCC 0.07 (95% CI: 0.05-0.10) when compared to cf-RNA integrity index from control subjects 0.25 (95% CI: 0.16-0.35) ($p < 0.001$; Fig. 1). Next, we examined the correlation between the urinary cf-RNA integrity indexes with clinical parameters. No significant association was found between the urinary cf-RNA integrity and gender, age, grade, and tumor size ($p > 0.025$; Table 1). We compared the urinary cf-RNA integrity index of control subjects and ccRCC patients with the different TNM stages (35 stage I, 29 stage II, 31 stage III). Each of the 3 stages including stage III patients had significantly lower urinary cf-RNA integrity index when compared with the controls ($p < 0.001$; Fig. 2). No significant difference was observed between the different TNM stages.

To assess the feasibility of using urinary cf-RNA integrity index as a diagnostic tool for

detecting ccRCC, ROC curve analyses was studied for urinary cf-RNA integrity index (Fig. 3). The area under the ROC curve for GAPDH was 0.86 (95% CI: 0.79-0.92). At the cutoff value of 0.13 for cf-RNA integrity index, the sensitivity and the specificity were respectively 73.3% and 92.6%.

Comparison of urinary cf-RNA integrity index in pre- and postoperative ccRCC

To evaluate whether changes in urinary cf-RNA integrity index occurred after surgical removal of the tumors, we compared in an independent set of 15 ccRCC patients pre- and postoperative (7 days after surgical) urine of ccRCC patients. It was found that the mean urinary cf-RNA integrity index 0.22 (95% CI: 0.17-0.36) in the postoperative subjects was significantly increased when compared to the preoperative subjects 0.06 (95% CI: 0.04-0.10) ($P < 0.001$; Fig. 4).

Detection of VEGF in cf-urine

In our preliminary observation, two size (98 bp and 420 bp) of the tumor related gene VEGF was detected in 50 of patients with ccRCC 45 of controls. We found that the small-sized VEGF (98 bp) was detected in 31 of 50 of patients with ccRCC and 3 of 45 of controls ($P < 0.001$; Figure S4). In contrast, the big-sized VEGF (420 bp) was detected in only 8 of total 95 cf-urine samples.

Discussion

Certain studies reported that NA could be released from apoptotic or necrotic cells and that NA size distribution may be used to determine the origin of NA from either apoptotic or necrotic cells.(Bryzgunova *et al*, 2006; Jahr *et al*, 2001) However, Tumor necrosis is a frequent event in solid malignant neoplasm, and it generates a spectrum of NA fragments with different strand lengths because of the presence of blood RNase and the different protection mechanisms. Cf-RNA in serum has been largely studied as a promising way for cancer diagnosis. However, there has never been a report on the study of cell-free RNA in the urine of cancer patients.

In this report, we have demonstrated that circulating cf-RNA is stable enough to be amplified after the cf-urine is left for 24 h. But the delayed blood processing did not lead to degradation of cf-RNA at room temperature incubation or at 4°C. In contrast, the effect of urinary RNases can be demonstrated by the free RNA liability experiment, which showed that >99% of the free added RNA was degraded on after a 20 s incubation time. Cf-RNA might be resistant to the

activity of urinary RNase. In a previous study by Kopreski et al, (Kopreski *et al*, 1999) freezing and thawing of sample was suggested to promote degradation of RNA. However, in our study, we have found that freezing and thawing of urine did not significantly change the RNA concentrations.

We investigated whether urinary cf-RNA integrity index could be diagnostic potential for ccRCC patients. The comparison between expressions of cf-RNA integrity index in urine of ccRCC and controls showed the urinary cf-RNA integrity index was significantly lower in ccRCC patients than in controls, and the urinary cf-RNA integrity index had significant diagnostic value for ccRCC with yielded AUC of 0.86. Because cf-RNA is considered to have been released from cancer tissues as well as from normal tissues, the majority are expected to have originated from normal tissues. In cancer patients, increased RNases in circulating has been detected, (Reddi & Holland, 1976) the big-sized RNA fragment might be easier degradation in cancer patients than controls. In contrast, the small-sized RNA fragment might be always protected in a complex with other molecules, such as exosomes, which are 30-100 nm membrane vesicles that are secreted into the extracellular environment by many different cell types. (van Niel *et al*, 2006) Recent evidence reveals that exosomes from mast cells contain both mRNA and miRNA that these RNAs can be transferred to other mast cells. (Valadi *et al*, 2007) Moreover, most body fluids contain significant amounts of exosomes. (Caby *et al*, 2005; Pisitkun *et al*, 2004)

We compared the urinary cf-RNA integrity index with clinic parameters. Among the ccRCC patients, we observed no significant difference of cf-RNA integrity index in groups with different gender, age, grade, and tumor size. But, urinary cf-RNA integrity index was significantly lower in ccRCC patients with the different TNM stages than the controls. We also measured cf-RNA integrity in paired urine before and 7 days after surgical removal of the tumors, to confirm urinary cf-RNA might be released from ccRCC and renal normal cells, and the more frequent necrosis event in cancer patients might provide more chance to degrade the big-sized RNA.

Finally, we tested a tumor-related gene in the cf-urine, VEGF, which could be expected in ccRCC with VHL mutations despite normal oxygenation conditions. (Ljungberg *et al*, 2006) We found that a 98 bp VEGF was detected in majority of urine samples of cancer patients while a 420 bp VEGF was difficult to detect. These preliminary results provided support for our previous

findings that small-sized RNA is detectable in cf-urine of cancer patients. Several results have been reported on the significance of up-regulated VEGF in peripheral blood of ccRCC.(Ljungberg *et al*, 2003; Sato *et al*, 1999) The correlation between the cf-RNA in the peripheral blood and urine is unknown and whether the circulating mRNA from the blood can pass through the kidney barrier into the urine need to be further studied. In addition, cf-RNA might be discharged directly by tumor cells of ccRCC into urine.

To our knowledge, it's the first report on the study of cell-free RNA in the urine of cancer patients with RCC. Some researchers including us have reported the potential utility in the clinical diagnosis of cf-DNA in the blood or urine samples.(Casadio *et al*; Gang *et al*, 2009) However, RNA is more sensible than DNA. Therefore, the application of Cf-RNA in the urine for cancer diagnosis is promising.

In conclusion, our results indicate that the urinary cf-RNA is stable under certain conditions and the urinary cf-RNA integrity index of patients with ccRCC is changed in comparison to that in control subject. Small-sized tumor RNA VEGF is detectable in cell-free urine. Gene expression of tumoral RNA in cell-free urine may represent novel and clinically beneficial tests for the diagnosis of renal cancer.

Acknowledgement: This research was supported by la Ligue Nationale contre le Cancer du Comité de la Loire, France.

References

- Caby MP, Lankar D, Vincendeau-Scherrer C, Raposo G, Bonnerot C (2005) Exosomal-Like Vesicles Are Present in Human Blood Plasma. *Int Immunol* **17**(7): 879-87
- Camps C, Buffa FM, Colella S, Moore J, Sotiriou C, Sheldon H, Harris AL, Gleadle JM, Ragoussis J (2008) Hsa-Mir-210 Is Induced by Hypoxia and Is an Independent Prognostic Factor in Breast Cancer. *Clin Cancer Res* **14**(5): 1340-8
- Casadio V, Calistri D, Tebaldi M, Bravaccini S, Gunelli R, Martorana G, Bertaccini A, Serra L, Scarpi E, Amadori D, Silvestrini R, Zoli W Urine Cell-Free DNA Integrity as a Marker for Early Bladder Cancer Diagnosis: Preliminary Data. *Urol Oncol*
- Chen Z, Li Y, Zhang H, Huang P, Luthra R (2010) Hypoxia-Regulated Microrna-210 Modulates Mitochondrial Function and Decreases Iscu and Cox10 Expression. *Oncogene* **29**(30): 4362-8
- Cohen HT, McGovern FJ (2005) Renal-Cell Carcinoma. *N Engl J Med* **353**(23): 2477-90
- Elashoff D, Zhou H, Reiss J, Wang J, Xiao H, Henson B, Hu S, Arellano M, Sinha U, Le A, Messadi D, Wang M, Nabili V, Lingen M, Morris D, Randolph T, Feng Z, Akin D, Kastratovic DA, Chia D, Abemayor E, Wong DT (2012) Prevalidation of Salivary Biomarkers for Oral Cancer Detection. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **21**(4): 664-72
- Feng G, Li G, Gentil-Perret A, Tostain J, Genin C (2008) Elevated Serum-Circulating Rna in Patients with Conventional Renal Cell Cancer. *Anticancer Res* **28**(1A): 321-6
- Gang F, Guorong L, An Z, Anne GP, Christian G, Jacques T (2009) Prediction of Clear Cell Renal Cell Carcinoma by Integrity of Cell-Free DNA in Serum. *Urology* **75**(2): 262-5
- Giannakakis A, Sandaltzopoulos R, Greshock J, Liang S, Huang J, Hasegawa K, Li C, O'Brien-Jenkins A, Katsaros D, Weber BL, Simon C, Coukos G, Zhang L (2008) Mir-210 Links Hypoxia with Cell Cycle Regulation and Is Deleted in Human Epithelial Ovarian Cancer. *Cancer Biol Ther* **7**(2): 255-64
- Halicka HD, Bedner E, Darzynkiewicz Z (2000) Segregation of Rna and Separate Packaging of DNA and Rna in Apoptotic Bodies During Apoptosis. *Exp Cell Res* **260**(2): 248-56
- Hasselmann DO, Rappl G, Tilgen W, Reinhold U (2001) Extracellular Tyrosinase Mrna within Apoptotic Bodies Is Protected from Degradation in Human Serum. *Clin Chem* **47**(8): 1488-9
- Hauser S, Wulfken LM, Holdenrieder S, Moritz R, Ohlmann CH, Jung V, Becker F, Herrmann E, Walgenbach-Brunagel G, von Ruecker A, Muller SC, Ellinger J (2012) Analysis of Serum Micrnas (Mir-26a-2*, Mir-191, Mir-337-3p and Mir-378) as Potential Biomarkers in Renal Cell Carcinoma. *Cancer Epidemiol* **36**(4): 391-4

- Ho AS, Huang X, Cao H, Christman-Skieller C, Bennewith K, Le QT, Koong AC (2010) Circulating Mir-210 as a Novel Hypoxia Marker in Pancreatic Cancer. *Transl Oncol* **3**(2): 109-13
- Huang X, Ding L, Bennewith KL, Tong RT, Welford SM, Ang KK, Story M, Le QT, Giaccia AJ (2009) Hypoxia-Inducible Mir-210 Regulates Normoxic Gene Expression Involved in Tumor Initiation. *Mol Cell* **35**(6): 856-67
- Kopreski MS, Benko FA, Kwak LW, Gocke CD (1999) Detection of Tumor Messenger Rna in the Serum of Patients with Malignant Melanoma. *Clin Cancer Res* **5**(8): 1961-5
- Ljungberg B, Jacobsen J, Haggstrom-Rudolfsson S, Rasmuson T, Lindh G, Grankvist K (2003) Tumour Vascular Endothelial Growth Factor (Vegf) Mrna in Relation to Serum Vegf Protein Levels and Tumour Progression in Human Renal Cell Carcinoma. *Urol Res* **31**(5): 335-40
- Ljungberg BJ, Jacobsen J, Rudolfsson SH, Lindh G, Grankvist K, Rasmuson T (2006) Different Vascular Endothelial Growth Factor (Vegf), Vegf-Receptor 1 and -2 Mrna Expression Profiles between Clear Cell and Papillary Renal Cell Carcinoma. *BJU Int* **98**(3): 661-7
- Masella R, Cantafora A, Guidoni L, Luciani AM, Mariutti G, Rosi A, Viti V (1989) Characterization of Vesicles, Containing an Acylated Oligopeptide, Released by Human Colon Adenocarcinoma Cells. Nmr and Biochemical Studies. *FEBS Lett* **246**(1-2): 25-9
- Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, Pogosova-Agadjanyan EL, Peterson A, Noteboom J, O'Briant KC, Allen A, Lin DW, Urban N, Drescher CW, Knudsen BS, Stirewalt DL, Gentleman R, Vessella RL, Nelson PS, Martin DB, Tewari M (2008) Circulating Micrnas as Stable Blood-Based Markers for Cancer Detection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(30): 10513-8
- Neal CS, Michael MZ, Rawlings LH, Van der Hoek MB, Gleadle JM (2010) The Vhl-Dependent Regulation of Micrnas in Renal Cancer. *BMC Med* **8**: 64
- Pisitkun T, Shen RF, Knepper MA (2004) Identification and Proteomic Profiling of Exosomes in Human Urine. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(36): 13368-73
- Reddi KK, Holland JF (1976) Elevated Serum Ribonuclease in Patients with Pancreatic Cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **73**(7): 2308-10
- Redova M, Poprach A, Nekvindova J, Iliev R, Radova L, Lakomy R, Svoboda M, Vyzula R, Slaby O (2012) Circulating Mir-378 and Mir-451 in Serum Are Potential Biomarkers for Renal Cell Carcinoma. *J Transl Med* **10**: 55
- Rosi A, Guidoni L, Luciani AM, Mariutti G, Viti V (1988) Rna-Lipid Complexes Released from the Plasma Membrane of Human Colon Carcinoma Cells. *Cancer Lett* **39**(2): 153-60

Sato K, Tsuchiya N, Sasaki R, Shimoda N, Satoh S, Ogawa O, Kato T (1999) Increased Serum Levels of Vascular Endothelial Growth Factor in Patients with Renal Cell Carcinoma. *Jpn J Cancer Res* **90**(8): 874-9

Stroun M, Anker P, Beljanski M, Henri J, Lederrey C, Ojha M, Maurice PA (1978) Presence of Rna in the Nucleoprotein Complex Spontaneously Released by Human Lymphocytes and Frog Auricles in Culture. *Cancer Res* **38**(10): 3546-54

Tsujiura M, Ichikawa D, Komatsu S, Shiozaki A, Takeshita H, Kosuga T, Konishi H, Morimura R, Deguchi K, Fujiwara H, Okamoto K, Otsuji E (2010) Circulating Micrnas in Plasma of Patients with Gastric Cancers. *Br J Cancer* **102**(7): 1174-9

Urquidi V, Rosser CJ, Goodison S (2012) Molecular Diagnostic Trends in Urological Cancer: Biomarkers for Non-Invasive Diagnosis. *Curr Med Chem* **19**(22): 3653-63

van Niel G, Porto-Carreiro I, Simoes S, Raposo G (2006) Exosomes: A Common Pathway for a Specialized Function. *J Biochem* **140**(1): 13-21

White NM, Yousef GM (2010) Micrnas: Exploring a New Dimension in the Pathogenesis of Kidney Cancer. *BMC Med* **8**: 65

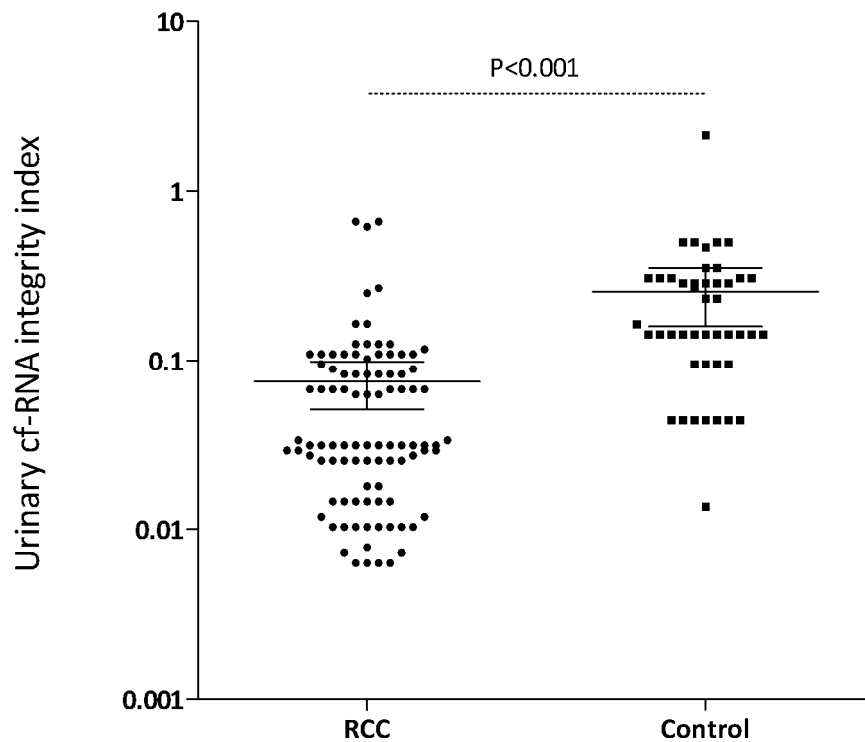
Wieczorek AJ, Rhyner C, Block LH (1985) Isolation and Characterization of an Rna-Proteolipid Complex Associated with the Malignant State in Humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**(10): 3455-9

Wulfken LM, Moritz R, Ohlmann C, Holdenrieder S, Jung V, Becker F, Herrmann E, Walgenbach-Brunagel G, von Ruecker A, Muller SC, Ellinger J (2011) Micrnas in Renal Cell Carcinoma: Diagnostic Implications of Serum Mir-1233 Levels. *PLoS One* **6**(9): e25787

Youssef YM, White NM, Grigull J, Krizova A, Samy C, Mejia-Guerrero S, Evans A, Yousef GM (2011) Accurate Molecular Classification of Kidney Cancer Subtypes Using Micrna Signature. *Eur Urol* **59**(5): 721-30

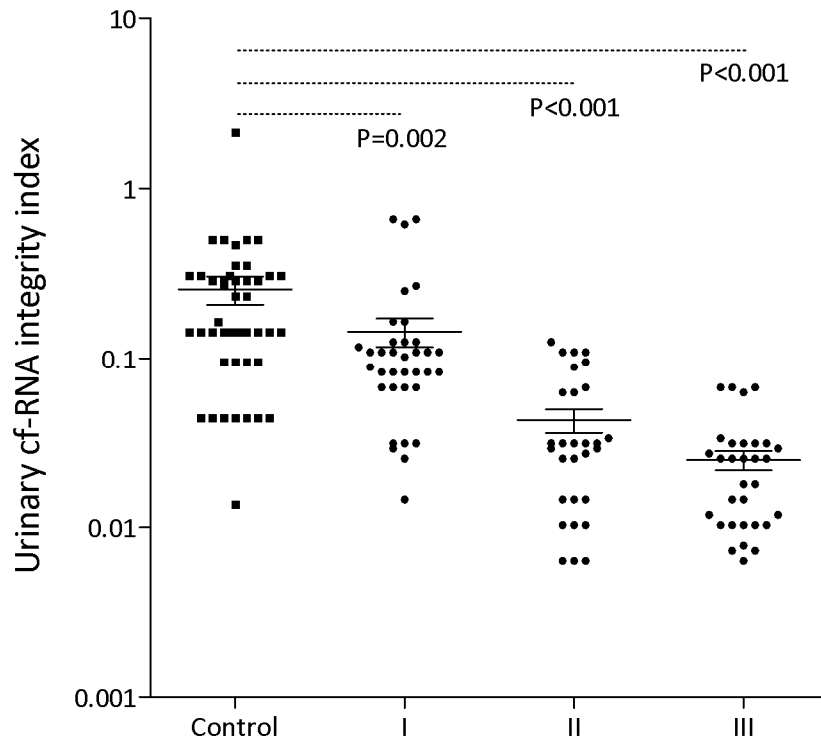
Zhao A, Li G, Peoc'h M, Genin C, Gigante M (2012) Serum Mir-210 as a Novel Biomarker for Molecular Diagnosis of Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *Exp Mol Pathol* **94**(1): 115-20

Figure 1. Urinary cf-RNA integrity index in the RCC patients and controls.



