



HAL
open science

Identification de nouveaux miARN régulateurs de la mucine MUC1, détermination de leurs rôles fonctionnels dans la cancérogenèse pancréatique et dans la chimiorésistance

Solange Tréhoux

► **To cite this version:**

Solange Tréhoux. Identification de nouveaux miARN régulateurs de la mucine MUC1, détermination de leurs rôles fonctionnels dans la cancérogenèse pancréatique et dans la chimiorésistance. Médecine humaine et pathologie. Université du Droit et de la Santé - Lille II, 2015. Français. NNT : 2015LIL2S003 . tel-01446278

HAL Id: tel-01446278

<https://theses.hal.science/tel-01446278v1>

Submitted on 25 Jan 2017

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.

UNIVERSITÉ DU DROIT ET DE LA SANTÉ - LILLE II

THÈSE DE DOCTORAT D'UNIVERSITÉ

Pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DU DROIT ET DE LA SANTÉ - LILLE II

Discipline : Sciences de la Vie et de la Santé

Présentée par

Solange TRÉHOUX

**Identification de nouveaux miARN régulateurs de la mucine MUC1,
détermination de leurs rôles fonctionnels dans la cancérogenèse pancréatique
et dans la chimiorésistance.**

Thèse dirigée par le Docteur Isabelle VAN SEUNINGEN

Soutenue le 15 janvier 2015

Devant le jury composé de :

Présidente : Professeur Emmanuelle Leteurtre

Rapporteurs : Docteur Pierre Cordelier

Docteur Eric Mas

Examineurs : Professeur Eric Adriaenssens

Docteur Jean-François Fonteneau

Docteur Isabelle Van Seuningen

Ce travail a été réalisé au Centre de Recherche Jean-Pierre Aubert,
dans l'unité mixte de recherche
INSERM UMR837 - Université de Lille2 - CHRU,
au sein de l'équipe 5,
"Mucines, différenciation et cancérogenèse épithéliales",
dirigée par le Docteur Isabelle Van Seuningen.

Remerciements

Je remercie,

Madame le Professeur Emmanuelle Leteurtre

en acceptant de présider ce jury,

Monsieur le Docteur Pierre Cordelier et

Monsieur le Docteur Eric Mas

en acceptant d'être les rapporteurs de cette thèse,

Monsieur le Professeur Eric Adriaenssens,

Monsieur le Docteur Jean-François Fonteneau et

Madame le Docteur Isabelle Van Seuningen

en acceptant de siéger dans ce jury.

Je remercie également,

Monsieur le Professeur Pierre Formstecher pour m'avoir accueillie dans son unité de Recherche, ainsi que son successeur Monsieur le Docteur Luc Buée.

Madame le Docteur Isabelle Van Seuning, pour m'avoir accueillie dans son équipe de Recherche et pour avoir dirigé cette thèse.

Nicolas Jonckheere, pour ses conseils durant ces quatre années.

Bérangère Barbot, pour son aide précieuse et son investissement personnel.

Florence Renaud, pour son investissement, ses conseils et critiques pertinentes.

Les actuels et anciens membres de l'équipe, Fatima Lahdaoui, Matthieu Corvaisier, Nicolas Skrypek, Bérinda Duchêne, Lucie Coppin, Anne Gandon, Mehdi El Amrani, Mathieu Messenger, Kanza Benomar, Lucie Cordiez, Céline Schulz et le Professeur Pascal Pigny, pour leurs conseils.

Ma famille et particulièrement Benoit pour son soutien et sa patience.

Je remercie aussi,

L'université de Lille2 pour son financement.

Les services de l'IMPRT-IFR114, et notamment, Anne-Sophie Drucbert, pour les mesures de luciférase et Delphine Tailleur, pour l'expérimentation animale.

Le Département d'Histologie de la Faculté de médecine de l'Université de Lille2, et notamment, M.H. Gevaert et R. Siminsky pour leurs aides techniques.

Liste des communications

Les travaux présentés dans ce manuscrit ont fait l'objet des communications suivantes :

Articles

Biochemical and Biophysical Research Communications, 2014.

The MUC1 oncomucin regulates pancreatic cancer cell biological properties and chemoresistance. Implication of p42-44 MAPK, Akt, Bcl-2 and MMP13 pathways.

Solange Tréhoux, Bérinda Duchêne, Nicolas Jonckheere et Isabelle Van Seuningen.

Soumis à publication :

Micro-RNAs miR-29a and miR-330-5p function as tumor suppressors by targeting the MUC1 mucin in pancreatic cancer cells.

Solange Tréhoux, Yannick Delpu, Florence Renaud, Emmanuelle Leteurtre, Jérôme Torrisani, Nicolas Jonckheere et Isabelle Van Seuningen.

Orales

XXXèmes Club d'études des cellules épithéliales digestives (CECED), Grenoble mars 2012.

Régulation de la mucine MUC1 par les miARN lors de la cancérogenèse pancréatique. Identification de nouvelles cibles thérapeutiques.

Solange Tréhoux, Nicolas Jonckheere et Isabelle Van Seuningen.

EuroCancer, Paris Juin 2012.

MiRNA negatively regulate MUC1 and MUC4 oncomucin expression and impact biological properties of pancreatic cancer cells.

Nicolas Jonckheere, Solange Tréhoux, Fatima Lahdaoui et Isabelle Van Seuningen

Mucins in health and disease: 12th international workshop on carcinoma-associated mucins, Cambridge England, juillet 2013.

MiR-29a and miR-330-5p are negative regulators of MUC1 oncogenic mucin in pancreatic cancer.

Solange Tréhoux, Yannick Delpu, Jérôme Torrisani, Nicolas Jonckheere et Isabelle Van Seuningen.

Club Français du Pancréas (CFP), Amien septembre 2013.

La mucine MUC1 est régulée de manière négative dans le cancer du pancréas par les miARN au niveau de son 5'-UTR et de son 3'-UTR

Solange Tréhoux, Yannick Delpu, Florence Renaud, Jérôme Torrisani, Nicolas Jonckheere et Isabelle Van Seuningen.

2ème journées des doctorants « Cancer » de Lille, Lille juin 2014.

Régulation de la mucine MUC1 par les miARN dans le cancer du pancréas. Identification de nouvelles cibles thérapeutiques.

Solange Tréhoux, Yannick Delpu, Florence Renaud, Emmanuelle Leteurtre, Jérôme Torrisani, Nicolas Jonckheere et Isabelle Van Seuningen.

Affichées

4th PhD Student Day of Jean-Pierre Aubert Research Center, Lille avril 2012.

MiR-29a and miR-330-5p are negative regulators of MUC1 expression in pancreatic cancer.

Solange Tréhoux, Nicolas Jonckheere et Isabelle Van Seuningen.

5èmes journées scientifiques du Cancéropôle Nord-Ouest, Deauville mai 2012.

Régulation de la mucine MUC1 par les miARN lors de la cancérogenèse pancréatique. Identification de nouvelles cibles thérapeutiques.

Solange Tréhoux, Nicolas Jonckheere et Isabelle Van Seuningen.

1ère journée des doctorants « Cancer » de Lille, Lille juin 2012.

MiR-29a et miR-330-5p sont des régulateurs négatifs de l'expression de la mucine MUC1 lors de la cancérogenèse pancréatique.

Solange Tréhoux, Nicolas Jonckheere et Isabelle Van Seuningen.

6èmes journées scientifiques du Cancéropôle Nord-Ouest, Deauville mai 2013.

MiR-29a et miR-330-5p sont des régulateurs négatifs de l'expression de la mucine oncogénique MUC1 lors de la cancérogénèse pancréatique.

Solange Tréhoux, Yannick Delpu, Jérôme Torrisani, Nicolas Jonckheere et Isabelle Van Seuningen.

13èmes Journées André Verbert, Lille septembre 2013.

MUC1 oncogenic mucin is down regulated through the 5'-UTR and the 3'-UTR by miRNAs in pancreatic cancer.

Solange Tréhoux, Yannick Delpu, Florence Renaud, Jérôme Torrisani, Nicolas Jonckheere et Isabelle Van Seuningen.

13èmes Journées jeunes chercheurs de la Fondation Arc, Paris octobre 2013.

La mucine MUC1 est régulée de manière négative dans le cancer du pancréas par les miARN au niveau de son 5'-UTR et de son 3'-UTR.

Solange Tréhoux, Yannick Delpu, Florence Renaud, Jérôme Torrisani, Nicolas Jonckheere et Isabelle Van Seuningen.

7èmes journées scientifiques du Cancéropôle Nord-Ouest, Deauville mai 2014.

Régulation de la mucine MUC1 par les miARN : identification de miR-29a et miR-330-5p comme deux suppresseurs de tumeurs.

Solange Tréhoux, Yannick Delpu, Florence Renaud, Emmanuelle Leteurtre, Jérôme Torrisani, Nicolas Jonckheere et Isabelle Van Seuningen.

Résumé

La mucine MUC1 est une oncoprotéine transmembranaire dont la surexpression dans 90% des adénocarcinomes pancréatiques a été associée à un mauvais pronostic. MUC1 est impliquée dans la transduction des signaux intracellulaires et dans les interactions cellulaires permettant de conférer aux cellules tumorales des propriétés accrues en termes de prolifération et d'invasion cellulaire. De plus il a été montré un rôle important de MUC1 dans la chimiorésistance à la gemcitabine, et dans la transition épithélio-mésenchymateuse des cellules cancéreuses pancréatiques. De manière intéressante il a pu être montré que MUC1 pouvait être internalisée et localisée dans le compartiment nucléaire afin d'agir comme un co-activateur transcriptionnel permettant de moduler l'expression de nombreux gènes comme ceux de la voie Wnt/ -caténine, les cibles de Stat1/3 ou le cluster miR-200c/miR141. De plus, il a été démontré que MUC1 pouvait être régulé de façon épigénétique, par méthylation de son promoteur, par acétylation des histones et par les miARN.

Notre objectif a été d'étudier l'inhibition de MUC1 par des miARN dérégulés dans le cancer pancréatique, afin de proposer une nouvelle stratégie thérapeutique innovante dans le but de ralentir la progression de ce cancer.

Nous avons sélectionné des miARN pouvant cibler la mucine MUC1 aussi bien au niveau de son 3'UTR, de son 5'UTR ou de sa région codante par l'utilisation des bases de données miRanda, miRWalk et TargetScan. Afin d'affiner cette sélection, nous avons ensuite retenu seulement ceux étant dérégulés dans le cancer pancréatique en étudiant leur expression dans des lignées cellulaires cancéreuses pancréatiques humaines ainsi que dans un modèle murin transgénique de cancérogenèse pancréatique et dans les tissus de patients atteints d'adénocarcinome pancréatique.

Nous avons dans un premier temps mis en évidence que parmi les miARN sélectionnés, la surexpression de miR-29a, miR-183, miR-200a, miR-330-5p, miR-876-3p et miR-939 entraînait une diminution de l'expression protéique de MUC1. En établissant le profil d'expression des miARN dans les trois modèles de cancer pancréatique dont nous disposons, nous avons pu mettre en évidence une dérégulation globale de miR-29a et miR-330-5p dans

les lignées cellulaires cancéreuses pancréatiques humaines ainsi que chez les patients atteints d'adénocarcinome pancréatique, et une dérégulation plus spécifique pour les autres miARN.

Nous avons alors pu mettre en évidence que parmi l'ensemble des miARN sélectionnés, seuls les miARN miR-29a et miR-330-5p avaient la capacité d'interagir avec l'ARNm de *MUC1* au niveau de son 3'UTR. Nous avons donc entrepris dans un second temps d'étudier le rôle de miR-29a et miR-330-5p dans le cancer du pancréas. Pour cela, nous avons utilisé une stratégie transitoire de surexpression et d'inhibition des miARN et une stratégie stable en réalisant des lignées surexprimant les miARN ainsi qu'une lignée déficiente en MUC1. Nous avons pu mettre en évidence que la surexpression de miR-29a et miR-330-5p, permettait de ralentir la prolifération cellulaire, la migration, l'invasion cellulaire, la croissance tumorale et augmentait la chimiosensibilité des cellules cancéreuses pancréatiques à la gemcitabine.

En conclusion, l'ensemble de ces données a permis de mettre en évidence un ensemble de miARN dérégulés dans le cancer du pancréas ayant la capacité de réguler négativement l'expression protéique de la mucine MUC1. Nous avons également montré que miR-29a et miR-330-5p étaient les seuls à réguler directement l'expression de MUC1 et qu'ils agissaient comme des suppresseurs de tumeurs en altérant les propriétés biologiques des cellules cancéreuses pancréatiques, *in vitro* et *in vivo*. Ces données nous permettent de proposer ces deux miARN comme une nouvelle piste thérapeutique potentielle pour le traitement de ce cancer.

Mots clés : cancer du pancréas, MUC1, miARN, miR-29a, miR-330-5p, chimiorésistance.

Abstract

The mucin MUC1 is a transmembrane oncoprotein overexpressed in 90% of pancreatic adenocarcinoma and associated with a poor prognosis. MUC1 is involved in cell signaling and cell interaction to enhanced tumor cell properties like cell proliferation and invasion. Furthermore it has been shown an important role of MUC1 in chemoresistance to gemcitabine, the basic treatment of pancreatic cancer, and in the epithelial-mesenchymal transition of pancreatic cancer cells. Interestingly it has been shown that MUC1 could be internalized and localized in the nuclear compartment to act as a transcriptional coactivator to modulate the expression of many genes such as the Wnt/ β -catenin, the targets of Stat1/3 or the miR-200c/miR141 cluster. Furthermore, it has been shown that MUC1 is regulated by epigenetics: by methylation of the promoter, histone acetylation and by miRNAs in breast and ovarian cancer.

Our aim was to study the inhibition of MUC1 by miRNAs deregulated in pancreatic cancer, to propose a new innovative therapeutic strategy to slow down progression of this cancer.

We selected miRNAs targeting the mucin MUC1, in its 3'UTR, its 5'UTR or its coding region by using databases such as Miranda, miRWalk and TargetScan. To refine this selection, we then selected only those being deregulated in pancreatic cancer by studying their expression in human pancreatic cancer cell lines, tissues from patients with pancreatic adenocarcinoma and transgenic mouse model of early pancreatic carcinogenesis.

We initially demonstrated that among the selected miRNAs, overexpression of miR-29a, miR-183, miR-200a, miR-330-5p, miR- and miR-939 876-3p led to a decrease of MUC1 protein expression. By establishing the miRNA expression profile in the three models of pancreatic cancer that we had, we were able to demonstrate an overall deregulation of miR-29a and miR-330-5p in human pancreatic cancer cell lines and in patients with a pancreatic adenocarcinoma, and a more specifically deregulation for the other miRNAs.

We were then able to show that among the selected miRNAs, only miRNAs miR-29a and miR-330-5p had the ability to interact with *MUC1* mRNA on its 3'UTR. We therefore undertook to study the role of miR-29a and miR-330-5p in pancreatic cancer. For this, we used a transient strategy to overexpress or inhibit miRNAs and stable cell lines overexpressing the miRNA as well as a deficient cell line for MUC1. We were able to show that overexpression of miR-29a and miR-330-5p slowed down cell proliferation, migration, cell invasion, tumor growth and increased chemosensitivity of pancreatic cancer cells to gemcitabine.

In conclusion, all these data allowed us to identify a set of deregulated miRNAs in pancreatic cancer which have the ability to decrease the mucin MUC1 protein expression level. We also showed that miR-29a and miR-330-5p were the only ones that can regulate the expression of MUC1 directly and act as tumor suppressors by altering the biological properties of pancreatic cancer cells in vitro and in vivo. These data allow us to propose these two miRNAs as a new potential therapeutic approach for the treatment of this cancer.

Keywords: pancreatic cancer, MUC1, miRNA, miR-29a, miR-330-5p, chemoresistance.

Sommaire

INTRODUCTION	1
A- L'ADENOCARCINOME PANCREATIQUE CANALAIRE	3
I- LE PANCREAS	3
1- MORPHOLOGIE ET LOCALISATION	3
2- LE PANCREAS EXOCRINE	3
3- LE PANCREAS ENDOCRINE	5
II- LES LESIONS CANCEREUSES DU PANCREAS EXOCRINE	5
1- LES LESIONS NEOPLASIQUES PANIN	5
2- AUTRES LESIONS	10
III- L'ADENOCARCINOME PANCREATIQUE CANALAIRE	10
1- CARACTERISTIQUES ET EPIDEMIOLOGIE	10
2- LES FORMES HEREDITAIRES	11
3- LES FACTEURS DE RISQUE	11
4- SYMPTOMES ET DIAGNOSTIC	12
IV- TRAITEMENTS DE L'ADENOCARCINOME PANCREATIQUE CANALAIRE	14
1- LA PRISE EN CHARGE CHIRURGICALE	14
2- LA PRISE EN CHARGE MEDICALE	15
V- CHIMIORESISTANCE DE L'ADENOCARCINOME PANCREATIQUE CANALAIRE	19
1- LIE AU METABOLISME DE LA GEMCITABINE	19
2- LE STROMA	20
3- LA TRANSITION EPITHELIO-MESENCHYMATEUSE	20
B- LES MUCINES	22
I- LA FAMILLE DES MUCINES	22
1- LES MUCINES SECRETEES	22
2- LES MUCINES MEMBRANAIRES	22
3- ROLE GENERAL	24
II- LA STRUCTURE GENERALE DES MUCINES	24
1- COMPOSITION GENERALE	24
2- MUCINES SECRETEES	26
3- MUCINES MEMBRANAIRES	26
4- GLYCOSYLATION ET CANCER	27
5- TERRITOIRES D'EXPRESSION DES MUCINES	29
III- LA MUCINE MUC1	31
1- LE GENE ET LES VARIANTS DE MUC1	31
2- LA STRUCTURE ET LOCALISATION DE MUC1	31
3- FONCTIONS MULTIPLES DE MUC1	34
IV- LA REGULATION GENIQUE ET EPIGENETIQUE DE MUC1	41
1- LA REGULATION DU PROMOTEUR DE <i>MUC1</i>	41
2- LA REGULATION EPIGENETIQUE	43

V- ROLES DES MUCINES DANS LA CHIMIORESISTANCE	47
1- ROLE GENERAL	47
2- LES MUCINES MEMBRANAIRES	47
3- LES MUCINES SECRETEES	48
VI- MUC1 ET THERAPIES ANTI-CANCEREUSES	48
1- ANTICORPS MONOCLONAUX	49
2- VACCIN ANTI-MUC1	49
3- PEPTIDES	51
C- LES MICRO-ARN	52
<hr/>	
I- LES MICRO-ARN	52
1- LA DECOUVERTE DES MIARN	52
2- FONCTION	52
3- LOCALISATION GENIQUE	54
4- BIOSYNTHESE DES MIARN	54
5- MODES DE FIXATION	56
II- EXPRESSION DES MIARN DANS LE PDAC	62
1- DEREGULATION DE L'EXPRESSION DES MIARN	62
2- LES MIARN COMME OUTIL THERAPEUTIQUE	65
3- PROFIL D'EXPRESSION DES MIARN DANS LE PDAC	67
III- IMPLICATION DES MIARN DANS LA CHIMIORESISTANCE DU PDAC	69
1- A LA GEMCITABINE	69
2- DANS LA TEM	70
OBJECTIFS	72
<hr/>	
RESULTATS	73
<hr/>	
PARTIE I : SELECTION DES MIARN ET ETUDE DE LEUR EXPRESSION DANS LE PDAC	74
PARTIE II : ETUDE DE LA REGULATION DE MUC1 PAR LES MIARN ET DETERMINATION DE LEURS FONCTIONS DANS LE PDAC	85
PARTIE III: ROLE DE MUC1 DANS LES PROPRIETES BIOLOGIQUES DES CELLULES DE PDAC	121
PARTIE IV : IDENTIFICATION DES <i>OFF-TARGETS</i> DE MIR-29A ET MIR-330-5P	141
PARTIE V : ROLE DE MIR-29A ET MIR-330-5P DANS LA CHIMIOSENSIBILITE A LA GEMCITABINE	146
CONCLUSION	160
<hr/>	
DISCUSSION	161
<hr/>	

I- SELECTION DES MIARN	162
II- EXPRESSION DES MIARN DANS LE PDAC	165
II- ETUDE DE LA REGULATION DE MUC1 ET DES FONCTIONS DES MIARN DANS LE PDAC	171
III- ROLE DES MIARN DANS LA CHIMIORESISTANCE	177
PERSPECTIVES	182
<hr/>	
I- IDENTIFICATION DES CIBLES DES MIARN	184
II- REGULATION DE MUC1 <i>IN VITRO</i> ET <i>IN VIVO</i>	186
III- ETUDE DE LA CHIMIORESISTANCE DANS LE PDAC	187
MATERIEL ET METHODES	189
<hr/>	
I- LIGNEES CELLULAIRES	191
II- TRANSFECTIONS TRANSITOIRES	193
1- TRANSFECTION INVERSE TRANSITOIRE siPORT™ NEOFX™ (AMBION®)	193
2- TRANSFECTION TRANSITOIRE LIPOFECTAMINE (INVITROGEN)	193
III- ETABLISSEMENT DES LIGNEES STABLES	195
1- INHIBANT MUC1	195
2- SUREXPRIMANT LE MIARN D'INTERET	195
IV- RETRO-TRANSCRIPTION ET AMPLIFICATION PAR POLYMERASE CHAIN REACTION SEMI-QUANTITATIVE	195
1- EXTRACTION DES ARN TOTAUX	195
2- RETRO-TRANSCRIPTION EN ADNC	196
3- RT MIARN	196
4- PCR	198
5- MIGRATION ELECTROPHORETIQUE	198
6- qPCR	200
V- EXTRACTION DE PROTEINES TOTALES ET WESTERN-BLOT	202
1- EXTRACTION DES PROTEINES	202
2- PREPARATION DES GELS	204
3- WESTERN-BLOT	204
4- <i>PROTEOME PROLIFER ARRAY™</i>	206
VI- CLONAGE DU 3'UTR DE MUC1 ET DU 5'-UTR	207
1- OBTENTION DE LA SEQUENCE DU 3'UTR ET DU 5'UTR DE MUC1	207
2- CLONAGE DANS LE VECTEUR PGL3-PROMOTEUR (<i>PROMEGA</i>)	207
VII- VALIDATION DES CIBLES DES MIARN	210
1- TEST D'ACTIVITE LUCIFERASE FIREFLY LUCIFERASE (<i>PROMEGA</i>)	210
2- TEST D'ACTIVITE LUCIFERASE RENILLA (<i>ACTIVE MOTIF</i>)	210
3- <i>BIOTIN PULL-DOWN ASSAY</i>	210
VIII- ACTIVITES BIOLOGIQUES DES MIARN	211
1- TEST DE SURVIE CELLULAIRE ET CHIMIORESISTANCE	211
2- TEST DE PROLIFERATION CELLULAIRE	211
3- TEST DE MIGRATION CELLULAIRE	212
4- TEST DE MIGRATION ET D'INVASION EN CHAMBRE DE BOYDEN	212
IX- TISSUS	212
1- MODELES MURINS	212
2- MODELES HUMAINS	213

X- IMMUNOHISTOCHEMIE	213
1- MANUEL : TISSUS MURINS	213
2- AUTOMATIQUE : XENOGREFFES ET TISSUS HUMAINS	215
XI- XENOGREFFES, INJECTIONS INTRATUMORALES ET INTRAPERITONEALES	215
1- LIGNEES STABLES	215
2- LIGNEES PARENTALES SUIVI D'UNE INJECTION INTRATUMORALE	216
3- INJECTION EN INTRAPERITONEAL DE MIARN	216
XII- TESTS STATISTIQUES	217
BIBLIOGRAPHIE	218

Liste des figures

Introduction

FIGURE 1 : APPAREIL DIGESTIF HUMAIN. LOCALISATION PROFONDE DU PANCREAS.	2
FIGURE 2 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DU PANCREAS (BARDEESY & DEPINHO, 2002).	4
FIGURE 3 : EVOLUTION DES LESIONS PRE-NEOPLASIQUES INTRA-EPITHELIALES (MORRIS, WANG, & HEBROK, 2010).	6
FIGURE 4 : MUTATIONS CLASSIQUEMENT RETROUVEES DANS LE PDAC (MORRIS <i>ET AL.</i> , 2010; VINCENT <i>ET AL.</i> , 2011).	8
FIGURE 5 : DUODENOPANCREATECTOMIE CEPHALIQUE (DPC) (BUC & SAUVANET, 2011).	13
FIGURE 6 : SPLENOPANCREATECTOMIE GAUCHE (DOKMAK & SAUVANET, 2011).	13
FIGURE 7 : METABOLISME DE LA GEMCITABINE.	18
FIGURE 8 : LA FAMILLE DES MUCINES MEMBRANAIRES (JONCKHEERE & VAN SEUNINGEN, 2008).	21
FIGURE 9 : INTERACTION DES MUCINES AVEC LE MICROENVIRONNEMENT (HOLLINGSWORTH & SWANSON, 2004)	23
FIGURE 10 : COMPOSITION DES MUCINES MEMBRANAIRES (HATTRUP & GENDLER, 2008).	25
FIGURE 11 : LOCALISATION CELLULAIRE APICALE DE MUC1. DELOCALISATION CIRCONFERENCEMENTELLE LORS DE LA TUMORIGENESE.	28
FIGURE 12 : PROFIL D'EXPRESSION DES MUCINES DANS LE PDAC (JONCKHEERE <i>ET AL.</i> , 2010; MORRIS <i>ET AL.</i> , 2010).	28
FIGURE 13 : GENE ET TRANSCRIT DE MUC1 (NATH & MUKHERJEE, 2014)	30
FIGURE 14 : STRUCTURE DE MUC1 (NATH & MUKHERJEE, 2014).	30
FIGURE 15 : SEQUENCE DE MUC1-C (NATH & MUKHERJEE, 2014).	32
FIGURE 16 : INTERACTION MUC1 ET RTK.	35
FIGURE 17 : INTERACTION DE MUC1 ET DE LA VOIE WNT/B-CATENINE.	37
FIGURE 18 : INTERACTION DE MUC1 ET DE STAT1-3.	37
FIGURE 19 : MUC1 ET TEM (WANG <i>ET AL.</i> , 2011).	40
FIGURE 20 : REGULATION DE LA REGION PROMOTRICE DE <i>MUC1</i> (JONCKHEERE & VAN SEUNINGEN, 2010).	42
FIGURE 21 : REGULATION DE <i>MUC1</i> PAR METHYLATION (YAMADA <i>ET AL.</i> , 2008).	44
FIGURE 22 : MECANISME DE CHIMIORESISTANCE A LA GEMCITABINE LIE A MUC1.	46
FIGURE 23 : SCHEMA DE BIOSYNTHESE DES MIARN (DI LEVA <i>ET AL.</i> , 2014)	53
FIGURE 24 : STRUCTURE D'UN MIARN (HA & KIM, 2014).	55
FIGURE 25 : APPARIEMENT MIARN-ARNM (FRIEDMAN <i>ET AL.</i> , 2009; BARTEL, 2009).	57
FIGURE 26 : CONSEQUENCE DE L'APPARIEMENT MIARN-ARNM : DIMINUTION DE L'EXPRESSION DE LA CIBLE (DA SACCO & MASOTTI, 2012).	59
FIGURE 27 : DEREGULATION DE LA BIOSYNTHESE DES MIARN (MULRANE <i>ET AL.</i> , 2013).	61
FIGURE 28 : MODIFICATIONS CHIMIQUES CLASSIQUES DES MIARN A VISEE THERAPEUTIQUE (GARZON <i>ET AL.</i> , 2010).	63