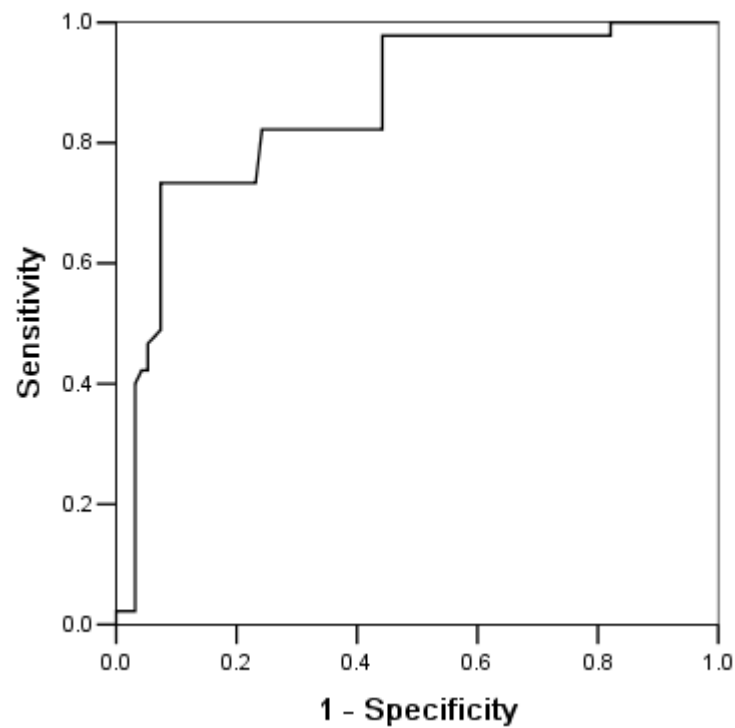
Scatter plots of urinary cf-RNA integrity index in RCC patients (n=95) and controls (n=45). The urinary cf-RNA integrity index was significantly lower in the RCC patients (mean: 0.07, 95%CI: 0.05-0.10) than in the controls (mean: 0.25, 95%CI: 0.16-0.35) ($P < 0.001$). The symbols indicate the means. The Error bars indicate the 95% confidence interval. Mann-Whitney U test used to determine statistical significance.

Figure 2. Urinary cf-RNA integrity index in the controls and the RCC patients with the different TNM stages.



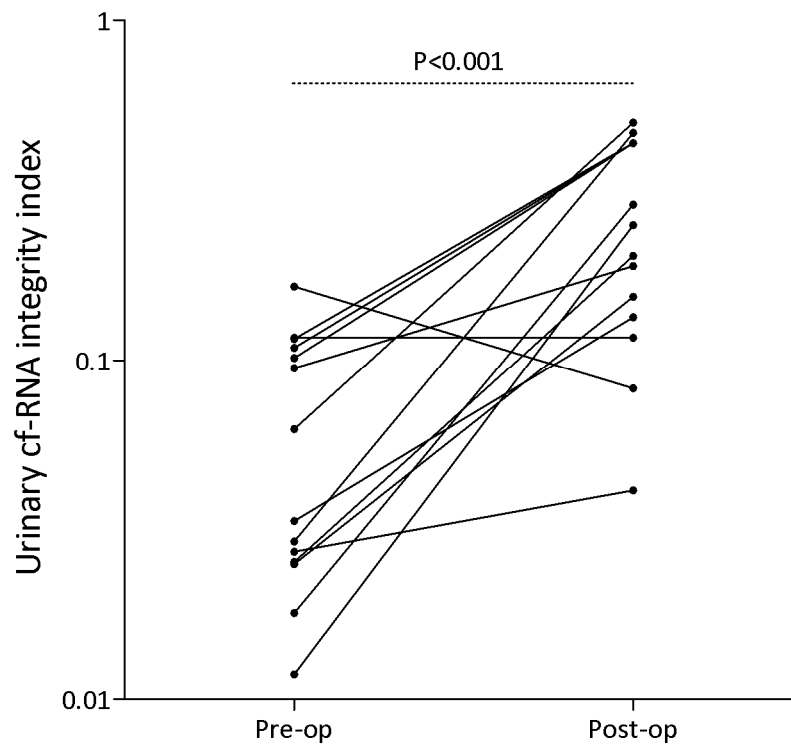
Scatter plots of urinary cf-RNA integrity index in the controls (n=45), and RCC patients with different TNM stage (35 with I, 29 with II, 31 with III). The urinary cf-RNA integrity index ($P<0.025$) in each stage was significantly lower than in the controls. No significant difference was observed between the different TNM stages. The symbols indicate the means. The Error bars indicate the 95% confidence interval. Mann-Whitney U test used to determine statistical significance.

Figure 3. Receiver operating characteristic (ROC) curve analysis using urinary cf-RNA integrity index for discriminating RCC patients.



Urinary cf-RNA integrity index yielded an AUC (the areas under the ROC curve) of 0.86 (95% CI: 0.79-0.924) with a sensitivity of 73.3% and a specificity of 92.6% in discrimination between the RCC patients and the controls.

Figure 4. Comparison of urinary cf-RNA integrity index between pre-operation and 7 days after surgical removal of tumor.

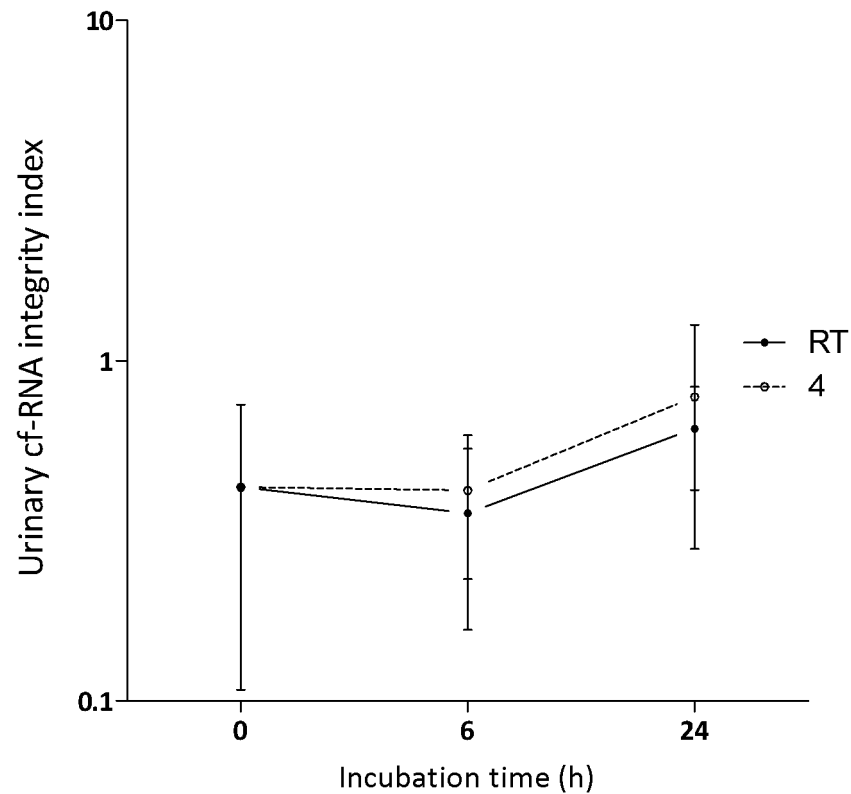


Changes of urinary cf-RNA integrity index in RCC patients (n=15) before (pre-Op) and 7 days after (post-Op) surgical removal of the tumor. Urinary cf-RNA integrity index was significantly increased in post-operative samples (mean: 0.22, 95% CI: 0.17-0.36) compared to the preoperative samples (mean: 0.06, 95% CI: 0.04-0.10) ($p<0.001$). Wilcoxon test used to determine statistical significance.

Table 1. Clinical characteristics analysis

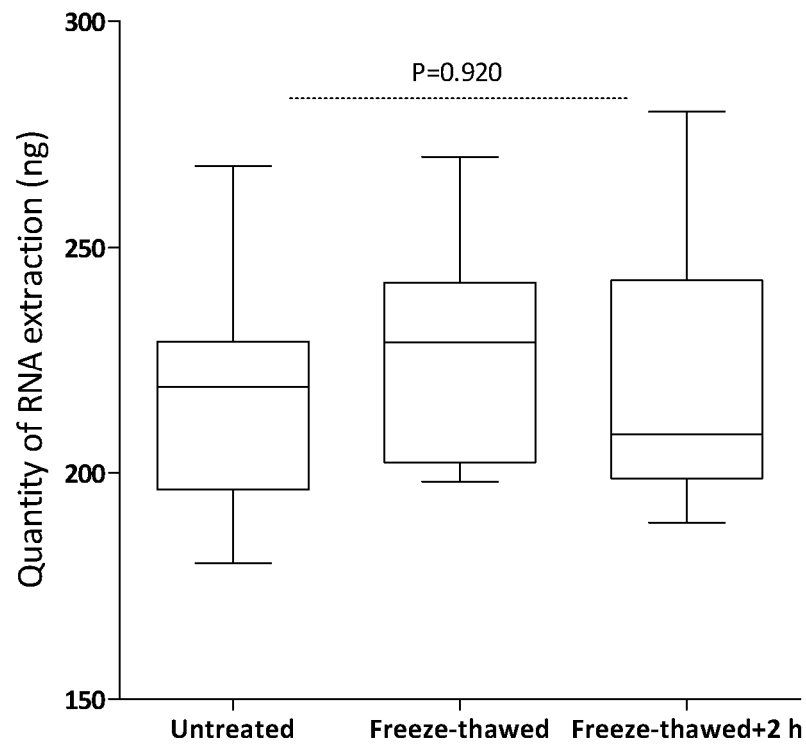
	No. Pts	Mean log (RNA integrity index)	P
Sex:			
Male	70	0.08 (95%CI:0.05, 0.11)	0.803
Female	25	0.07 (95%CI:0.04, 0.10)	
Age:			
64 or Older	49	0.08 (95%CI:0.04, 0.11)	0.679
63 or Younger	46	0.07 (95%CI:0.04, 0.10)	
Stage:			
T1+T2	64	0.09 (95%CI:0.07, 0.13)	0.001*
T3	31	0.03 (95%CI:0.02, 0.04)	
Grade:			
G1+G2	47	0.09 (95%CI:0.04, 0.13)	0.849
G3+G4	48	0.06 (95%CI:0.05, 0.08)	
Tumor size (cm):			
4 or Greater than 4	47	0.09 (95%CI:0.05, 0.13)	0.262
Less than 4	48	0.05 (95%CI:0.03, 0.07)	
*Differences statistically significant after Bonferroni correction as P values are < 0.025			

Figure S1. Effect of delayed processing of urinary cf-RNA integrity index expression.



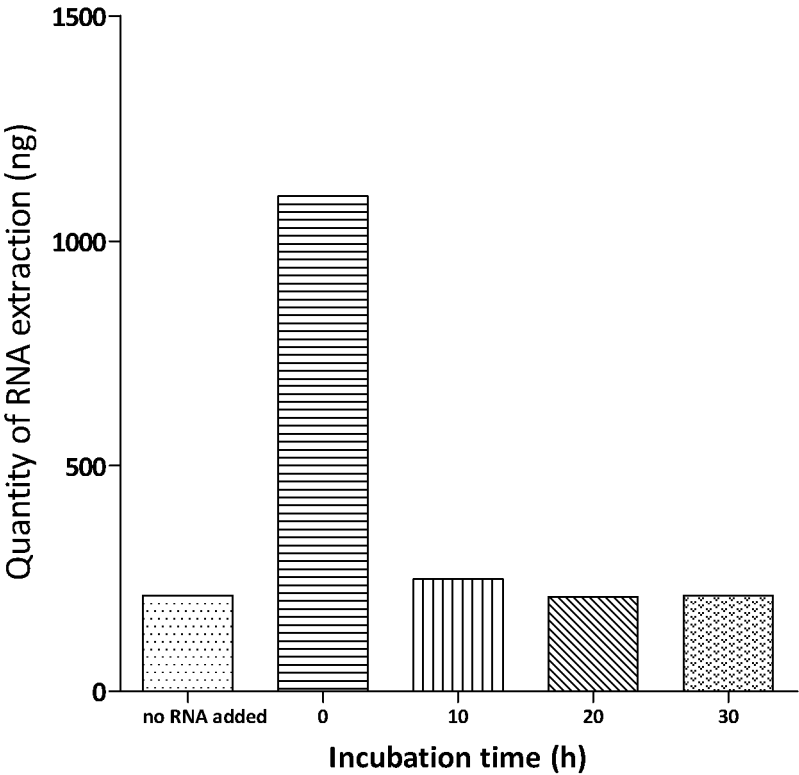
Urinary cf-RNA integrity index as determined by real-time quantitative RT-PCR are plotted on the Y axis. Whereas the incubation time of urine (h) is plotted on the x axis. ○, urine incubated at 4°C; ●, urine incubated at room temperature (RT). The symbols indicate the means. The Error bars indicate the 95% confidence intervals. Statistically significant differences were determined using Friedman tests.

Figure S2. Effect of freezing/thawing of urine on RNA concentrations.



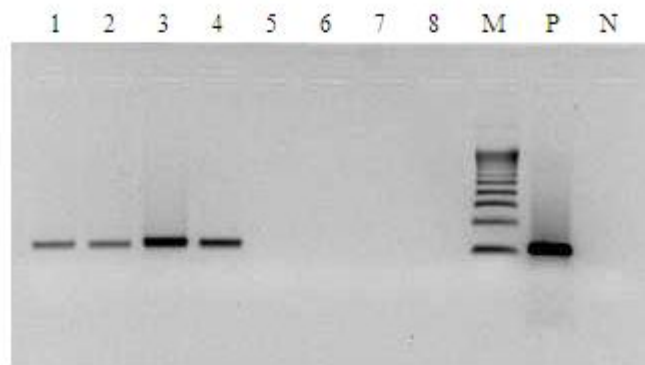
Quantity of RNA extraction (ng) as determined by spectrometer is plotted on y axis. The processing categories are shown on the x axis. The upper and lower limits of the boxes and the lines across the boxes indicate the 75th and 25th percentiles and the median. Statistically significant differences were determined using Friedman tests.

Figure S3. Temporal variation of the quantity of exogenous free RNA added to cf-urine



Quantity of RNA extraction (ng) as determined by spectrometer is plotted on y axis. The processing categories are shown on the x axis.

Figure S4. Detection of VEGF of urine samples.



A gel view of PCR products of VEGF from cf-urine with different groups. Lane 1, 2, 3, 4 (VEGF 98bp) are for RCC patients, lanes 3, 4, 5, 6 (VEGF 98bp) for controls subjects. Lane M was for the molecular marker. P for positive control and N for negative control. The gene VEGF was detected in 31 of 50 of patients with RCC and 3 of 45 of controls ($P < 0.001$; Chi-square Test).

Table S1. Characteristics of study subjects

Renal Cell Carcinoma (RCC) (N=95)		
No. Sex (%)		
Male	70	(73.7)
Female	25	(26.3)
Median Age (range)	64	(34-83)
No. TNM (%)		
T1	35	(36.8)
T2	29	(30.5)
T3	31	(32.7)
No. Grade (%)		
G1	15	(15.8)
G2	32	(33.7)
G3	42	(44.2)
G4	6	(6.3)
Metastasis (%)		
No	91	(95.8)
Yes	4	(4.2)
Controls (N=45)		
No. Sex (%)		
Male	25	(55.5)
Female	20	(44.5)
Median Age (range)	50.2	(20-68)

Article 3

L'urine fournit une alternative au sang (sérum/plasma) qui est une source potentielle de marqueurs tumoraux. Les études précédentes ont montré que le miR-15, le miR-210 et le miR-1233 sont des marqueurs spécifiques pour le cancer du rein à cellule claire (ccRCC). Le but de cette étude était de déterminer si les miARNs libres circulants dans l'urine peuvent être utilisés comme marqueurs pour le ccRCC. Le taux des trois miARNs a été analysé dans 75 échantillons de patients et de 45 sujets contrôle par PCR quantitative à temps réel. Nous avons observé que le miR-210 et le miR-1233 libres circulants urinaires ont une valeur discriminante significative pour diagnostiquer un ccRCC. Le niveau du miR-210 avait une aire sous la courbe ROC(AUC) de 0,76 et le taux du miR-1233 avait une AUC de 0,78. La combinaison des deux dosages a permis d'augmenter la sensibilité à 66,7% et la spécificité à 91,1%. De plus, le taux des ARNs libres circulants urinaires était significativement réduit une semaine après la chirurgie. Ces résultats suggèrent que les miARNs libres circulants urinaires sont de très bons marqueurs pour le diagnostic du ccRCC.

Detection of urinary cell-free microRNAs in clear cell renal cell carcinoma

An Zhao^{1,3}, Christian Genin³, Michel Péoc'h², Nicolas Mottet¹, Guorong Li¹

¹Department of Urology, North Hospital, CHU of Saint-Etienne, University of Jean-Monnet, Saint-Etienne, France

²Department of Pathology, North Hospital, CHU of Saint-Etienne, University of Jean-Monnet, Saint-Etienne, France

³Clinical Immunology Laboratory, North Hospital, CHU of Saint-Etienne, University of Jean-Monnet, Saint-Etienne, France

Soumis.

Background: Urine provides an alternative to blood serum/plasma as potential source of tumor biomarkers. We tested miR-15, miR-210, mi5-1233, which proven to have specificity for clear cell renal cell carcinoma (ccRCC) in previous studies were selected as diagnostic markers.

Methods: The expression levels of these three miRNAs were performed on 75 patients and 45 normal controls by quantitative real-time PCR.

Results: we found that the urinary cell-free (ucf) miR-210 and miR-1233 have significant diagnostic value for ccRCC. MiR-210 yielded an AUC (the areas under the ROC curve) of 0.76 and miR-1233 yielded an AUC of 0.78 in discriminating ccRCC from controls. Combined ROC analyses using these 2 miRNAs revealed an elevated AUC of 0.84 with 66.7% sensitivity and 91.1% specificity. Moreover, the expression level of ucf-miR-210 and ucf-miR-1233 was significantly decreased in the patients one week after the operation ($p < 0.001$).

Conclusion: ucf-miR-210 and ucf-miR-1233 are ideal biomarkers for ccRCC diagnosis.

Key words: urine, cell-free microRNA, detection, renal cell carcinoma.

The corresponding author: Dr. Guorong Li, Department of Urology/ Clinical Immunology Laboratory, North Hospital, CHU of Saint-Etienne, 42055 Saint-Etienne cedex 2, France. Tél: 0033-477828814 ; Fax : 0033-477828464. E-mail: grli2001@yahoo.fr

INTRODUCTION

Kidney cancer is the third most common urological cancer in the United State, with an estimated 65 150 new cases and 13 680 deaths in 2013 (Siegel *et al*, 2013).. Clear cell or conventional renal cell carcinoma (ccRCC) is the most frequent subtype of RCC and accounts for approximately 75-80% of these tumors, and this subtype is responsible for the majority of deaths caused by the disease (Capitanio *et al*, 2009). Recent advances in diagnostic techniques have increased the early detection of ccRCC and decreased the mortality rate. However, approximately 33% of patients with ccRCC present with disseminated disease at diagnosis (Curti, 2004), and nearly 30-40% of patients will still metastasize after extended radical resections (Skolarikos *et al*, 2007). Once metastatic disease develops, the 5-year survival rate for patients with ccRCC drops from 60% to <5% (Figlin *et al*, 1997). Therefore, the importance of detecting novel biomarkers using a less invasive diagnostic assay for ccRCC should be emphasized.

MiRNAs are 18-25 nucleotide noncoding RNA molecules that are involved in tumorigenesis and the development of various cancers (Garzon *et al*, 2009; Inui *et al*, 2010). Mitechell et al (Mitchell *et al*, 2008) clearly reported that circulating miRNAs existed in serum/plasma, and were originated from cancerous tissue and are protected from endogenous RNase activity. Certains articles reported that the circulating miRNAs are resistant to endogenous ribonuclease activity may possibly be binding with some protein including the Argonaute 2 protein and lipoproteins (Arroyo *et al*, 2011; Vickers *et al*, 2011), or packaged by some kinds of secretory particles, such as apoptotic bodies and exosomes (Cocucci *et al*, 2009; Hasselmann *et al*, 2001; Kosaka *et al*, 2010). In addition, exosomes from mast cells contain both mRNA and miRNA that these RNAs can be transferred to other mast cells (Valadi *et al*, 2007).

Concerning ccRCC, some researchers including us have reported the potential utility in the clinical diagnosis of circulating miRNAs in the blood samples (Redova *et al*, 2012; Wulfken *et al*, 2011; Zhao *et al*, 2012). These serum miRNAs may be somewhat valuable to ccRCC detection; however, the collection of blood specimens is cumbersome on account of the need for sterile equipment and trained staff. Moreover, the miRNA in peripheral blood could be released from different tumors and diseases. To circumvent the need for blood samples, the potential of alternative body fluids such as urine and saliva for detection of urological cancer and head/neck cancer has been investigated (Elashoff *et al*, 2012; Urquidi *et al*, 2012).

In this study, three miRNAs were measured in the cell-free urine (cf-urine), miR-15, miR-210 and miR-1233 (Huang *et al*, 2009b; Wulfken *et al*, 2011; Zhao *et al*, 2012), which proven to have specificity for ccRCC in previous studies were selected as diagnostic markers. This study was divided into three parts: (1) confirmation of the urinary cell-free miRNA (ucf-miRNA) is stable enough to be amplified. We describe a first study on the effects of various preanalytical issues on the stability of ucf-miRNA. (2) Evaluation of expression level of ucf-miRNA using quantitative real-time PCR by comparing results from 75 patients with ccRCC and 45 volunteers. (3) Evaluation of the diagnostic value and clinical characteristics of ucf-miRNAs.

MATERIALS AND METHODS

Samples

Urine samples from seventy five patients with clear cell renal cell carcinoma were collected in this study. All patients with a renal tumor had a pathological diagnosis. The ccRCC was graded according to the Fuhrman criteria and staged according to the UICC system (Fuhrman *et al*, 1982; Sobin & Wittekind, 2003). The study was approved by the local ethics committee. The patients received the necessary information concerning the study and a consent statement was received from each patient. The control urine samples were collected from 25 healthy volunteers and 16 renal disease patients without carcinoma. Lastly, the urine samples from 15 patients were collected 7 days after the tumor resection, and these samples were used to determine whether miRNAs markers in cf-urine of ccRCC patients were reduced after the tumor resection.

Processing of urine samples

In this study, all cf-urines were obtained by the initial centrifugation of the whole urine samples at 1200g for 10 min at 4 °C to spin down the cells (Centrifuge 5417R; Eppendorf, Germany). Supernatants were collected and further centrifuged at 12 000g for 10 min at 4 °C to completely remove cellular components (Centrifuge 5417R; Eppendorf). The cell-free urines were then stored at -80 °C until RNA isolation. Urine samples were processed and cf-urine was frozen within 6 hr of the urine draw.

The stability evaluation of ucf-miRNAs

A total of 12 cell-free urine samples were used in this part.

Delayed urine processing. The urine samples were divided into two portions, each portion

with 6 samples. For the first portion, the uncentrifuged urine samples were left at room temperature or 4°C for 0, 6, and 24 h. The second portion was that the urine samples were centrifuged at 12 000g for 10 min at 4 °C to completely remove cellular components, and then the collected cf-urine were left at 4°C for 0, 6, and 24 h. After that, Cf-urine was subjected to RNA extraction.

Freezing and thawing of urine. Each urine samples was divided into three parts. One-third was snap-frozen in liquid nitrogen and then thawed at room temperature immediately. One-third was snap-frozen and thawed, after which the thawed urine was left at room temperature for 2h. Cf-urine was then collected for RNA extraction.

RNA extraction

Total RNA was extracted from 350 µl cell-free urine using MicroMini Kit (Qiagen, Germany) according to manufacturer's protocol. In brief, 700 µl QIAzol solutions (Qiagen) were added to each sample for lysis. Total RNA was extracted after the addition of 5.6×10^8 copies of the synthetic miRNA cel-miR-39 (Qiagen, Germany); RNA was eluted in 25 µl by Rnase-free water. The RNA concentration and purity were controlled by UV spectrophotometry using a Nanodrop ND-1000 (Thermo Scientific, USA). The RNA specimens were stored at -80°C until reverse transcription.

Reverse Transcription

The reverse transcription reaction was carried out with miScript Reverse Transcription Kit (Qiagen) in 20 µl containing 10 µl of RNA extract, 4 µl of 5 X miScript RT Buffer, 1 µl of miScript Reverse Transcriptase Mix. For synthesis of cDNA, the reaction mixtures were incubated at 37°C for 60 min, at 95°C for 5min and then held at 4°C. The cDNA specimens were stored at -20°C until PCR.

MiRNA quantification by real-time quantitative PCR

The amounts of ucf miRNAs were quantified by qPCR using the miScript SYBR Green PCR kit (Qiagen). 2 µl of cDNA solution was amplified using 12,5 µl of 2 X QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix, 1 µl of 10 X miScript Universal Primer, 1 µl of 10 X miScript Primer Assay and 8,5 µl of nuclease-free water in a final volume of 25µl. Quantitative PCR was run on a 7500 Real-Time PCR system (Applied Biosystems, USA). The reaction mixtures were incubated at 95°C for 10 min, followed by 40 cycles of 95°C for 15 s, 56°C 30 s and 72°C 35 s. The universal human reference RNA (Stratagene, EU) was used as a positive control and the RNase-free water

(Qiagen) was used as a negative control in each PCR assay. The cycle threshold (Ct) values were calculated with the SDS 1.4 software (Applied Biosystems). Each sample was run in duplicates for analysis. The expression levels of ucf-miRNAs were normalized to cel-miR-39, and were calculated utilizing the $2^{-\Delta\Delta C_t}$ method (Livak & Schmittgen, 2001).

Statistical Methods

Expression levels were compared by using the Mann-Whitney U test, Friedman or Wilcoxon test. Receiver-operating characteristics (ROC) curve was established to evaluate the diagnostic value of ucf-miRNAs for the differentiation between ccRCC patients and controls. A p value of less than 0.05 was considered statistically significant. For the multiple comparisons carried out in this study, Bonferroni correction was taken into consideration. According to this correction P value of less than 0.008 was considered statistically significant. All analysis was performed with IBM SPSS 19.0 and GraphPad prism 5.0 software.

RESULTS

Patient population

A total of 120 participants including 75 ccRCC patients and 45 normal subjects were recruited into this study (Table. 1). No significant differences of age or gender were found between ccRCCs patients and normal controls ($p = 0.789$, ANOVA: $p = 0.673$, chi-square test).

Stability of ucf-miRNAs

To determine whether delayed urine processing would lead to degradation of ucf-miRNAs, we measured the ucf-miRNAs expression left for 0, 6 and 24h. At room temperature, ucf-miRNAs expression of centrifuged urine were no significant difference at 6 h compared with 0 h ($P = 0.145$), but then significantly decreased at 24 h when compared with 6 h ($P = 0.014$; Fig. 1a). On the other hand, when the centrifuged urine was left at 4°C, no significant difference within 6h ($P = 0.246$), the significantly decreased at 24 h when compared with 6 h ($P = 0.004$). In contrast, when urine was uncentrifuged, the ucf-miRNAs concentrations showed no significant changes among the three incubation time points ($P = 0.119$ for room temperature incubation and $P = 0.585$ for 4°C incubation; Fig. 1b)

Effects of freezing and thawing

Experiments were carried out to investigate the ucf-miRNA concentrations in freeze-thawed

cf-urine. Liquid nitrogen was used in the process to minimize the time of achieving the frozen state. No significant difference was found for ucf-miRNA concentrations among untreated urine, freeze-thawed urine, and freeze-thawed urine that had been left for 2 h at room temperature ($P = 0.459$; Fig. 2).

Comparison of the expression levels of ucf-miRNAs in ccRCC patients and controls

All three miRNAs were detected in the 120 cf-urine samples including 75 ccRCC and 45 normal controls, the mean ucf-miR-210 level was significantly higher in ccRCC patients ($3.9E - 3 \pm 1.2E - 3$) than in normal controls ($0.3E - 3 \pm 0.07E - 3$) ($p < 0.001$; Figure 3a). Also, ucf-miR-1233 expression level was significantly up-regulated in ccRCC patients ($28.6E - 3 \pm 9E - 3$) than those in controls ($1.1E - 3 \pm 0.2E - 3$) ($p < 0.001$; Figure 3b). No significant difference was observed in the expression level of miR-15 between ccRCC patients ($1.9E - 3 \pm 0.6E - 3$) and controls ($0.5E - 3 \pm 0.1E - 3$) ($p = 0.521$; Figure 3c).

Comparison of the expression levels of ucf-miRNAs in pre- and postoperative RCC

To evaluate whether changes of expression levels of ucf-miRNAs occurred after surgical removal of the tumors, we compared in an independent set of 15 ccRCC patients pre- and postoperative (7 days after surgical) urine. It was found that the expression level of ucf-miR-210 was significantly reduced in post-operative samples (mean of expression: $4.1E - 3 \pm 1.6E - 3$) compared to the preoperative samples (mean of expression: $0.11E - 3 \pm 0.05E - 3$) ($p < 0.001$), and the expression levels of the ucf-miR-1233 was significantly reduced in post-operative samples (mean of expression: $30.6E - 3 \pm 14.4E - 3$) compared to the preoperative samples (mean of expression: $1.4E - 3 \pm 0.6E - 3$) ($p < 0.001$) (Fig. 4).

Diagnostic utility of ucf-miR-210 and ucf-miR-1233 in combination

Roc curve analyses revealed that both ucf-miR-210 and ucf-miR-1233 were valuable biomarkers for differentiating ccRCC from controls with an AUC (the areas under the ROC curve) of 0.76 (95% CI: 0.67-0.85) and 0.78 (95% CI: 0.70-0.87), respectively (Fig. 5). At the cutoff value of $2.9E - 4$ for miR-210, the optimal sensitivity and specificity were 73.3% and 66.7%, respectively. At the cutoff value of $2.7E - 3$ for miR-1233, the optimal sensitivity and specificity were 60% and 93.7%, respectively. The combination of miR-210 and miR-1233 for discriminating ccRCC from normal was analyzed by a binary logistic regression model with entry of all variables. As shown in Fig. 4, all two variables provided significantly independent effects: $\log itP = 1.055 -$

$419.7X_{\text{miR-210}} - 568.7X_{\text{miR-1233}}$. The combination (ucf-miR-210 + ucf-miR-1233) had an AUC of 0.82 (95% CI: 0.75-0.89), which was significantly improved compared to miR-210 and miR-1233 alone. At the cutoff value of 0.64 for the combination miRNAs, the optimal sensitivity and specificity were 66.7% and 91.1%, respectively.

Relationship between expression levels of ucf-miR-210 and ucf-miR-1233 and clinical characteristics

Next, we examined the correlation between the expression levels of ucf-miR-210 and ucf-miR-1233 with clinical parameters. No significant association was found between the levels of ucf-miRNAs and sex, age, tumor size, stage except and the tumor grade (Table 2). Patients were further stratified based on the diagnosis of the TNM staging of ccRCC, and TNM Stage I was the least advanced. As shown in Figure 6, each of the 3 stages including stage I patients had significantly elevated ucf-miR-210 and ucf-miR-1233 expression levels when compared with the controls ($p < 0.001$, respectively). No significant difference was observed between the different TNM stages.

DISCUSSION

A recent study published by Youssef et al, (Youssef *et al*, 2011) demonstrated that microRNA expression profiles allow distinguishing between RCC and oncocytoma, Circulating nucleic acids in biological fluids can be measured relatively inexpensively for the development of early noninvasive cancer diagnostics. Most of the focus thus far has been on tumor-, fetus-, or transplanted – organ/cell-specific genetic markers in the bloodstream. Because urine can be collected noninvasively in large amount, it provides an attractive alternative to blood serum/plasma as a potential source of disease biomarkers. Recent studies have identified that urinary nucleic acids alteration in cancer patients compared to the controls (Jamaspishvili *et al*, 2009; Wang *et al*, 2012). These findings prompted us to investigate whether the cell-free miRNAs in urine have potential as a diagnostic biomarker for ccRCC.

In this report, we have demonstrated that circulating miRNA in urine is stable enough to be amplified after the cf-urine is left for 24 h. for the centrifuged samples, the circulating miRNA concentrations unchanged during the first 6h, but decreased significantly at 24 h when compared with 6 h (Fig. 1a). In contrast, no significant differences were found in the uncentrifuged samples

(Fig. 1b) may be attributable to the release of miRNA from necrotic and/or apoptotic of cells in the urine. In addition, no significantly change whether the urine samples were divided at 4 °C or room temperature. We next study the effects of freezing and thawing. As shown in Fig. 1c, no significant difference was found for the expression of circulating miRNA among untreated urine, freeze-thawed urine, and freeze-thawed urine that had been left for 2 h at room temperature. To obtain a reliable circulating miRNA in the urine, the urine samples should be processed within 6 h.

One of the most studied miRNAs in cancer, MiR-210, which was over-expressed in various types of human malignancy (Camps et al, 2008; Ho et al, 2010), suggesting its important role in tumorigenesis. In this study, we showed that the level of circulating miR-210 in urine was significantly higher in ccRCC patients than in controls, and this change could discriminate ccRCC from healthy controls with a high specificity and sensitivity. The mechanism of upregulation of circulating miR-210 is not completely clear. Recent data suggest that over-expression of miR-210 was related with HIF pathway. Campa et al (Camps et al, 2008) showed that miR-210 in human breast cancer are not only a marker of tumor hypoxia in vivo but also an indicator regulated by HIF-1 α in variety of tumor types through a hypoxia-responsive element. The accumulation of HIF is a key event in ccRCC due to mutation in VHL gene (Cohen & McGovern, 2005). Therefore, miR-210 may be over-expressed due to the accumulation of HIF-1 α in ccRCC.

In our previous study, (Zhao *et al*, 2012) the serum miR-210 was significantly elevated in patients ccRCC, and the expression level of serum miR-210 was reduced postoperatively. These findings are similar as our present results. The expression level of circulating miR-210 in urine was also significantly reduced after surgery, suggesting that the circulating miRNA could be released partially from the primary renal tumors. However, its exact mechanism and whether the circulating miRNA from the blood can pass through the kidney barrier into the urine need to be further studied.

The second over-expressed miRNA in urine from ccRCC patients was miR-1233, located on chromosome 15q14. Wulfken et al, (Wulfken *et al*, 2011) for the first time that serum miR-1233 was a potential marker for ccRCC diagnosis with yielded AUC of 0.588. These findings is consistent to the our present study, we have shown that the expression level of ucf-miR-1233

from patients with ccRCC was also significantly higher than that in healthy controls, the ROC analysis showed the AUC value of 0.78. The information about the function of miR-1233 is still missing.

The multi over-expression miRNAs in biological fluids was possible released by tumor cells. The combination of multi miRNAs analysis may have more diagnostic significance. In this study, both miR-210 and mi-1233 had significant diagnostic value for ccRCC and yied AUC of 0.76 and 0.78, respectively. Combined ROC analyses using these 2 targets could yield an increased AUC of 0.82 with 66.7% sensitivity and 91.1% specificity, respectively. In addition, we evaluated the value of ucf-miRNAs on diagnosis of early stages of cancer, and our results revealed that both ucf-miR-210 and miR-1233 have significant diagnostic value for early stage of ccRCC, suggesting their potential value for early detection of cancer.

Recently, some researchers (Redova et al, 2012) found that circulating miR-378 in serum was a promising biomarker in RCC while the others (Hauser et al, 2012) showed that serum miR-378 level was unlikely to provide diagnostic information in RCC. The different technique, the different reference gene selection and method of calculation may explain the different results. It is obvious that the technique standardization is needed.

In conclusion, we found that mirRNA in cell-free urine was stable. thus further validation of the effectiveness in a larger study is required. If this confirms the predictive value, we suggest the combination of ucf-miRNAs could rapidly enter clinical application. It may provide a new diagnostic method for ccRCC.

Acknowledgement: This research was supported by la Ligue Nationale contre le Cancer du Comité de la Loire, France.

REFERENCES

- Arroyo JD, Chevillet JR, Kroh EM, Ruf IK, Pritchard CC, Gibson DF, Mitchell PS, Bennett CF, Pogosova-Agadjanyan EL, Stirewalt DL, Tait JF, Tewari M (2011) Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108(12): 5003-8
- Camps C, Buffa FM, Colella S, Moore J, Sotiriou C, Sheldon H, Harris AL, Gleadle JM, Ragoussis J (2008) hsa-miR-210 Is induced by hypoxia and is an independent prognostic factor in breast cancer. *Clin Cancer Res* 14(5): 1340-8
- Capitanio U, Cloutier V, Zini L, Isbarn H, Jeldres C, Shariat SF, Perrotte P, Antebi E, Patard JJ, Montorsi F, Karakiewicz PI (2009) A critical assessment of the prognostic value of clear cell, papillary and chromophobe histological subtypes in renal cell carcinoma: a population-based study. *BJU Int* 103(11): 1496-500
- Cocucci E, Racchetti G, Meldolesi J (2009) Shedding microvesicles: artefacts no more. *Trends Cell Biol* 19(2): 43-51
- Cohen HT, McGovern FJ (2005) Renal-cell carcinoma. *N Engl J Med* 353(23): 2477-90
- Curti BD (2004) Renal cell carcinoma. *JAMA* 292(1): 97-100
- Elashoff D, Zhou H, Reiss J, Wang J, Xiao H, Henson B, Hu S, Arellano M, Sinha U, Le A, Messadi D, Wang M, Nabili V, Lingen M, Morris D, Randolph T, Feng Z, Akin D, Kastratovic DA, Chia D, Abemayor E, Wong DT (2012) Prevalidation of salivary biomarkers for oral cancer detection. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 21(4): 664-72
- Figlin RA, Pierce WC, Kaboo R, Tso CL, Moldawer N, Gitlitz B, deKernion J, Beldegrun A (1997) Treatment of metastatic renal cell carcinoma with nephrectomy, interleukin-2 and cytokine-primed or CD8(+) selected tumor infiltrating lymphocytes from primary tumor. *J Urol*

158(3 Pt 1): 740-5

Fuhrman SA, Lasky LC, Limas C (1982) Prognostic significance of morphologic parameters in renal cell carcinoma. *Am J Surg Pathol* 6(7): 655-63

Garzon R, Calin GA, Croce CM (2009) MicroRNAs in Cancer. *Annu Rev Med* 60: 167-79

Hasselmann DO, Rapp G, Tilgen W, Reinhold U (2001) Extracellular tyrosinase mRNA within apoptotic bodies is protected from degradation in human serum. *Clin Chem* 47(8): 1488-9

Hauser S, Wulfken LM, Holdenrieder S, Moritz R, Ohlmann CH, Jung V, Becker F, Herrmann E, Walgenbach-Brunagel G, von Ruecker A, Muller SC, Ellinger J (2012) Analysis of serum microRNAs (miR-26a-2*, miR-191, miR-337-3p and miR-378) as potential biomarkers in renal cell carcinoma. *Cancer Epidemiol* 36(4): 391-4

Ho AS, Huang X, Cao H, Christman-Skieller C, Bennewith K, Le QT, Koong AC (2010) Circulating miR-210 as a Novel Hypoxia Marker in Pancreatic Cancer. *Transl Oncol* 3(2): 109-13

Huang Y, Dai Y, Yang J, Chen T, Yin Y, Tang M, Hu C, Zhang L (2009) Microarray analysis of microRNA expression in renal clear cell carcinoma. *Eur J Surg Oncol* 35(10): 1119-23

Inui M, Martello G, Piccolo S (2010) MicroRNA control of signal transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11(4): 252-63

Jamaspishvili T, Kral M, Khomeriki I, Student V, Kolar Z, Bouchal J (2009) Urine markers in monitoring for prostate cancer. *Prostate Cancer Prostatic Dis* 13(1): 12-9

Kosaka N, Iguchi H, Yoshioka Y, Takeshita F, Matsuki Y, Ochiya T (2010) Secretory mechanisms and intercellular transfer of microRNAs in living cells. *J Biol Chem* 285(23): 18532-41