Résultats

FIGURE 29 : ETUDE DU PROFIL D'EXPRESSION DE LA MUCINE MUC1 DANS LES LIGNEES CANCEREUSES PANCREATIQUES HUMAINES PAR WESTERN-BLOT.	76
FIGURE 30 : ETUDE DE L'EXPRESSION DE LA MUCINE MUC1 PAR WESTERN-BLOT APRES SUREXPRESSION DES MIARN POSSEDANT UN SITE DE FIXATION SUR SON ARNM DANS LA LIGNEE CAPAN-2.	76
FIGURE 31 : ETUDE DE L'EXPRESSION DES MIARN DANS LES LIGNEES CELLULAIRES CANCEREUSES PANCREATIQUES HUMAINES MIAPACA-2, PANC-1, CAPAN-1, CAPAN-2 ET BXPC-3 EN COMPARAISON AVEC LA LIGNEE CANALAIRE PANCREATIQUE HUMAINE IMMORTALISEE HPDE.	78
FIGURE 32 : ETUDE DE L'EXPRESSION DES MIARN DANS LE MODELE MURIN DE CANCER PANCREATIQUE PDX1-CRE; LSTOPL-KRAS ^{G12D} EN COMPARAISON AVEC LE MODELE MURIN KRAS ^{WT} CONTROLE.	80

FIGURE 33 : ETUDE DE L'EXPRESSION DES MIARN CHEZ DES PATIENTS ATTEINTS D'ADENOCARCINOME PANCREATIQUE INFILTRANT. COHORTE DE 18 PATIENTS POUR MIR-29A ET MIR-330-5P. COHORTE DE 8 PATIENTS POUR LES AUTRES MIARN.	82
FIGURE 34 : ETUDE DE L'EXPRESSION DE MUC1 DANS LES LIGNEES BXPC-3 ET PANC-1 PAR WESTERN-BLOT.	115
FIGURE 35 : ETUDE DE L'INHIBITION DE MIR-29A ET MIR-330-5P SUR LES PROPRIETES DES CELLULES CANCEREUSES PANCREATIQUES HUMAINES PAR TRANSFECTION TRANSITOIRE.	115
FIGURE 36 : VOIES DE SIGNALISATION IMPLIQUEES SUITE A LA SUREXPRESSION OU L'INHIBITION DE MIR-29A ET MIR-330-5P DANS LA LIGNEE CAPAN-2.	117
FIGURE 37 : ETUDE DU ROLE DE MIR-29A ET MIR-330-5P <i>IN VIVO</i> DANS LA LIGNEE CAPAN-1.	117
FIGURE 38 : ETUDE DES PROPRIETES BIOLOGIQUES DE LA LIGNEE STABLE CAPAN-2 SUREXPRIMANT LE MIR-330-5P EN COMPARAISON A SON CONTROLE MIR-NEG.	119
FIGURE 39 : PROPRIETES DE MIR-29A ET MIR-330-5P DANS LES LIGNEES CAPAN-2 MUC1-KD.	142
FIGURE 40 : PROFIL D'EXPRESSION DES ACTEURS DU METABOLISME DE LA GEMCITABINE.	147
FIGURE 41 : PROFIL D'EXPRESSION DES ACTEURS DE LA TEM.	149
FIGURE 42 : IMPLICATION DES MIARN DANS LA CHIMIOSENSIBILITE.	153
FIGURE 43 : PROPRIETES BIOLOGIQUES DE LA LIGNEE CAPAN-2 SUREXPRIMANT/INHIBANT MIR-876-3P ET MIR-203.	155
FIGURE 44 : PROPRIETES BIOLOGIQUES DE LA LIGNEE CAPAN-2 SUREXPRIMANT TRANSITOIREMENT MIR-939, MIR-183 ET MIR-200A.	157

Conclusion

FIGURE 45 : SCHEMA SUR LES MECANISMES IDENTIFIES OU HYPOTHETIQUES MEDIANTE LES EFFETS DE MIR-29A ET MIR-330-5P SUR LES PROPRIETES DES CELLULES CANCEREUSES PANCREATIQUES.	159
---	-----

Discussion

FIGURE 46 : SITES DE FIXATION DES MIARN SUR LE 3'UTR DE MUC1 D'APRES MICRORNA.ORG.	163
--	-----

Perspectives

FIGURE 47 : ETUDE DES VOIES DE SIGNALISATION APRES TRANSFECTION TRANSITOIRE PAR MIARN-MUC1 DES LIGNEES STABLES SUREXPRIMANT MIR-29A OU MIR-330-5P.	185
FIGURE 48 : ETUDE DE L'EXPRESSION DE MIR-29A PAR QRT-PCR DANS LE PANCREAS ET LE DUODENUM APRES INJECTION INTRA-PERITONEALE DE MIR-29A DANS LES SOURIS PDX1-CRE; KRAS ^{G12D} .	185

Matériel et méthodes

FIGURE 49 : CLONAGE DU 3'UTR ET DU 5'UTR DE MUC1.	208
---	-----

Liste des tableaux

Résultats

TABLEAU 1 : PREDICTION DES MIARN CIBLANT MUC1.	75
TABLEAU 2 : PREDICTION DE LA PRESENCE DE SEQUENCES CIBLES POUR LES MIARN D'INTERET SUR LE 3'UTR DES GENES CIBLES.	144
TABLEAU 3 : BILAN DE L'EXPRESSION DES ACTEURS DU METABOLISME DE LA GEMCITABINE.	151
TABLEAU 4 : BILAN DE L'EXPRESSION DES MARQUEURS DE LA TEM.	151

Perspectives

TABLEAU 5 : PREDICTION DE LA PRESENCE DE SEQUENCES CIBLES POUR LES MIARN IDENTIFIES DANS CETTE ETUDE SUR LE 3'UTR DES GENES D'INTERETS IMPLIQUES DANS LE METABOLISME DE LA GEMCITABINE.	183
TABLEAU 6 : PREDICTION DE LA PRESENCE DE SEQUENCES CIBLES POUR LES MIARN IDENTIFIES DANS CETTE ETUDE SUR LE 3'UTR DES GENES D'INTERETS IMPLIQUES DANS LA TEM.	183

Matériel et méthodes

TABLEAU 7 : CARACTERISTIQUES DES LIGNEES CELLULAIRES CANCEREUSES PANCREATIQUES HUMAINES.	190
TABLEAU 8 : MUTATIONS DECRITES ET EXPRESSION DE LA MUCINE MUC1 DANS LES LIGNEES CELLULAIRES CANCEREUSES PANCREATIQUES HUMAINES.	190
TABLEAU 9 : MILIEUX DE CULTURES UTILISES POUR LA CULTURE DES LIGNEES CELLULAIRES HUMAINES.	192
TABLEAU 10 : SEQUENCES DES AMORCES UTILISEES POUR L'ETABLISSEMENT DES MODELES CELLULAIRES STABLES.	194
TABLEAU 11 : LISTE DES AMORCES DE PCR ET DE MUTAGENESE DIRIGEE.	197
TABLEAU 12 : PROGRAMME DE PCR	198
TABLEAU 13 : PROGRAMME DE QPCR.	200
TABLEAU 14 : LISTE DES AMORCES DE QPCR.	201
TABLEAU 15 : LISTE DES AMORCES DES MIARN ET DE L'ARN U6/U6.	201
TABLEAU 16 : COMPOSITION DES GELS DE POLYACRYLAMIDE.	203
TABLEAU 17 : LISTE DES ANTICORPS UTILISES POUR LES WESTERN-BLOTS.	205

Liste des abréviations

5-aza : 5-aza-2-déoxycytidine
5-FU : 5-Fluorouracile
aa : acide aminé
ADN : Acide désoxyribonucléique
ADNc : Acide DésoxyriboNucléique complémentaire
AGO : Argonaute
Akt : *v-akt murine thymoma viral oncogene*
ARN : Acide ribonucléique
ARNm : Acide Ribonucléique messenger
ABCC : *ATP-binding Cassette C*
AP-1 : *Activator Protein-1*
Bax : *Bcl-2 associated X protein*
BCA : Acide bicinchoninique
Bcl-2 : *B-cell lymphoma 2*
Bcl_{xL} : *B-cell lymphoma extra-large*
BET : Bromure d'éthidium
Bmi-1 : *B-cell-specific Moloney murine leukemia virus insertion site 1*
BSA : Sérum albumine bovine
CDA : Cytidine Désaminase
CDK : *cyclin-dependent kinase*
ChIP : immunoprécipitation de la chromatine
CK : *Cystine-Knot*
CO₂ : Dioxyde de carbone
Ct : Carboxy-terminal
c-Myc : *v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog*
dCK : désoxycytidine Kinase
DFdC : 2'-désoxy-2',2'-difluorocytidine
DMSO : Diméthylsulfoxyde
DNMT : *DNA méthyltransférase*
dNTP : Désoxynucléotide triphosphate
DPC : duodéno-pancréatectomie céphalique

D-PBS : *Dubelcco-Phosphate-buffered saline*
DTT : Dithiothréitol
EDTA : acide éthylène diamine tétraacétique
EGF/EGFR : *Epidermal Growth Factor / EGF receptor*
ER : récepteur à l'oestrogène
ErbB : *Erythroblastic leukemia viral oncogene homolog*
Erk : *Extracellular signal-regulated kinase*
FAMMM : *Familial Atypical Multiple Mole Melanoma*
Fuc : Fucose
Gal : Galactose
GalNAc : *N-acétylgalactosamine*
GAPDH : Glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase
GlcNAc : *N-acétylglucosamine*
Gsk3- : *Glycogen synthase kinase 3*
GRB2 : *Growth factor receptor-bound protein 2*
GTP : Guanosine triphosphate
GTPase : GTP hydrolase
HAT : Histone acétyltransférase
hCNT1 : *human Concentrative Nucleoside Transporter 1*
HCV : Virus de l'hépatite C
HDAC : Histones déacétylases
hENT1 : *human Equilibrative Nucleoside Transporter 1*
HER : *Human EGFR*
HIF : *Hypoxia Inducible Factor*
hTERT : *Human Telomerase Reverse Transcriptase*
IC₅₀ : *Inhibitory Concentration 50*
IHC : Immunohistochimie
IPMN : *Intraductal Papillary Mucinous Neoplasm*
IRES : *Internal Ribosome Entry Site*
IRM : Imagerie par Résonance Magnétique
KD : *Knock-down*
KLF4 : *Kruppel-Like Factor 4*
KRAS : *V-Ki-ras2 Kirsten Rat Sarcoma viral oncogene homolog*
LB : Luria Bertani
Lin14 : *Abnormal cell LINEage*

LNA : *Locked Nucleic Acid*
m7G : 7-méthylguanosine
Man : Mannose
MAPK : *Mitogen-Activated Protein Kinase*
MCN : *Mucinous Cystic Neoplasm*
MDR : *Multidrug Resistance*
MEC : Matrice extracellulaire
MET : Transition mésenchymo-épithéliale
miARN : micro-ARN
miRISC : *miRNA-Induced Silencing Complex*
mirSVR : *micro-RNA support vector regression algorithm*
M-MLV : *Moloney Murine Leukemia Virus*
MRE : *miRNA response element*
MRP : *MDR-related Protein*
MTT : sel de tétrazolium
NeuAc : acide N-acétylneuraminique
NF- B : *Nuclear Factor Kappa B*
Nt : Amino-terminal
nt : nucléotide
NTP : Nucléoside trisphosphate
PABP : *Poly(A) binding protein*
PanIN : *Pancreatic Intraepithelial Neoplasm*
pb : paire de bases
PCR : *Polymerase Chain Reaction*
PDAC : *Pancreatic Ductal Adenocarcinoma*
PI3K : Phosphatidylinositol 3-Kinase
pH : potentiel Hydrogène
Pré-miARN, pré-miR : Précurseur du miARN
Pri-miRNA, pri-miR : Transcrit primaire du miARN
PTEN : *Phosphatase and Tensin homolog deleted on chromosome 10*
PTS : Proline/Thréonine/Sérine
p/v : poids/volume
PVDF : Fluorure de polyvinylidène
qRT-PCR : quantitative Reverse transcriptase-Polymerase Chain Reaction
RIPA : *Radio-Immunoprecipitation Assay buffer*

RISC : *RNA-Induced Silencing Complex*
RLB : *Reporter Lysis Buffer*
RNase : Ribonucléase
RPMI : *Roswell Park Memorial Institute*
RRM1/2 : Ribonucléotide Réductase 1 et 2
RT : *Reverse Transcriptase*
RT-PCR : *Retro-transcription - Polymerase Chain Reaction*
RTK : Récepteur à activité tyrosine kinase
SDS : Dodécylsulfate de sodium
SEA : *Sea urchin sperm protein Enterokinase and Agrin*
S.E.M : *Standard error of the mean*
Ser : Sérine
SH2 : *Src-homology domain 2*
ShARN : *Short hairpin ARN*
SMAD : *Mothers against decapentaplegic*
SNAI1/2-Snail/Slug : *C2H2-type zinc finger transcription factors*
STAT : *Signal Transduction and Activator of Transcription*
SVF : Sérum de veau foetal
TBE : Tris Borate EDTA
TEM : Transition épithélio-mésenchymateuse
TGF / : *Transforming Growth Factor alpha/beta*
TK : Thymidine Kinase
TP53 : *Tumor Protein p53*
TR : *Tandem Repeat*
TSA : Trichostatine A
Tyr : Tyrosine
UTR : *Untranslated Region*
v/v : volume/volume
VNTR : *Variable Number of Tandem Repeat*
vWF : *von Willebrand Factor*
Zeb1/2 : *Zinc finger E-box-binding homeobox 1/2*

Introduction

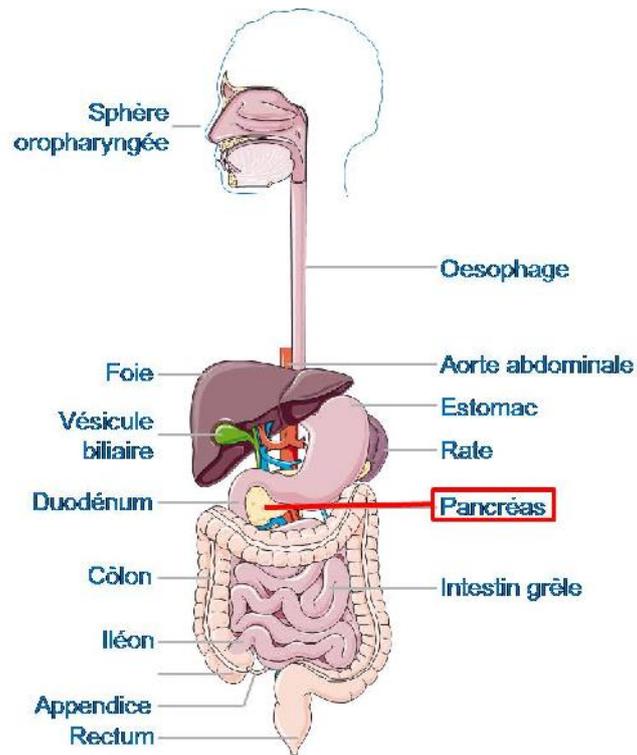


Figure 1 : Appareil digestif humain. Localisation profonde du pancréas.

A- *L'adénocarcinome pancréatique canalaire*

I- Le pancréas

1- Morphologie et localisation

Le pancréas est une glande amphicrine composée de cellules endocrines et de cellules exocrines. C'est un organe localisé profondément dans l'abdomen, long de 15 cm, large de 4 cm et épais de 2 cm (Figure 1). Il se trouve en arrière de l'estomac. Il est solidaire du cadre duodénal et se situe devant la voie biliaire principale. Il est composé de trois parties : la tête au niveau de l'anse duodénale qui se prolonge par le corps et se termine par la queue proche de la rate. Il est traversé par le canal de Wirsung.

Le pancréas a deux fonctions physiologiques majeures. La première est la digestion qui est effectuée par le pancréas exocrine. La seconde est la régulation de la glycémie qui est effectuée par le pancréas endocrine. Ces fonctions s'effectuent par la sécrétion d'hormones et de peptides qui vont se déverser dans le canal de Wirsung qui débouche dans le duodénum par l'ampoule de Vater (Bardeesy & DePinho, 2002; Hezel *et al.*, 2006), (Figure 2).

2- Le pancréas exocrine

Le pancréas exocrine représente 80% de la masse du pancréas. Il est constitué des cellules acinaires et des cellules canalaire. Les acinis vont produire des enzymes digestives qui vont être sécrétées comme par exemple les enzymes protéolytiques (trypsine), glucolytiques (amylase), ou lipolytique (lipase). Les cellules canalaire vont produire des mucines, des ions (Na^+ , K^+) et du bicarbonate. L'ensemble de ces composés va former le suc pancréatique contenant également 98% d'eau et indispensable à la digestion (Bardeesy & DePinho, 2002; Hezel *et al.*, 2006), (Figure 2).

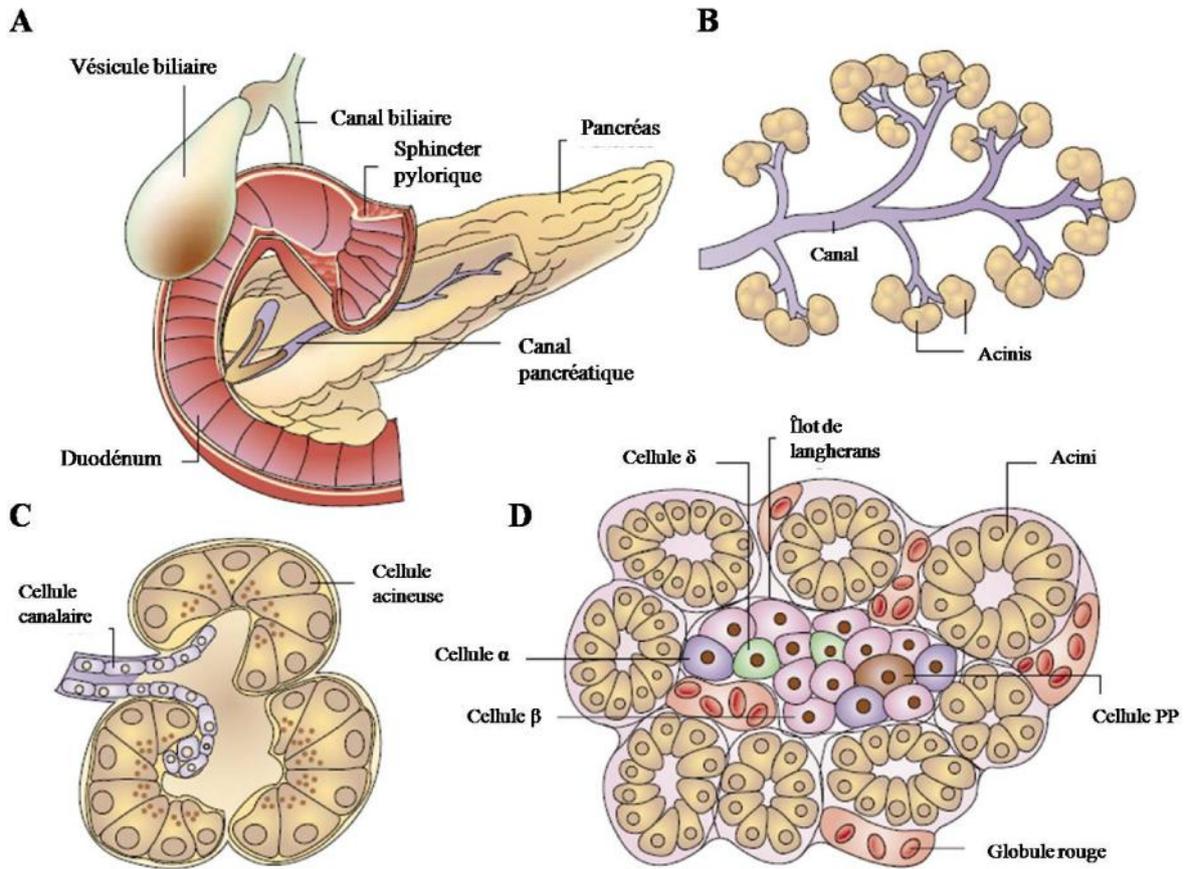


Figure 2 : Représentation schématique du pancréas (Bardeesy & DePinho, 2002).

- (A) Pancréas coupe longitudinale.
- (B) Canaux et lobules pancréatiques.
- (C) Organisation des grappes d'acinis.
- (D) Organisation du pancréas endocrine.

3- Le pancréas endocrine

Le pancréas endocrine est constitué de quatre types cellulaires spécialisés. Ces cellules sont organisées en îlots de Langerhans et vont permettre la sécrétion d'hormones pour contrôler la glycémie. Les îlots sont minoritaires dans le pancréas (moins de 2%). Les cellules alpha () et beta () régulent la glycémie *via* la sécrétion respective de glucagon et d'insuline (Figure 2). L'insuline est une hormone hypoglycémisante sécrétée quand le taux de glucose est supérieur à 1 g/l et qui va permettre de stocker le glucose dans les adipocytes. Le glucagon est une hormone hyperglycémisante qui va libérer le glucose dans le sang. Les cellules PP vont sécréter le polypeptide pancréatique et les cellules gamma () de la somatostatine qui vont permettre de moduler la sécrétion d'insuline et de glucagon au niveau du pancréas endocrine mais également de réguler la production d'enzymes digestives au niveau du pancréas exocrine (Bardeesy & DePinho, 2002; Hezel *et al.*, 2006).

II- Les lésions cancéreuses du pancréas exocrine

La majorité des adénocarcinomes pancréatiques canaux (PDAC) sont issus des cellules canaux siégeant dans 70% des cas au niveau de la tête du pancréas. Il existe trois types de lésions pancréatiques aboutissant à un cancer du pancréas, dont la plus fréquemment retrouvée est la lésion pancréatique intra-épithéliale (PanIN). Ces lésions sont également les mieux caractérisées et intéressent plus particulièrement le laboratoire. Elles seront donc plus détaillées dans cette partie et les deux autres lésions seront très brièvement citées.

1- Les lésions néoplasiques PanIN

a- Caractérisation morphologique

Les lésions PanIN sont des néoplasies pancréatiques intra-épithéliales microscopiques de moins de 5 mm. Elles représentent 90% des lésions retrouvées dans le PDAC. Elles se distinguent par une accumulation de modifications cytologiques, architecturales et par l'accumulation de modifications géniques (Hruban *et al.*, 2000, 2007; Bardeesy & DePinho, 2002; Maitra & Hruban, 2008; Zavoral *et al.*, 2011; Cowan & Maitra, 2014). Les PanIN sont classiquement classées en trois stades reflétant une dysplasie de bas grade, de moyen grade et de haut grade, jusqu'au stade de PDAC (Figure 3).

- Les cellules canaux pancréatiques forment une monocouche de cellules épithéliales cubiques avec un noyau uniforme rond localisé au pôle basal.

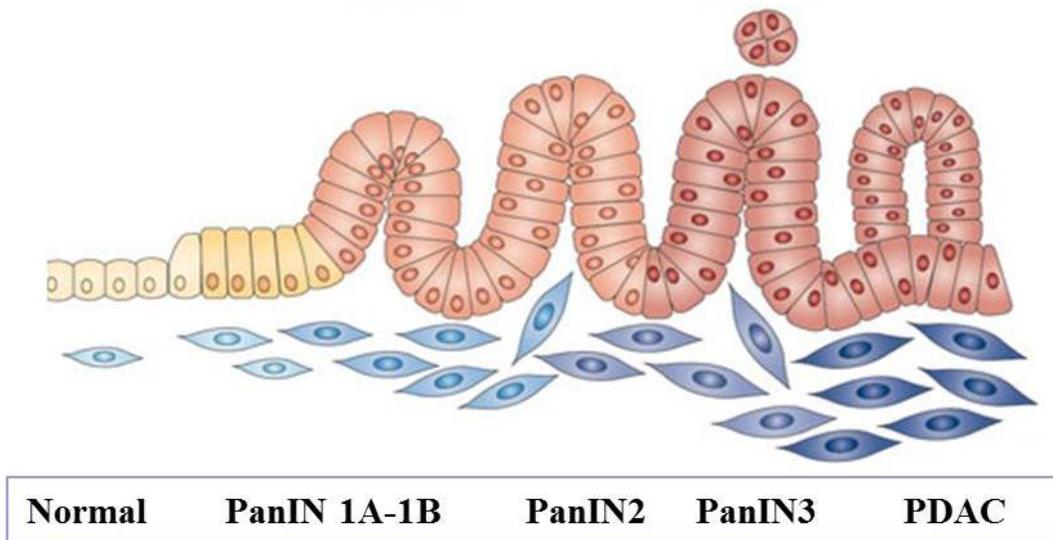


Figure 3 : Evolution des lésions pré-néoplasiques intra-épithéliales (Morris, Wang, & Hebrok, 2010).

- Les lésions PanIN 1A et 1B représentent une dysplasie de bas grade. Les cellules ont une morphologie plus allongée, sont mucin-sécrétantes et développent une architecture papillaire pour le grade PanIN1B alors qu'elles sont planes au grade PanIN1A. La distinction des PanIN1A et 1B est assez difficile et rarement pratiquée en clinique.

- Les lésions PanIN2 correspondent à une dysplasie de moyen grade. Les cellules présentent des anomalies nucléaires comme un noyau plus large et une perte de polarité cellulaire et nucléaire. Le noyau n'est plus restreint au pôle basal.

- Les lésions PanIN3 caractérisent une dysplasie de haut grade. Les cellules présentent des anomalies nucléaires sévères et des mitoses anormales, une perte de polarité cellulaire ainsi qu'un bourgeonnement dans la lumière des canaux. Le stade PanIN3 est un carcinome *in situ*.

b- Caractérisation génique

Les lésions PanIN sont également caractérisées par l'accumulation de modifications géniques telles que des mutations ponctuelles activatrices d'oncogènes ou inactivatrices de gènes suppresseurs de tumeurs, des amplifications géniques, des délétions, une altération des programmes de réparation de l'ADN ainsi que des modifications épigénétiques (Figure 4).