- 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(4): 402-8
- Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, Pogosova-Agadjanyan EL, Peterson A, Noteboom J, O'Briant KC, Allen A, Lin DW, Urban N, Drescher CW, Knudsen BS, Stirewalt DL, Gentleman R, Vessella RL, Nelson PS, Martin DB, Tewari M (2008) Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(30): 10513-8
- Redova M, Poprach A, Nekvindova J, Iliev R, Radova L, Lakomy R, Svoboda M, Vyzula R, Slaby O (2012) Circulating miR-378 and miR-451 in serum are potential biomarkers for renal cell carcinoma. *J Transl Med* 10: 55
- Siegel R, Naishadham D, Jemal A (2013) Cancer statistics, 2013. *CA Cancer J Clin* 63(1): 11-30
- Skolarikos A, Alivizatos G, Laguna P, de la Rosette J (2007) A review on follow-up strategies for renal cell carcinoma after nephrectomy. *Eur Urol* 51(6): 1490-500; discussion 1501
- Sobin L, Wittekind C (2003) TNM classification of malignant tumors, 6th edition. UICC International Union Against Cancer. New York: Wiley-Liss. 193
- Urquidi V, Rosser CJ, Goodison S (2012) Molecular diagnostic trends in urological cancer: biomarkers for non-invasive diagnosis. *Curr Med Chem* 19(22): 3653-63
- Valadi H, Ekstrom K, Bossios A, Sjostrand M, Lee JJ, Lotvall JO (2007) Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol* 9(6): 654-9
- Vickers KC, Palmisano BT, Shoucri BM, Shamburek RD, Remaley AT (2011) MicroRNAs are

transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins. *Nat Cell Biol* 13(4): 423-33

Wang G, Chan ES, Kwan BC, Li PK, Yip SK, Szeto CC, Ng CF (2012) Expression of microRNAs in the urine of patients with bladder cancer. *Clin Genitourin Cancer* 10(2): 106-13

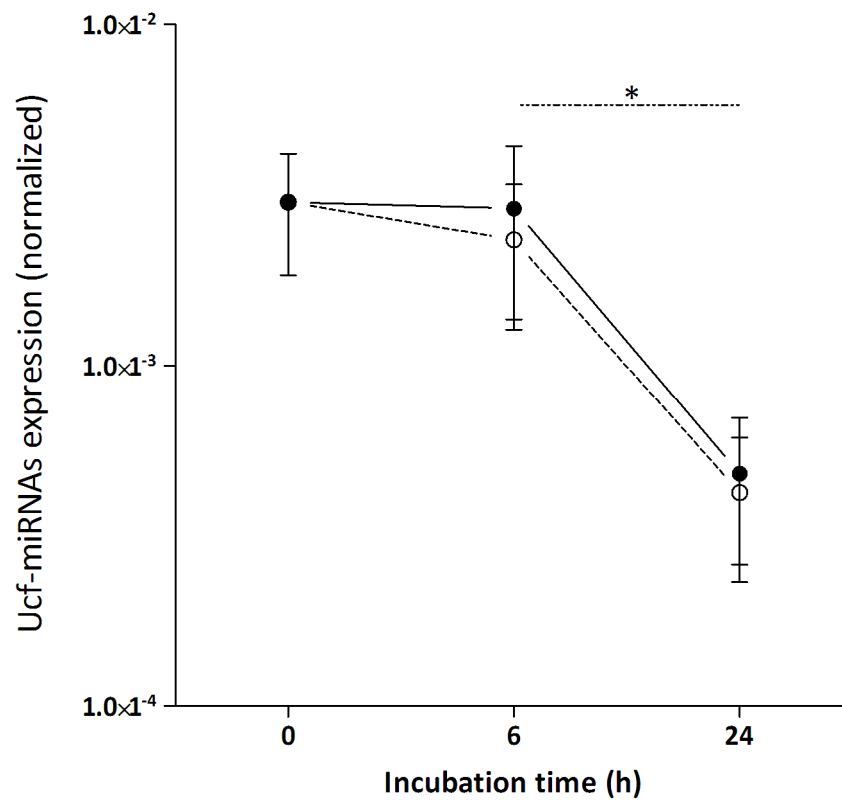
Wulfken LM, Moritz R, Ohlmann C, Holdenrieder S, Jung V, Becker F, Herrmann E, Walgenbach-Brunagel G, von Ruecker A, Muller SC, Ellinger J (2011) MicroRNAs in renal cell carcinoma: diagnostic implications of serum miR-1233 levels. *PLoS One* 6(9): e25787

Youssef YM, White NM, Grigull J, Krizova A, Samy C, Mejia-Guerrero S, Evans A, Yousef GM (2011) Accurate molecular classification of kidney cancer subtypes using microRNA signature. *Eur Urol* 59(5): 721-30

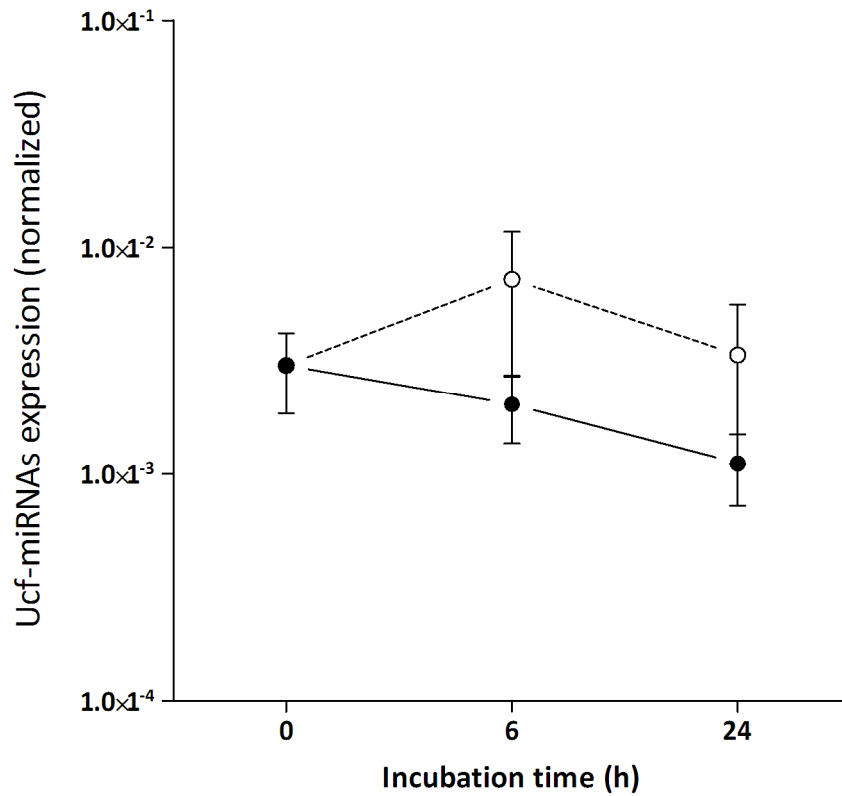
Zhao A, Li G, Peoc'h M, Genin C, Gigante M (2012) Serum miR-210 as a novel biomarker for molecular diagnosis of clear cell renal cell carcinoma. *Exp Mol Pathol* 94(1): 115-20

Figure 1. Effect of delayed processing of centrifuged or uncenctrifuged on ucf-miRNAs expressions.

(a)

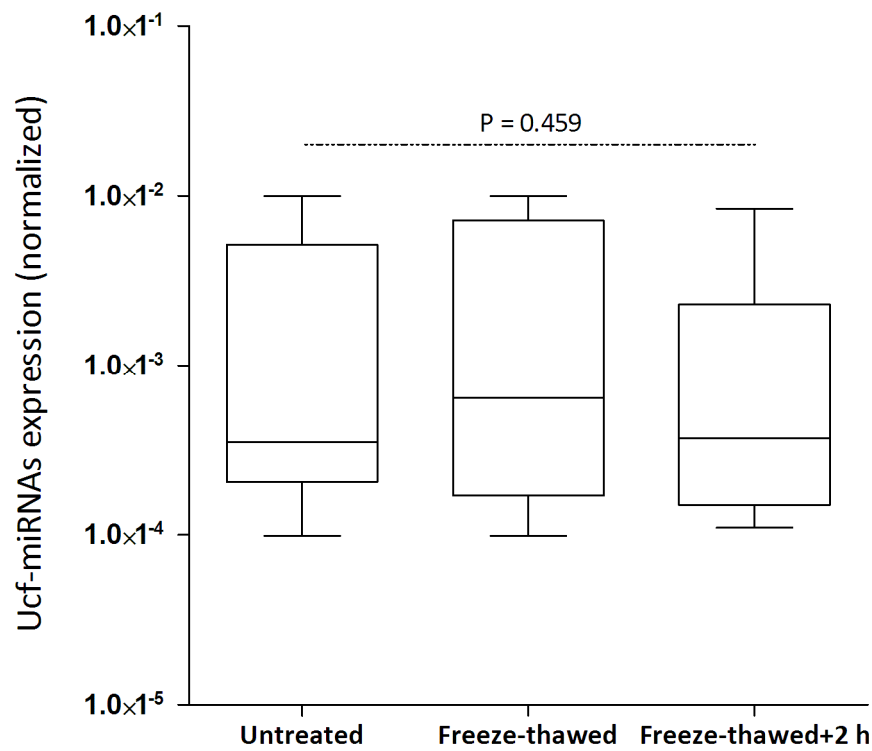


(b)



Centrifuged ucf-miRNAs expression (a) and uncentrifuged ucf-miRNAs expression (b) as determined by real-time quantitative RT-PCR are plotted on the Y axis. Whereas the incubation time of urine (h) is plotted on the x axis. ○, urine incubated at room temperature; ●, urine incubated at 4°C. Expression levels of the miRNAs (Log10 scale at Y-axis) were normalized to cel-miR-39. The symbols indicate the means at specified time points. The error bars denote the interval between the 25th and 75th percentiles. Significant increases or decreases are indicated by *. Statistically significant differences were determined using Friedman and Wilcoxon tests.

Figure 2. Effect of freezing/thawing on ucf-miRNAs expression.

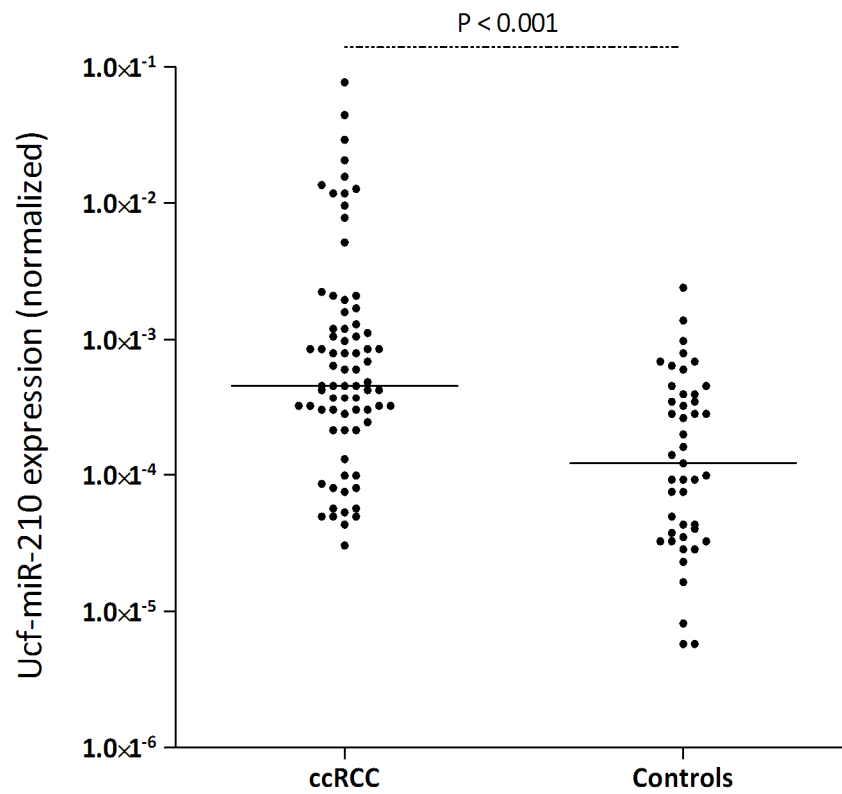


Ucf-miRNAs expression determined by real-time quantitative RT-PCR is plotted on the Y axis.

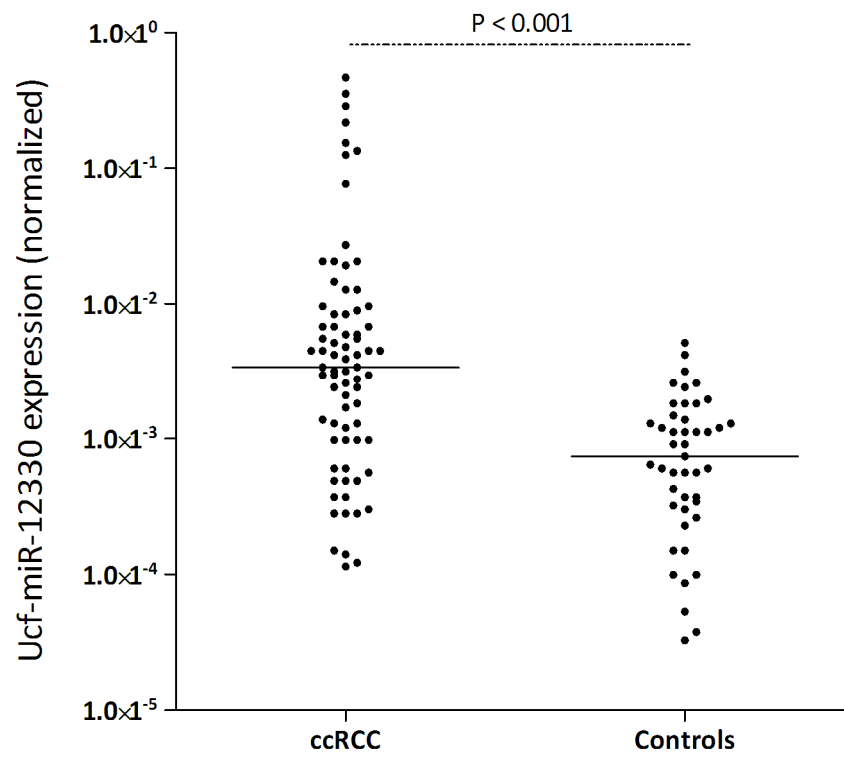
The processing categories are shown on the x axis. The upper and lower limits of the boxes and the lines across the boxes indicate the 75th and 25th percentiles and the median. Statistically significant differences were determined using Friedman tests.

Figure 3. Expression levels of ucf-miR-1233, ucf-miR-210 and ucf-miR-15 in the ccRCC patients and controls.

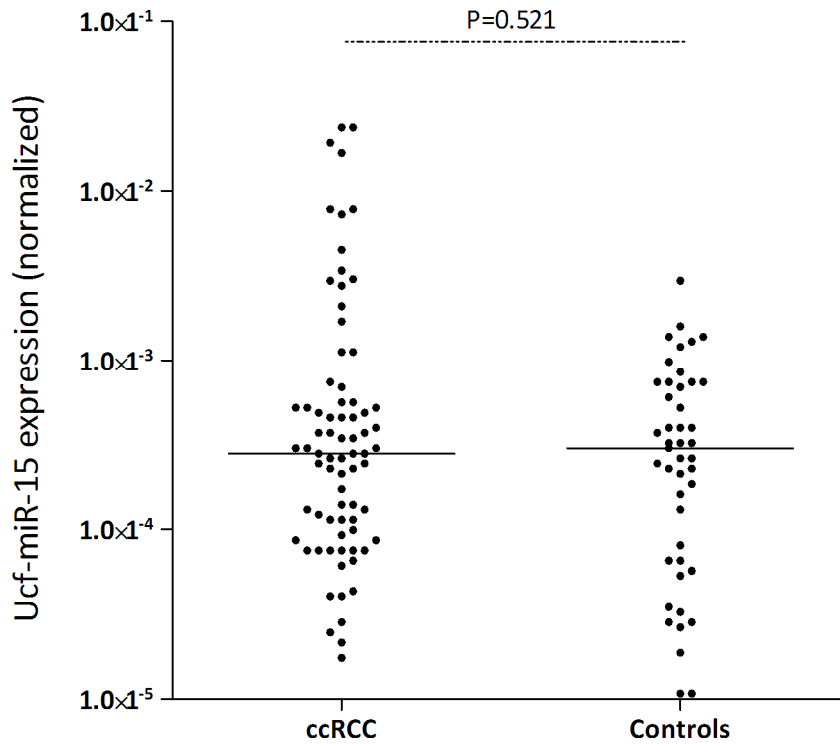
(a)



(b)



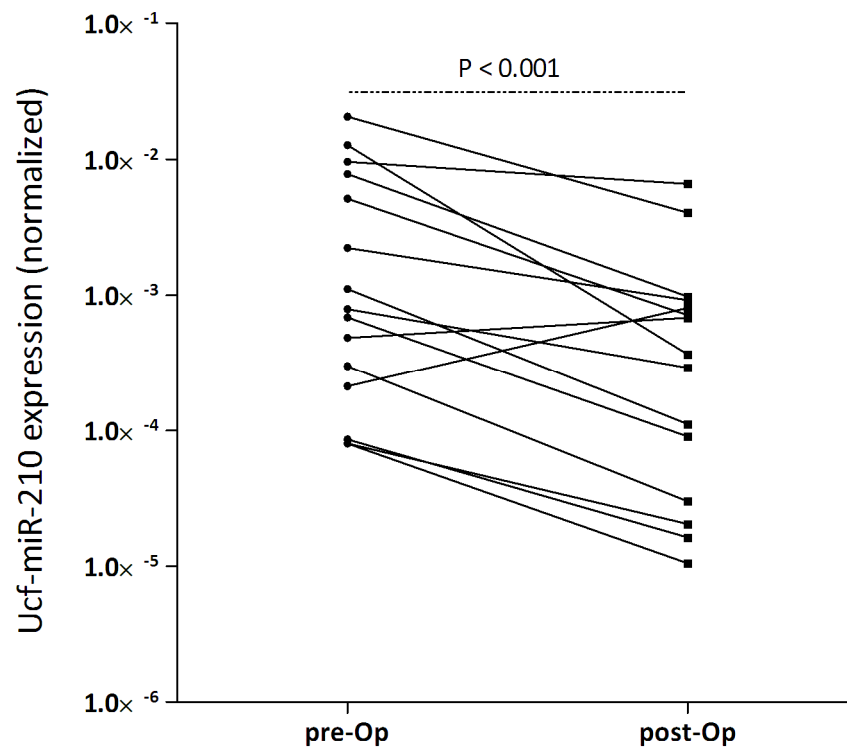
(c)



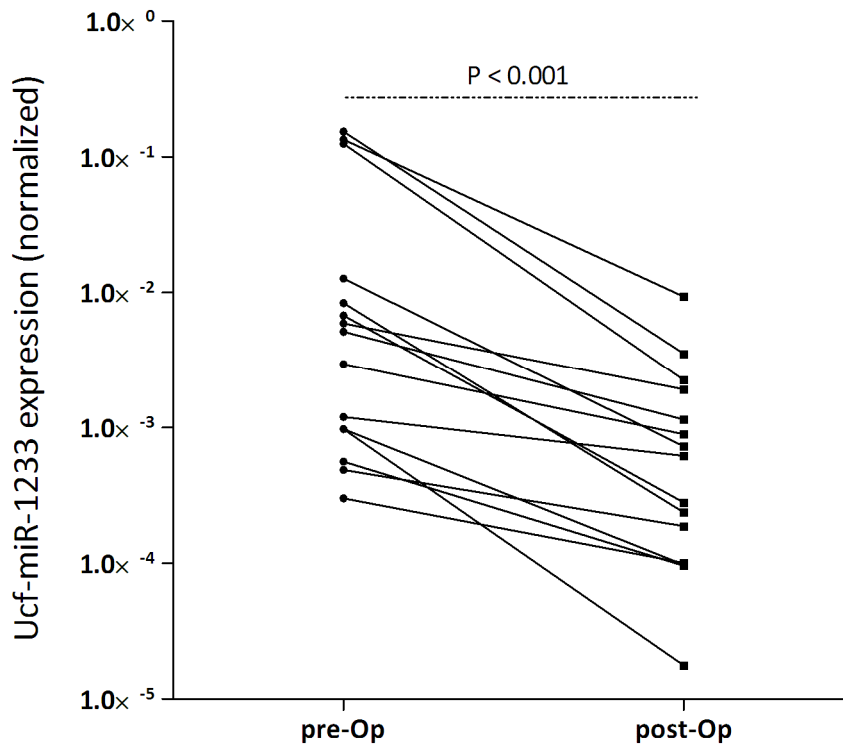
Scatter plots of expression levels of ucf-miR-210 (a), ucf-miR-1233 (b) and ucf-miR-15 (c) in ccRCC patients (n=75) and controls (n=45). The ucf-miR-210 expression level was significantly higher in the ccRCC patients (mean of expression: $3.9E - 3 \pm 1.2E - 3$) than in the controls (mean of expression: $0.3E - 3 \pm 0.07E - 3$) ($P < 0.001$). The ucf-miR-1233 expression level was significantly higher in the ccRCC patients (mean of expression: $28.6E - 3 \pm 0.9E - 3$) than in the controls (mean of expression: $1.1E - 3 \pm 0.2E - 3$) ($P < 0.001$). No significant difference was observed in the expression level of miR-15a ($P = 0.521$). Expression levels of the ucf-miRNAs (log₁₀ scale at Y-axis) were normalized to cel-miR-39. The line represents the median value. Mann-Whitney U test used to determine statistical significance.