On retrouve fréquemment, et dès les stades les plus précoces, une mutation ponctuelle activatrice de l'oncogène Kras (chromosome 12p) qui est une petite GTPase intracellulaire au niveau du codon 12. Les mutations les plus fréquentes sont G12D et G12V. On retrouve dans une proportion moins élevée une mutation des codons 16 et 61. La mutation de Kras est décrite comme l'une des premières mutations de ce cancer et est surtout la plus commune. On la retrouve dans 36% des lésions PanIN1, dans 44% des lésions PanIN2, dans 87% des lésions PanIN3 et dans plus de 95% des PDAC (Bardeesy & DePinho, 2002; Maitra *et al.*, 2005; Maitra & Hruban, 2008; Morris *et al.*, 2010). L'importance de la mutation de l'oncogène Kras dans l'initiation du PDAC a été montrée par l'utilisation de nombreux modèles murins exprimant un Kras constitutivement actif dans le pancréas. Néanmoins il a été montré que l'expression de Kras seule était nécessaire mais non suffisante pour induire un adénocarcinome pancréatique invasif (Hingorani *et al.*, 2003). L'activation de Kras est associée à une activation des voies de signalisation *Mitogen Activated Protein Kinase* (MAPK) et phosphatidylinositol-3-kinase/*v-akt murine thymoma viral oncogene*-protéine kinase B (PI3K/AKT-PKB) et permet une augmentation de la prolifération et de la survie cellulaire.

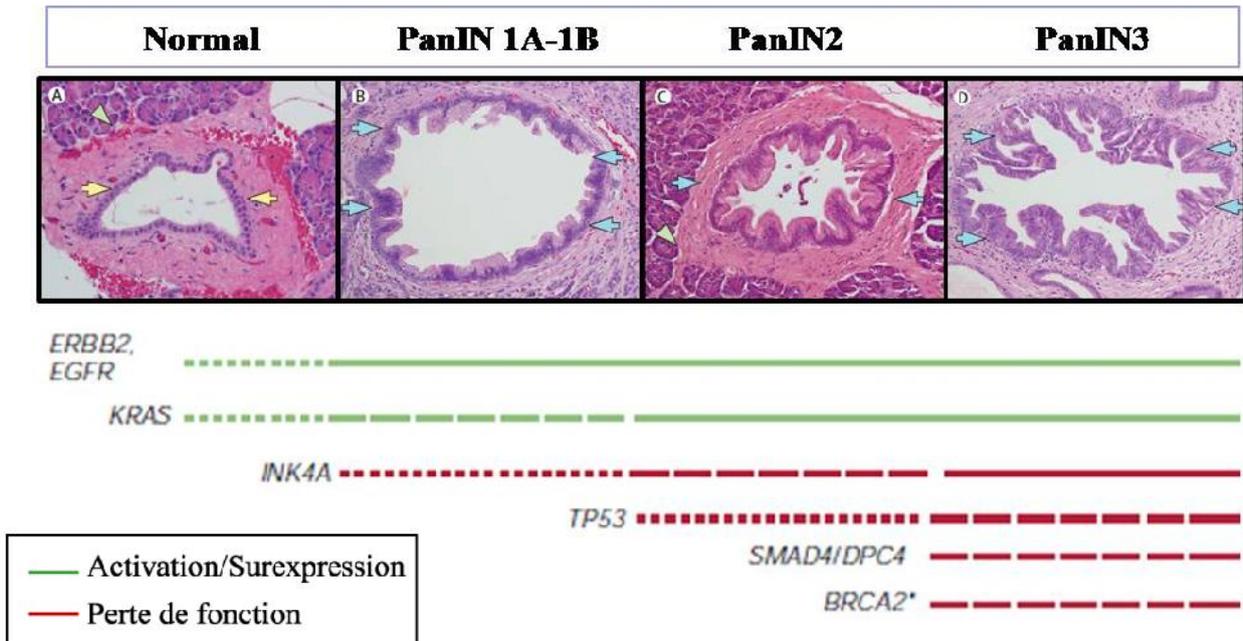


Figure 4 : Mutations classiquement retrouvées dans le PDAC (Morris *et al.*, 2010; Vincent *et al.*, 2011).

Dans un second temps, on observe dès les premiers stades de développement des lésions PanIN une surexpression des récepteurs à activité tyrosine kinase de la famille ErbB dont notamment l'*Epidermal Growth Factor Receptor* EGFR/ErbB1 et dans une moindre mesure *Human Epidermal Growth factor Receptor 2* HER2/ErbB2. Cette surexpression est associée à l'induction d'une boucle de stimulation autocrine et à une augmentation de l'activité des voies PI3K/AKT et MAPK (Bardeesy & DePinho, 2002; Hezel *et al.*, 2006). La voie PI3K/AKT est activée de manière constitutive dans le PDAC par une amplification génique du gène *AKT2* dans 10 à 15% des cas.

On retrouve également des mutations inactivatrices, des délétions intragéniques ou encore une méthylation du promoteur du gène *cyclin-dependent kinase inhibitor 2A* (CDKN2A/INK4A (9p21)) de la protéine P16 dans 30% des lésions PanIN1A-1B, dans 55% des lésions PanIN2, dans 71% des lésions PanIN3 et dans 90% des PDAC (Feldmann *et al.*, 2007; Maitra & Hruban, 2008). L'inactivation de P16 favorise la progression du cycle cellulaire et notamment la transition G1/S en laissant possible l'interaction de la cycline D1 et des cyclines dépendantes des kinases CDK4/CDK6. Une surexpression nucléaire de la cycline D1 est également retrouvée dans 1/3 des lésions PanIN2, dans la moitié des lésions PanIN3 et dans 60 à 85% des PDAC.

La mutation du gène suppresseur de tumeur *tumor protein P53* (TP53, (17p)) est retrouvée dans 50% à 75% des PDAC à partir des stades plus tardifs PanIN2-3. L'altération de l'expression de la protéine P53 va alors favoriser la survie cellulaire en bloquant les signaux de mort cellulaire par apoptose et en permettant à la cellule de proliférer malgré l'accumulation de dommages à l'ADN (Feldmann *et al.*, 2007; Maitra & Hruban, 2008).

La délétion de *Mothers against decapentaplegic homolog 4* (Smad4/DPC4) située au niveau de la région 18q21 est retrouvée à un stade tardif, dans 30% des stades PanIN3 et dans 55% des PDAC. La suppression de l'expression de Smad4 entraîne une perte de dépendance des cellules cancéreuses pancréatiques à la voie du *tumor growth factor beta* (TGF-), (Bardeesy & DePinho, 2002; Feldmann *et al.*, 2007; Maitra & Hruban, 2008).

Le raccourcissement des télomères est un des événements les plus fréquents retrouvés dès le stade PanIN1 et maintenu jusqu'au stade de PDAC dans près de 90 à 100% des cas et favorise l'instabilité génique, les cassures de l'ADN et les réarrangements chromosomiques (van Heek *et al.*, 2002; Feldmann *et al.*, 2007; Maitra & Hruban, 2008).

2- Autres lésions

Il existe deux autres types de lésions à l'origine du PDAC. Les lésions intracanalaires papillaires mucineuses (IPMN) correspondant à une néoplasie épithéliale mucin-sécrétante de plus d'un cm. Ces lésions sont localisées au niveau du canal de Wirsung ou des canaux adjacents. Ces lésions sont retrouvées de manière plus fréquente au niveau de la tête du pancréas (Hruban *et al.*, 2007).

Les lésions mucineuses kystiques sont des lésions néoplasiques kystiques mucin-sécrétantes (MCN) de 1 à 3 cm. Ces lésions ont un stroma particulier de type ovarien, sont localisées à plus de 90% au niveau du corps ou de la queue du pancréas et se développent préférentiellement chez la femme (Hruban *et al.*, 2007). Les cancers provenant de ces deux types de lésions (IPMN et MCN) ont un meilleur pronostic que ceux provenant des lésions PanIN.

III- L'adénocarcinome pancréatique canalaire

1- Caractéristiques et épidémiologie

Le PDAC est un cancer très hétérogène, invasif/infiltrant à travers la lame basale et peu vascularisé. Le PDAC est caractérisé par une forte réaction stromale nommée réaction desmoplastique. Le stroma du PDAC est riche et dense et peut représenter 20 à 80% de la tumeur. Il est composé de protéines de la matrice extra-cellulaire (MEC) comme les collagènes de type I et III et de fibronectine. On y retrouve des fibroblastes dont notamment les *cancer associated fibroblasts* (CAF) et les cellules étoilées permettant notamment la sécrétion de facteur de croissance et le remodelage de la MEC, des cellules endothéliales et immunitaires, des péricytes et des fibres nerveuses (Rasheed, Matsui, & Maitra, 2012).

Le PDAC est un cancer de mauvais pronostic. La médiane de survie est de 6 mois et la survie à 5 ans est inférieure à 5% (Siegel, Naishadham, & Jemal, 2013). La découverte de ce cancer est très souvent fortuite, son développement est majoritairement asymptomatique

jusqu'à un stade avancé de la maladie. Le PDAC est découvert dans 80% des cas à un stade déjà métastatique. Ces mauvaises statistiques s'expliquent par un diagnostic tardif de la maladie, par le manque de thérapie efficace et l'inexistence de test de dépistage précoce (Siegel *et al.*, 2013; Wolfgang *et al.*, 2013).

Il a été estimé 11 662 nouveaux cas en France en 2012 (données de l'Institut National sur le Cancer) dont 51% de cas chez l'homme. C'est un cancer dont l'incidence progresse en France depuis 1980, qui se développe entre 65 et 75 ans et qui a une incidence mondiale légèrement plus élevée chez l'homme que chez la femme avec un sexe ratio de 1,48. On dénombre 10,2 cas pour 100 000 hommes et 6,9 cas pour 100 000 femmes.

2- Les formes héréditaires

Dans environ 95% des cas le PDAC est un cancer sporadique. On estime que 2 à 10% des PDAC ont un déterminisme génétique (Wolfgang *et al.*, 2013). On peut citer les principaux syndromes qui sont communs également à d'autres cancers comme :

- Le syndrome de Peutz-Jeghers (PJS), causé par une mutation du gène *sérine thréonine kinase 11 (STK11)* - *kinase hépatique B1 (LKB1)*.
- Le syndrome de Li-Fraumeni (mutation du gène *TP53*).
- Le syndrome de Lynch (*MutL homolog*, MLH1, MSH2, MSH3).
- Le syndrome de *Familial Atypical Multiple Mole Melanoma* (FAMMM) présentant une mutation du gène *p16/CDKN2A*.
- La mutation du gène de la *protéase sérine1, trypsine-1 (PRSS1)* dans les formes de pancréatites chroniques héréditaires.
- La mutation germinale de *CDKN2A*.
- La mutation du gène *Breast cancer 2 (BRCA2)*.

3- Les facteurs de risque

Le premier facteur de risque est commun à de nombreux cancers : il s'agit du tabagisme actif et passif. Le tabagisme actif augmente de 2,2 fois le risque de développer un PDAC. Il est estimé que 25% des PDAC sont dûs au tabac ou à la fumée de cigarette. Le tabagisme augmente le nombre de mutations retrouvées dans les tumeurs. L'arrêt du tabac permet de diminuer le risque de développer un PDAC à 1,6 pour un arrêt inférieur à 10 ans et à 1,12

pour un arrêt depuis 15 à 20 ans (Bosetti *et al.*, 2012). Le second facteur de risque est nutritionnel. Le diabète de type 2 déclaré depuis au moins 10 ans augmente le risque de PDAC de 1,51 fois (Huxley *et al.*, 2005). Il est également estimé que 1% des personnes déclarant un diabète développeront un PDAC dans les trois ans (Chari *et al.*, 2005). L'obésité et notamment un indice de masse corporel (IMC) supérieur à 35, augmente le risque de PDAC de 1,55 fois comparé à un IMC normal compris entre 18,9 et 24,9 (Arslan *et al.*, 2010). Le troisième facteur de risque est l'alcoolisme. La consommation d'alcool augmente le risque de PDAC de 1,46 fois (Lucenteforte *et al.*, 2012). La pancréatite chronique augmente le risque de PDAC de 2,71 fois (Duell *et al.*, 2012). Il existe également des risques environnementaux dont l'exposition aux hydrocarbures, aux insecticides et aux organochlorés.

L'ensemble de ces facteurs de risque est peu spécifique et il n'existe pas de prévention pour le PDAC ni de marqueur diagnostique précoce.

En plus de ces facteurs communs il a été identifié des facteurs de risques génétiques. Les *Single Nucleotide Polymorphism* (SNP) constituent la forme la plus abondante de variations génétiques dans le génome humain. Les SNP sont stables, abondants et répartis dans l'ensemble du génome. Les SNP sont associés à la diversité des individus, aux différences de sensibilité aux maladies mais également aux réponses thérapeutiques. Dans une étude de 2009, il a été mis en évidence un SNP au locus 9q34 correspondant au gène ABO des groupes sanguins, comme étant impliqué dans la prédisposition au PDAC (Amundadottir *et al.*, 2009). Les résultats indiquent que les personnes possédant le groupe sanguin O ont un risque moins important de développer un PDAC que celles des groupes A et B. D'autres SNP au niveau des locus 13q22 et 12q21 ont également été impliqués dans la prédisposition au PDAC (Amundadottir *et al.*, 2009; Willis *et al.*, 2012).

4- Symptômes et diagnostic

a- Symptômes

Le développement du PDAC est silencieux pendant de nombreuses années. Les symptômes qui apparaissent par la suite sont peu spécifiques et peuvent être similaires à d'autres pathologies. On retrouve des douleurs persistantes à l'estomac ou au niveau du dos. Il apparaît également ensuite un amaigrissement dû à une perte d'appétit qui peut être rapide et

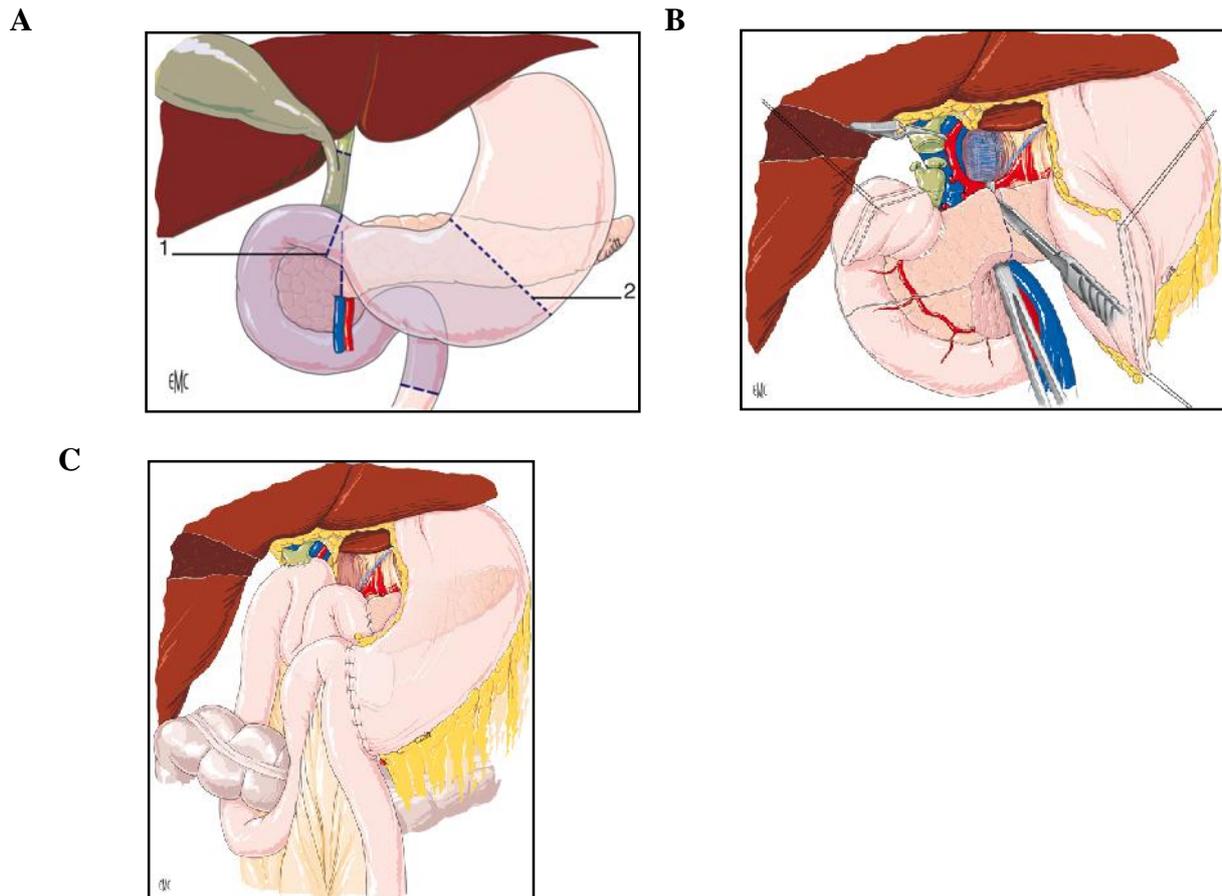


Figure 5 : Duodéno pancréatectomie céphalique (DPC) (Buc & Sauvanet, 2011).

(A) Limites de résection.

(B) Section de l'isthme pancréatique au bistouri.

(C) Reconstruction : anastomoses pancréatico-jéjunale, hépato-jéjunale et gastro-jéjunale précolique.

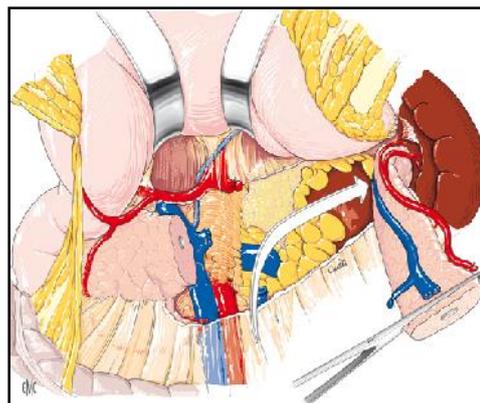


Figure 6 : Spléno pancréatectomie gauche (Dokmak & Sauvanet, 2011).
Section de l'isthme pancréatique et des vaisseaux spléniques.

importante à cause de l'apparition de difficultés à digérer et de nausées. Un ictère peut apparaître lorsque le canal biliaire est obstrué par la tumeur ainsi qu'un prurit.

b- Diagnostic

Le diagnostic s'effectue grâce à un bilan d'imagerie médicale et d'analyse biologique. L'échographie fournit un diagnostic indirect et ne permet pas de détecter plus de 20% des PDAC. Le tomodensitomètre-scanner est un examen de choix pour détecter ce cancer. Il permet de détecter des lésions de plus de 2cm dans 90% des cas. Cependant l'imagerie n'étant pas totalement fiable, il est difficile de déterminer les bords de la tumeur afin d'évaluer son extension. Dans ce but, une échoendoscopie couplant endoscopie et échographie est alors réalisée. Elle permet de mettre en évidence près de 95% des cancers de toutes tailles même inférieures à 2 cm et peut être couplée à une biopsie *via* l'introduction d'une aiguille fine dans l'endoscope pour réaliser une ponction. L'imagerie par résonance magnétique (IRM) peut être une alternative au scanner mais n'apporte pas d'avantage. Le dosage sérique du CA 19-9 (*sialyl Lewis A blood antigen*) peut être utilisé comme marqueur dans le PDAC, le diabète et le cancer colorectal (Magnani *et al.*, 1983). C'est un marqueur peu spécifique et c'est surtout l'évolution des variations de son taux d'expression qui permet d'évaluer la progression ou la régression de la maladie. On peut l'utiliser par exemple pour évaluer la réussite ou l'échec d'un traitement médical chimiothérapeutique.

IV- Traitements de l'adénocarcinome pancréatique canalaire

1- La prise en charge chirurgicale

Le seul traitement à visée curative pour le PDAC est l'exérèse chirurgicale. Un bilan d'extension locorégionale est réalisé par échoendoscopie pour déterminer la résection locale à effectuer en évaluant l'extension ganglionnaire et vasculaire. Cette thérapeutique n'est possible que dans 20% des cas de PDAC et améliore le pronostic vital avec une survie à 5 ans passant de 5% à 20%. Le PDAC est un cancer agressif, il est donc dans les 80% des cas restants détecté à un stade métastatique non opérable. Il existe des contre-indications à cette chirurgie dont notamment : l'envahissement de l'artère hépatique, de l'artère et de la veine mésentérique, la présence de métastases viscérales ou de carcinose péritonéale. La chirurgie consiste en une duodéno-pancréatectomie céphalique par la procédure de Whipple quand la tumeur est localisée au niveau de la tête du pancréas (Figure 5) (Buc & Sauvanet, 2011)

ou une spléno pancréatectomie gauche en cas de localisation au niveau de la queue du pancréas (Figure 6) (Dokmak & Sauvanet, 2011). Une partie de l'intestin, de l'estomac, de la vésicule biliaire ou encore de la rate sont aussi enlevées pendant l'intervention. De ce fait, de nombreuses anastomoses (pancréatico-jéjunale, hépato-jéjunale et gastro-jéjunale précolique) sont réalisées pour rétablir la continuité du système digestif (Figure 5). La chirurgie pancréatique est lourde et complexe et a de nombreuses complications comme les fistules pancréatiques, les hémorragies, la gastroparésie ou encore l'apparition de fuites sur les anastomoses. Il peut y avoir jusqu'à 30% de récurrence suite à ces traitements chirurgicaux.

2- La prise en charge médicale

La prise en charge médicale du PDAC repose sur l'utilisation de drogue chimiothérapeutique seule ou en combinaison qui peut être couplée avec de la radiothérapie. Un grand nombre de composés ont été testés ou le sont actuellement pour le traitement du PDAC. Les bénéfices sont modestes au niveau de la survie des patients. Le PDAC étant un cancer présentant une forte chimiorésistance.

a- La chimiothérapie de base

Pendant longtemps le traitement chimiothérapeutique du PDAC fût à base de 5-fluorouracile (5-Fu), un inhibiteur de la thymidylate synthase, et permettait d'obtenir une réponse minimale. Le 5-Fu est un analogue pyrimidique dérivé de l'uracile. En 1997, un essai clinique de phase III a comparé le 5-Fu à la gemcitabine (gemzar®) un autre analogue pyrimidique. Cette étude a permis de mettre en évidence une amélioration de la médiane de survie passant de 4,2 à 5,7 mois ainsi qu'une amélioration significative du taux de survie à un an passant de 2% à 18% (Burriss *et al.*, 1997). Depuis cet essai, la chimiothérapie de base du PDAC est la gemcitabine (Burriss & Storniolo, 1997; Burriss *et al.*, 1997). La gemcitabine ou 2'-désoxy-2',2'-difluorocytidine (DFdC) est un dérivé de la désoxycytidine. C'est un analogue nucléotidique qui appartient à la famille des antimétabolites. Son rôle est de bloquer de façon irréversible la réplication de l'ADN en s'y incorporant.

D'autres analogues pyrimidiques sont utilisés en combinaison avec la gemcitabine comme la capécitabine qui est une pro-droge du 5-Fu (Jonckheere, Skrypek, & Van Seuning, 2014). La capécitabine est convertie en 5-Fu par une réaction multi-étape et a montré un

intérêt pour les cancers de stades avancés par rapport à l'utilisation du 5-Fu (Cartwright *et al.*, 2002). D'autres drogues dérivées de platine qui sont des agents alkylants comme l'oxaliplatine peuvent être également utilisées. L'oxaliplatine va interagir avec les groupements amines ou hydroxyles des nucléotides de l'ADN. De nombreux essais utilisant cette drogue seule ou en combinaison ont été réalisés mais peu ont montrés un bénéfice significatif. Enfin, des inhibiteurs de la topoisomerase I comme l'irinotecan dont le métabolite actif est le SN-38 peuvent être également utilisées. Le SN-38, interagit entre la topoisomérase I et le brin d'ADN clivé afin d'empêcher la ligation et d'entraîner la mort cellulaire. Aucun bénéfice suffisamment significatif n'a été constaté lors de l'utilisation de ce composé seul ou en combinaison.

b- Les protocoles utilisés

Il existe différents protocoles de chimiothérapies administrés en France en fonction du stade de développement du PDAC et de la résecabilité de la tumeur. Les tumeurs pancréatiques sont classées en 4 groupes : résecable, à la limite de la résecabilité, localement avancée/non résecable et enfin métastatique. La chimiothérapie peut être administrée de façon continue pendant un temps donné ou par cure successive. Une chambre implantable (port-à-cath®) peut être posée afin de faciliter son administration. Les combinaisons de drogues chimiothérapeutiques présentent de meilleurs résultats au niveau de la survie des patients.

- En cas de cancer résecable : une chimiothérapie néo-adjuvante et/ou adjuvante à base de gemcitabine est proposée en plus de la chirurgie. Elle peut être couplée à la radiothérapie ou à la capécitabine (Cunningham *et al.*, 2009). Un essai clinique multicentrique européen ESPAC4 a été mis en place pour évaluer le bénéfice de ce traitement et est coordonné par le Pr. John Neoptolemos.

- En cas de cancer localement avancé : la chimiothérapie reste la gemcitabine et peut être couplée à de la radiothérapie. Aucun bénéfice au niveau de la survie des patients n'a pu être mis en évidence lors d'association de chimiothérapies comme le GEMOX associant gemcitabine et oxaliplatine (Louvet *et al.*, 2005), ou à la capécitabine (Mukherjee *et al.*, 2013). L'utilisation de thérapies ciblées comme le cétuximab un anticorps monoclonal anti-EGFR (Philip *et al.*, 2010) ou le bévacizumab un anticorps monoclonal anti-Vascular

Endothelial Growth Factor (VEGF) (Fogelman *et al.*, 2011) n'a pas permis d'améliorer la survie des patients.

- En cas de cancer métastatique : la chimiothérapie est palliative à base de gemcitabine et peut être associée à l'erlotinib (Moore *et al.*, 2007; Verslype *et al.*, 2007; Welch & Moore, 2007). Un protocole plus récent à base de FOLFIRINOX peut être proposé pour les patients avec un bon état général (Conroy *et al.*, 2011) ou de manière plus récente avec la combinaison gemcitabine et nab-paclitaxel (Von Hoff *et al.*, 2013).

c- Les essais cliniques prometteurs

L'essai clinique de phase II de Conroy datant de 2011 a permis de mettre en évidence une amélioration significative de la survie grâce au protocole FOLFIRINOX. Le FOLFIRINOX combine 4 molécules : le 5-Fu, la leucovorine/acide folinique qui potentialise l'effet du 5-Fu, l'irinotécan et l'oxaliplatine. Une augmentation significative de la médiane de survie a pu être constatée passant de 6,8 mois pour la gemcitabine seule à 11,1 mois pour le FOLFIRINOX (Conroy *et al.*, 2011). Néanmoins ce traitement est très agressif et une forte toxicité a été mise en évidence avec des effets secondaires importants (nausées, diarrhée, neutropénie fébrile, neuropathie, ...) en comparaison à la gemcitabine qui peut apporter un confort de vie à certains malades.