Figure 3. Comparison of the expression levels of ucf-miR-210 and ucf-miR-1233 between pre-operation and 7 days after surgical removal of tumor.

(a)

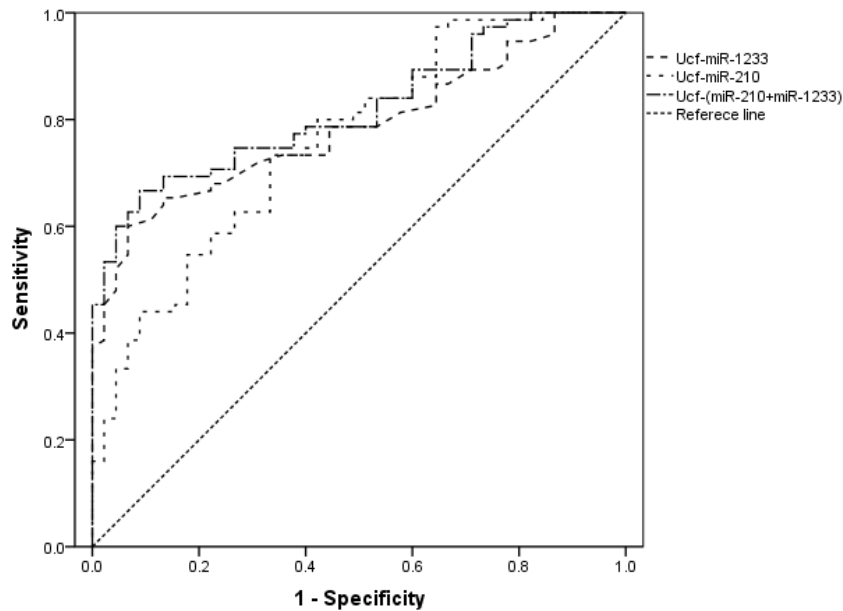


(b)



Changes of ucf-miR-1233 (a) and ucf-miR-210 (b) in ccRCC patients (n=15) before (pre-Op) and 7 days after (post-Op) surgical removal of the tumor. Expression level of ucf-miR-210 was significantly reduced in post-operative samples (mean of expression: $4.1\text{E} - 3 \pm 1.6\text{E} - 3$) compared to the preoperative samples (mean of expression: $0.11\text{E} - 3 \pm 0.05\text{E} - 3$) ($p < 0.001$), and expression level of the ucf-miR-1233 was significantly reduced in post-operative samples (mean of expression: $30.6\text{E} - 3 \pm 14.4\text{E} - 3$) compared to the preoperative samples (mean of expression: $1.4\text{E} - 3 \pm 0.6\text{E} - 3$) ($p < 0.001$). Expression levels of the ucf- miRNAs (Log10 scale at Y-axis) were normalized to cel-miR-39. Statistically significant differences were determined using Wilcoxon tests.

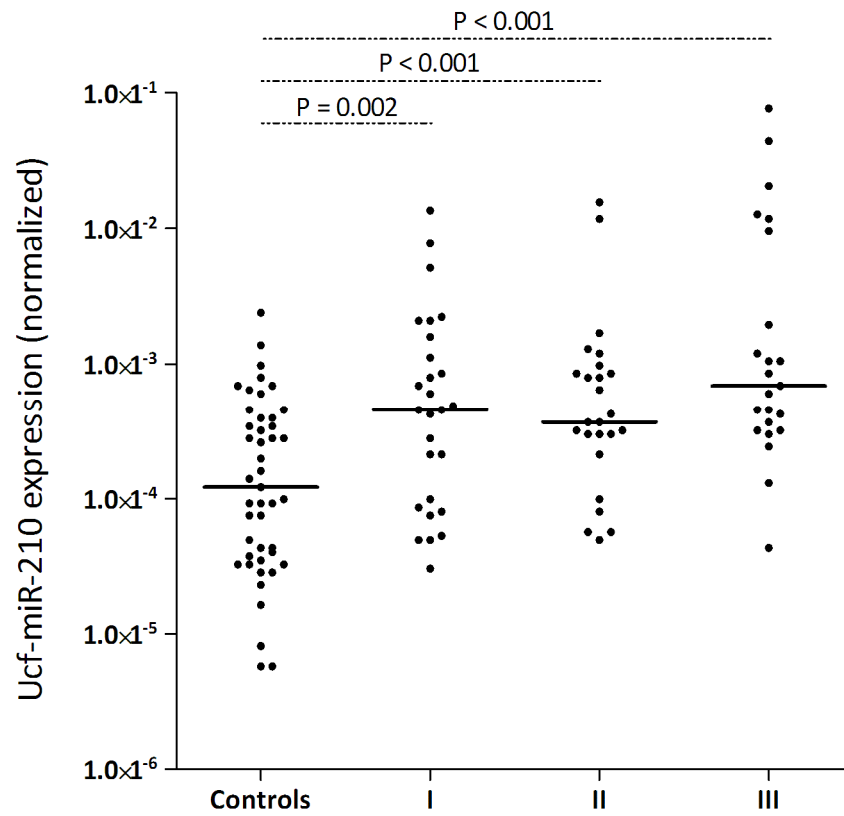
Figure 5. Receiver operating characteristic (ROC) curve analysis using the ucf-miR-1233, ucf-miR-210 and a combination of ucf-miR-210 and ucf-miR-1233 for discriminating ccRCC patients.



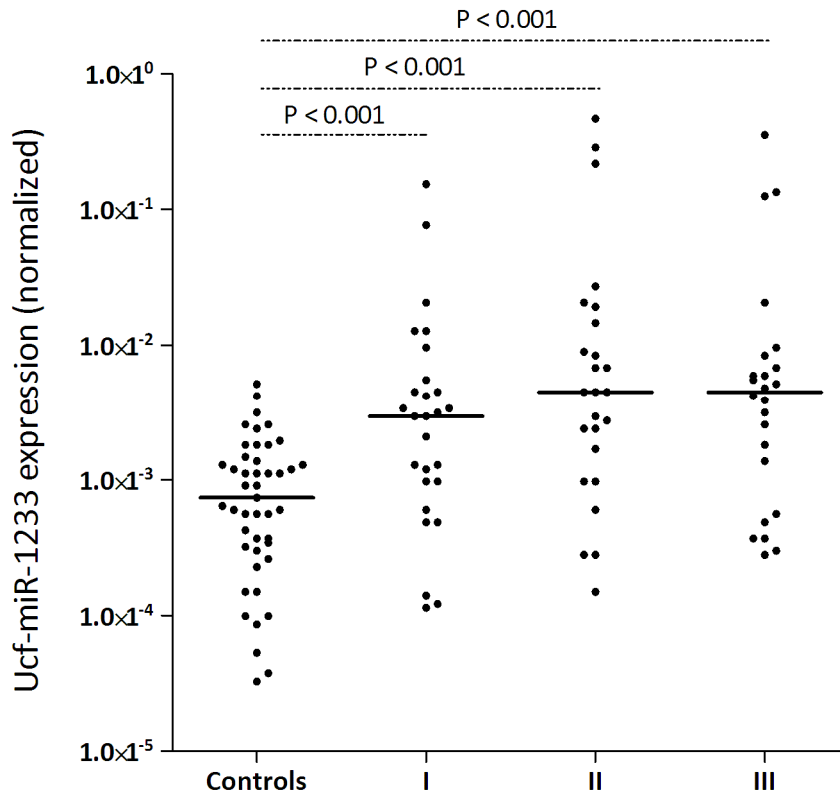
Ucf-miR-210 yielded an AUC (the areas under the ROC curve) of 0.76 (95% CI: 0.67-0.85) with a sensitivity of 73.3% and a specificity of 66.7%, and ucf-miR-1233 yielded an AUC of 0.78 (95% CI: 0.70-0.87) with a sensitivity of 60% and a specificity of 93.7% in discrimination between the ccRCC patients and the controls. The combination (ucf-miR-210 + ucf-miR-1233) had an AUC of 0.82 (95% CI: 0.75-0.89 with sensitivity of 66.7% and a specificity of 91.1%.

Figure 6. Urine levels of miR-210 and miR-1233 in the controls and the ccRCC patients with the different TNM stages.

(a)



(b)



Scatter plots of expression levels of ucf-miR-210 (a) and ucf-miR-1233 (b) in the controls (n = 45), and ccRCC patients with different TNM stages (27 with I, 25 with II, 23 with III). The expression level of ucf-miR-210 ($p < 0.001$) and ucf-miR-1233 ($p < 0.001$) in each stage was significantly higher than in the controls. No significant difference was observed between the different TNM stages. Expression level of the miRNAs (Log₁₀ scale at Y-axis) was normalized to cel-miR-39. The lines represent the medians. Mann-Whitney U test was used to determine statistical significance.

TABLE 1. Characteristics of study subjects

ccRCC patients (N=75)

No. Sex (%)

Male 54 (72)

Female 21 (28)

Median Age (range) 64 (34-83)

No. TNM (%)

T1 27 (36)

T2 25 (33.3)

T3 23 (30.7)

No. Grade (%)

G1 12 (16)

G2 24 (32)

G3 34 (45.3)

G4 5 (6.7)

No. Metastasis (%)

No 72 (96)

Yes 3 (4)

Controls (N=45)

No. Sex (%)

Male 25 (55.5)

Female 20 (44.5)

Median Age (range) 50.2 (20-68)

Table 2. Relationship between the expression levels of ucf-miRNAs and clinical characteristics

	miR-210	miR-1233
Gender		
r	0.183	0.116
p	0.117	0.322
Age		
r	0.080	0.180
p	0.476	0.103
Tumor size		
r	-0.113	0.014
p	0.327	0.906
TNM stage		
r	-0.105	0.051
p	0.368	0.616
Grade		
r	-0.258	-0.060
p	0.175	0.497

r, correlation coefficient

DISCUSSION

1. *MiARNs*

Les miARNs tumoraux ont été découverts dans le plasma pour la première fois par Mitchell et al (Mitchell *et al*, 2008). Ils ont démontré que les miARNs circulants peuvent être utilisés comme nouveau marqueur de diagnostic pour le cancer de la prostate. Ils ont aussi montré la forte stabilité des miARNs plasmatiques après incubation prolongée à la température ambiante ou après congélations/décongélations répétées. Ces résultats ont stimulé la recherche sur les miARNs circulant pour la détection de cancers chez les patients.

Le miR-210 est le plus fréquent des miARNs étudiés en oncologie. La surexpression du miR-210 a été décrite dans différents types de cancer (Camps *et al*, 2008; Ho *et al*, 2010), ce qui suggère que le miR-210 joue un rôle important dans la tumorigénèse. Dans cette étude, nous avons testé le taux du miR-210 dans le tissu tumoral/normal des 32 patients avec un ccRCC. Tous les miARNs ont été obtenus après amplification. Le taux moyen du miR-210 était significativement plus élevé dans le tissu tumoral que dans le tissu normal. Ces résultats sont en accord avec ceux d'autres études. Neal et al (Neal *et al*, 2010) ont aussi montré que le niveau du miR-210 était significativement plus élevé chez les patients avec un ccRCC et qu'il était corrélé avec la survie des patients.

Le mécanisme de la surrégulation du miR-210 n'est pas encore entièrement connu. L'expression de miR-210 est augmentée en condition d'hypoxie et peut réguler la protéine fer-soufre (Fe-S) qui est impliquée dans la chaîne respiratoire mitochondriale. Ceci suggère un mécanisme de régulation de la respiration anaérobie dans les tumeurs (Chen *et al*, 2010; White & Yousef, 2010). Une autre étude a rapporté que le miR-210 peut aussi réguler l'hypoxie et le cycle cellulaire dans le cancer en agissant sur le facteur de transcription E2F (Giannakakis et al, 2008). Ces dernières données suggèrent que la surexpression du miR-210 est liée à la voie du HIF. L'activation du HIF s'avère être l'événement-clé dans le ccRCC (Cohen & McGovern, 2005). Par

conséquent, la surexpression du miR-210 dans le ccRCC peut être la raison de l'accumulation de HIF-1a. Le mécanisme exact et son implication dans la tumorigénèse du ccRCC doivent encore être étudiés. Toutefois, sa valeur diagnostique devra être explorée.

Nous avons évalué la capacité du miR-210 circulant dans le sérum pour détecter le ccRCC. Sur les échantillons de sérum, le taux moyen du miR-210 était significativement plus élevé chez les patients avec un ccRCC que chez les sujets sains ($p < 0,001$). Le taux du miR-210 sérique avait une aire sous la courbe ROC (AUC) de 0,833 avec une sensibilité de 85,4% et une spécificité de 68,4%. En plus, le niveau du miR-210 sérique était significativement plus élevé chez les patients avec un ccRCC de stade 1 que chez les sujets sains. De plus, le taux moyen du miR-210 sérique avait significativement diminué une semaine après la chirurgie ($p = 0,001$). Ces derniers résultats suggèrent que le miR-210 sérique pourrait être libéré par les cellules tumorales de ccRCC.

Des études récentes ont rapporté que le miR-210 ou que les autres miARNs sont des marqueurs potentiels pour le diagnostic du cancer. Huang et al (Huang *et al*, 2009a) ont mesuré le taux des 12 miARNs dans le plasma chez les patients avec un cancer colorectal. Ils ont trouvé que le miR-29a (AUC=0,844) et le miR-92a (AUC=0,838) pourraient servir à diagnostiquer les patients avec un cancer colorectal avancé. Tsujiura et al (Tsujiura *et al*, 2010) ont aussi démontré que les concentrations des miARNs plasmatiques (miR-17-5p, miR-21, miR-106a, miR-106b) étaient significativement plus élevées chez les patients avec un cancer gastrique que chez les sujets contrôle ($p = 0,05$, $0,006$, $0,008$ and $< 0,001$), tandis que le taux du let-7a était significativement abaissé chez les patients avec un cancer gastrique. Par conséquent, les miARNs libres circulants peuvent être utilisés comme biomarqueur pour le diagnostic de cancer, le miR-210 peut devenir un nouveau marqueur pour le ccRCC.

Le dosage des acides nucléiques libres sériques/plasmatiques circulants peut être utile pour la détection du ccRCC. Cependant, la collecte d'échantillons de sang est complexe en raison de la nécessité de matériel stérile et d'un personnel qualifié. De plus, les miARNs dans le sang périphérique pourraient être libérés par différents types de cancer et de maladies. Pour contourner la nécessité d'utilisation des échantillons sanguins, la possibilité d'utiliser des liquides biologiques

comme l'urine et la salive a été étudiée pour la détection du cancer urologique et du cancer de la tête et du cou (Elashoff *et al*, 2012; Urquidi *et al*, 2012).

Dans cette étude, nous avons démontré, pour la première fois, la stabilité des miARNs et des mARNs libres circulant dans l'urine. Tout d'abord, les miARNs libres circulants urinaires sont assez stables pour être amplifiés après une incubation de 24 h. Dans les échantillons centrifugés, le taux du miARN libre circulant est inchangé au cours des 6 premières heures, mais il était significativement diminué à 24 h par rapport à 6 h. De plus, il n'y a pas de différence significative dans les échantillons non centrifugés, ce qui peut être attribuable au miARN libéré par nécrose et/ou par apoptose des cellules dans l'urine. De plus, le niveau des miARNs n'a pas changé quand les échantillons urinaires ont été gardés à 4 °C ou à température ambiante. Pour obtenir un miARN fiable dans l'urine, les échantillons doivent être traités en moins de 6 h.

Nous avons ensuite analysé dans l'urine le taux des trois miARNs (miR-15, miR-210, miR-1233) libres circulants chez les patients avec ccRCC. Le taux moyen du miR-210 et du miR-1233 était significativement plus élevé chez les patients avec un ccRCC que chez les sujets sains. De plus, le taux moyen du miR-210 et du miR-1233 libre circulant urinaire était significativement diminué une semaine après la chirurgie ($p=0,001$). Par contre, il n'y a pas eu de différence significative du taux de miR-15 libres circulants urinaires entre les patients avec ccRCC et les sujets normaux.

Dans nos résultats précédents (Zhao *et al*, 2012), le taux du miR-210 sérique était significativement plus élevé chez les patients avec un ccRCC de stade 1 que chez les sujets sains et le taux moyen du miR-210 sérique était significativement diminué une semaine après la chirurgie. Ces résultats sont semblables aux résultats du taux du miR-210 libre circulant dans l'urine. Le taux moyen du miR-210 libre circulant urinaire était aussi significativement diminué après la chirurgie. Ceci laisse penser que le miR-210 et le miR-1233 libres circulants urinaires pourraient être libérés par des cellules tumorales de ccRCC. Cependant, le mécanisme exact qui explique le passage de la barrière rénale par les miARNs libres circulants dans l'urine doit encore être étudié.

Le second miARN libre circulant, surexprimé dans l'urine, est miR-1233, qui est situé sur le chromosome 15q14. Wulfken et al (Wulfken *et al*, 2011) a mis en évidence pour la première fois l'augmentation du taux du miR-1233 dans le sérum des patients avec RCC. L'aire sous la courbe ROC est de 0,588. La sensibilité et la spécificité sont respectivement 77,6% et 37,6%. Toutefois, il n'y a pas de corrélation entre le niveau du miR-1233 sérique et les caractéristiques cliniques. Ces résultats sont conformes avec notre étude. Le taux moyen du miR-1233 était significativement plus élevé chez les patients avec un ccRCC que chez les sujets sains. L'AUC est de 0,78. La fonction du miR-1233 n'est toujours pas claire. Le logiciel de prédiction (miRWalk) a analysé des cibles potentielles du miR-1233 qui sont des gènes du cancer comme le BLCAP ou P53.

Chaque type de tumeur peut libérer plusieurs miARNs. La combinaison de plusieurs miARNs peut augmenter la signification en pratique clinique. Dans cette étude, les deux miARNs ont une valeur diagnostique pour le ccRCC. La combinaison de deux miARNs a permis d'augmenter la sensibilité de 66,7% et la spécificité de 91,1%. De plus, nous avons évalué la valeur diagnostique des miARNs libres circulants urinaires sur le cancer à un stade précoce. Nos résultats ont montré que les deux miARN libres circulants urinaires étaient significativement plus élevés chez les patients avec un ccRCC de stade 1 que chez les sujets sains, ce qui suggère l'intérêt d'utiliser des miARNs pour détecter le cancer à un stade précoce.