Plus récemment, une étude rétrospective de 2010 à 2013 pour un cancer de stade avancé ou métastatique a permis de confirmer les résultats obtenus dans l'étude de Conroy et collaborateurs (Moorcraft *et al.*, 2014). Les études de Paniccia et collaborateurs et Christian et collaborateurs ont permis de mettre en évidence qu'un traitement néo/adjuvant (avant une intervention chirurgicale) à base de FOLFIRINOX pour un cancer à la limite de la résecabilité permet d'obtenir un nombre suffisant de cancer pouvant devenir résecable (Paniccia *et al.*, 2014; Christian *et al.*, 2014).

L'association du nab-paclitaxel avec la gemcitabine a permis en 2013 de mettre en évidence une amélioration de la médiane de survie passant à 8,5 mois comparé à 6,7 mois pour la gemcitabine seule (Von Hoff *et al.*, 2013). Cependant les effets secondaires restent également importants (neuropathie, fatigue).

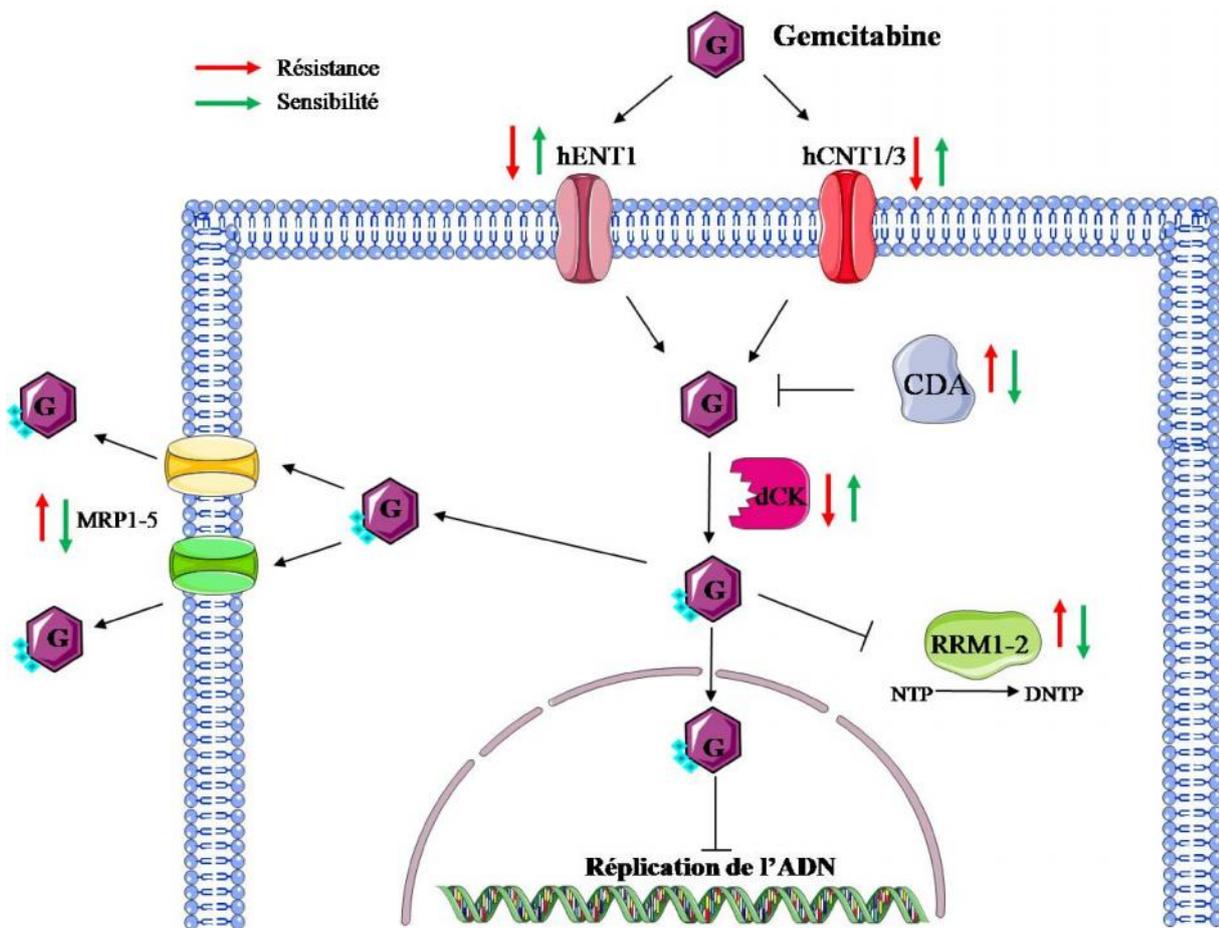


Figure 7 : Métabolisme de la gemcitabine.

hCNT1/3 : human Concentrative Nucleoside Transporter 1/3 ; hENT1 : human Equilibrative Nucleoside Transporter 1 ; dCK : déoxycytidine kinase ; RRM1/2 : Ribonucléotide Réductase 1 et 2 ; CDA : Cytidine Désaminase ; NTP : Nucléoside Triphosphate ; dNTP : désoxynucléotide triphosphate ; MRP : Multidrug Resistance-related Protein.

V- Chimiorésistance de l'adénocarcinome pancréatique canalaire

Le PDAC est un cancer caractérisé par une chimiorésistance accrue. Nous avons montré que peu de thérapies fonctionnent dans cette pathologie. De ce fait de nombreuses études ont pour objectif de décrypter les mécanismes sous-jacents de chimiorésistances. Trois mécanismes sont étudiés dans le PDAC dont deux d'entre eux, le métabolisme de la gemcitabine et la transition épithélio-mésenchymateuse sont étudiés au laboratoire et vont être brièvement décrit.

1- Lié au métabolisme de la gemcitabine

La gemcitabine est incorporée par les cellules par les transporteurs *Concentrative/Equilibrium nucleoside transporter* hCNT1/3 et hENT1. La gemcitabine est alors phosphorylée successivement en nucléotide mono-, di- et tri-phosphate (DFdCTP) dont la première étape est catalysée par la désoxy-cytidine kinase (dCK). La gemcitabine s'incorpore dans les cellules en division (Figure 7) ce qui conduit à un arrêt irréversible de la synthèse d'ADN. Une diminution de l'expression des transporteurs hCNT/hENT ou de l'enzyme dCK sont fréquemment retrouvées dans les tumeurs pancréatiques. A l'inverse, une augmentation de l'expression des canaux détoxifiants de la famille des *Multidrug Resistance Proteins* (MRP), ou de la cytidine désaminase (CDA) permettant la conversion de la désoxycytidine en uracile ou de la Ribonucléotide Réductase 1-2 (RRM) (par effet de compétition) sont également retrouvées dans les tumeurs pancréatiques. Ces variations d'expressions peuvent être corrélées à une diminution de la survie et à une augmentation de la chimiorésistance (Tanaka *et al.*, 2010; Jonckheere *et al.*, 2014; de Sousa Cavalcante & Monteiro, 2014).

On retrouve par exemple une diminution de l'expression du transporteur hENT1 dans les tumeurs pancréatiques, ce qui influe directement sur la thérapeutique de base utilisée dans le traitement de ce cancer. La médiane de survie est de 17,1 mois pour les patients présentant une faible expression de hENT1 et de 26,2 mois pour ceux présentant une forte expression comme dans l'étude ESPAC3 (Greenhalf *et al.*, 2014). L'utilisation de hENT1 comme marqueur prédictif reste controversée puisqu'une autre étude n'a pas mis en évidence de différence significative de son expression dans le PDAC (Ormanns *et al.*, 2014).

2- Le stroma

Le cancer du pancréas présente un stroma dense comportant de nombreux types cellulaires et qui peut représenter jusqu'à 80% de la surface de la tumeur. Le micro-environnement tumoral peut représenter un obstacle, une barrière piégeant les molécules anti-cancéreuses et limitant leur diffusion. Le stroma du PDAC est une hypothèse selon laquelle les molécules thérapeutiques comme la gemcitabine ne fonctionnent pas aussi bien dans ce cancer (Neesse *et al.*, 2011). De ce fait, une meilleure compréhension du micro-environnement tumorale est nécessaire pour mieux appréhender son implication dans le PDAC et dans la chimiorésistance.

3- La transition épithélio-mésenchymateuse

La transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) est un procédé biologique qui permet à une cellule épithéliale polarisée interagissant normalement avec la lame basale, de subir une série de changements biochimiques qui lui permettent d'acquérir un phénotype cellulaire mésenchymateux et des capacités biologiques accrues, comme une augmentation des capacités migratoires, invasives, une résistance élevée à l'apoptose, une grande production de composants de la MEC, et à une chimiorésistance (Kalluri & Weinberg, 2009). La TEM complète se caractérise par une dégradation de la membrane basale dans laquelle est ancrée la cellule anciennement épithéliale et polarisée, et par la formation d'une cellule mésenchymateuse qui va pouvoir migrer au-delà de sa localisation d'origine. Il a été montré dans les cellules cancéreuses pancréatiques humaines que l'acquisition d'un phénotype de TEM était corrélée à une induction de la chimiorésistance dans des modèles cellulaires chimiorésistants à la gemcitabine ou au 5-Fu. (Satoh, Hamada, & Shimosegawa, 2014).

Les enjeux actuels du PDAC sont :

- *D'identifier de nouveaux marqueurs de diagnostic précoce.*
- *De comprendre le mécanisme de chimiorésistance.*
- *De découvrir de nouvelles cibles et de nouveaux outils thérapeutiques.*

Dans ce but, le laboratoire s'intéresse depuis de nombreuses années aux rôles d'une famille de protéine, les mucines, dans la cancérogenèse épithéliale. La plus connue et la plus étudiée est la mucine MUC1. Cette mucine fait l'objet de beaucoup d'intérêt en cancérologie et notamment dans le PDAC et fera l'objet de cette seconde partie précédée par une introduction générale sur la famille des mucines.

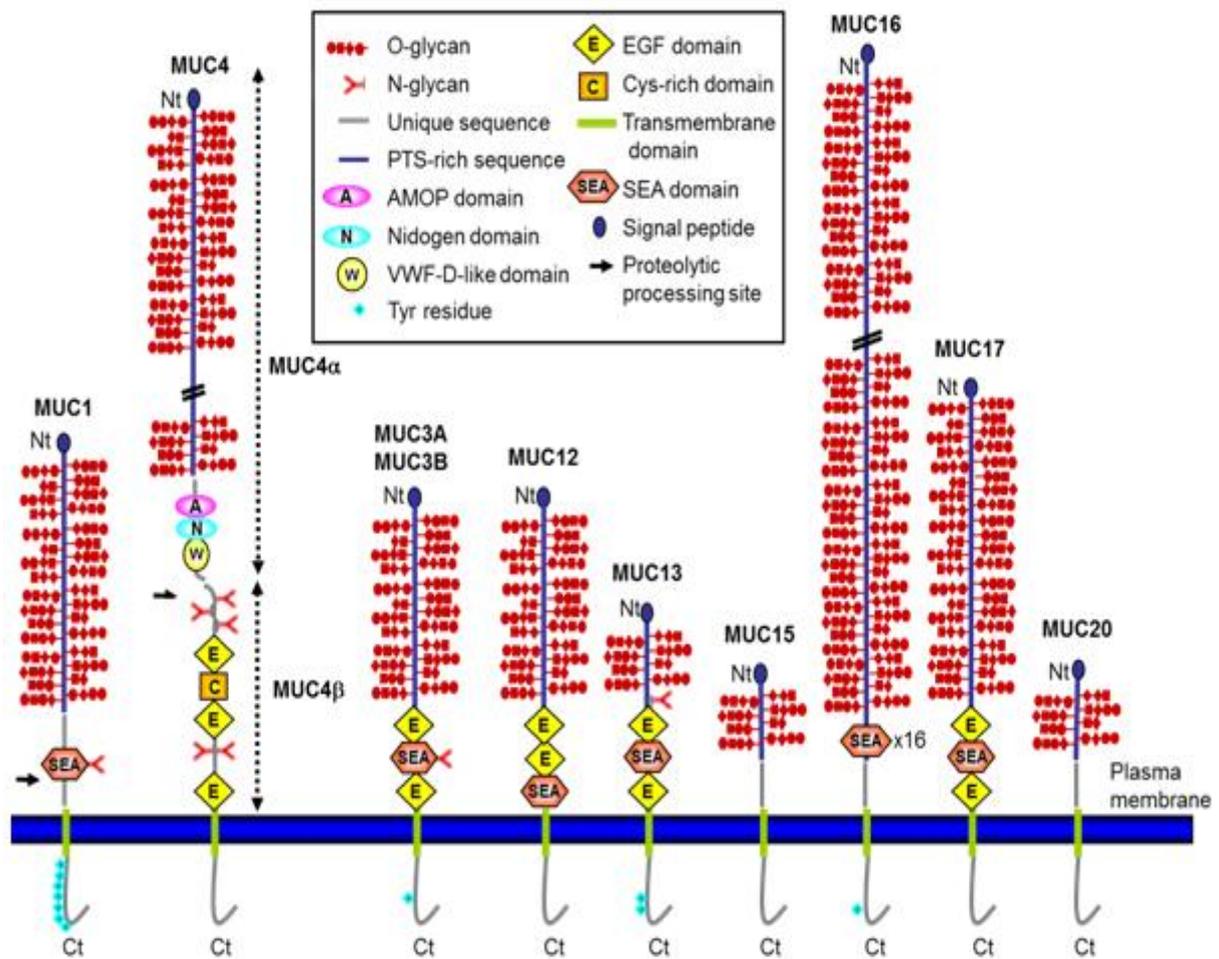


Figure 8 : La famille des mucines membranaires (Jonckheere & Van Seuning, 2008).

B- Les mucines

I- La famille des mucines

Les mucines sont une famille de 21 membres de O-glycoprotéines filamenteuses de masse moléculaire élevée (Porchet & Aubert, 2004). Elles sont composées d'une longue chaîne polypeptidique, appelée apomucine, sur laquelle se greffent de nombreuses chaînes oligosaccharidiques. La glycosylation représente environ 80% du poids de la molécule mature. Initialement décrites comme les protéines composant le mucus, les mucines ont pu être subdivisées en deux sous familles.

1- Les mucines sécrétées

Les mucines sécrétées sont impliquées dans la protection des épithéliums contre les agressions extérieures telles que l'inflammation, les agents pathogènes comme les bactéries et les virus et les variations de pH, en formant le gel de mucus. Le mucus est une barrière physique constituée d'un réseau tri-dimensionnel de mucines qui s'oligomérisent. Le mucus est principalement formé par les mucines MUC2, MUC5AC, MUC5B, MUC6 et MUC19 qui lui confèrent alors ses propriétés rhéologiques telles que l'élasticité, la viscosité et l'adhésivité (Moniaux *et al.*, 2001; Dekker *et al.*, 2002; Porchet & Aubert, 2004; Jonckheere & Van Seuningen, 2008). Les mucines représentent 5% de la composition totale du mucus, les 95% restant étant principalement constituée d'eau et d'ions (Hollingsworth & Swanson, 2004).

2- Les mucines membranaires

Les mucines transmembranaires comme MUC1, MUC3A, MUC3B, MUC4, MUC12, MUC13, MUC15, MUC16, MUC17, MUC20 et MUC21 sont impliquées dans la signalisation cellulaire, les interactions cellule-cellule et les interactions cellule-MEC (Roussel *et al.*, 1988; Moniaux *et al.*, 2001; Dekker *et al.*, 2002; Porchet & Aubert, 2004). Elles se situent au niveau apical des cellules épithéliales polarisées, composent également la barrière protectrice des épithéliums et permettent de transmettre les signaux de stress, de survie et de croissance en intra-cellulaire (Jonckheere & Van Seuningen, 2010) (Figure 8).

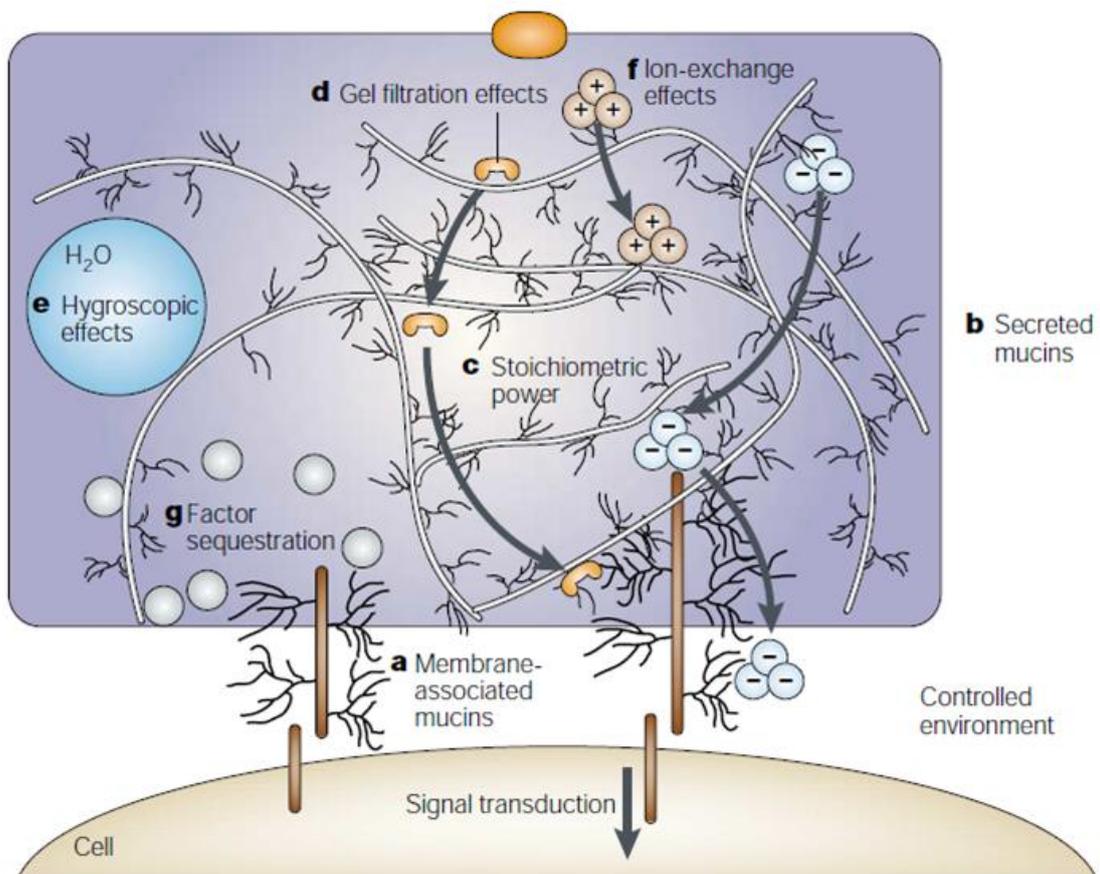


Figure 9 : Interaction des mucines avec le microenvironnement (Hollingsworth & Swanson, 2004)

3- Rôle général

Les mucines ont un rôle central dans la différenciation épithéliale et dans le maintien de l'homéostasie cellulaire et tissulaire. Elles vont permettre de favoriser la survie cellulaire dans des conditions environnementales difficiles, comme au niveau des épithéliums respiratoire et digestif, ou dans l'acidité de l'estomac (Gendler & Spicer, 1995; Hattrup & Gendler, 2008). Leur structure particulière va leur permettre d'interagir avec le microenvironnement local à la surface des cellules. Elles vont permettre de contribuer grandement à des fonctions spécifiques de type gel-filtration, de séquestration de facteurs de croissance, de cytokines et de chimiokines (Hollingsworth & Swanson, 2004) (Figure 9). L'altération de l'expression des mucines, et notamment leur surexpression dans de nombreux cancers, est souvent associée à un mauvais pronostic. Ceci s'explique par la faible accessibilité des tumeurs dû au réseau dense de mucus et de mucines ; au réservoir à facteurs de croissance ainsi formé; et à l'augmentation des signaux de survie cellulaire transmis en intra-cellulaire.

II- La structure générale des mucines

1- Composition générale

Les mucines sont composées d'une longue chaîne polypeptidique appelé apomucine. C'est une séquence riche en résidus proline (Pro-P), sérine (Ser-S) et thréonine (Thr-T) dénommée séquence PTS, répétée de nombreuses fois et formant le domaine *Tandem Repeat* (TR), représentant 20 à 50% de la composition totale en acide aminés (Roussel *et al.*, 1988). Ces acides aminés hydroxylés comme la sérine et la thréonine permettent la liaison des chaînes O-glycosidiques sur l'apomucine. La séquence du TR est variable en nombre de résidus et en fréquence de répétition selon les organes et types cellulaire (VNTR *Variable Number Tandem Repeat*) (Vinall *et al.*, 1998).

La structure saccharique est composée de galactose (Gal), fucose (Fuc), N-acétylglucosamine (GlcNAc), N-acétylgalactosamine (GalNAc) et d'acide N-acétylneuraminique (NeuAc) (Hounsell, Lawson, & Feizi, 1982; Hounsell & Feizi, 1982). La composition des chaînes permet une grande variabilité en termes de structure, de longueur (2 à 20 résidus) et d'acidité. Les chaînes O-glycosidiques se composent de trois régions d'une composition saccharique particulière et ordonnée qui s'assemblent grâce aux glycosyltransférases dans l'appareil de Golgi (Hounsell & Feizi, 1982) :

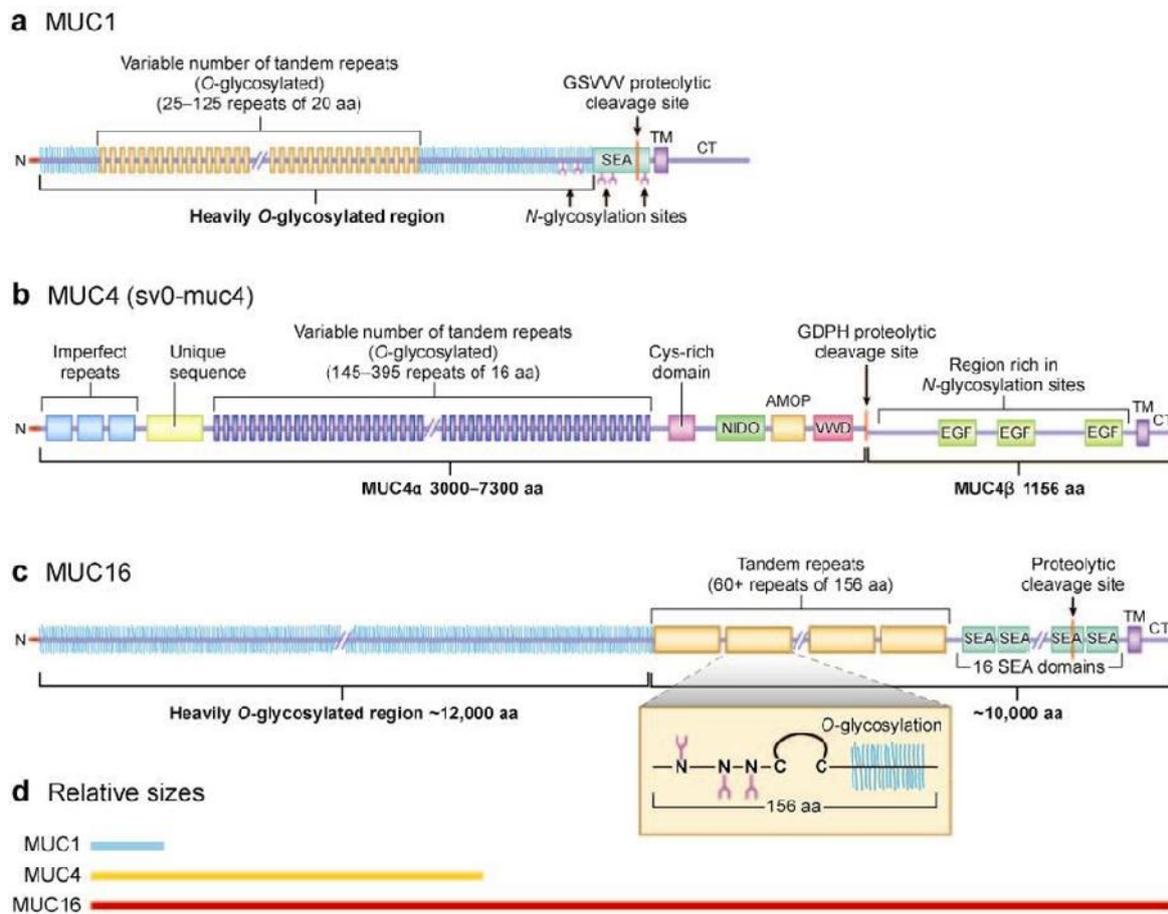


Figure 10 : Composition des mucines membranaires (Hattrup & Gendler, 2008).

- L'initiation de la O-glycosylation consiste en l'ajout d'un résidu GalNAc sur un acide aminé (aa) hydroxylé (GalNAc-O-Ser/Thr)

- Le noyau, nommé également le cœur, consiste en l'ajout d'un résidu GlcNAc ou Gal (Gal 1/GlcNAc 1-3GalNAc-O-Ser/Thr)

- Un squelette saccharique plus ou moins ramifié, formé de résidus GlcNAc et Gal répétés un grand nombre de fois Gal 1-3/4GlcNAc 1

- Une région périphérique qui termine la structure et se compose de saccharides comme le Fuc, le NeuAc ou des résidus sulfatés de GlcNAc ou de Gal. Ces saccharides confèrent les charges négatives des mucines.

Il existe également de rares sites de N-glycosylations sur les mucines, aux nombres de 5 sur la mucine MUC1. Elles se composent en plus du GlcNAc et du Gal de mannose (M). La N-glycosylation s'effectue sur un résidu asparagine.

2- Mucines sécrétées

Les particularités des mucines sécrétées sont qu'elles possèdent des régions en N-terminal et C-terminal riches en résidus Cystéine (Cys-C) ainsi qu'en N-glycannes permettant leur dimérisation en Ct et leur multimérisation en Nt par la formation de pont disulfures grâce aux domaines *CYS*, *Cystine-Knot* (CK) et *von Willebrand Factor* (vWF), avant d'être sécrétées dans la lumière des organes sous forme de long filaments (Perez-Vilar & Hill, 1999; Perez-Vilar, Sheehan, & Randell, 2003; Perez-Vilar & Mabolo, 2007). La région vWF a une homologie de domaine avec le facteur vWF, une glycoprotéine multimérique sécrétée dans le sang et essentielle à la coagulation et l'homéostasie (Hollingsworth & Swanson, 2004). Les mucines sécrétées possèdent également un domaine D, comme la mucine MUC2, lui permettant sa trimérisation.

3- Mucines membranaires

La particularité de certaines mucines membranaires comme MUC1 est l'existence d'un domaine *Sea urchin sperm protein Enterokinase and Agrin* (SEA). Le domaine SEA permet le clivage et l'association des sous-unités d'une mucine (Palmai-Pallag *et al.*, 2005; Levitin *et al.*, 2005; Macao *et al.*, 2006), (Figure 10). Certaines mucines membranaires possèdent également des domaines possédant des homologies de séquence avec le facteur de croissance à l'EGF nommé domaine conservé de type EGF, comme la mucine MUC4 par exemple

(Carraway *et al.*, 2000; Jonckheere, Skrypek, Merlin, *et al.*, 2012; Jonckheere, Skrypek, Frénois, *et al.*, 2012). Ces domaines vont permettent l'interaction des mucines avec les récepteurs tyrosine kinase de la famille ErbB. Certaines mucines membranaires comme MUC1 possèdent une queue cytoplasmique contenant des sites de phosphorylation.

4- Glycosylation et cancer

Les O-glycannes ont un rôle de protection contre les clivages protéolytiques et permettent de maintenir la conformation et la stabilité de la protéine. Ils protègent également les épithéliums des stress mécaniques et chimiques, servent de site d'attachement aux bactéries commensales et pathogènes, participent à l'adhésion et la signalisation cellulaire, à la présentation des facteurs de croissance et au système immunitaire. Certains motifs sont spécifiques des tissus et varient pendant le développement et les pathologies comme le cancer. Dans ces pathologies on retrouve fréquemment une glycosylation aberrante et une altération de la synthèse et de l'expression des O-glycannes des mucines, et notamment une terminaison d'élongation précoce (Jonckheere, Skrypek, & Van Seuning, 2010). La glycosylation aberrante des mucines peut être en partie expliquée par la perte d'expression de glycosyltransférases. On observe alors l'apparition de chaînes glycaniques tronquées constituées des antigènes T (Gal 1-3GalNAc-O-Ser/Thr), Tn (GalNAc-O-Ser/Thr) et sialyl-Tn (NeuAc 1-6-GalNAc-O-Ser/Thr).

Des études immunohistochimiques ont permis de mettre en évidence de nombreux antigènes associés aux tumeurs (TAA) sur les mucines qui sont produits suite à une synthèse incomplète ou à une néo-synthèse de chaînes sacchariques et sont caractéristiques des tumeurs. Beaucoup de TAA retrouvés sur les mucines se sont avérés être des antigènes de groupes sanguins. Ces antigènes de mucines peuvent être dosés dans le sérum des patients atteints de pathologies cancéreuses par exemple et servent de marqueurs diagnostiques, pronostiques et de cibles pour les thérapies anticancéreuses vaccinales. Les plus connus et utilisés sont le CA15.3 (carbohydre antigen 15.3) préférentiellement produit sur MUC1 et marqueur dans le cancer du sein, CA125 préférentiellement produit sur MUC16 et marqueur dans le cancer de l'ovaire. L'évolution de l'expression de ces marqueurs permet de connaître l'évolution de la pathologie et peut être un outil pour évaluer la progression ou la régression d'une tumeur suite à un traitement.

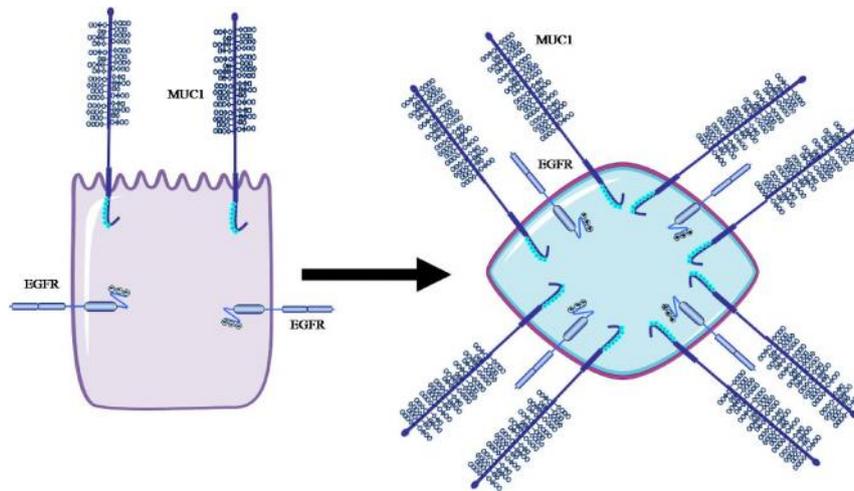


Figure 11 : Localisation cellulaire apicale de MUC1. Délocalisation circumférentielle lors de la tumorigénèse.

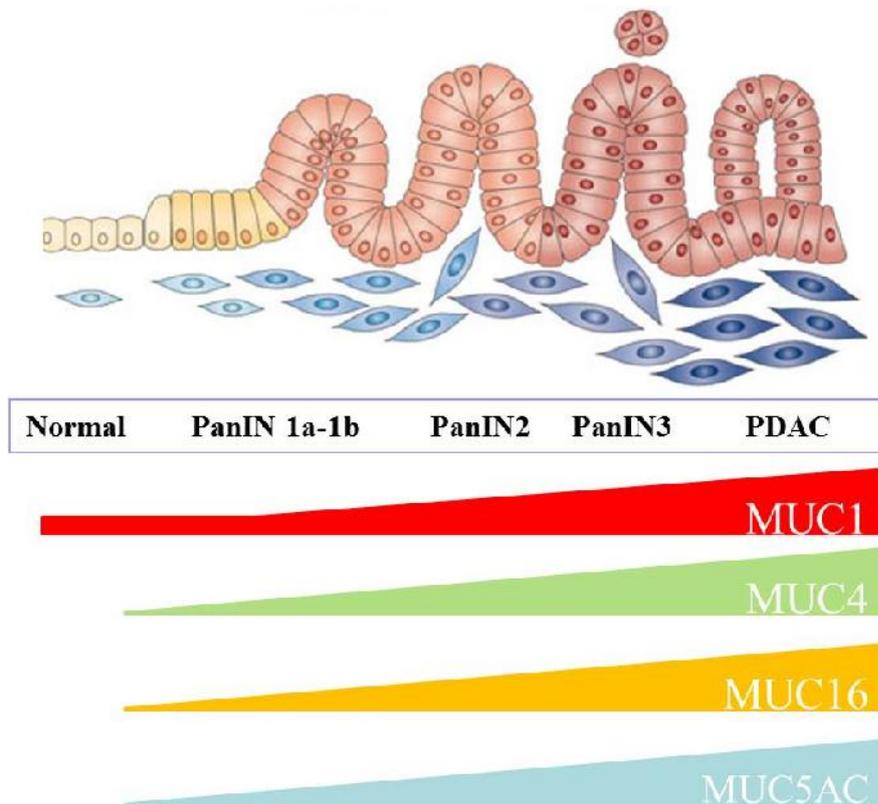


Figure 12 : Profil d'expression des mucines dans le PDAC (Jonckheere *et al.*, 2010; Morris *et al.*, 2010).

5- Territoires d'expression des mucines

a- Physiologique

Les mucines membranaires, dont MUC1, sont exprimées par de nombreuses cellules épithéliales au pôle apical dans des environnements souvent particuliers : au niveau du système respiratoire, de l'estomac, du tractus intestinal et digestif, des organes spécialisés comme le pancréas, le foie, la vessie, le rein, les glandes salivaires et lacrymales, les yeux et également au niveau de la glande mammaire, des ovaires, de l'utérus et de la prostate (Ho *et al.*, 1993). La mucine MUC1 n'est pas exprimée au niveau des cellules épithéliales de la peau et des cellules mésenchymateuses (Hanisch & Müller, 2000). En revanche, certaines cellules non épithéliales comme les lymphocytes B et T expriment MUC1 (Treon *et al.*, 1999).

b- Dans le cancer et le cancer du pancréas

Dans la majorité des cancers épithéliaux on peut retrouver une surexpression de MUC1 et une délocalisation circonférentielle et intra-cellulaire lors de la perte de polarité de la cellule pendant la progression tumorale (Figure 11). C'est notamment le cas dans 90% des adénocarcinomes du sein, des ovaires et du pancréas, dans 80% des cancers de l'estomac, dans 70% des cancers colorectaux et du rein, et enfin dans 60% des cancers du poumon (Beatson, Taylor-Papadimitriou, & Burchell, 2010).

Dans le pancréas sain la mucine MUC1 est exprimée au niveau des cellules canalaire et centro-acineuses (Ho *et al.*, 1993; Balagué *et al.*, 1995; Terada *et al.*, 1996; Hanisch & Müller, 2000; Yonezawa *et al.*, 2008). L'ARNm de MUC1 est le seul ARNm de mucine détecté dans les acinis (Balagué *et al.*, 1995). Les mucines membranaires MUC4 et MUC16 ne sont pas voire très peu exprimées, tout comme la mucine sécrétée MUC5AC. Dans l'adénocarcinome pancréatique, on retrouve dans 90% des cas une surexpression de MUC1 et une néo-expression de MUC4, MUC16 et MUC5AC (Figure 12), (Jonckheere *et al.*, 2010).

La surexpression de la mucine MUC1 et la néo-expression des mucines MUC4/MUC16/MUC5AC dès les stades les plus précoces de la cancérogenèse pancréatique (PanIN1), fait de ce cancer un modèle de choix pour l'étude des mécanismes de régulation de cette famille de protéines.

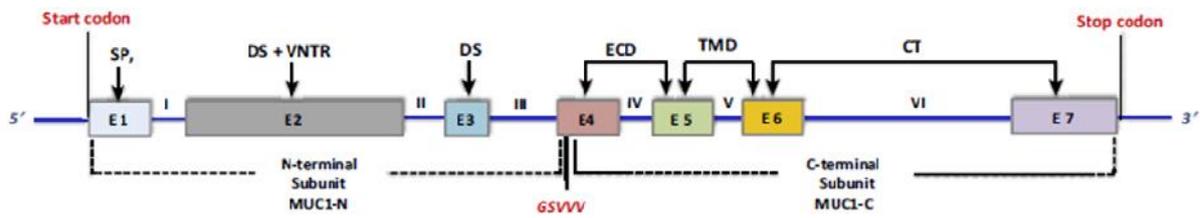


Figure 13 : Gène et transcrit de MUC1 (Nath & Mukherjee, 2014)

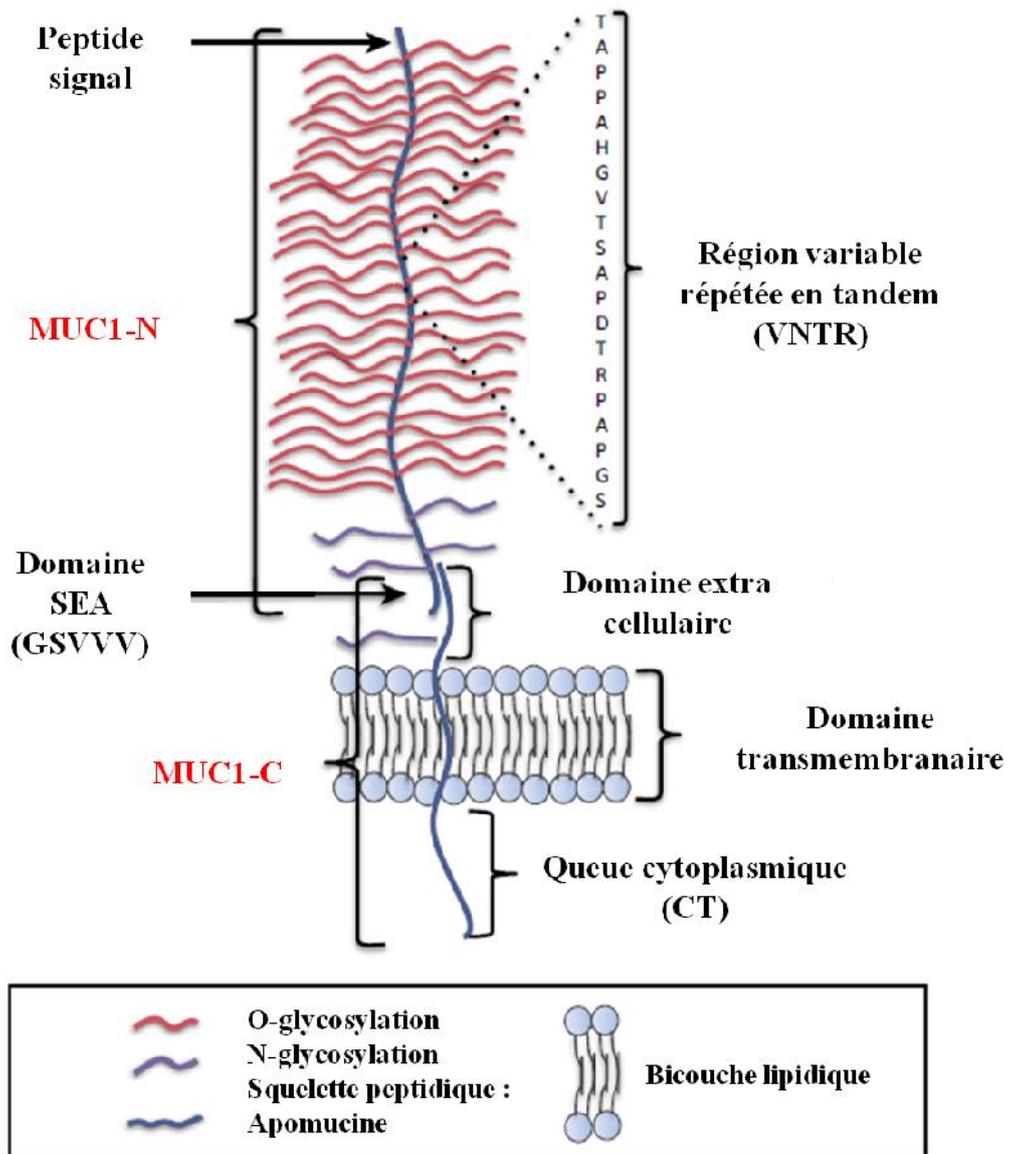


Figure 14 : Structure de MUC1 (Nath & Mukherjee, 2014).

III- La mucine MUC1

La mucine MUC1 est aussi connue sous les noms de CA15.3, *Polymorphic Epithelial Mucin* (PEM), Episialine, DUPAN-2, DF3, *Human Milk Fat Globule* (HMGF), *Epithelial Membrane Antigen* (EMA), CD227 et KL6 (Gendler & Spicer, 1995). Ces nombreux noms s'expliquent par le polymorphisme de la protéine et par l'absence d'identification du gène durant de nombreuses années.

1- Le gène et les variants de MUC1

La mucine MUC1 fut la première mucine découverte dont le gène a été caractérisé dans les années 1990 (Swallow, Gendler, Griffiths, Corney, *et al.*, 1987; Lan *et al.*, 1990; Gendler & Spicer, 1995). Le gène *MUC1* est localisé sur le chromosome 1 en q21-q24 (Swallow, Gendler, Griffiths, Kearney, *et al.*, 1987), contient 7 exons et a une taille variable de 4 à 7 kb dû à un polymorphisme important de la région VNTR allant de 400 à 2400 résidus (Lancaster *et al.*, 1990). Le gène *MUC1* est structuré en domaines. L'exon 1 code pour le peptide signal. L'exon 2 code pour le domaine central, codant une séquence répétée parfaitement en tandem de 20 acides aminés. Les exons 6 et 7 codent pour le domaine trans-membranaire et la queue cytoplasmique respectivement. MUC1 peut subir un épissage alternatif permettant de former les variants MUC1/SEC et MUC1/Y (Wreschner *et al.*, 1990). MUC1/SEC ne possède pas de domaine trans-membranaire ni de queue cytoplasmique alors que MUC1/Y résulte d'une délétion du domaine VNTR (Zrihan-Licht *et al.*, 1994), (Figure 13).

2- La structure et localisation de MUC1

a- Structure

La protéine MUC1 est composée de deux sous-unités MUC1-C et MUC1-N. MUC1-C est composée d'une partie extra-cellulaire de 58 aa, d'un domaine trans-membranaire de 28 aa et d'une queue cytoplasmique de 72 aa. MUC1-N se compose de la région répétée en tandem (VNTR) de 20 aa répétés 25 à 125 fois contenant chacun 5 sites de O-glycosylations sur les résidus sérine et thréonine. Cinq sites de N-glycosylations sont également présents à la suite du domaine VNTR, proche du domaine SEA (Figure 14). La séquence en aa du VNTR peut varier en fonction des organes et du type cellulaire conférant un grand polymorphisme. Un domaine de type SEA permet l'auto-clivage de MUC1 au niveau de la séquence FRPG/SVVV

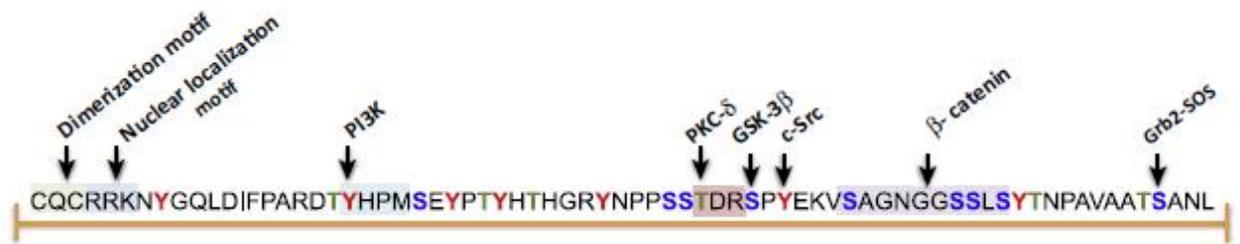


Figure 15 : Séquence de MUC1-C (Nath & Mukherjee, 2014).

à la limite du domaine trans-membranaire (Parry *et al.*, 2001; Levitin *et al.*, 2005; Macao *et al.*, 2006). Ce clivage est effectué dans le réticulum endoplasmique et permet d'obtenir les deux sous-unités de MUC1 (Figure 14).

La sous-unité MUC1-N est extra-cellulaire et peut être relarguée dans la circulation, en condition physiologique et pathologique et laisse la seconde sous-unité de MUC1 à la membrane. MUC1-C peut être considérée comme un « mini-récepteur », senseur de stress environnants. Les deux sous-unités peuvent également interagir par une liaison non covalente. La présence d'un site d'adressage dans le domaine extra-cellulaire et d'un motif CQC localisé à la jonction entre le domaine trans-membranaire et la queue cytoplasmique de MUC1 permet sa localisation cellulaire apicale et sa dimérisation (CQC) (Pemberton *et al.*, 1996). La queue cytoplasmique de MUC1 contient 7 résidus tyrosines phosphorylables, un domaine de type SH2 et de nombreux sites d'interactions avec ses partenaires. Contrairement aux autres mucines membranaires, MUC1 ne possède pas de domaine EGF ni de domaine de polymérisation. La partie MUC1-C peut subir également des clivages et être localisée en intra-cellulaire. Cette délocalisation de MUC1-C est considérée comme un marqueur de cancérogénèse.

b- Localisation intra-cellulaire

En condition physiologique la mucine MUC1 est exprimée exclusivement au niveau membranaire. En condition pathologique, la partie MUC1-C peut être internalisée par endocytose par un mécanisme dépendant des clathrines et impliquant la fixation de l'adaptateur AP-2 sur le domaine YHPM, et de *Growth factor receptor-bound protein 2* (GRB2) sur le domaine YTNP. Le recyclage de MUC1 à la membrane plasmique est possible par palmitoylation des cystéines du domaine CQC de MUC1 (Kinlough *et al.*, 2004, 2006). La protéine MUC1-C peut être ensuite adressée au niveau nucléaire faisant de MUC1-C un co-activateur majeur de la transcription de nombreux gènes par interaction avec de nombreux partenaires tel que la β -caténine (Li *et al.*, 2001; Wen *et al.*, 2003), p120 caténine (Liu *et al.*, 2014), P53 (Wei, Xu, & Kufe, 2005), et le récepteur aux oestrogènes ER- car MUC1 ne possède pas de domaine de fixation à l'ADN (Singh & Hollingsworth, 2006) (Figure 15). Cependant, MUC1-C peut également être transloquée au noyau sous forme d'homodimère par la dimérisation de son domaine CQC. Ce mécanisme est possible grâce à l'interaction *via* le motif de localisation nucléaire RKK avec l'importine- β et la translocation nucléaire par la nucléoporine 62 (Leng *et al.*, 2007). L'internalisation de MUC1-C lui permet également

d'être localisée à la mitochondrie par les chaperonnes du complexe HSP70/HSP90 afin d'avoir un rôle anti-apoptotique (J. Ren *et al.*, 2006; Kufe, 2013).

3- Fonctions multiples de MUC1

MUC1 joue un rôle dans différentes propriétés cellulaires comme la prolifération la différenciation cellulaire, la survie, l'adhésion et la signalisation cellulaire. Ces différents rôles ont notamment été montrés *via* l'utilisation d'un modèle murin transgénique déficient en MUC1 (MUC1^{-/-}) comparé au modèle *wild-type* (MUC1^{+/+}) (Spicer *et al.*, 1995). Pour l'étude de son rôle dans le PDAC, un modèle murins triple transgénique mimant une cancérogenèse pancréatique est rendu déficient en MUC1 dans le pancréas (Tinder *et al.*, 2008; Besmer *et al.*, 2011). De ce modèle murin, des lignées murines knock-out pour MUC1 (KCKO) ont été utilisées en comparaison avec leur contrôle (KCM) dans de nombreuses expériences afin de comprendre le rôle de MUC1 dans la cancérogenèse pancréatique et sont à l'origine d'une partie des propriétés de MUC1 qui vont être décrites (Besmer *et al.*, 2011). Des études dans le cancer du sein essentiellement (Kufe *et al.*, 2013), du poumon ou du rein sont également des modèles particulièrement intéressant pour étudier les fonctions de MUC1.

a- Adhésion et anti-adhésion

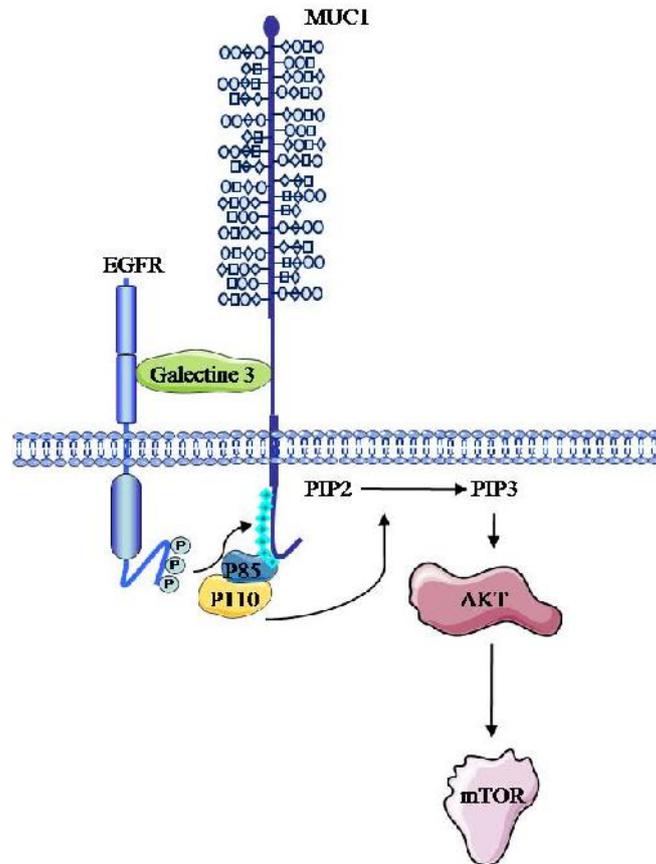
La mucine MUC1 possède à la fois des propriétés adhésives et anti-adhésives. En condition physiologique, la localisation apicale de MUC1 dont l'apomucine mesure de 200 à 500 nM (Bramwell, Wiseman, & Shotton, 1986) favoriserait les interactions cellulaires et avec la MEC. En condition pathologique, la surexpression et surtout la délocalisation circonférentielle de MUC1 bloqueraient les interactions cellulaires et les interactions avec la MEC à cause de son domaine extra-cellulaire (Hollingsworth & Swanson, 2004). En contrepartie, la structure de MUC1 et sa composition glycanique favorisent son interaction avec les molécules d'adhésion telles que *Inter Cellular Adhesion Molecule* (ICAM-1) et la E-sélectine, dont le phénomène est important dans les mécanismes invasifs et métastatiques.

b- Interaction avec les récepteurs tyrosine kinase.

i- La famille ErbB : prolifération et survie

Le complexe MUC1-N et MUC1-C est exprimé au pôle apical des cellules épithéliales polarisées. De la même manière en condition physiologique, les récepteurs à activité tyrosine

A



B

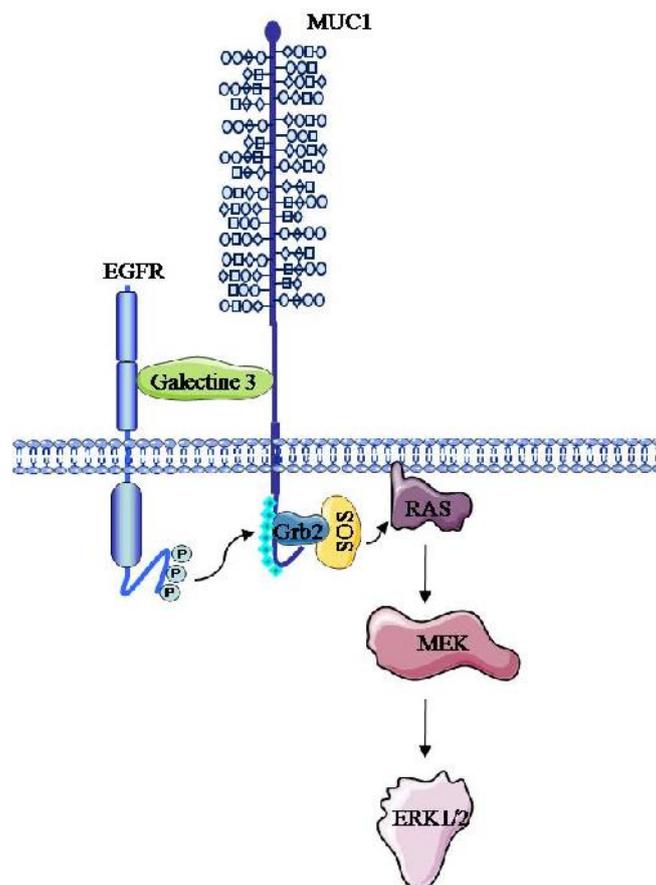


Figure 16 : Interaction MUC1 et RTK.

(A) Voie PI3K/Akt.