L'étude la plus récente (Redova *et al*, 2012), a montré que le miR-378 dans le sérum était un marqueur du RCC, tandis qu'un autre auteur (Hauser *et al*, 2012) a montré que l'utilisation du miR-378 sérique était peu fiable pour diagnostiquer le RCC. Les techniques et la sélection différentes du gène de référence peuvent expliquer les résultats divergents. En plus, nous avons utilisé les gènes de référence de 5s tARN et de cel-miR-39 qui sont plus stables que les autres gènes de référence (ie. U6 ou RNU6b).

L'autre étude de 2011 (Youssef et al, 2011), a montré que le profil d'expression des miARN permet la distinction entre le RCC et l'oncocytome. Par conséquent, des validations supplémentaires sont nécessaires pour une étude future.

2. *ARNm*

L'existence d'ARNm libres circulants dans les liquides biologiques est une observation importante du fait que l'ARNm est plus labile que l'ADN en présence de ribonucléase (Reddi & Holland, 1976). Notre groupe a démontré que le taux d'ARNm libre circulant est augmenté significativement chez les patients avec ccRCC (Feng et al, 2008). Certains articles ont rapporté que l'ARNm libre circulant pourrait se complexer avec les protéines, les lipides, les lipoprotéines ou les phospholipides (Masella *et al*, 1989; Rosi *et al*, 1988; Stroun *et al*, 1978; Wieczorek *et al*, 1985) liés à l'ADN au sein des nucléosomes, ou protégés dans les corps apoptotiques (Halicka *et al*, 2000) ou à de petites vésicules (Hasselmann *et al*, 2001). Par conséquent, l'ARNm libre circulant dans l'urine pourrait être moins fragile que prévu et le fragment d'ARNm libre circulant pourrait être différent entre un patient avec un cancer et un sujet normal du fait d'un mécanisme de protection. Cependant, on ne sait toujours pas s'il existe de l'ARNm libre circulant dans l'urine de patients avec un cancer.

Dans cette étude, nous avons démontré que l'ARNm libre circulant est assez stable pour être amplifié après une incubation de 24 h. L'incubation prolongée de l'urine n'a pas conduit à la dégradation de l'ARNm libre circulant à la température ambiante ou à 4 °C. En plus, l'ARN libre circulant, qui représente 99% de l'ARNm commercial de référence est dégradé après une incubation de l'urine pendant 20 s. L'ARNm libre circulant pourrait résister à l'action des RNases urinaires. Dans l'étude précédente de Kopreski et al (Kopreski *et al*, 1999), la congélation/décongélation des échantillons pourrait favoriser la dégradation de l'ARNm. Cependant, dans notre étude, nous avons trouvé que la congélation/décongélation n'a pas changé significativement le taux de l'ARNm.

Nous avons cherché à savoir si l'index d'intégrité de l'ARN libre circulant urinaire pouvait être un outil diagnostique pour les patients avec ccRCC. La comparaison de l'expression de l'index d'intégrité de l'ARN libre circulant urinaire chez les patients ccRCC et les contrôles a montré que l'index d'intégrité était significativement inférieur chez les patients avec ccRCC versus les sujets contrôle et le taux d'intégrité de l'ARNm libre circulant urinaire avait une

valeur diagnostique significative avec une AUC de 0,86. L'ARNm libre circulant serait libéré par les cellules cancéreuses autant que par les tissus normaux. Chez les patients avec un cancer, une augmentation de la RNase circulante a été détectée, (Reddi & Holland, 1976) ce qui suggère que l'ARNm libre circulant de grande taille est plus facilement dégradé au cours d'un cancer que chez les sujets normaux. De plus, l'ARNm de petite taille peut être protégé dans un complexe avec une autre molécule, comme les exosomes, qui sont des vésicules de 30-100 nm (van Niel *et al*, 2006). Des preuves récentes ont révélé que les exosomes des mastocytes contiennent des ARNm et des miARNs, et ces ARNs peuvent être transférés d'un mastocyte à l'autre. De plus, la majorité des liquides biologiques contient des quantités importantes d'exosomes (Caby *et al*, 2005; Pisitkun *et al*, 2004).

Nous avons recherché une corrélation entre l'index d'intégrité de l'ARN libre circulant urinaire et les paramètres cliniques. Parmi les patients avec un ccRCC, nous n'avons observé aucune corrélation significative entre l'index d'intégrité de l'ARN libre circulant urinaire et les paramètres cliniques. De plus, l'index d'intégrité de l'ARN libre circulant urinaire était significativement diminué une semaine après la chirurgie.

Nous avons ensuite testé un gène tumoral libre circulant dans l'urine, le VEGF, qui pourrait apparaître à la suite des mutations de VHL dans le ccRCC malgré des conditions d'oxygénation normales (Ljungberg *et al*, 2006). Nous avons trouvé qu'un VEGF avec 98 pb était détecté dans les urines de la majorité des patients avec ccRCC tandis qu'un VEGF avec 420 pb était très difficile à détecter. Ces résultats préliminaires ont permis de confirmer nos résultats précédents, montrant que l'ARNm libre circulant de petite taille peut-être détectable dans l'urine de patients avec ccRCC. Certains articles ont étudié la surrégulation de VEGF dans le sang périphérique chez les patients avec ccRCC (Ljungberg *et al*, 2003; Sato *et al*, 1999). Comme les miARNs libres circulants, la corrélation entre les ARNs libres circulants dans l'urine et le sang n'est toujours pas claire.

Nous publions donc la première étude sur l'ARNm libre circulant dans l'urine de patients avec cancer. Certaines recherches dont la nôtre ont rapporté l'existence d'ADN libre circulant

dans le sang ou l'urine (Casadio *et al*; Gang *et al*, 2009). Dans cette étude, nous avons démontré que la détection de l'ARN libre circulant urinaire peut être un outil diagnostique potentiel, et s'il est confirmé, cela apporterait de nombreux avantages par rapport aux techniques actuelles basées sur l'ADN.

3. L'intérêt d'un marqueur biologie dans le cancer du rein

Les performances de l'étude des microARNs sériques et urinaires sur l'intégrité de l'ARN libre urinaire pour le diagnostic du cancer du rein à cellules claires sont prometteuses. Il reste bien sûr à définir la place exacte que pourrait prendre ce dosage en pratique clinique. Pourrait-il remplacer les biopsies rénales ? Faut-il plutôt le considérer comme un éventuel biomarqueur qui viendrait en complément des autres démarches diagnostiques pour participer à la décision, au moins dans certaines situations cliniques difficiles, soit avant de faire des biopsies rénales, soit avant d'opter pour telle ou telle modalité thérapeutique ? Pourrait-il avoir un intérêt pour l'établissement d'un pronostic et pour le suivi (prédiction d'une récurrence ou d'une progression soit après néphrectomie soit au cours d'un traitement médical).

Ce dernier aspect peut être très intéressant au vu des travaux présentés. En effet les microARNs sériques et urinaires et l'intégrité de l'ARN libre urinaire sont significativement modifiés en post-opératoire, ce qui permettrait d'ajouter un outil non invasif à la surveillance et éventuellement remplacer les modalités de suivi sur plusieurs années en imagerie qui peut être néphrotoxique et irradiante (risque de cancer secondaire). On peut éventuellement imaginer également de modifier les traitements en fonction de l'évolution des marqueurs, comme cela est fait dans le cancer du testicule, par exemple.

L'intérêt diagnostique des petits ARNs circulants est fortement suggéré pour l'établissement d'un diagnostic. Cependant, dans nos résultats, il n'a pas été mis en évidence de corrélation entre l'expression des petits ARNs circulants et le stade ou le grade du cancer. Aucune autre étude n'a été spécifiquement consacrée à la recherche d'un rôle pronostique de la mesure des petits ARNs libres sériques ou urinaires chez les malades avec ccRCC. De même, Hauser et al, ont montré que le taux du miARN sérique ne permet pas de prédire le stade, le grade Fuhrman, ou d'autres caractéristiques. En plus, l'absence de corrélation entre l'expression des miARNs circulants et le stade dans les autres cancers, laisse penser qu'une corrélation entre l'expression des petits ARNs circulants et le pronostic est peu probable. Le dosage des petits ARNs circulants semble plutôt

correspondre à un outil de diagnostic précoce.

Une dernière perspective concerne le couplage des miARNs avec d'autres marqueurs diagnostiques de mARN. L'idée générale, commune en fait à de nombreux cancers, est de penser que la démarche diagnostique sera d'autant plus fiable qu'elle sera basée sur l'évaluation de plusieurs marqueurs. La sensibilité globale devrait être améliorée dans la mesure où le test global serait considéré comme positif si au moins un marqueur est positif, de même que la spécificité si la positivité du test global est nuancée par la nécessité d'avoir au moins un marqueur connu pour son extrême spécificité. A ce titre, il faut souligner que la mesure de biomarqueurs dans les sérums et les urines ne concernent pas les seuls miARN ou mARN. Ainsi par exemple, les miARNs ont déjà été évalués pour leur la valeur diagnostique:

Marqueurs	Expression	Seuil (ROC)	Sensibilité	Spécificité	Références
miR-378	↑	0.02	70%	60%	(Redova <i>et al</i> , 2012)
miR-451	↓	2.0	81%	77%	(Redova <i>et al</i> , 2012)
miR-378+miR-451			81%	83%	(Redova <i>et al</i> , 2012)
miR-1233	↑	1.15	77.4%	37.6%	(Wulfken <i>et al</i> , 2011)

ou les marqueurs moléculaires basés sur un tissu de ccRCC inclut : VEGF, CAIX, mTOR, survivin, B7-H1, P53, MMP, IMP3, Ki-67, CRP, Vimentin, Fascin.

CONCLUSION

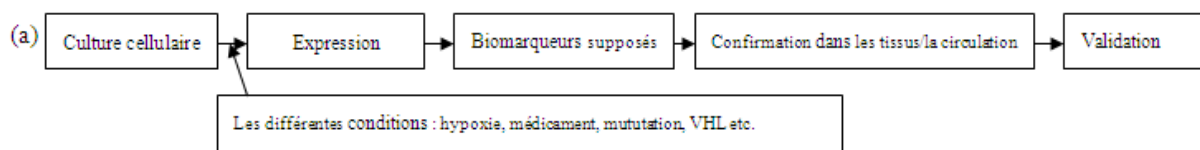
Les travaux présentés dans cette thèse ont montré que le niveau du miR-210 circulant dans le sérum chez les patients atteints de ccRCC était plus élevé que chez les sujets sains. Le miR-210 circulant sérique pourrait représenter un marqueur puissant pour le diagnostic de ccRCC. Nous avons démontré pour la première fois que la détection des miARNs et mARN dans l'urine est possible. Nous avons observé que les miARNs et le mARN circulant dans l'urine ont été assez stables pour être amplifié dans différentes conditions. Nous avons démontré que le miR-210 et le miR-1233 circulant urinaire sont des marqueurs moléculaires spécifiques du ccRCC. La combinaison des deux miARNs a permis d'augmenter la sensibilité et la spécificité pour le diagnostic de ccRCC. Nous sommes également les premiers à montrer que l'index d'intégrité du mARN circulant urinaire chez les patients avec ccRCC était plus diminué que chez les sujets sains. De plus, nous avons aussi montré que la petite taille de VEGF dans l'urine peut être détectée chez les patients avec ccRCC.

PERSPECTIVE

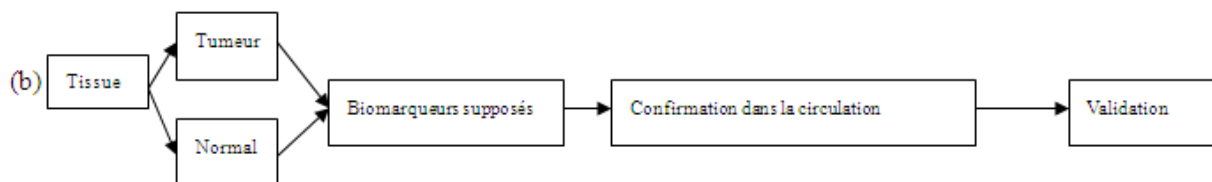
La stratégie prospective

Un bon marqueur diagnostique devrait être capable de permettre la distinction entre une pathologie rénale non tumorale et une pathologie rénale tumorale bénigne, de préciser le sous-type de carcinomes à cellules rénales (cellules claires, papillaires, chromophobes) et d'éliminer les diagnostics histologiques que sont les tumeurs des voies excrétrices. Les petits ARNs libres circulants commencent juste à être étudiés, parmi les nouveaux biomarqueurs en cours de développement pour l'aide au diagnostic dans le cancer du rein dans lequel ils tiennent une place à part. Cependant, il reste à déterminer leurs indications en pratique clinique et à réaliser la standardisation des méthodes d'extraction et de l'expression normalisée.

Pour valider les marqueurs, les stratégies sont montrées dans les figures ci-dessous:

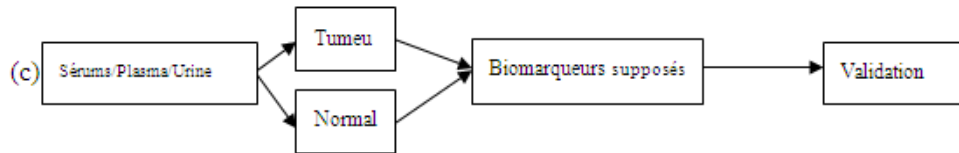


La stratégie a) : cette stratégie dépend du choix de la lignée cellulaire de ccRCC ou du sous-type de RCC. Il est possible d'appliquer des traitements (hypoxie, méthylation, mutation de gène) dans le processus de culture cellulaire. Ensuite, il faut trouver les biomarqueurs supposés par le profil exprimé. Enfin, la validation des biomarqueurs supposés dans le sérum ou l'urine.



La stratégie b) : elle évite l'étape de criblage des marqueurs dans la culture cellulaire. Elle commence directement au niveau du tissu tumoral. Mais, il a été montré que le niveau d'expression des marqueurs n'est pas le même dans le tissu et le sérum. Ceci suggère que la

détection des biomarqueurs dans les tissus tumoraux peut être discordante avec leur détection dans le sérum ou l'urine.



La stratégie c) : l'utilisation directe des échantillons de sang circulant pour l'étude du profil d'expression et la sélection des biomarqueurs, est une meilleure méthode. Cependant, la concentration des ARNs dans le sérum ou l'urine est faible et l'ARN est sous forme de petits fragments dans la circulation. Pour la détection, nous proposons la détection de plusieurs petits fragments d'un gène tumoral dans la circulation pour augmenter la sensibilité ou la détection de plusieurs petits marqueurs et pour améliorer la spécificité. En plus, la standardisation de la méthode d'extraction des ARNs dans le sérum ou l'urine seront réalisées dans l'avenir.

Le rôle de biomarqueurs

Le diagnostic de tumeur rénale repose actuellement sur l'imagerie (TDM rénal) et sur l'histologie (biopsie pré-opératoire). Dans de nombreux cas, en particulier chez les patients de moins de 70 ans et sans co-morbidités majeures, il n'est pas réalisé de biopsie et la décision opératoire est prise sur la seule base de l'imagerie. Ceci est dû au fait que d'une part, une tumeur bénigne peut croître en taille et compromettre la possibilité d'une chirurgie conservatrice et d'autre part que, dans les volumineuses tumeurs hyper-vascularisées au scanner, la probabilité que la tumeur soit maligne est proche de 100%. Il en est de même en cas d'extension locorégionale ou de métastases à distance. On réserve donc la biopsie aux seules situations où on pense qu'elle est de nature à changer la décision thérapeutique. Il devrait en être de même pour tout test diagnostique car l'imagerie est de toute façon indispensable avant la chirurgie (stratégie chirurgicale) ou avant un traitement général (bilan d'extension, définition des cibles). Cependant, l'imagerie n'est pas capable de faire la distinction entre les tumeurs bénignes et les tumeurs malignes et entre les sous-types histologiques de carcinome à cellules claires qui est le plus fréquent. Il n'existe pas dans le cancer rénal de marqueur comme la PSA dans le cancer de la

prostate ou la Foetoprotéine et l'HCG dans le cancer du testicule.

Dans cette thèse, nous avons montré que les petits ARNs dans le sérum et les urines et l'intégrité des ARNs dans les urines étaient des outils diagnostiques dans le cancer du rein à cellules claires. Si ces petits ARNs circulants sont validés, on peut éventuellement imaginer l'intérêt pratique en clinique comme la détection des petits ARNs circulants dans l'urine pour prédire le cancer, la classification de la tumeur pour aider le clinicien, la prédiction d'une récurrence ou d'une progression soit après néphrectomie soit au cours d'un traitement médical.

REFERENCES

Arroyo JD, Chevillet JR, Kroh EM, Ruf IK, Pritchard CC, Gibson DF, Mitchell PS, Bennett CF, Pogosova-Agadjanyan EL, Stirewalt DL, Tait JF, Tewari M (2011) Argonaute2 Complexes Carry a Population of Circulating Micrnas Independent of Vesicles in Human Plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**(12): 5003-8

Badger MR, Price GD (1989) Carbonic Anhydrase Activity Associated with the Cyanobacterium *Synechococcus Pcc7942*. *Plant Physiol* **89**(1): 51-60

Barber RD, Harmer DW, Coleman RA, Clark BJ (2005) Gapdh as a Housekeeping Gene: Analysis of Gapdh Mrna Expression in a Panel of 72 Human Tissues. *Physiol Genomics* **21**(3): 389-95

Bates DO, Cui TG, Doughty JM, Winkler M, Sugiono M, Shields JD, Peat D, Gillatt D, Harper SJ (2002) Vegf165b, an Inhibitory Splice Variant of Vascular Endothelial Growth Factor, Is Down-Regulated in Renal Cell Carcinoma. *Cancer Res* **62**(14): 4123-31

Berezikov E, Guryev V, van de Belt J, Wienholds E, Plasterk RH, Cuppen E (2005) Phylogenetic Shadowing and Computational Identification of Human Micrna Genes. *Cell* **120**(1): 21-4

Beyer C, Pisetsky DS (2009) The Role of Microparticles in the Pathogenesis of Rheumatic Diseases. *Nat Rev Rheumatol* **6**(1): 21-9

Blinov MN, Luganova IS, Vladimirova AD (1981) [Factors of a Nucleic Nature in Human Blood Plasma]. *Vopr Med Khim* **27**(5): 600-3

Blower PE, Chung JH, Verducci JS, Lin S, Park JK, Dai Z, Liu CG, Schmittgen TD, Reinhold WC, Croce CM, Weinstein JN, Sadee W (2008) Micrnas Modulate the Chemosensitivity of Tumor Cells. *Mol Cancer Ther* **7**(1): 1-9

Bocci G, Man S, Green SK, Francia G, Ebos JM, du Manoir JM, Weinerman A, Emmenegger U, Ma L, Thorpe P, Davidoff A, Huber J, Hicklin DJ, Kerbel RS (2004) Increased Plasma Vascular Endothelial Growth Factor (Vegf) as a Surrogate Marker for Optimal Therapeutic Dosing of Vegf Receptor-2 Monoclonal Antibodies. *Cancer Res* **64**(18): 6616-25

Brenner W, Farber G, Herget T, Lehr HA, Hengstler JG, Thuroff JW (2002) Loss of Tumor Suppressor Protein Pten During Renal Carcinogenesis. *Int J Cancer* **99**(1): 53-7

Bryzgunova OE, Skvortsova TE, Kolesnikova EV, Starikov AV, Rykova EY, Vlassov VV, Laktionov PP (2006) Isolation and Comparative Study of Cell-Free Nucleic Acids from Human Urine. *Ann N Y Acad Sci* **1075**: 334-40

Caby MP, Lankar D, Vincendeau-Scherrer C, Raposo G, Bonnerot C (2005) Exosomal-Like Vesicles Are Present in Human Blood Plasma. *Int Immunol* **17**(7): 879-87

Calin GA, Croce CM (2006) MicroRNA Signatures in Human Cancers. *Nat Rev Cancer* **6**(11): 857-66

Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, Bichi R, Zupo S, Noch E, Aldler H, Rattan S, Keating M, Rai K, Rassenti L, Kipps T, Negrini M, Bullrich F, Croce CM (2002) Frequent Deletions and Down-Regulation of Micro- Rna Genes Mir15 and Mir16 at 13q14 in Chronic Lymphocytic Leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(24): 15524-9

Camps C, Buffa FM, Colella S, Moore J, Sotiriou C, Sheldon H, Harris AL, Gleagle JM, Ragoussis J (2008) Hsa-Mir-210 Is Induced by Hypoxia and Is an Independent Prognostic Factor in Breast Cancer. *Clin Cancer Res* **14**(5): 1340-8

Camussi G, Deregibus MC, Bruno S, Cantaluppi V, Biancone L (2010) Exosomes/Microvesicles as a Mechanism of Cell-to-Cell Communication. *Kidney Int* **78**(9): 838-48

Capitanio U, Cloutier V, Zini L, Isbarn H, Jeldres C, Shariat SF, Perrotte P, Antebi E, Patard JJ, Montorsi F, Karakiewicz PI (2009) A Critical Assessment of the Prognostic Value of Clear Cell, Papillary and Chromophobe Histological Subtypes in Renal Cell Carcinoma: A Population-Based Study. *BJU Int* **103**(11): 1496-500

Casadio V, Calistri D, Tebaldi M, Bravaccini S, Gunelli R, Martorana G, Bertaccini A, Serra L, Scarpi E, Amadori D, Silvestrini R, Zoli W Urine Cell-Free DNA Integrity as a Marker for Early Bladder Cancer Diagnosis: Preliminary Data. *Urol Oncol*

Casadio V, Calistri D, Tebaldi M, Bravaccini S, Gunelli R, Martorana G, Bertaccini A, Serra L, Scarpi E, Amadori D, Silvestrini R, Zoli W (2012) Urine Cell-Free DNA Integrity as a Marker for Early Bladder Cancer Diagnosis: Preliminary Data. *Urol Oncol*

Chen Z, Li Y, Zhang H, Huang P, Luthra R (2010) Hypoxia-Regulated MicroRNA-210 Modulates Mitochondrial Function and Decreases Iscu and Cox10 Expression. *Oncogene* **29**(30): 4362-8

Cho WC (2007) Oncomirs: The Discovery and Progress of Micromas in Cancers. *Mol Cancer* **6**: 60

Chow WH, McLaughlin JK, Mandel JS, Wacholder S, Niwa S, Fraumeni JF, Jr. (1996) Obesity and Risk of Renal Cell Cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **5**(1): 17-21

Clark PE (2007) Recent Advances in Targeted Therapy for Renal Cell Carcinoma. *Curr Opin Urol* **17**(5): 331-6

Cocucci E, Racchetti G, Meldolesi J (2009) Shedding Microvesicles: Artefacts No More. *Trends*

Cell Biol **19**(2): 43-51

Cohen HT, McGovern FJ (2005) Renal-Cell Carcinoma. *N Engl J Med* **353**(23): 2477-90

Curti BD (2004) Renal Cell Carcinoma. *JAMA* **292**(1): 97-100

Datta K, Mondal S, Sinha S, Li J, Wang E, Knebelmann B, Karumanchi SA, Mukhopadhyay D (2005) Role of Elongin-Binding Domain of Von Hippel Lindau Gene Product on Hur-Mediated Vpf/Vegf Mrna Stability in Renal Cell Carcinoma. *Oncogene* **24**(53): 7850-8

de Riese WT, Crabtree WN, Allhoff EP, Werner M, Liedke S, Lenis G, Atzpodien J, Kirchner H (1993) Prognostic Significance of Ki-67 Immunostaining in Nonmetastatic Renal Cell Carcinoma. *J Clin Oncol* **11**(9): 1804-8

Dhote R, Pellicer-Coeuret M, Thiounn N, Debre B, Vidal-Trecan G (2000) Risk Factors for Adult Renal Cell Carcinoma: A Systematic Review and Implications for Prevention. *BJU Int* **86**(1): 20-7

Dimopoulos MA, Mouloupoulos LA, Costantinides C, Deliveliotis C, Pantazopoulos D, Dimopoulos C (1996) Primary Renal Lymphoma: A Clinical and Radiological Study. *J Urol* **155**(6): 1865-7

Dutta KK, Zhong Y, Liu YT, Yamada T, Akatsuka S, Hu Q, Yoshihara M, Ohara H, Takehashi M, Shinohara T, Masutani H, Onuki J, Toyokuni S (2007) Association of Microrna-34a Overexpression with Proliferation Is Cell Type-Dependent. *Cancer Sci* **98**(12): 1845-52

Ebos JM, Bocci G, Man S, Thorpe PE, Hicklin DJ, Zhou D, Jia X, Kerbel RS (2004) A Naturally Occurring Soluble Form of Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2 Detected in Mouse and Human Plasma. *Mol Cancer Res* **2**(6): 315-26

Edge SB, Compton CC (2010) The American Joint Committee on Cancer: The 7th Edition of the Ajcc Cancer Staging Manual and the Future of Tnm. *Ann Surg Oncol* **17**(6): 1471-4

Elashoff D, Zhou H, Reiss J, Wang J, Xiao H, Henson B, Hu S, Arellano M, Sinha U, Le A, Messadi D, Wang M, Nabili V, Lingen M, Morris D, Randolph T, Feng Z, Akin D, Kastratovic DA, Chia D, Abemayor E, Wong DT (2012) Prevalidation of Salivary Biomarkers for Oral Cancer Detection. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **21**(4): 664-72

Escudier B Sorafenib for the Management of Advanced Renal Cell Carcinoma. *Expert Rev Anticancer Ther* **11**(6): 825-36

Escudier B, Albiges L (2011) Vascular Endothelial Growth Factor-Targeted Therapy for the Treatment of Renal Cell Carcinoma. *Drugs* **71**(9): 1179-91

Fadok VA, Bratton DL, Rose DM, Pearson A, Ezekewitz RA, Henson PM (2000) A Receptor for Phosphatidylserine-Specific Clearance of Apoptotic Cells. *Nature* **405**(6782): 85-90

Feng G, Li G, Gentil-Perret A, Tostain J, Genin C (2008) Elevated Serum-Circulating Rna in Patients with Conventional Renal Cell Cancer. *Anticancer Res* **28**(1A): 321-6

Figlin RA, Pierce WC, Kaboo R, Tso CL, Moldawer N, Gitlitz B, deKernion J, Belldegrun A (1997) Treatment of Metastatic Renal Cell Carcinoma with Nephrectomy, Interleukin-2 and Cytokine-Primed or Cd8(+) Selected Tumor Infiltrating Lymphocytes from Primary Tumor. *J Urol* **158**(3 Pt 1): 740-5

Fish JE, Santoro MM, Morton SU, Yu S, Yeh RF, Wythe JD, Ivey KN, Bruneau BG, Stainier DY, Srivastava D (2008) Mir-126 Regulates Angiogenic Signaling and Vascular Integrity. *Dev Cell* **15**(2): 272-84

Flaherty KT, Fuchs CS, Colditz GA, Stampfer MJ, Speizer FE, Willett WC, Curhan GC (2005) A Prospective Study of Body Mass Index, Hypertension, and Smoking and the Risk of Renal Cell Carcinoma (United States). *Cancer Causes Control* **16**(9): 1099-106

Fontana L, Fiori ME, Albini S, Cifaldi L, Giovinnazzi 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**(5): e2236

Fuhrman SA, Lasky LC, Limas C (1982) Prognostic Significance of Morphologic Parameters in Renal Cell Carcinoma. *Am J Surg Pathol* **6**(7): 655-63

Fujita J, Kraus MH, Onoue H, Srivastava SK, Ebi Y, Kitamura Y, Rhim JS (1988) Activated H-Ras Oncogenes in Human Kidney Tumors. *Cancer Res* **48**(18): 5251-5

Furusato B, Mohamed A, Uhlen M, Rhim JS (2010) Cxcr4 and Cancer. *Pathol Int* **60**(7): 497-505

Gang F, Guorong L, An Z, Anne GP, Christian G, Jacques T (2009) Prediction of Clear Cell Renal Cell Carcinoma by Integrity of Cell-Free DNA in Serum. *Urology* **75**(2): 262-5

Garzon R, Calin GA, Croce CM (2009) Micrnas in Cancer. *Annu Rev Med* **60**: 167-79

Giannakakis A, Sandaltzopoulos R, Greshock J, Liang S, Huang J, Hasegawa K, Li C, O'Brien-Jenkins A, Katsaros D, Weber BL, Simon C, Coukos G, Zhang L (2008) Mir-210 Links Hypoxia with Cell Cycle Regulation and Is Deleted in Human Epithelial Ovarian Cancer. *Cancer Biol Ther* **7**(2): 255-64

Gumz ML, Zou H, Kreinest PA, Childs AC, Belmonte LS, LeGrand SN, Wu KJ, Luxon BA, Sinha M, Parker AS, Sun LZ, Ahlquist DA, Wood CG, Copland JA (2007) Secreted

Frizzled-Related Protein 1 Loss Contributes to Tumor Phenotype of Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *Clin Cancer Res* **13**(16): 4740-9

Halicka HD, Bedner E, Darzynkiewicz Z (2000) Segregation of Rna and Separate Packaging of DNA and Rna in Apoptotic Bodies During Apoptosis. *Exp Cell Res* **260**(2): 248-56

Hara S, Oya M, Mizuno R, Horiguchi A, Marumo K, Murai M (2005) Akt Activation in Renal Cell Carcinoma: Contribution of a Decreased Pten Expression and the Induction of Apoptosis by an Akt Inhibitor. *Ann Oncol* **16**(6): 928-33

Hasselmann DO, Rappl G, Tilgen W, Reinhold U (2001) Extracellular Tyrosinase Mrna within Apoptotic Bodies Is Protected from Degradation in Human Serum. *Clin Chem* **47**(8): 1488-9

Hauser S, Wulfken LM, Holdenrieder S, Moritz R, Ohlmann CH, Jung V, Becker F, Herrmann E, Walgenbach-Brunagel G, von Ruecker A, Muller SC, Ellinger J (2012) Analysis of Serum Micrnas (Mir-26a-2*, Mir-191, Mir-337-3p and Mir-378) as Potential Biomarkers in Renal Cell Carcinoma. *Cancer Epidemiol* **36**(4): 391-4

Hemmerlein B, Kugler A, Ozisik R, Ringert RH, Radzun HJ, Thelen P (2001) Vascular Endothelial Growth Factor Expression, Angiogenesis, and Necrosis in Renal Cell Carcinomas. *Virchows Arch* **439**(5): 645-52

Ho AS, Huang X, Cao H, Christman-Skieller C, Bennewith K, Le QT, Koong AC (2010) Circulating Mir-210 as a Novel Hypoxia Marker in Pancreatic Cancer. *Transl Oncol* **3**(2): 109-13

Hristov M, Erl W, Linder S, Weber PC (2004) Apoptotic Bodies from Endothelial Cells Enhance the Number and Initiate the Differentiation of Human Endothelial Progenitor Cells in Vitro. *Blood* **104**(9): 2761-6

Huang X, Ding L, Bennewith KL, Tong RT, Welford SM, Ang KK, Story M, Le QT, Giaccia AJ (2009a) Hypoxia-Inducible Mir-210 Regulates Normoxic Gene Expression Involved in Tumor Initiation. *Mol Cell* **35**(6): 856-67

Huang Y, Dai Y, Yang J, Chen T, Yin Y, Tang M, Hu C, Zhang L (2009b) Microarray Analysis of Micrna Expression in Renal Clear Cell Carcinoma. *Eur J Surg Oncol* **35**(10): 1119-23

Huang Z, Huang D, Ni S, Peng Z, Sheng W, Du X (2009c) Plasma Micrnas Are Promising Novel Biomarkers for Early Detection of Colorectal Cancer. *Int J Cancer* **127**(1): 118-26

Hugel B, Martinez MC, Kunzelmann C, Freyssinet JM (2005) Membrane Microparticles: Two Sides of the Coin. *Physiology (Bethesda)* **20**: 22-7

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 Micrna

Expression in Human Peripheral Blood Microvesicles. *PLoS One* **3**(11): e3694

Inui M, Martello G, Piccolo S (2010) MicroRNA Control of Signal Transduction. *Nat Rev Mol Cell Biol* **11**(4): 252-63

Ivanov S, Liao SY, Ivanova A, Danilkovitch-Miagkova A, Tarasova N, Weirich G, Merrill MJ, Proescholdt MA, Oldfield EH, Lee J, Zavada J, Waheed A, Sly W, Lerman MI, Stanbridge EJ (2001) Expression of Hypoxia-Inducible Cell-Surface Transmembrane Carbonic Anhydrases in Human Cancer. *Am J Pathol* **158**(3): 905-19

Jacobsen J, Rasmuson T, Grankvist K, Ljungberg B (2000) Vascular Endothelial Growth Factor as Prognostic Factor in Renal Cell Carcinoma. *J Urol* **163**(1): 343-7

Jahr S, Hentze H, Englisch S, Hardt D, Fackelmayer FO, Hesch RD, Knippers R (2001) DNA Fragments in the Blood Plasma of Cancer Patients: Quantitations and Evidence for Their Origin from Apoptotic and Necrotic Cells. *Cancer Res* **61**(4): 1659-65

Jamaspishvili T, Kral M, Khomeriki I, Student V, Kolar Z, Bouchal J (2009) Urine Markers in Monitoring for Prostate Cancer. *Prostate Cancer Prostatic Dis* **13**(1): 12-9

Johnstone RM (2006) Exosomes Biological Significance: A Concise Review. *Blood Cells Mol Dis* **36**(2): 315-21

Kamm RC, Smith AG (1972) Nucleic Acid Concentrations in Normal Human Plasma. *Clin Chem* **18**(6): 519-22

Keck PJ, Hauser SD, Krivi G, Sanzo K, Warren T, Feder J, Connolly DT (1989) Vascular Permeability Factor, an Endothelial Cell Mitogen Related to Pdgf. *Science* **246**(4935): 1309-12

Kopreski MS, Benko FA, Kwak LW, Gocke CD (1999) Detection of Tumor Messenger Rna in the Serum of Patients with Malignant Melanoma. *Clin Cancer Res* **5**(8): 1961-5

Korpál M, Lee ES, Hu G, Kang Y (2008) The Mir-200 Family Inhibits Epithelial-Mesenchymal Transition and Cancer Cell Migration by Direct Targeting of E-Cadherin Transcriptional Repressors Zeb1 and Zeb2. *J Biol Chem* **283**(22): 14910-4

Kosaka N, Iguchi H, Yoshioka Y, Takeshita F, Matsuki Y, Ochiya T (2010) Secretory Mechanisms and Intercellular Transfer of MicroRNAs in Living Cells. *J Biol Chem* **285**(23): 17442-52

Krutzfeldt J, Rajewsky N, Braich R, Rajeev KG, Tuschl T, Manoharan M, Stoffel M (2005) Silencing of MicroRNAs in Vivo with 'Antagomirs'. *Nature* **438**(7068): 685-9

Kume H, Takahashi S, Teramoto S, Isurugi K (2001) Risk Factors for Adult Renal Cell

Carcinoma: A Systematic Review and Implications for Prevention. *BJU Int* **88**(7): 804

Lagos-Quintana M, Rauhut R, Lendeckel W, Tuschl T (2001) Identification of Novel Genes Coding for Small Expressed Rnas. *Science* **294**(5543): 853-8

Lange T, Guttmann-Raviv N, Baruch L, Machluf M, Neufeld G (2003) Vegf162, a New Heparin-Binding Vascular Endothelial Growth Factor Splice Form That Is Expressed in Transformed Human Cells. *J Biol Chem* **278**(19): 17164-9

Lau NC, Lim LP, Weinstein EG, Bartel DP (2001) An Abundant Class of Tiny Rnas with Probable Regulatory Roles in *Caenorhabditis Elegans*. *Science* **294**(5543): 858-62

Lee RC, Ambros V (2001) An Extensive Class of Small Rnas in *Caenorhabditis Elegans*. *Science* **294**(5543): 862-4

Leung DW, Cachianes G, Kuang WJ, Goeddel DV, Ferrara N (1989) Vascular Endothelial Growth Factor Is a Secreted Angiogenic Mitogen. *Science* **246**(4935): 1306-9

Levi F, Ferlay J, Galeone C, Lucchini F, Negri E, Boyle P, La Vecchia C (2008) The Changing Pattern of Kidney Cancer Incidence and Mortality in Europe. *BJU Int* **101**(8): 949-58

Levy AP, Levy NS, Goldberg MA (1996) Post-Transcriptional Regulation of Vascular Endothelial Growth Factor by Hypoxia. *J Biol Chem* **271**(5): 2746-53

Li A, Omura N, Hong SM, Vincent A, Walter K, Griffith M, Borges M, Goggins M (2010) Pancreatic Cancers Epigenetically Silence Sip1 and Hypomethylate and Overexpress Mir-200a/200b in Association with Elevated Circulating Mir-200a and Mir-200b Levels. *Cancer Res* **70**(13): 5226-37

Li G, Cuilleron M, Cottier M, Gentil-Perret A, Lambert C, Genin C, Tostain J (2006) The Use of Mn/Ca9 Gene Expression in Identifying Malignant Solid Renal Tumors. *Eur Urol* **49**(2): 401-5

Li G, Cuilleron M, Gentil-Perret A, Cottier M, Passebosc-Faure K, Lambert C, Genin C, Tostain J (2003) Rapid and Sensitive Detection of Messenger Rna Expression for Molecular Differential Diagnosis of Renal Cell Carcinoma. *Clin Cancer Res* **9**(17): 6441-6

Li G, Feng G, Gentil-Perret A, Genin C, Tostain J (2007) Ca9 Gene Expression in Conventional Renal Cell Carcinoma: A Potential Marker for Prediction of Early Metastasis after Nephrectomy. *Clin Exp Metastasis* **24**(3): 149-55

Li G, Passebosc-Faure K, Lambert C, Gentil-Perret A, Blanc F, Oosterwijk E, Mosnier JF, Genin C, Tostain J (2001) The Expression of G250/Mn/Ca9 Antigen by Flow Cytometry: Its Possible Implication for Detection of Micrometastatic Renal Cancer Cells. *Clin Cancer Res* **7**(1): 89-92

Liu H, Brannon AR, Reddy AR, Alexe G, Seiler MW, Arreola A, Oza JH, Yao M, Juan D, Liou LS, Ganesan S, Levine AJ, Rathmell WK, Bhanot GV (2010) Identifying Mrna Targets of Microrna Dysregulated in Cancer: With Application to Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *BMC Syst Biol* **4**: 51

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**(4): 402-8

Ljungberg B, Jacobsen J, Haggstrom-Rudolfsson S, Rasmuson T, Lindh G, Grankvist K (2003) Tumour Vascular Endothelial Growth Factor (Vegf) Mrna in Relation to Serum Vegf Protein Levels and Tumour Progression in Human Renal Cell Carcinoma. *Urol Res* **31**(5): 335-40

Ljungberg BJ, Jacobsen J, Rudolfsson SH, Lindh G, Grankvist K, Rasmuson T (2006) Different Vascular Endothelial Growth Factor (Vegf), Vegf-Receptor 1 and -2 Mrna Expression Profiles between Clear Cell and Papillary Renal Cell Carcinoma. *BJU Int* **98**(3): 661-7

Lo YM (2001) Circulating Nucleic Acids in Plasma and Serum: An Overview. *Ann N Y Acad Sci* **945**: 1-7

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**(7043): 834-8

Lu Z, Liu M, Stribinskis V, Klinge CM, Ramos KS, Colburn NH, Li Y (2008) Microrna-21 Promotes Cell Transformation by Targeting the Programmed Cell Death 4 Gene. *Oncogene* **27**(31): 4373-9

Masella R, Cantafora A, Guidoni L, Luciani AM, Mariutti G, Rosi A, Viti V (1989) Characterization of Vesicles, Containing an Acylated Oligopeptide, Released by Human Colon Adenocarcinoma Cells. Nmr and Biochemical Studies. *FEBS Lett* **246**(1-2): 25-9