(B) Voie MAPK.

kinase (RTK) comme la famille des récepteurs ErbB sont dans ces conditions exprimés au pôle baso-latéral. Lors de la perte de polarité des cellules épithéliales dans certaines pathologies cancéreuses ou en cas de stress par exemple, MUC1 et l'EGFR sont délocalisés et repositionnés sur l'entièreté de la cellule. La glycosylation de l'Asn-36 situé au niveau de la partie C-terminale extra-cellulaire de MUC1 permet la fixation de la galectine-3, une lectine endogène dérégulée dans les pathologies cancéreuses, dont notamment dans le PDAC (Merlin *et al.*, 2011). Cela va permettre la formation d'un pont entre MUC1 et l'EGFR (Ramamamy *et al.*, 2007), (Figure 16). Le motif YEKV situé au niveau de la queue cytoplasmique de MUC1 est un substrat de phosphorylation pour l'EGFR, permettant l'activation des voies MAPK (Schroeder *et al.*, 2001) et de survie cellulaire comme la voie PI3K-Akt (Raina, Kharbanda, & Kufe, 2004) ; le motif YEKV étant un site de fixation de *c-Src Src homology domain 2* c-Src-SH2. La phosphorylation de MUC1 sur le site YTNP permet également l'activation de la voie MAPK par la fixation de Grb2-Sos (Kufe, 2013), (Figure 16). De plus, il a été montré que l'expression de MUC1 régule la dégradation de l'EGFR en diminuant son ubiquitination et en augmentant son recyclage et son internalisation (Kufe, 2013). Des travaux du laboratoire ont montré que MUC1 et l'EGFR forment un complexe en intra-cellulaire, co-immunoprecipitent et colocalisent au niveau cytoplasmique et nucléaire (Merlin *et al.*, 2011).

ii- Autres RTK

MUC1 peut également interagir avec d'autres RTK comme ErbB2, ErbB3 et ErbB4 (Schroeder *et al.*, 2001), le *fibroblast growth factor receptor 3* (FGFR3) (Jian Ren *et al.*, 2006), le *Platelet-derived growth factor receptor* (PDGFR-) (Singh *et al.*, 2007) et l'*hepatocyte growth factor receptor* (HGFR/c-Met) (Singh *et al.*, 2008). L'activation du FGFR3 permet la phosphorylation de MUC1 sur le résidu Tyr-46 et induit la signalisation par SRC (Jian Ren *et al.*, 2006).

L'activation du récepteur Met permet la phosphorylation de MUC1 sur la Tyr-20. La phosphorylation du motif YHPM permet l'interaction de MUC1 avec la sous-unité p85 de PI3K mais facilite également l'interaction de MUC1 et de P53. La phosphorylation de MUC1 par le récepteur Met a plutôt un rôle sur la motilité et l'invasion cellulaire médiés par P53 et la régulation de la métalloprotéase matricielle MMP1 (Singh *et al.*, 2008).

Enfin, l'activation du PDGFR- permet la phosphorylation de MUC1 sur les résidus Tyr-20 et Tyr-35, permettant à MUC1 d'avoir un rôle dans l'invasion cellulaire (Singh *et al.*, 2007) (Figure 16).

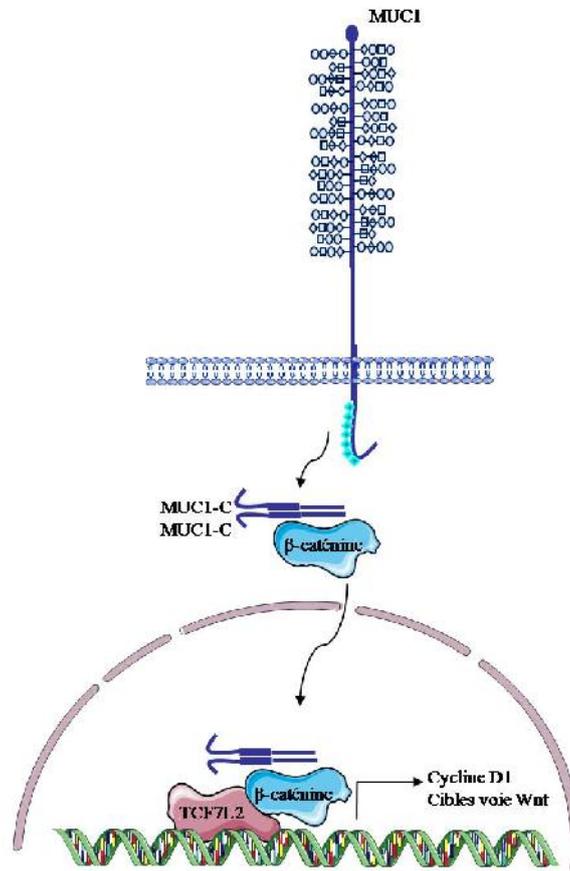


Figure 17 : Interaction de MUC1 et de la voie Wnt/ β -caténine.

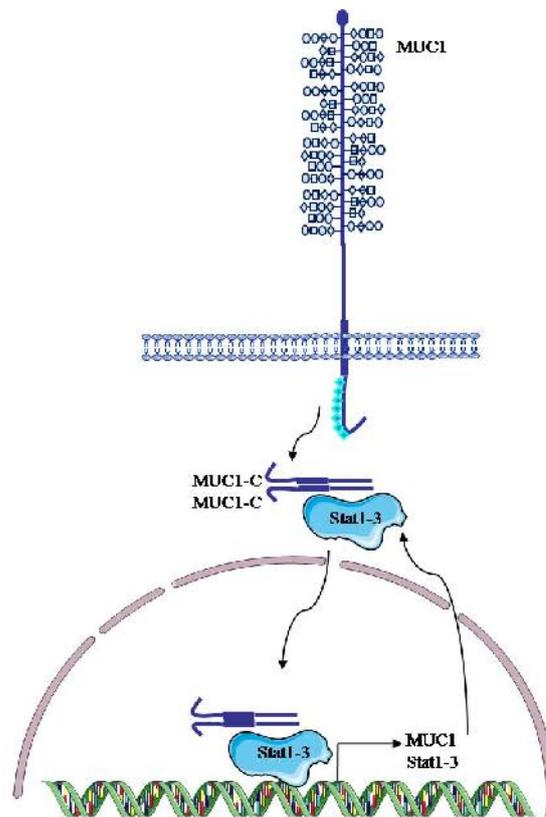


Figure 18 : Interaction de MUC1 et de Stat1-3.

c- La voie Wnt/ -caténine

La voie Wnt/ -caténine est importante pour le développement et est couramment utilisée par les cellules cancéreuses dont les cellules cancéreuses pancréatiques (Zavoral *et al.*, 2011; Anastas & Moon, 2013). Il a été montré que MUC1-C pouvait interagir avec la -caténine au niveau du motif SAGNGGSSLS dans le cytoplasme de la cellule afin de stabiliser l'expression de la -caténine en bloquant son interaction avec la *Glycogen synthase kinase 3* (GSK3-) (Yamamoto *et al.*, 1997; Huang *et al.*, 2003). Le complexe MUC1-C/ -caténine est ensuite transloqué au niveau nucléaire afin d'interagir avec TCF7L2 et de permettre la transcription des cibles de la voie Wnt/ -caténine comme notamment la cycline D1 et d'augmenter dans ce cas la prolifération cellulaire (Rajabi *et al.*, 2012), (Figure 17).

d- La voie de Stat1-3

Les facteurs de transcription de la famille des *Signal transducer and activator of transcription* et notamment Stat1, 3 et 5 sont majoritairement impliqués dans de nombreuses pathologies cancéreuses (Yu & Jove, 2004). Il a été montré que MUC1-C était capable d'interagir avec Stat1 afin de transcrire les cibles de la voie Stat, dont fait également partie MUC1 grâce à l'existence d'élément de réponse Stat au niveau de son promoteur (Khodarev *et al.*, 2010). De façon similaire MUC1-C peut interagir avec Jak1 et Stat3 afin de transcrire les cibles de Stat3 comme la cycline D1, MUC1 et Stat3 lui-même (Ahmad *et al.*, 2011). Ces interactions entre MUC1 et la voie des Stat ont été liées à une diminution de la survie dans le cancer du sein notamment et à un lien avec une réponse inflammatoire à l'interleukine 6 (IL-6). De plus, l'implication de MUC1 dans la réponse inflammatoire liée aux Stat a permis de mettre en évidence le rôle de MUC1 dans l'augmentation des propriétés invasives et métastatiques des cellules cancéreuses infectées par le virus *Epstein-Barr virus* (EBV) par l'induction de son expression par *Latent protein 1* (LMP1/Stat1-3) (Kondo *et al.*, 2007) (Figure 18).

e- La voie NF- B

Le *nuclear factor-kappa B* (NF- B), est un homodimère ou hétérodimère composé des sous-unités RelA-p65, RelB, c-Rel, NF- B1-p50 et NF- B2-p52. C'est un facteur de transcription ubiquitaire impliqué dans la prolifération et la survie cellulaire. Il a été montré que MUC1 était capable d'interagir avec *inhibitor of nuclear factor kappa-B kinase* IKK- et

IKK- afin de favoriser le relargage de p65 et son association avec MUC1-C (Ahmad *et al.*, 2007, 2009). De plus il a été mis en évidence une association de p65/MUC1-C au niveau du promoteur des gènes cibles de p65 dont notamment *B-cell lymphoma-extra large* (Bcl_{-XL}) et MUC1, afin de favoriser la survie cellulaire (Ahmad *et al.*, 2007, 2009).

f- Métabolisme et hypoxie

Le métabolisme du glucose est couramment utilisé par les cellules cancéreuses pour leur prolifération et leur survie et notamment dans un contexte hypoxique. Il a été démontré que la mucine MUC1 est capable d'interagir physiquement avec le facteur *hypoxia inducible factor* HIF1- , un régulateur clé de la glycolyse (Aubert *et al.*, 2009; Chaika *et al.*, 2012). MUC1 va permettre de stabiliser le facteur HIF1- et va servir de co-activateur transcriptionnel pour induire l'expression des gènes de la glycolyse dans un contexte hypoxique afin de favoriser la survie et la prolifération. En parallèle, il a également été montré que MUC1 était une cible de HIF1- dans le cancer du rein (Aubert *et al.*, 2009).

g- Mort cellulaire apoptotique

MUC1-C va pouvoir directement interagir par son domaine CQC avec *Bcl-2-associated X protein* (Bax) une protéine pro-apoptotique *via* son domaine BH3 au niveau de la Cys-62 (Ahmad *et al.*, 2012), séquestrant ainsi Bax, bloquant le relargage du cytochrome c et empêchant l'activation des caspases 3 & 9, favorisant ainsi la survie cellulaire. MUC1 peut également favoriser l'expression de Bcl_{-XL}, une protéine anti-apoptotique par un mécanisme dépendant de la voie PI3K-Akt ou de NF- B pour favoriser encore la survie cellulaire (Raina *et al.*, 2004; Ahmad *et al.*, 2009).

MUC1-C est capable d'inhiber l'expression de P53 en interagissant avec le facteur de transcription *Kruppel-like factor 4* (KLF4) au niveau des éléments de réponse PE21 du promoteur de P53 (Wei, Xu, & Kufe, 2007). Inversement, MUC1-C peut également interagir avec P53 afin de permettre l'arrêt de la croissance cellulaire et de favoriser la survie cellulaire dans un contexte génotoxique en favorisant l'expression de P21 et en diminuant l'expression de Bax (Wei *et al.*, 2005).

Dans un second temps il a également été montré que MUC1 pouvait bloquer la mort cellulaire en réponse aux dommages à l'ADN. MUC1 va interagir avec la tyrosine kinase

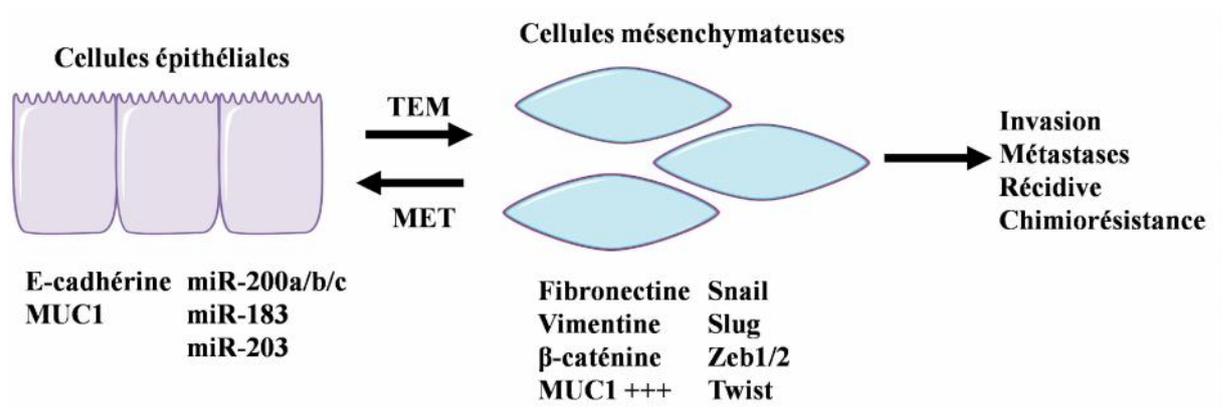


Figure 19 : MUC1 et TEM (Wang *et al.*, 2011).

Abelson murine leukemia viral oncogene (c-Abl) lorsque celle-ci phosphoryle MUC1 au niveau de la tyrosine Y793 (motif YXXP), séquestrant ainsi c-Abl dans le cytoplasme et inhibant son import nucléaire (Raina *et al.*, 2006).

h- La TEM

Les mucines sécrétées sont des marqueurs de différenciation épithéliale terminale. La mucine MUC2 est par exemple utilisée comme marqueur de différenciation intestinale des cellules caliciformes et MUC1 comme marqueur phénotypique épithélial dans de nombreux tissus. Cependant, il a pu être mis en évidence dans le PDAC (Roy *et al.*, 2011) et le cancer du rein (Gnemmi *et al.*, 2014) que la surexpression aberrante de MUC1 était liée à une augmentation du processus de TEM (Figure 19), à une augmentation des propriétés invasives et métastatiques des cellules pancréatiques et à l'augmentation de l'expression de marqueurs mésenchymateux comme la Vimentine, Snail et Slug et à une diminution de l'expression de marqueurs épithéliaux comme la E-cadhérine. Il a également été montré une co-régulation positive de MUC1 et Snail *via* la voie Wnt/ -caténine dans le cancer du rein (Gnemmi *et al.*, 2014).

De manière plus récente il a été montré que MUC1 était capable d'interagir avec le facteur *Zinc finger E-box-binding homeobox 1* (Zeb1) afin de réprimer l'expression du cluster miR-200c/141, une famille de miARN dont l'implication a été montrée dans les processus de TEM (Kalluri & Weinberg, 2009; Wellner *et al.*, 2009; Xia *et al.*, 2010; Rajabi *et al.*, 2013).

IV- La régulation génique et épigénétique de MUC1

1- La régulation du promoteur de MUC1

Le promoteur de *MUC1* (3000 pb) est riche en nucléotides GC et contient une boîte TATA 25 nucléotides avant le site d'initiation de la transcription (Abe, Siddiqui, & Kufe, 1989). La transcription de *MUC1* peut être induite par différents facteurs de transcription tels que *Specificity Protein 1 transcription factor* (Sp1), *Activator Protein-1* (AP1), *Nuclear Factor-1* (NF-1), *Tumor Necrosis Factor* (TNF), l'interféron, l'ER, STAT3 et les facteurs GATA dont notamment GATA3 (Abe *et al.*, 1989; Abba *et al.*, 2006; Jonckheere & Van Seuning, 2010). La région -743/-1 a été montrée suffisante pour induire l'activité

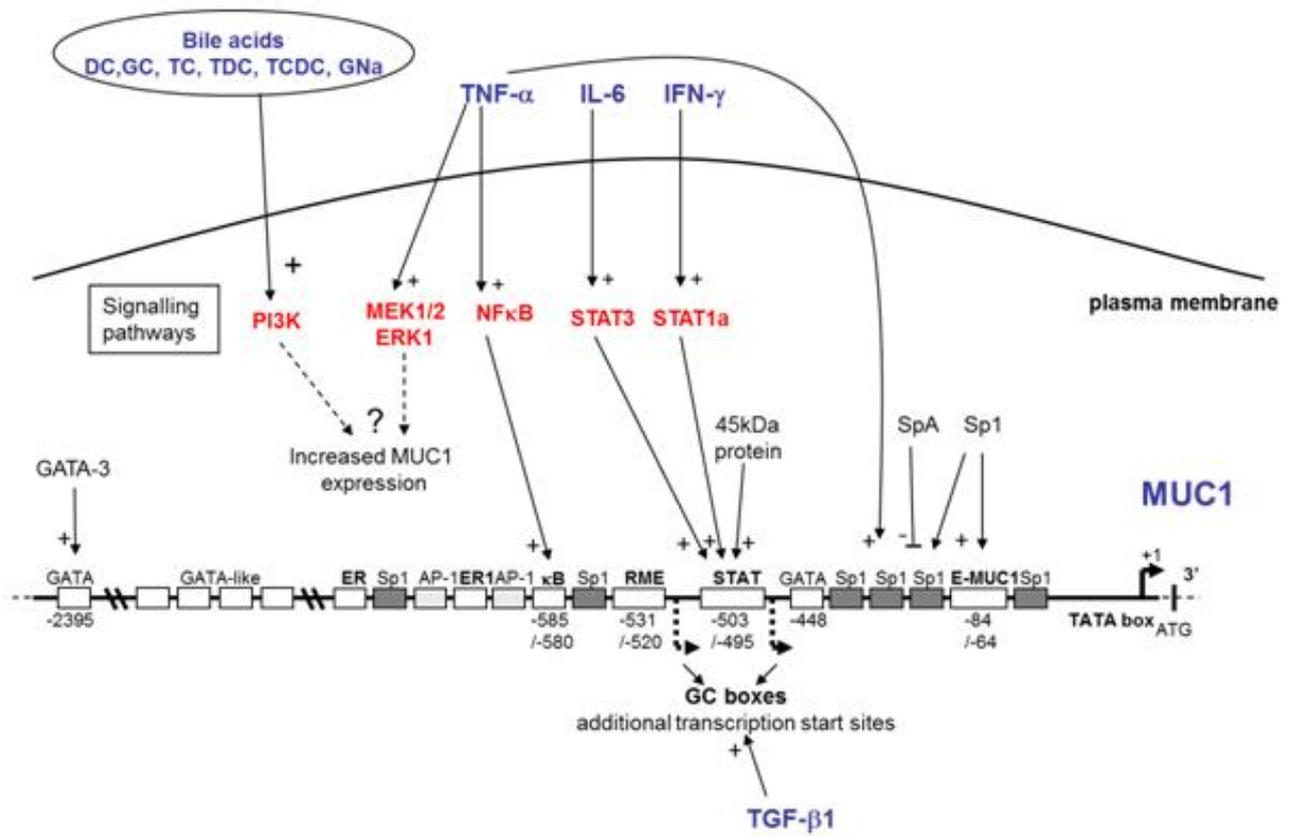


Figure 20 : Régulation de la région promotrice de *MUC1* (Jonckheere & Van Seuning, 2010).

minimale de transcription pour exprimer MUC1. La région -150/-60 contient un élément de réponse à SP1 et une E-box appelée E-MUC1 (-86/-64) importante pour son expression tissulaire (Kovarik *et al.*, 1993) (Figure 20).

2- La régulation épigénétique

Le terme épigénétique définit l'ensemble des modifications d'expression d'un gène héritable mitotiquement et/ou méïotiquement et qui n'entraîne pas de changement dans la séquence nucléotidique de l'ADN (Jones & Baylin, 2002). Les mécanismes épigénétiques comprennent :

- La méthylation de l'ADN qui consiste en l'ajout d'un groupement méthyle -CH₃ sur le carbone 5 des cytosines contenues dans un contexte dinucléotidique particulier, les îlots CpG. Ces dinucléotides CpG sont inégalement répartis au sein du génome humain mais sont retrouvés préférentiellement dans l'extrémité 5' des gènes au niveau des régions promotrices. Cette méthylation s'effectue par des *DNA méthyltransférases* (DNMT) et le profil de méthylation est maintenu au cours des divisions cellulaires. Lors de la cancérogenèse, le profil de méthylation des gènes varie : il est observé une hypométhylation globale des oncogènes avec une hyperméthylation locale sur les promoteurs de certains gènes suppresseurs de tumeurs entraînant alors une modification de la transcription (Kanwal & Gupta, 2011).

- Les modifications des histones qui sont réversibles et médiées par les histones acétyltransférases (HAT) et les histones désacétylases (HDAC). Ces modifications vont influencer l'état de la chromatine et favoriser, ou inhiber, la transcription des gènes (Kanwal & Gupta, 2011).

- La régulation par les micro-ARN (miARN). Les miARN sont de petits ARN non codants de 18 à 25 nucléotides génétiquement codés. Ils ont la capacité de réguler l'expression des gènes au niveau post-transcriptionnel (Bartel, 2004).

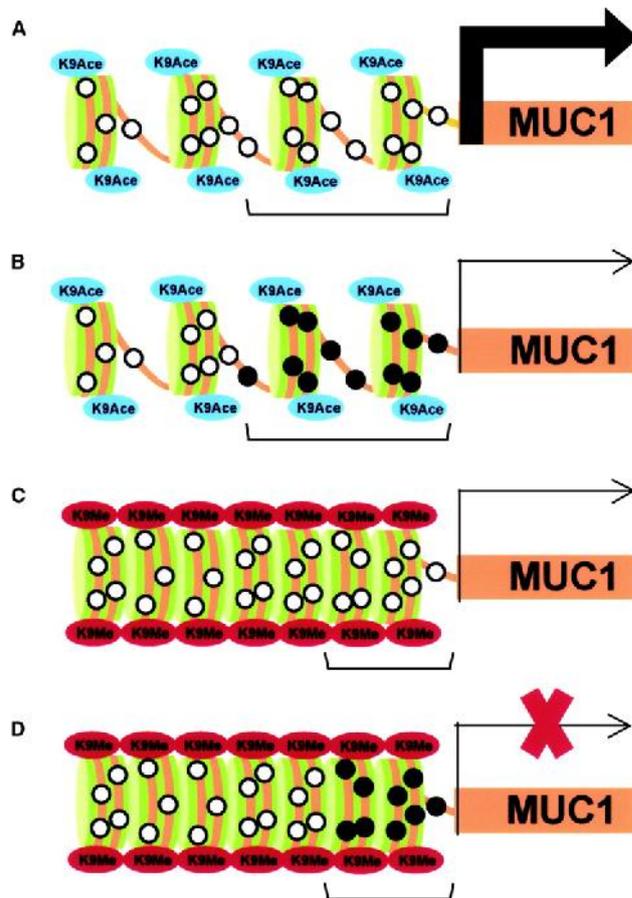


Figure 21 : Régulation de *MUC1* par méthylation (Yamada *et al.*, 2008).

(A) Déméthylation de l'ADN, déméthylation de l'histone H3-K9, acétylation de l'histone H3-K9 : forte expression de *MUC1* (ex : lignées MCF-7, HPAFII)

(B) Légère méthylation du promoteur de *MUC1*, déméthylation de l'histone H3K9, acétylation de l'histone H3K9 : expression de *MUC1* (ex : lignée Panc-1)

(C) Déméthylation de l'ADN, méthylation de l'histone H3K9 : faible expression de *MUC1* (ex : lignée LS174T)

(D) Méthylation de l'ADN et de l'histone H3K9 : pas d'expression de *MUC1* (exemple : lignées MDA-MB-453, Caco2)

a- Par méthylation et acétylation des histones

Le gène *MUC1* est caractérisé par la présence d'une région répétée en tandem de 60 paires de bases riche en îlots CpG (184 sites) (Yamada *et al.*, 2011). L'étude de lignées exprimant ou non *MUC1* dans des modèles cellulaires de cancer du pancréas, du sein ou du côlon a permis de mettre en évidence que 9 de ces sites proches du site d'initiation de la transcription étaient liés à l'expression de *MUC1* (Zrihan-Licht *et al.*, 1995). Les analyses épigénétiques ont mis en évidence que *MUC1* était régulée par méthylation de son promoteur et de la lysine 9 de l'histone H3 (H3K9) ainsi que par acétylation de l'H3K9 (Yamada *et al.*, 2008, 2011). Il a ainsi pu être mis en évidence 4 niveaux de régulation épigénétique de *MUC1* selon son taux d'expression. On retrouve une forte expression de *MUC1* lors de la déméthylation de son promoteur et de l'acétylation de l'H3K9, une expression modérée soit avec l'apparition de sites de méthylation sur les îlots CpG soit par méthylation de l'H3K9 et une non expression lors de la méthylation du promoteur et de l'H3K9 (Yamada *et al.*, 2008), (Figure 21).

b- Par les miARN

A ce jour, trois miARN ont été identifiés comme inhibant l'expression de la mucine *MUC1*. Le miR-145 inhibe *MUC1* et diminue l'invasion et le potentiel métastatique de lignées cancéreuses mammaires humaines (Sachdeva & Mo, 2010) et ovariennes (H. Wu *et al.*, 2013) et ce miARN est majoritairement décrit comme un miARN suppresseur de tumeur. Le miR-1226 inhibe *MUC1*, diminue la survie, la croissance cellulaire et induit l'apoptose par perte du potentiel de membrane mitochondrial (Jin, Rajabi, & Kufe, 2010). Le miR-125b inhibe *MUC1*, diminue la croissance, la survie cellulaire et induit l'apoptose en augmentant les dommages à l'ADN (Rajabi *et al.*, 2010).

Les autres membres de la famille des mucines ont également été associés à une régulation par les miARN. C'est notamment le cas de la mucine membranaire *MUC4* qui est régulée dans le PDAC par deux miARN ayant un rôle suppresseur de tumeur les miR-219-1-3p et le miR-150 (Srivastava *et al.*, 2011; Lahdaoui *et al.*, 2014). De manière plus récente, les mucines membranaires *MUC4* et *MUC16* ont été identifiées comme deux cibles du miR-200c qui va se fixer au niveau de leur région codante dans le PDAC (Radhakrishnan *et al.*, 2013).

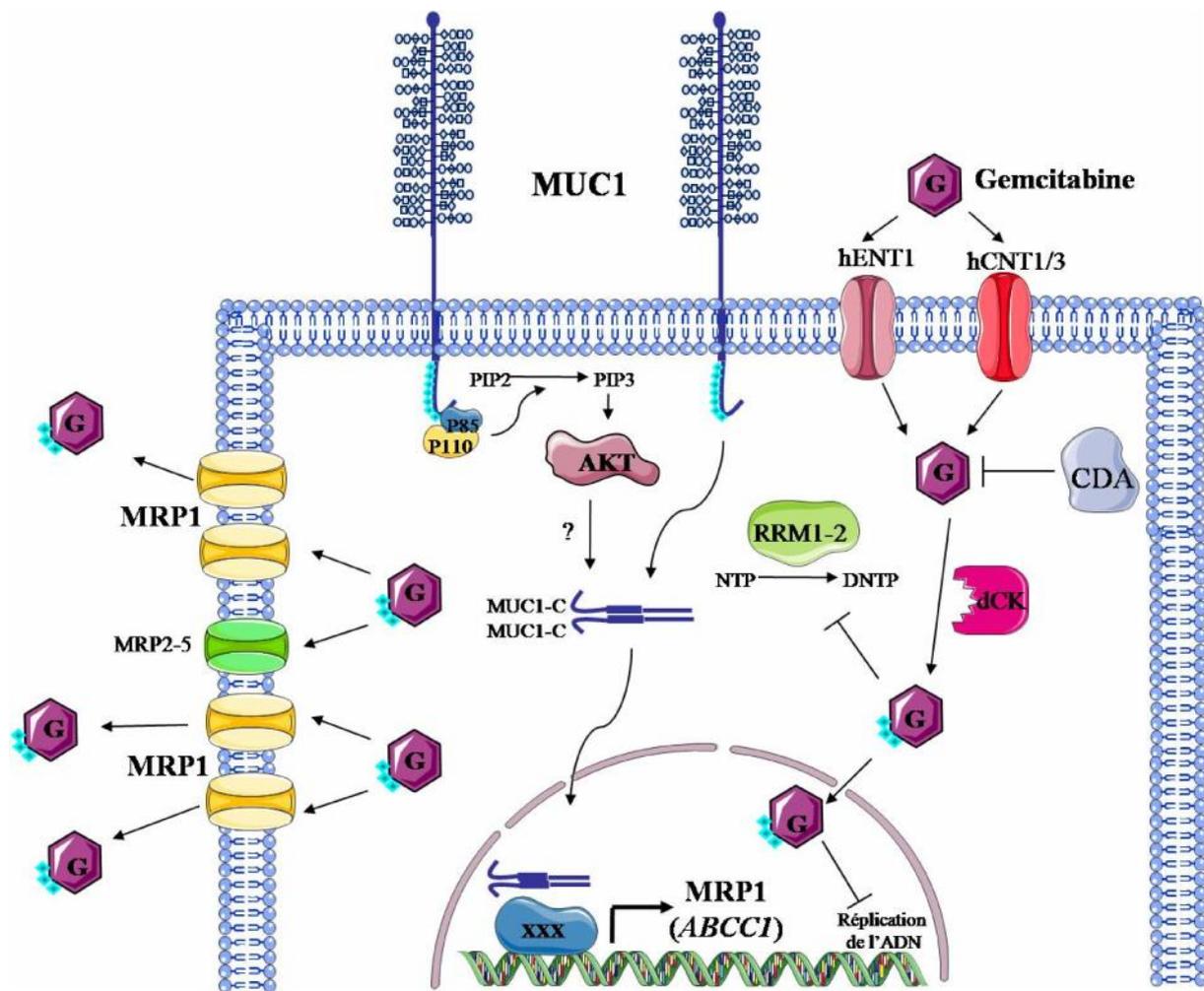


Figure 22 : Mécanisme de chimiorésistance à la gemcitabine lié à MUC1.

MUC1-C agit comme co-facteur transcriptionnel du gène *ATP-binding cassette (ABC) transporters* (ABCC1) et favorise l'expression du canal détoxifiant MRP1 via deux mécanismes l'un dépendant de la voie PI3K-AKT et le second indépendamment. Le facteur de transcription n'a pas encore été identifié. Ce mécanisme favorise le relargage extracellulaire de la gemcitabine et la chimiorésistance.

hCNT1/3 : human Concentrative Nucleoside Transporter 1/3 ; hENT1 : human Equilibrative Nucleoside Transporter 1 ; dCK : désoxycytidine kinase ; RRM1/2 : Ribonucléotide Réductase 1 et 2 ; CDA : Cytidine Désaminase ; NTP : Nucléoside Triphosphate ; dNTP : désoxynucléotide triphosphate ; MRP : Multidrug Resistance-related Protein.

c- La régulation des miARN par MUC1

En plus de la régulation des mucines par les miARN, il a été montré que la mucine MUC1 a la capacité de réguler l'expression des miARN. Il a notamment été mis en évidence que MUC1-C pouvait agir comme co-facteur transcriptionnel des miARN de la famille miR-200c. Dans un premier temps, MUC1-C interagit avec la sous-unité p65 de NF- B et favorise la transcription de Zeb-1 ; et dans un second temps MUC1-C interagit avec Zeb-1 afin de bloquer la transcription du miR-200c/141 afin de favoriser la TEM et l'invasion cellulaire (Rajabi *et al.*, 2013).

V- Rôles des mucines dans la chimiorésistance

1- Rôle général

De par leur structure et leur composition, il est proposé une implication des mucines dans la chimiorésistance des cancers épithéliaux (Jonckheere *et al.*, 2014). L'encombrement stérique entraîne notamment le masquage d'épitopes antigéniques, diminue l'accès aux tumeurs des cellules immunitaires et bloque l'accès des molécules anti-cancéreuses à leur cible comme par exemple les récepteurs tyrosine kinase (van de Wiel-van Kemenade *et al.*, 1993). Les charges négatives des mucines entraînent des interactions électrostatiques avec les molécules chargées positivement comme avec la gemcitabine, et diminue ainsi leur diffusion au sein des cellules (Khanvilkar, Donovan, & Flanagan, 2001). L'augmentation de la densité du mucus limite également la diffusion des molécules par la formation d'un maillage peu pénétrable (Jonckheere *et al.*, 2014).

2- Les mucines membranaires

a- MUC1

La surexpression de MUC1 est impliquée dans la chimiorésistance des cellules cancéreuses pancréatiques à la gemcitabine. Il a été mis en évidence que MUC1-C pouvait agir comme co-facteur transcriptionnel du gène *ATP-binding cassette (ABC) transporters* (ABCC1), et ainsi favoriser l'expression du canal détoxifiant MRP1 via deux mécanismes l'un dépendant de la voie PI3K-AKT et le second indépendamment (Figure 22) (Nath *et al.*, 2013). Néanmoins le facteur de transcription avec lequel MUC1-C interagit pour augmenter la transcription du gène *ABCC1* n'est pas encore identifié. Une surexpression des canaux détoxifiants MRP3/5 et MDR1 est également observé lors de la surexpression de MUC1.

La surexpression de MUC1 semble également être impliquée dans la réponse à l'Herceptine dans le cancer du sein (Fessler *et al.*, 2009). La surexpression de MUC1 est corrélée à une résistance aux drogues de chimiothérapie dérivées de platine dans le cancer de l'ovaire (Takano *et al.*, 2004; D. Zhang *et al.*, 2013). L'inhibition de MUC1 sensibilise également les cellules au cisplatine (Ren *et al.*, 2004) et au tamoxifène (Kharbanda *et al.*, 2013). L'inhibition de la O-glycosylation des mucines par le benzyl-alpha-GalNAc sensibilise les cellules cancéreuses pancréatiques au 5-Fu (Kalra & Campbell, 2007, 2009).

b- MUC4

Il a été montré au laboratoire que l'inhibition de l'expression de la mucine MUC4 dans les cellules cancéreuses pancréatiques humaines Capan-2 et Capan-1 permettait de sensibiliser ces cellules à la gemcitabine par l'activité de la voie NF- κ B et la régulation de l'expression du transporteur hCNT-1 (Skrypek *et al.*, 2013).

3- Les mucines sécrétées

Les mucines sécrétées comme MUC2, MUC5AC et MUC5B sont impliquées dans la résistance au 5-Fu et au méthotrexate dans les cellules de carcinome colorectal HT29 (Leteurtre *et al.*, 2004). Les études cliniques réalisées par la suite ont pu mettre en évidence une faible réponse aux traitements dans les cancers de type mucineux (Oberholzer *et al.*, 2012).

VI- MUC1 et thérapies anti-cancéreuses

La protéine MUC1 est surexprimée dans de nombreux cancers et elle est impliquée dans la majorité des voies de signalisation. En 1999, il était déjà estimé que la surexpression de MUC1 pouvait être détectée dans 72% des nouveaux cas de cancers et dans 66% des cas de décès par cancer (Greenlee *et al.*, 2001; Beatson *et al.*, 2010). En 2009, il était estimé que sur 1 400 000 tumeurs diagnostiquées aux Etats-Unis, 900 000 surexprimaient MUC1 ce qui représente environ 64% des cas (Donald W. Kufe, 2009). L'hypothèse proposée était d'utiliser MUC1 comme marqueur universel de malignité. Dans ce sens, depuis le lien entre MUC1 et le cancer du sein établi dans les années 1980 (Arklie *et al.*, 1981), de nombreux essais cliniques sont en cours, dont des essais de phase III ; mais à ce jour aucune thérapie visant MUC1 n'est utilisée couramment en clinique. L'exception étant l'établissement du

caractère malin de certaines tumeurs diagnostiquées grâce à la délocalisation intra-cellulaire de MUC1 lors de réalisation de cytoponction à l'aiguille fine (Monges *et al.*, 1999).

1- Anticorps monoclonaux

La partie MUC1-N peut être relarguée dans la circulation et est retrouvée à des concentrations importantes dans le plasma de patients atteints de cancer et notamment de cancer du sein métastatique (dosage du CA-15.3 en clinique). La partie MUC1-N étant hautement immunogène chez la souris, de nombreux essais d'anticorps monoclonaux dirigés contre cette sous-unité ont fait l'objet d'études cliniques. Cependant le pool extra-cellulaire de MUC1-N représente une barrière pour la délivrance des anticorps monoclonaux à la surface des cellules tumorales pour induire une réponse cellulaire cytotoxique. De ce fait malgré de nombreux essais de Phase I concluants comme pour l'anticorps anti-MUC1 AS1402 (Pegram *et al.*, 2009), les essais de phase II ne permettent pas la mise en évidence de bénéfice par rapport au traitement de référence (létrazole) pour les cancers du sein métastatique ER positif (Ibrahim *et al.*, 2011). La partie MUC1-C n'étant pas relarguée dans la circulation et non détectable dans le plasma, de nouveaux essais tendent à développer de nouveaux anticorps monoclonaux ciblant la partie MUC1-C afin de pouvoir atteindre plus facilement les cellules tumorales.

2- Vaccin anti-MUC1

En 2009, MUC1 a été classée par le *National Cancer Institute* comme le second potentiel meilleur marqueur antigénique sur 75 pour le développement de vaccins anti-cancéreux (Cheever *et al.*, 2009). Les vaccins anti-MUC1 ont pour but de déclencher une réponse immunitaire par les lymphocytes T cytotoxiques (Roulois, Grégoire, & Fonteneau, 2013). L'une des difficultés rencontrées pour cette stratégie thérapeutique est de déterminer le fragment peptidique de MUC1 à utiliser et son état de glycosylation puisqu'il avait été montré : qu'un peptide non glycosylé ne permettait pas un ciblage correct des cellules tumorales, qu'un peptide glycosylé entraînait une faible réponse immunitaire et qu'un peptide densément glycosylé ne pouvait pas être pris en charge par les cellules présentatrices d'antigènes (APC) (Lakshminarayanan *et al.*, 2012).

Une réponse humorale envers la mucine MUC1 peut être détectée dans des formes bénignes de cancer du sein. La présence d'anticorps dirigée contre MUC1 est alors associée à

un meilleur pronostic (Blixt *et al.*, 2011). Par la suite, l'identification de trois séquences peptidiques dérivées de MUC1 ont fait l'objet d'études avancées. Le peptide **SAPDTRPAP** semble être le plus prometteur et a fait l'objet des études qui vont être décrites (Graves *et al.*, 2005; Lakshminarayanan *et al.*, 2012).

Tout d'abord, une étude de 2007 de Mukherjee et collaborateurs avait mis en évidence une bonne réponse immunitaire cytotoxique mais aucune réponse humorale dans un modèle préclinique de cancer du côlon traité par un vaccin testant deux séquences peptidiques de MUC1 APGSTAPPA et **SAPDTRPAP** (Mukherjee *et al.*, 2007).

Par la suite, une étude de Phase III a testé un vaccin-liposome le L-BLP25 présentant un peptide de 25 aa de MUC1-N situé au niveau du TR (STAPPAHGVT**SAPDTRPAP**PGSTAPP). Dans des études précliniques murines, le L-BLP25 induit une réponse immunitaire cellulaire caractérisée par une prolifération des cellules T et une production d'IFN- γ . Une étude de phase III a été menée pour le cancer du poumon non à petites cellules non résecable après radiochimiothérapie (successive ou simultanée), et a été un échec en ne montrant aucune amélioration de la survie passant à 25,6 mois contre 22,3 mois pour le placebo (Butts *et al.*, 2014; Kroemer, Zitvogel, & Galluzzi, 2013). Un sous-groupe ayant reçu le traitement et de la radiochimiothérapie simultanément présente une amélioration de la médiane de survie passant de 20,6 mois à 30,8 mois. Néanmoins les essais cliniques ont ensuite été arrêtés devant les faibles bénéfices.

Finalement, une brillante étude de 2012 a permis de mettre en évidence l'efficacité d'un vaccin anti-MUC1 tripartite (Lakshminarayanan *et al.*, 2012). Ce vaccin est composé du peptide MUC1 glycosylé (**SAPDT**(GalNAc)**RPAP**), d'un épitope *T helper* dérivé du polio virus (KLFVWVKITYKDT) et d'un lipopeptide (Pam3CysSK4) agoniste du *Toll-like receptor 2* (TLR2). Ce vaccin a pu déclencher, dans un modèle préclinique murin de cancer du sein, une réponse immunitaire cellulaire et humorale caractérisée par une réponse cytotoxique des lymphocytes T et une production d'anticorps IgG chez les souris immunisées avec ce vaccin. Une cytotoxicité anticorps-dépendante à médiation cellulaire (ADCC) a été mesurée *in vitro* par les cellules *Natural Killer* (NK) stimulés par de l'IL2 qui sont alors capables de lyser les cellules cancéreuses exprimant MUC1 afin de générer une réponse immunitaire thérapeutique.

3- Peptides

Les fonctions intra-cellulaires de MUC1 passent essentiellement par la dimérisation de son domaine CQC ou l'interaction *via* ce domaine avec ses multiples partenaires. De ce fait la stratégie peptidique ciblant MUC1 a pour but de bloquer ce domaine. Le premier peptide utilisé a été le Go-201 qui cible le domaine CQC et permet de bloquer la dimérisation de MUC1 et de diminuer sa translocation nucléaire. Des traitements cellulaires avec le peptide Go-201 ont mis en évidence un blocage de la croissance cellulaire et une induction de l'apoptose dans le cancer du sein, en bloquant notamment les voies Wnt/ -caténine, Stat3 et NF- B (Raina *et al.*, 2009, 2012). Une seconde génération de peptide, le Go-203, est actuellement testé en phase I d'essai clinique pour des tumeurs solides de stade avancé. Ce peptide est couramment utilisé dans les expérimentations et permet d'altérer la majorité des propriétés cellulaires des cellules cancéreuses (Raina *et al.*, 2011; Uchida *et al.*, 2013).

L'ensemble de ces données a permis de mettre en évidence le rôle clé de la mucine MUC1 dans la cancérogenèse épithéliale, dans les propriétés des cellules cancéreuses ainsi que dans la chimiorésistance des tumeurs pancréatiques. Les résultats encourageants obtenus avec les essais cliniques ciblant MUC1 confirme l'intérêt de cibler cette mucine dans la cancérogenèse. Néanmoins, il reste nécessaire d'identifier de nouveaux outils et de nouvelles stratégies.

Dans ce but, le laboratoire s'intéresse à l'utilisation des micro-ARN, des régulateurs de l'expression génique possédant un potentiel thérapeutique et qui feront l'objet de cette dernière partie.

C- Les micro-ARN

I- Les micro-ARN

1- La découverte des miARN

Le premier miARN a été découvert en 1993 chez *Caenorhabditis elegans* par la mise en évidence que l'ARN non codant lin-4 avait une complémentarité anti-sens avec lin-14 ce qui va alors entraîner une inhibition de lin-14 (Lee, Feinbaum, & Ambros, 1993). En 2000, un second ARN non codant nommé let-7 a été identifié chez *Caenorhabditis elegans*. Il a été mis cette fois-ci en évidence que let-7 a la capacité de réguler négativement l'expression de lin-41 en s'appariant avec son 3' *Untranslated Region* (UTR) (Reinhart *et al.*, 2000). En 2001, ce phénomène a été élargi par la mise en évidence de l'existence d'une nouvelle classe de régulateurs de l'expression génique : les micro-ARN. Les miARN sont exprimés dans de nombreux organismes, comme l'homme, la souris, la drosophile, les plantes et sont phylogénétiquement bien conservés (Lagos-Quintana *et al.*, 2001; Lau *et al.*, 2001). Ils appartiennent à la famille des ARN non codants. Cette famille est composée de nombreux membres. Les ARN non codants peuvent être simplement classés en deux groupes : les petits ARN non codants dont font partie les miARN, les siARN, les snARN, les piARN ou encore les snoARN ; et les long ARN non codants comme les lncARN. Les miARN sont la classe d'ARN non codants les plus étudiés.

2- Fonction

Les miARN sont des régulateurs de l'expression des gènes au niveau post-transcriptionnel. Il est estimé qu'un miARN peut réguler des centaines de cibles. Une cible peut être régulée par de nombreux miARN et 60% des gènes peuvent être régulés par les miARN (Di Leva, Garofalo, & Croce, 2014). Leur fonction principale est d'inhiber l'expression d'un gène par un appariement majoritairement imparfait avec l'ARNm cible. De ce fait les miARN sont impliqués dans l'ensemble des processus biologiques, physiologiques et pathologiques. Ils peuvent avoir un rôle dans l'embryogenèse, la croissance cellulaire, la migration cellulaire, l'invasion cellulaire, la mort cellulaire, la formation de métastases, la fibrose, la TEM et la chimiorésistance (Bartel, 2004, 2009).

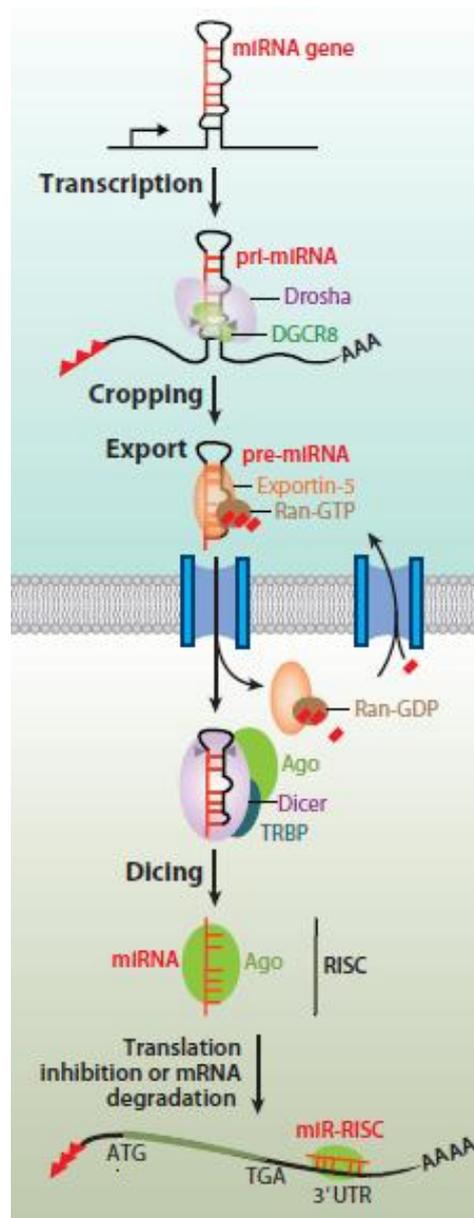


Figure 23 : Schéma de biosynthèse des miARN (Di Leva *et al.*, 2014)

Le miARN est transcrit par la polymérase II en un long transcrit primaire le pri-miARN coiffé et polyadénylé qui sera mûré par Droscha et DGCR8 en un précurseur plus court le pre-miARN. Le pre-miARN sera exporté par l'exportine 5 par un mécanisme RanGTP. Le miARN va de subir une étape de maturation au niveau cytoplasmique réalisée notamment par Dicer, Ago et TRBP afin d'aboutir à la formation d'un miARN mature simple brin qui s'incorporera dans le complexe RISC afin de permettre son activité.

DGCR8 *DiGeorge syndrome critical region gene 8* ; DICER, *endoribonuclease or helicase with RNase motif* ; TRBP, *TAR RNA-binding protein* ; RISC, *RNA-induced silencing complex*.

3- Localisation génique

Les miARN peuvent se localiser dans les régions intergéniques, être indépendants et posséder leur propre promoteur. Ils peuvent aussi se situer dans les régions intragéniques, au niveau des introns de leur gène hôte et être soumis à la même régulation transcriptionnelle que celui-ci. Certains miARN peuvent se localiser dans l'exon des gènes hôtes. Ils peuvent être transcrits de façon monocistronique (miR-210), bicistronique (miR-221/222) ou polycistronique (miR-17/92) et ont dans ces cas une forte homologie de séquence entre les membres d'une même famille (Di Leva *et al.*, 2014). Les miARN suivis de lettre comme miR-29a, miR-29b et miR-29c ont une séquence d'appariement avec l'ARNm qui se différencie de quelques bases, alors que les miARN suivis de chiffres sont transcrits par des locus géniques différents mais possèdent la même séquence mature de fixation à l'ARNm.

4- Biosynthèse des miARN

Il existe différentes voies de biosynthèse des miARN, la plus commune étant la suivante (Figure 23). Les miARN sont majoritairement transcrits par l'ARN polymérase de type II en un unique transcrit primaire long de 1 à 3 kb : le pri-miARN. Le pri-miARN possède une coiffe en 5' et est polyadénylé. Des cas rares ont été rapportés de transcription par l'ARN polymérase de type III et concerneraient des miARN contenus dans des séquences Alu du génome (Borchert, Lanier, & Davidson, 2006).

Le pri-miARN est clivé par la ribonucléase de type III Drosha (Lee *et al.*, 2003) qui est associée avec *DiGeorge syndrome critical region gene 8* (DGCR8) afin de former le miARN précurseur (pré-miARN) long de 70 à 100 nucléotides (Han *et al.*, 2004). DGCR8 est une protéine permettant de reconnaître et de se fixer aux ARN double brin et va permettre de positionner la sous-unité catalytique de la RNase III Drosha au niveau du miARN.

Ce pré-miARN va ensuite être exporté dans le cytoplasme par l'exportine de type 5 (XPO5) par un mécanisme RanGTP (Kim, 2004). Dans le cytoplasme va se dérouler la maturation du miARN. La ribonucléase de type III *endoribonuclease or helicase with RNase motif* (DICER) va cliver le pré-miARN en un miARN double-brin mature de 18 à 25 nucléotides (Hutvagner *et al.*, 2001). DICER va pour cela interagir avec *TAR RNA-binding protein* (TRBP) (Chendrimada *et al.*, 2005) ce qui va alors favoriser le recrutement des protéines de la famille Argonaute, majoritairement Ago2, lorsque le miARN double brin est formé.

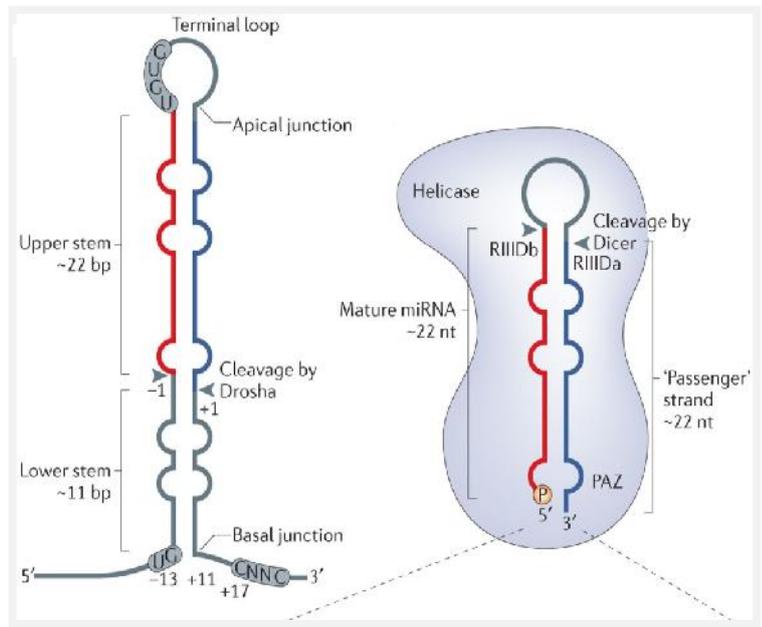


Figure 24 : Structure d'un miARN (Ha & Kim, 2014).

Les sites de clivages pour Drosha et Dicer sont indiqués.

Ceci va permettre la formation du complexe *RNA-induced silencing complex* (RISC) (Schwarz *et al.*, 2003). Les deux brins du miARN sont séparés par une hélicase : le brin dit mature, majoritaire, sera incorporé dans le complexe RISC et reste associé à Ago2 alors que le brin « passager, minoritaire » sera le plus souvent dégradé.

Ce complexe miARN-RISC, souvent abrégé miRISC, permet l'activité du miARN (Ambros, 2003; Bartel, 2004; Garzon, Marcucci, & Croce, 2010; Ha & Kim, 2014), (Figure 23, Figure 24).

Les enzymes clés de la biosynthèse des miARN sont impliquées dans de nombreux procédés de synthèse d'autres petits ARN et sont soumises à régulation (Ha & Kim, 2014). Ces régulations permettent d'accentuer l'affinité avec le miARN, d'augmenter la stabilité des complexes formés et de réguler leur localisation. Ainsi, l'altération de ce procédé dans les pathologies peut être une cause de dérégulation de l'expression des miARN et par conséquent de leurs cibles, et peut être une cible de thérapie. On retrouve par exemple une diminution de l'expression de DICER dans les cancers du sein et du poumon ce qui a été associée à un mauvais pronostic (Karube *et al.*, 2005; Khoshnaw *et al.*, 2012). Aujourd'hui, en plus de la voie classiquement décrite de biosynthèse des miARN, on peut retrouver une synthèse indépendante de Drosha et DGCR8 ou indépendante de Dicer (Ha & Kim, 2014).

5- Modes de fixation

a- Les différents types d'interaction miARN-ARNm

Le complexe miRISC permet au miARN de se fixer majoritairement au niveau du 3'UTR de ses ARNm cibles grâce à une séquence spécifique de fixation appelée *seed* longue de 6 à 8 nucléotides et situé en 5' du miARN. La fixation du miARN sur sa cible s'effectue grâce à une complémentarité des bases de Watson et Crick au niveau de la séquence *miRNA response element* (MRE) (Figure 25). Il est également décrit une fixation minoritaire des miARN au niveau du 5'UTR (1%) ou de la région codante des ARNm (25%). Il existe 4 types de fixations décrits pour l'interaction entre le miARN et sa cible (Friedman *et al.*, 2009; Bartel, 2009) (Figure 25) :

- Les sites canoniques correspondent à une séquence *seed* classique de 7 à 8 bases. Ils sont les mieux prédits, les plus conservés et les plus efficaces.