Mathew A, Devesa SS, Fraumeni JF, Jr., Chow WH (2002) Global Increases in Kidney Cancer Incidence, 1973-1992. *Eur J Cancer Prev* **11**(2): 171-8

Meldrum NU, Roughton FJ (1933) The State of Carbon Dioxide in Blood. *J Physiol* **80**(2): 143-70

Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, Fritz BR, Wyman SK, Pogosova-Agadjanyan EL, Peterson A, Noteboom J, O'Briant KC, Allen A, Lin DW, Urban N, Drescher CW, Knudsen BS, Stirewalt DL, Gentleman R, Vessella RL, Nelson PS, Martin DB, Tewari M (2008) Circulating Micrnas as Stable Blood-Based Markers for Cancer Detection. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(30): 10513-8

Morel O, Toti F, Hugel B, Bakouboula B, Camoin-Jau L, Dignat-George F, Freyssinet JM (2006) Procoagulant Microparticles: Disrupting the Vascular Homeostasis Equation? *Arterioscler*

Thromb Vasc Biol **26**(12): 2594-604

Motzer RJ, Bander NH, Nanus DM (1996) Renal-Cell Carcinoma. *N Engl J Med* **335**(12): 865-75

Mukhopadhyay D, Datta K (2004) Multiple Regulatory Pathways of Vascular Permeability Factor/Vascular Endothelial Growth Factor (Vpf/Vegf) Expression in Tumors. *Semin Cancer Biol* **14**(2): 123-30

Mukhopadhyay D, Knebelmann B, Cohen HT, Ananth S, Sukhatme VP (1997) The Von Hippel-Lindau Tumor Suppressor Gene Product Interacts with Sp1 to Repress Vascular Endothelial Growth Factor Promoter Activity. *Mol Cell Biol* **17**(9): 5629-39

Neal CS, Michael MZ, Rawlings LH, Van der Hoek MB, Gleadow JM (2010) The Vhl-Dependent Regulation of Micrnas in Renal Cancer. *BMC Med* **8**: 64

Ng EK, Chong WW, Jin H, Lam EK, Shin VY, Yu J, Poon TC, Ng SS, Sung JJ (2009) Differential Expression of Micrnas in Plasma of Patients with Colorectal Cancer: A Potential Marker for Colorectal Cancer Screening. *Gut* **58**(10): 1375-81

Ng EK, Tsui NB, Lam NY, Chiu RW, Yu SC, Wong SC, Lo ES, Rainer TH, Johnson PJ, Lo YM (2002) Presence of Filterable and Nonfilterable Mrna in the Plasma of Cancer Patients and Healthy Individuals. *Clin Chem* **48**(8): 1212-7

Pal S, Datta K, Khosravi-Far R, Mukhopadhyay D (2001) Role of Protein Kinase C ζ in Ras-Mediated Transcriptional Activation of Vascular Permeability Factor/Vascular Endothelial Growth Factor Expression. *J Biol Chem* **276**(4): 2395-403

Pantuck AJ, Seligson DB, Klatte T, Yu H, Leppert JT, Moore L, O'Toole T, Gibbons J, Belldegrun AS, Figlin RA (2007) Prognostic Relevance of the Mtor Pathway in Renal Cell Carcinoma: Implications for Molecular Patient Selection for Targeted Therapy. *Cancer* **109**(11): 2257-67

Park SM, Gaur AB, Lengyel E, Peter ME (2008) The Mir-200 Family Determines the Epithelial Phenotype of Cancer Cells by Targeting the E-Cadherin Repressors Zeb1 and Zeb2. *Genes Dev* **22**(7): 894-907

Patard JJ, Pouessel D, Culine S (2007) New Therapies in Renal Cell Carcinoma. *Curr Opin Support Palliat Care* **1**(3): 174-9

Pigati L, Yaddanapudi SC, Iyengar R, Kim DJ, Hearn SA, Danforth D, Hastings ML, Duelli DM (2010) Selective Release of Micrna Species from Normal and Malignant Mammary Epithelial Cells. *PLoS One* **5**(10): e13515

Pillai RS, Bhattacharyya SN, Filipowicz W (2007) Repression of Protein Synthesis by Mirnas: How Many Mechanisms? *Trends Cell Biol* **17**(3): 118-26

Pisitkun T, Shen RF, Knepper MA (2004) Identification and Proteomic Profiling of Exosomes in Human Urine. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(36): 13368-73

Puissegur MP, Mazure NM, Bertero T, Pradelli L, Grosso S, Robbe-Sermesant K, Maurin T, Lebrigand K, Cardinaud B, Hofman V, Fourre S, Magnone V, Ricci JE, Pouyssegur J, Gounon P, Hofman P, Barbry P, Mari B Mir-210 Is Overexpressed in Late Stages of Lung Cancer and Mediates Mitochondrial Alterations Associated with Modulation of Hif-1 Activity. *Cell Death Differ* **18**(3): 465-78

Quero L, Dubois L, Lieuwes NG, Hennequin C, Lambin P Mir-210 as a Marker of Chronic Hypoxia, but Not a Therapeutic Target in Prostate Cancer. *Radiother Oncol* **101**(1): 203-8

Reddi KK, Holland JF (1976) Elevated Serum Ribonuclease in Patients with Pancreatic Cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* **73**(7): 2308-10

Redova M, Poprach A, Nekvindova J, Iliev R, Radova L, Lakomy R, Svoboda M, Vyzula R, Slaby O (2012) Circulating Mir-378 and Mir-451 in Serum Are Potential Biomarkers for Renal Cell Carcinoma. *J Transl Med* **10**: 55

Richard CL, Blay J (2008) Cxcr4 in Cancer and Its Regulation by Ppargamma. *PPAR Res* **2008**: 769413

Rosi A, Guidoni L, Luciani AM, Mariutti G, Viti V (1988) Rna-Lipid Complexes Released from the Plasma Membrane of Human Colon Carcinoma Cells. *Cancer Lett* **39**(2): 153-60

Ruvkun G (2001) Molecular Biology. Glimpses of a Tiny Rna World. *Science* **294**(5543): 797-9

Saito Y, Liang G, Egger G, Friedman JM, Chuang JC, Coetzee GA, Jones PA (2006) Specific Activation of Microrna-127 with Downregulation of the Proto-Oncogene Bcl6 by Chromatin-Modifying Drugs in Human Cancer Cells. *Cancer Cell* **9**(6): 435-43

Sato K, Tsuchiya N, Sasaki R, Shimoda N, Satoh S, Ogawa O, Kato T (1999) Increased Serum Levels of Vascular Endothelial Growth Factor in Patients with Renal Cell Carcinoma. *Jpn J Cancer Res* **90**(8): 874-9

Schetter AJ, Leung SY, Sohn JJ, Zanetti KA, Bowman ED, Yanaihara N, Yuen ST, Chan TL, Kwong DL, Au GK, Liu CG, Calin GA, Croce CM, Harris CC (2008) Microrna Expression Profiles Associated with Prognosis and Therapeutic Outcome in Colon Adenocarcinoma. *JAMA* **299**(4): 425-36

Sengupta S, den Boon JA, Chen IH, Newton MA, Stanhope SA, Cheng YJ, Chen CJ, Hildesheim

- A, Sugden B, Ahlquist P (2008) MicroRNA 29c Is Down-Regulated in Nasopharyngeal Carcinomas, up-Regulating Mnas Encoding Extracellular Matrix Proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**(15): 5874-8
- Siegel R, Naishadham D, Jemal A Cancer Statistics, 2013. *CA Cancer J Clin* **63**(1): 11-30
- Siegel R, Naishadham D, Jemal A (2013) Cancer Statistics, 2013. *CA Cancer J Clin* **63**(1): 11-30
- Sisco KL (2001) Is Rna in Serum Bound to Nucleoprotein Complexes? *Clin Chem* **47**(9): 1744-5
- Skolarikos A, Alivizatos G, Laguna P, de la Rosette J (2007) A Review on Follow-up Strategies for Renal Cell Carcinoma after Nephrectomy. *Eur Urol* **51**(6): 1490-500; discussion 1501
- Slaby O, Jancovicova J, Lakomy R, Svoboda M, Poprach A, Fabian P, Kren L, Michalek J, Vyzula R Expression of Mirna-106b in Conventional Renal Cell Carcinoma Is a Potential Marker for Prediction of Early Metastasis after Nephrectomy. *J Exp Clin Cancer Res* **29**: 90
- Smith KS, Jakubzick C, Whittam TS, Ferry JG (1999) Carbonic Anhydrase Is an Ancient Enzyme Widespread in Prokaryotes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(26): 15184-9
- Sobin L, Wittekind C (2003) Tnm Classification of Malignant Tumors, 6th Edition. Uicc International Union against Cancer. New York: Wiley-Liss. 193
- Stroun M, Anker P, Beljanski M, Henri J, Lederrey C, Ojha M, Maurice PA (1978) Presence of Rna in the Nucleoprotein Complex Spontaneously Released by Human Lymphocytes and Frog Auricles in Culture. *Cancer Res* **38**(10): 3546-54
- Stroun M, Anker P, Maurice P, Gahan PB (1977) Circulating Nucleic Acids in Higher Organisms. *Int Rev Cytol* **51**: 1-48
- Takamizawa J, Konishi H, Yanagisawa K, Tomida S, Osada H, Endoh H, Harano T, Yatabe Y, Nagino M, Nimura Y, Mitsudomi T, Takahashi T (2004) Reduced Expression of the Let-7 MicroRNAs in Human Lung Cancers in Association with Shortened Postoperative Survival. *Cancer Res* **64**(11): 3753-6
- Tamura M, Gu J, Tran H, Yamada KM (1999) Pten Gene and Integrin Signaling in Cancer. *J Natl Cancer Inst* **91**(21): 1820-8
- Tang G, Tang X, Mendu V, Jia X, Chen QJ, He L (2008) The Art of MicroRNA: Various Strategies Leading to Gene Silencing Via an Ancient Pathway. *Biochim Biophys Acta* **1779**(11): 655-62
- Tannapfel A, Hahn HA, Katalinic A, Fietkau RJ, Kuhn R, Wittekind CW (1996) Prognostic Value of Ploidy and Proliferation Markers in Renal Cell Carcinoma. *Cancer* **77**(1): 164-71

- Thery C, Zitvogel L, Amigorena S (2002) Exosomes: Composition, Biogenesis and Function. *Nat Rev Immunol* **2**(8): 569-79
- Tsui NB, Ng EK, Lo YM (2002) Stability of Endogenous and Added Rna in Blood Specimens, Serum, and Plasma. *Clin Chem* **48**(10): 1647-53
- Tsujiura M, Ichikawa D, Komatsu S, Shiozaki A, Takeshita H, Kosuga T, Konishi H, Morimura R, Deguchi K, Fujiwara H, Okamoto K, Otsuji E (2010) Circulating Micrnas in Plasma of Patients with Gastric Cancers. *Br J Cancer* **102**(7): 1174-9
- Turchinovich A, Weiz L, Langheinz A, Burwinkel B (2011) Characterization of Extracellular Circulating Microrna. *Nucleic Acids Res* **39**(16): 7223-33
- Uchida T, Wada C, Wang C, Egawa S, Ohtani H, Koshiba K (1994) Genomic Instability of Microsatellite Repeats and Mutations of H-, K-, and N-Ras, and P53 Genes in Renal Cell Carcinoma. *Cancer Res* **54**(14): 3682-5
- Urquidi V, Rosser CJ, Goodison S (2012) Molecular Diagnostic Trends in Urological Cancer: Biomarkers for Non-Invasive Diagnosis. *Curr Med Chem* **19**(22): 3653-63
- Valadi H, Ekstrom K, Bossios A, Sjostrand M, Lee JJ, Lotvall JO (2007) Exosome-Mediated Transfer of Mrnas and Micrnas Is a Novel Mechanism of Genetic Exchange between Cells. *Nat Cell Biol* **9**(6): 654-9
- van Niel G, Porto-Carreiro I, Simoes S, Raposo G (2006) Exosomes: A Common Pathway for a Specialized Function. *J Biochem* **140**(1): 13-21
- Vickers KC, Palmisano BT, Shoucri BM, Shamburek RD, Remaley AT (2011) Micrnas Are Transported in Plasma and Delivered to Recipient Cells by High-Density Lipoproteins. *Nat Cell Biol* **13**(4): 423-33
- Wang G, Chan ES, Kwan BC, Li PK, Yip SK, Szeto CC, Ng CF (2012) Expression of Micrnas in the Urine of Patients with Bladder Cancer. *Clin Genitourin Cancer* **10**(2): 106-13
- Wang K, Zhang S, Marzolf B, Troisch P, Brightman A, Hu Z, Hood LE, Galas DJ (2009a) Circulating Micrnas, Potential Biomarkers for Drug-Induced Liver Injury. *Proc Natl Acad Sci USA* **106**(11): 4402-7
- Wang K, Zhang S, Weber J, Baxter D, Galas DJ (2010) Export of Micrnas and Microrna-Protective Protein by Mammalian Cells. *Nucleic Acids Res* **38**(20): 7248-59
- Wang L, Yang B, Yang Q, Qiao S, Wang Y, Sun Y (2009b) Strong Expression of Chemokine Receptor Cxcr4 by Renal Cell Carcinoma Cells Correlates with Metastasis. *Clin Exp Metastasis* **26**(8): 1049-54

- Wang S, Aurora AB, Johnson BA, Qi X, McAnally J, Hill JA, Richardson JA, Bassel-Duby R, Olson EN (2008) The Endothelial-Specific MicroRNA Mir-126 Governs Vascular Integrity and Angiogenesis. *Dev Cell* **15**(2): 261-71
- Weber JA, Baxter DH, Zhang S, Huang DY, Huang KH, Lee MJ, Galas DJ, Wang K (2010) The MicroRNA Spectrum in 12 Body Fluids. *Clin Chem* **56**(11): 1733-41
- Weiler J, Hunziker J, Hall J (2006) Anti-Mirna Oligonucleotides (Amos): Ammunition to Target Mirnas Implicated in Human Disease? *Gene Ther* **13**(6): 496-502
- Weiss GJ, Bemis LT, Nakajima E, Sugita M, Birks DK, Robinson WA, Varella-Garcia M, Bunn PA, Jr., Haney J, Helfrich BA, Kato H, Hirsch FR, Franklin WA (2008) Egfr Regulation by MicroRNA in Lung Cancer: Correlation with Clinical Response and Survival to Gefitinib and Egfr Expression in Cell Lines. *Ann Oncol* **19**(6): 1053-9
- White NM, Yousef GM (2010) MicroRNAs: Exploring a New Dimension in the Pathogenesis of Kidney Cancer. *BMC Med* **8**: 65
- Wieczorek AJ, Rhyner C, Block LH (1985) Isolation and Characterization of an Rna-Proteolipid Complex Associated with the Malignant State in Humans. *Proc Natl Acad Sci U S A* **82**(10): 3455-9
- Wulfken LM, Moritz R, Ohlmann C, Holdenrieder S, Jung V, Becker F, Herrmann E, Walgenbach-Brunagel G, von Ruecker A, Muller SC, Ellinger J (2011) MicroRNAs in Renal Cell Carcinoma: Diagnostic Implications of Serum Mir-1233 Levels. *PLoS One* **6**(9): e25787
- Youssef YM, White NM, Grigull J, Krizova A, Samy C, Mejia-Guerrero S, Evans A, Yousef GM (2011) Accurate Molecular Classification of Kidney Cancer Subtypes Using MicroRNA Signature. *Eur Urol* **59**(5): 721-30
- Zhang Y, Liu D, Chen X, Li J, Li L, Bian Z, Sun F, Lu J, Yin Y, Cai X, Sun Q, Wang K, Ba Y, Wang Q, Wang D, Yang J, Liu P, Xu T, Yan Q, Zhang J, Zen K, Zhang CY (2010) Secreted Monocytic Mir-150 Enhances Targeted Endothelial Cell Migration. *Mol Cell* **39**(1): 133-44
- Zhao A, Li G, Peoc'h M, Genin C, Gigante M (2012) Serum Mir-210 as a Novel Biomarker for Molecular Diagnosis of Clear Cell Renal Cell Carcinoma. *Exp Mol Pathol* **94**(1): 115-20
- Zhou H, Guo JM, Lou YR, Zhang XJ, Zhong FD, Jiang Z, Cheng J, Xiao BX (2010) Detection of Circulating Tumor Cells in Peripheral Blood from Patients with Gastric Cancer Using MicroRNA as a Marker. *J Mol Med (Berl)* **88**(7): 709-17
- Zhu S, Wu H, Wu F, Nie D, Sheng S, Mo YY (2008) MicroRNA-21 Targets Tumor Suppressor Genes in Invasion and Metastasis. *Cell Res* **18**(3): 350-9

Zundel W, Schindler C, Haas-Kogan D, Koong A, Kaper F, Chen E, Gottschalk AR, Ryan HE, Johnson RS, Jefferson AB, Stokoe D, Giaccia AJ (2000) Loss of Pten Facilitates Hif-1-Mediated Gene Expression. *Genes Dev* **14**(4): 391-6

ANNEXES

ANNEXE 1

PUBLICATIONS:

1. **An Zhao**, Guorong Li, Michel Péoc'h, Christian Genin, Marc Gigante. Serum miR-210 as a novel biomarker for molecular diagnosis of clear cell renal cell carcinoma. *ExpMolPathol*. 2013 Feb; 94(1):115-20. doi: 10.1016/j.yexmp.2012.10.005. Epub 2012 Oct 9
2. **An Zhao**, Michel Péoc'h, Christian Genin, Nicolas Mottet, Guorong Li. Cell-free RNA in urine as a possible molecular diagnostic tool for clear cell renal cell carcinoma. (Revision submits to *International Journal of Cancer*)
3. **An Zhao**, Michel Péoc'h, Christian Genin, Nicolas Mottet, Guorong Li. Detection of urinary cell-free microRNAs in clear cell renal cell carcinoma. (Submit to *British Journal of Cancer*)
4. Li G, Badin G, **Zhao A**, Gentil-Perret A, Tostain J, Péoc'h M, Gigante M. Prognostic value of CXCR4 expression in patients with clear cell renal cell carcinoma. *HistolHistopathol*. 2013 Apr 23. [Epub ahead of print]
5. Li G, Cuilleron M, **Zhao A**, Obadia F, Mouracade P, Tostain J, Cottier M, Peoc'h M, Gigante M. Combination of core biopsy and fine-needle aspiration increases diagnostic rate for small solid renal tumors. *Anticancer Res*. 2012 Aug;32(8):3463-6.
6. Gigante M, Li G, Ferlay C, Perol D, Blanc E, Paul S, **Zhao A**, Tostain J, Escudier B, Negrier S, Genin C. Prognostic value of serum CA9 in patients with metastatic clear cell renal cell carcinoma under targeted therapy. *Anticancer Res*. 2012 Dec;32(12):5447-51.
7. Li G, Bilal I, Gentil-Perret A, Feng G, **Zhao A**, Peoc'h M, Genin C, Tostain J, Gigante M. CA9 as a molecular marker for differential diagnosis of cystic renal tumors. *Urol Oncol*. 2012 Jul-Aug;30(4):463-8. doi: 10.1016/j.urolonc.2010.04.014. Epub 2010 Sep 6.
8. Gang F, Guorong L, **An Z**, Anne GP, Christian G, Jacques T. Prediction of clear cell renal cell carcinoma by integrity of cell-free DNA in serum. *Urology*. 2010 Feb;75(2):262-5. doi: 10.1016/j.urology.2009.06.048. Epub 2009 Dec 4.
9. Li G, Feng G, Cuilleron M, **Zhao A**, Gentil-Perret A, Cottier M, Genin C, Tostain J. CA9 level in renal cyst fluid: a possible molecular diagnosis of malignant tumours. *Histopathology*. 2009 Jun;54(7):880-4. doi: 10.1111/j.1365-2559.2009.03302.x. Epub 2009 May 11.