- Les sites marginaux décrivent une séquence *seed* de 6 bases. Ils sont estimés moins efficaces, mais correctement conservés.

- Les sites supplémentaires correspondent en plus de la séquence *seed* traditionnelle, à une séquence supplémentaire d'appariement en 3' qui augmente l'interaction entre le miARN et sa cible.

- Les sites complémentaires : lorsqu'il existe un mésappariement de fixation au niveau de la séquence *seed*, l'existence d'un site complémentaire en 3' permet une compensation de fixation, mais ces sites restent largement minoritaires.

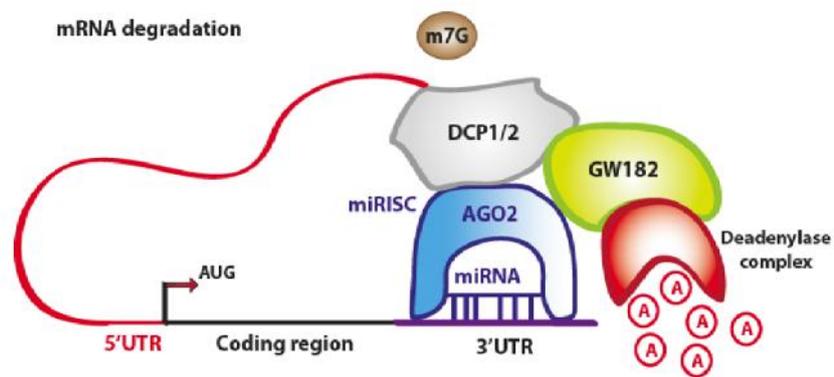
Les interactions entre le miARN et la cible sont également favorisées lors de la présence d'un A ou d'un U sur la 9e base. La région centrale du miARN contient en général un mésappariement qui permet d'éviter le clivage de l'ARNm par la protéine Ago.

b- Conséquences de l'appariement

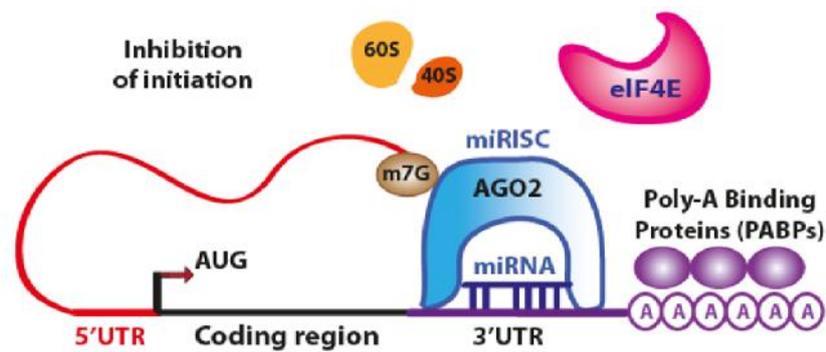
Lorsque l'appariement entre le miARN et sa cible est parfait, l'ARNm cible sera dégradé alors que si l'appariement est imparfait la traduction de l'ARNm en protéine sera bloquée, ce qui est majoritairement le cas chez l'Homme. Récemment, d'autres modes d'action des miARN ont été proposés : la fixation de miARN au niveau du 5'UTR ou de la région codante pouvant entraîner une activation ou une inhibition de la traduction de la cible (Kim *et al.*, 2008; Garzon *et al.*, 2010; Da Sacco & Masotti, 2012).

La traduction est un procédé en trois étapes comportant une étape d'initiation de la traduction, une étape d'élongation et une de terminaison. La coiffe en 5' de l'ARNm contient 7 guanosines méthylées. Le facteur *Eukaryotic translation initiation factor* eIF4e reconnaît cette coiffe, permet le recrutement du facteur eIF4g qui se fixe alors à *poly A binding protein* (PABP) ce qui permet le recrutement des ribosomes pour la synthèse protéique.

A



B



C

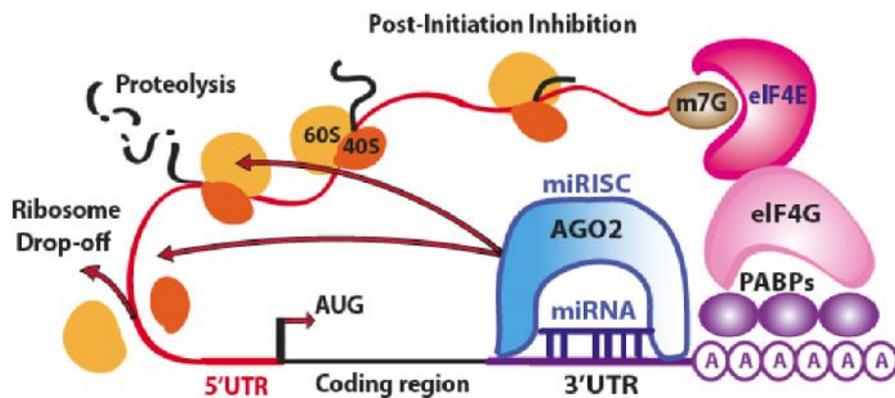


Figure 26 : Conséquence de l'appariement miARN-ARNm : diminution de l'expression de la cible (Da Sacco & Masotti, 2012).

(A) Dégradation de l'ARNm.

(B) Inhibition de l'initiation de la traduction.

(C) Inhibition de la traduction lors de l'élongation.

- La fixation du miARN peut bloquer l'initiation de la traduction lorsque le complexe miRISC interagit avec la coiffe et le 3'UTR de l'ARNm cible ce qui empêche alors le recrutement de la protéine eIF4e et par conséquent le recrutement des ribosomes (Figure 26). Ce mécanisme est conforté par la démonstration de la nécessité de la présence d'une coiffe m7G et d'une queue poly(A) pour la répression de la traduction induite par les miARN (Mathonnet *et al.*, 2007 ; Thermann & Hentze, 2007).

- La fixation du complexe miRISC peut entraîner un blocage de la traduction par une terminaison prématurée de la synthèse protéique et une dégradation de la protéine. Ce mécanisme est conforté par l'observation d'une association des miARN aux polysomes (Huntzinger and Izaurralde 2011).

Le blocage de la synthèse protéique est le mécanisme privilégié permettant l'inhibition de l'expression de la cible puisque cette inhibition n'entraîne pas forcément de variation dans le taux d'ARNm de la cible (Pillai *et al.*, 2005).

- La fixation peut entraîner une dégradation de l'ARNm lorsque la protéine Ago2 interagit avec les protéines *Glycin Tryptophan repeat-containing protein of 182 kDa* (GW182) et *mRNA-decapping enzyme* (DCP1/2). DCP1/2 va supprimer la coiffe de l'ARNm pendant que les protéines GW182 et PABP favorisent la déadénylation de l'ARNm. L'implication de GW182 est indispensable pour l'inhibition de l'expression de la cible (Eulalio, Huntzinger, & Izaurralde, 2008). En conséquence, on peut observer en pratique une diminution de la quantité des transcrits ciblés lors de la surexpression d'un miARN (Selbach *et al.*, 2008). Les microARN associés aux ARNm sont retrouvés dans des régions particulières nommées les *Processing bodies* qui sont des sites de stockage et de dégradation des ARNm (Jakymiw *et al.* 2007).

- La fixation peut favoriser la traduction. Le complexe miR-122/Ago2 est par exemple détourné par le virus de l'hépatite C (HCV) au niveau du foie (Jopling, 2008). Le miR-122 est impliqué dans le métabolisme des lipides et du cholestérol (Esau *et al.*, 2006). Le complexe miRISC se lie alors à deux sites de fixation au niveau du 5'UTR de l'ARNm de l'HCV et favorise sa réplication et l'accumulation du génome viral au sein des cellules. Un autre exemple provient du miR-10a qui interagit quant à lui avec le motif 5'- *terminal oligopyrimidine tract* (TOP), situé dans le 5'-UTR des ARNm codant des protéines ribosomales pour stimuler leur traduction (Ørom *et al.*, 2008).

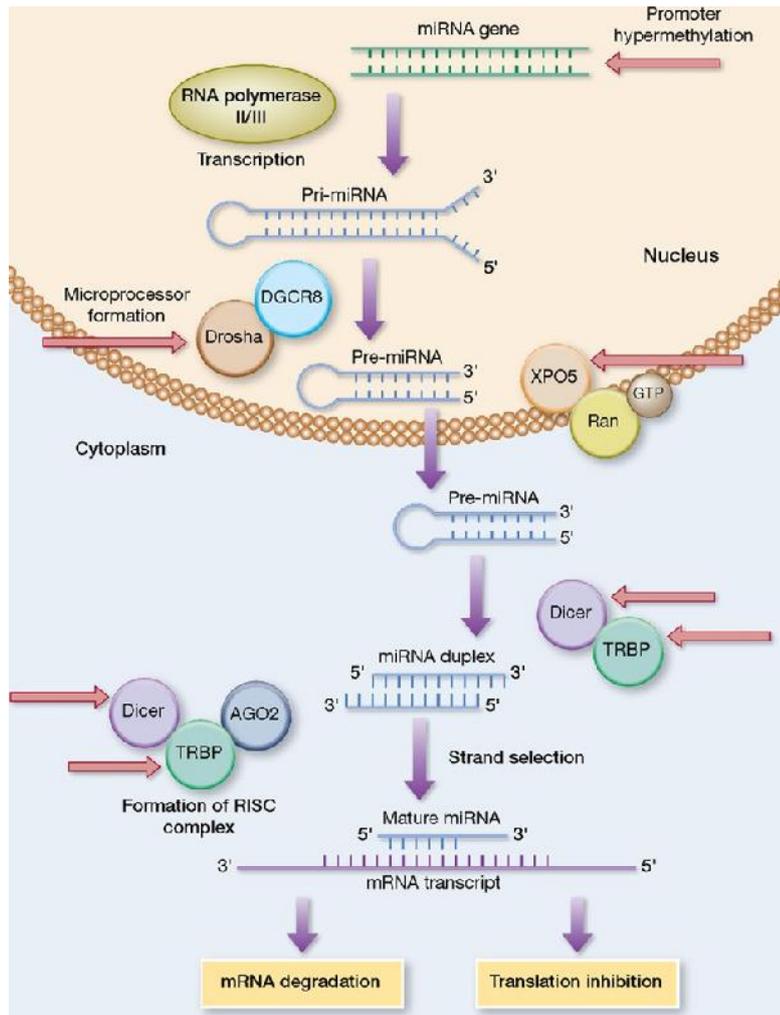


Figure 27 : Dérégulation de la biosynthèse des miARN (Mulrane *et al.*, 2013).

Les principales dérégulations sont marquées par une flèche rouge. La mutation de l'exportine 5 dans le cancer du colon à instabilité microsatellitaire favorise l'accumulation nucléaire des miARN. La mutation de TRBP2 dans le cancer du colon à instabilité microsatellitaire altère le processus de maturation des miARN et diminue l'efficacité de Dicer. L'inhibition de Dicer ou de Drosha dans le cancer du sein altère le processus de synthèse des miARN.

II- Expression des miARN dans le PDAC

1- Dérégulation de l'expression des miARN

a- Causes

La dérégulation de l'expression des miARN dans les pathologies cancéreuses est multifactorielle. En général, la surexpression ou l'inhibition d'un miARN peut être due à une amplification/délétion génique, une activation/répression de la transcription par une dérégulation des facteurs de transcription ou à une perte/gain de contrôle répressif épigénétique (méthylation, acétylation) (Esquela-Kerscher & Slack, 2006; Di Leva & Croce, 2013).

Le miR-148a est par exemple retrouvé sous-exprimé dans le PDAC par méthylation de l'ADN. Ce phénomène intervient précocément dans la cancérogenèse pancréatique à partir du stade PanIN1 (Hanoun *et al.*, 2010). De plus, la méthylation de la région codant miR-148a a été identifiée comme permettant de différencier le PDAC (n=39) de la pancréatite chronique (PC) (n=20). L'expression du miR-148a peut être proposée comme un marqueur permettant un diagnostic différentiel entre le PDAC et la PC.

Une dérégulation du programme de biosynthèse des miARN faisant appel à de nombreux acteurs peut entraîner une dérégulation de l'expression des miARN comme par exemple une inhibition de Dicer ou de Drosha, ou encore une mutation de l'exportine 5 ou de TRBP (Di Leva *et al.*, 2014) (Figure 27).

La dérégulation de l'expression des miARN a permis de mettre en évidence des profils d'expression différents des miARN au niveau de la tumeur, du tissu sain et des fluides corporels (sérum, salive, urine). Ce profil de miARN permet alors d'établir une signature spécifique qui peut dans certains cas apporter des informations clinico-pathologiques comme le pronostic, la survie ou l'agressivité. Ce profil est communément appelé « miRNome » (Lu *et al.*, 2005; Volinia *et al.*, 2006). En général, un miARN sous-exprimé peut être assimilé à un miARN suppresseur de tumeur et un miARN surexprimé peut être considéré comme un oncomiR lorsque des études complémentaires sont en mesure de démontrer ce rôle.

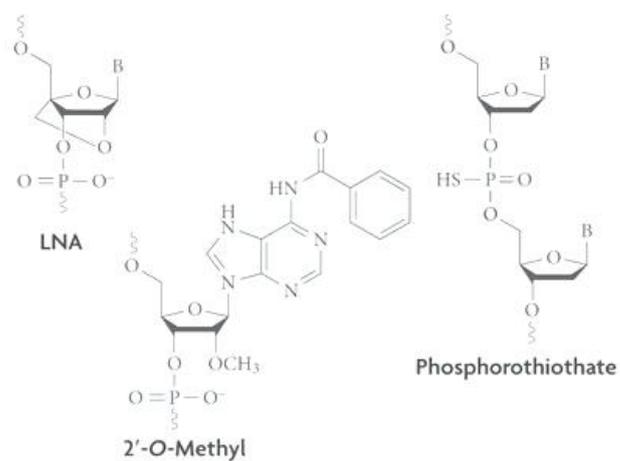


Figure 28 : Modifications chimiques classiques des miARN à visée thérapeutique (Garzon *et al.*, 2010).

b- Conséquences

La perte de l'expression d'un miARN ayant la capacité de réguler une dizaine de cibles va entraîner la surexpression de ces dernières. C'est par exemple le cas pour la famille des miARN-34 qui sont hyperméthylés dans les cancers, ou encore pour les miARN miR-15/16. De ce fait, ces miARN n'ont plus la capacité d'inhiber l'expression de leur cible comme *B-cell lymphoma 2* (Bcl-2), une protéine anti-apoptotique ce qui va favoriser la survie cellulaire (Bommer *et al.*, 2007) (Cimmino *et al.*, 2005).

L'expression du miARN let-7 est diminuée dans le PDAC et sa surexpression permet d'inhiber l'expression de la protéine Kras, un oncogène majeur du PDAC (Torrisoni *et al.*, 2009). Des travaux du laboratoire ont montré que l'expression de miR-219-1-3p est également diminuée dans le PDAC. La surexpression de ce miARN permet d'inhiber l'expression de la mucine membranaire oncogénique MUC4 qui est impliquée dans la progression tumorale des cellules de PDAC (Lahdaoui *et al.*, 2014; Jonckheere *et al.*, 2012). De plus, une corrélation inverse entre l'expression de miR-219-1-3p et de la mucine MUC4 a été mise en évidence dès les stades précoces de la cancérogenèse pancréatique (PanIN1-2). A l'inverse, la surexpression d'un miARN oncogénique comme le miR-21 va permettre d'inhiber de façon plus importante des cibles qui sont souvent des gènes suppresseurs de tumeurs comme la *phosphatase and tensin homolog* (PTEN) ce qui va favoriser l'activation de la voie PI3K/AKT et la survie cellulaire (Meng *et al.*, 2007).

Enfin, des modifications cette fois-ci au niveau des UTR des ARNm peuvent entraîner une perte de fonction du miARN. C'est le cas lorsque l'on observe un raccourcissement de la taille des UTR qui peut entraîner la perte du site de fixation du miARN. Le raccourcissement de la taille des UTR est un événement fréquent, souvent dû à l'apparition de sites de polyadénylation alternatifs, l'épissage alternatif ou encore à des clivages alternatifs générant différentes isoformes de l'ARNm avec des UTR de longueurs différentes (Sandberg *et al.*, 2008; Mayr & Bartel, 2009). On peut retrouver également une mutation au niveau du site de fixation pour le miARN, ou une accessibilité du site de fixation réduite due à la fixation d'autres protéines telles que les *RNA binding protein* (RBP) ou par la fixation d'un autre miARN entraînant un effet de compétition (Di Leva & Croce, 2013; Di Leva *et al.*, 2014).

2- Les miARN comme outil thérapeutique

Le profil d'expression des miARN est très souvent altéré dans les cancers et cette altération ressort souvent comme spécifique de la tumeur. L'altération de l'expression d'un seul miARN peut avoir de lourdes conséquences sur les cellules, notamment sur leurs propriétés cellulaires comprenant également leur potentiel de chimiorésistance. De par leur capacité à réguler plusieurs cibles simultanément, les miARN sont devenus des outils thérapeutiques intéressants. Les études tentent de déterminer le rôle des miARN par des approches de gain ou de perte de fonction et de déterminer leurs cibles intracellulaires. Les thérapies utilisant les miARN ont pour but de restaurer l'expression d'un miARN suppresseur de tumeur comme cela peut être décrit pour miR-15/16, miR-34, miR-200, let-7, miR-29, miR-219-1-3p; ou inhiber l'expression d'un oncomiR comme pour miR-21, miR-155, miR-221/222 et miR-17/92 et d'être utilisés seules ou en combinaison avec les thérapies de référence. (Garzon *et al.*, 2010; Rius & Lyko, 2012; Garofalo, Leva, & Croce, 2014; Gayral *et al.*, 2014) (Figure 28).

- La restauration de l'expression d'un miARN : par l'utilisation de mime de miARN ou de vecteurs d'expression. Les mimes de miARN se composent d'un miARN double brin, dont l'un des brins correspond à la séquence du miARN souhaité, et le second est modifié chimiquement comme par l'ajout d'un 2'-O-méthyle (2'-O-Me) pour ne pas être pris en charge par le complexe RISC et être rapidement dégradé.

La surexpression de let-7 dans des lignées cellulaires cancéreuses pancréatiques permet de ralentir la prolifération cellulaire *in vitro*, mais ne parvient pas à ralentir la croissance tumorale *in vivo* (Torrisoni *et al.*, 2009). Au laboratoire, la surexpression de miR-219-1-3p dans le PDAC a permis de montrer un ralentissement de la prolifération et de la migration cellulaires *in vitro* et une diminution de la croissance tumorale *in vivo* (Lahdaoui *et al.*, 2014).

Le premier essai clinique concernant un miARN mimic cible le miR-34a. Une étude multicentrique de phase I est en cours (NCT01829971) afin de réexprimer le miR-34a par injection d'un liposome MRX34 (Mirna Therapeutics, Inc) qui favoriserait un arrêt de la croissance cellulaire et une mort cellulaire apoptotique pour des patients atteints de cancer du foie primaire ou souffrants de métastases hépatiques.

- L'inhibiton de l'expression d'un miARN : par l'utilisation d'oligonucléotide anti-miARN (AMOS) de première génération, de *locked nucleic acid* (LNA) correspondant à la seconde génération, ou de vecteurs d'expression pour inhiber un miARN oncogénique. L'anti-miARN AMOS possède une complémentarité parfaite avec le miARN ciblé afin de s'y hybrider et de bloquer alors son activité lorsque l'affinité est suffisante pour ne pas être séparé par les hélicases. L'ajout de modifications chimiques tel qu'un 2'-O-méthyle et une liaison phosphorothioate permet de prévenir la dégradation par les nucléases. Les LNA de seconde génération ont permis d'augmenter l'affinité d'interaction avec le miARN mais en diminuant légèrement la spécificité.

Le miravirsén est un LNA anti-miR-122 qui est testé comme traitement antiviral de l'hépatite C. Il a été développé en clinique par Santaris Pharma et a été utilisé chez l'homme dans un essai clinique de phase I. L'innocuité a pu être démontrée et un essai de phase 2 est développé. Dans cet essai le miravirsén est injecté en intra-veineuse, le protocole défini est de 5 injections hebdomadaires. La toxicité du produit était acceptable et une réponse dose-dépendante ainsi qu'une diminution de la charge virale a pu être mise en évidence chez 36 patients souffrant d'infection chronique par VHC (Lennox *et al.*, 2013).

L'inhibition de l'expression du miR-21 dans le PDAC par l'utilisation d'un vecteur lentiviral a mis en évidence un ralentissement de la prolifération cellulaire *in vitro* et de la croissance tumorale *in vivo* ainsi qu'une augmentation de l'angiogenèse (Sicard *et al.*, 2013). La combinaison de l'inhibition de miR-21 et d'un traitement par la gemcitabine a mis en évidence un arrêt de la croissance tumorale *in vivo*. De plus, l'inhibition de miR-21 a permis de démontrer une meilleure efficacité pour ralentir la croissance tumorale que l'utilisation de la gemcitabine seule.

- L'utilisation d'éponge à miARN (SPONGE-miARN). C'est une molécule d'ARN leurre, contenant plusieurs séquences anti-sens de fixation répétées pour un miARN et peut permettre par exemple de cibler l'ensemble des miARN d'une même famille ou bien alors de s'affranchir des modifications chimiques. Un miR-sponge pour le cluster miR-17-92 a été généré et a mis en évidence que l'inhibition combinée des miARN de ce cluster était plus efficace que l'inhibition individuelle de chacun de ces miARN (Kluiver *et al.*, 2012).

L'ensemble de ces stratégies se heurte à un problème récurrent qui se trouve être le manque d'efficacité de délivrance des miARN *in vivo*. Dans ce but des études tentent d'essayer de délivrer de manière efficace un miARN *in vivo* par l'utilisation de liposomes, de nanoparticules ou de vecteurs viraux (Chen *et al.*, 2010; Garofalo *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2014). Des problèmes de toxicité de ces molécules, de spécificité, mais également le manque de connaissances dans la détermination des *off-targets* des miARN limitent leur utilisation thérapeutique.

3- Profil d'expression des miARN dans le PDAC

De nombreuses études ont eu pour objectif d'établir le profil d'expression des miARN dans les cancers. Néanmoins très peu d'études mettent en évidence une dérégulation similaire des miARN. Ces différences peuvent s'expliquer par le fait que les auteurs utilisent des technologies différentes. Le choix du contrôle interne est également un élément crucial et peut entraîner des résultats différents, la prise en compte de la part stromale du cancer pancréatique est également un élément important puisqu'il peut représenter jusqu'à 90% de la surface tumorale, et enfin le nombre d'échantillons utilisés varie. Plusieurs études majeures ont proposé un profil d'expression des miARN dans le PDAC ou les lésions PanIN.

L'étude de Szafranska et collaborateurs de 2007 (Szafranska *et al.*, 2007) a testé l'expression de 377 miARN et a comparé leur expression dans des tissus sains (n=5), dans des PDAC macrodisséqués (n=8) et dans des pancréatites chroniques (n=6) préalablement congelés ainsi que dans des lignées cellulaires de PDAC (n=6). Ils ont pu mettre en évidence une dérégulation de 26 miARN et proposent finalement que la surexpression de miR-196a et l'inhibition de miR-217 permettent de différencier le pancréas sain du PDAC.

L'étude de Schultz et collaborateurs de 2012 (Schultz *et al.*, 2012) a testé l'expression de 475 miARN et comparé leur expression dans des tissus sains inclus en paraffine (n=28), des PDAC non microdisséqués (n=170), des pancréatites chroniques (n=23) et des adénocarcinomes ampullaires (de type pancréatobiliaire et intestinal) (n=107). Ils ont mis en évidence une différence d'expression pour 19 miARN. Parmi ceux-là, ils ont identifié en accord avec l'étude de Szafranska et collaborateurs, une diminution de l'expression de miR-217 dans le PDAC et une surexpression de miR-196b. Ils proposent également que la différence d'expression de trois groupes de miARN, miR-411 et miR-198, miR-614 et

miR-122, miR-614 et miR-93* permettent de différencier le PDAC et le PDAC ampullaire, de la pancréatite chronique et du tissu sain.

L'étude de Bloomston et collaborateurs (Bloomston *et al.*, 2007) a étudié 326 miARN sur 65 tissus de PDAC et 42 tissus de pancréatites chroniques. Ils ont mis en évidence 21 miARN surexprimés et 4 sous exprimés. La surexpression de miR-196a a pu être associée à une diminution de la survie des patients avec une médiane de survie passant de 26,5 mois à 14,3 mois. La surexpression de miR-155 qui est associée à un mauvais pronostic dans le PDAC (Greither *et al.*, 2010) a également été identifiée dans l'étude de Szafranska et collaborateurs. Enfin, une inhibition de l'expression de miR-148a a été identifiée dans les études de Bloomston et de Szafranska et collaborateurs.

L'étude de Yu et collaborateurs (Yu *et al.*, 2012) a porté sur la quantification de 735 miARN dans 34 lésions PanIN et 15 canaux pancréatiques normaux isolés par microdissection laser. Ils ont pu identifier une expression spécifique de miR-196b à partir du stade PanIN3 et dans le PDAC. Ils ont également mis en évidence la surexpression de miR-21, miR-155, miR-200a et miR-200b, et la sous-expression de miR-200c.

L'étude de Du Rieu et collaborateurs a permis de mettre en évidence une dérégulation de l'expression des miARN dans les lésions PanIN isolées par microdissection laser (Du Rieu *et al.*, 2010). Cette étude a permis de mettre en évidence que la dérégulation de l'expression du miR-21 intervient de façon très précoce et évolue dans le temps avec une surexpression de 40% dans les lésions PanIN1, de 67% dans les lésions PanIN2 et de 100% dans les lésions PanIN3. Récemment, il a été montré que la surexpression de miR-21 et miR-31 ainsi qu'une faible expression de miR-375 est associée à une diminution de la survie dans le PDAC (Bera *et al.*, 2014; Frampton *et al.*, 2014).

Une étude pilote basée sur l'expression des miARN dans le plasma et la bile a permis de proposer un test diagnostique pour le PDAC. Les auteurs ont étudié l'expression des miARN chez 215 patients atteints de PDAC (n=77) de PC (n=67) ou de cholédocholithiase (présence d'un calcul biliaire dans le canal cholédoque) utilisé comme groupe contrôle (n=71). Les résultats montrent une augmentation de l'expression de miR-10b, miR-155 et miR-106 dans le plasma des patients atteints de PDAC (Cote *et al.*, 2014). La confirmation de ce résultat pourrait permettre d'envisager le développement de test diagnostique pour le PDAC.

III- Implication des miARN dans la chimiorésistance du PDAC

A ce jour, l'expression d'une quinzaine de miARN a été corrélée à une différence significative dans la chimiorésistance du PDAC *in vitro* et/ou *ex vivo* par la réalisation d'études rétrospectives et prospectives afin d'utiliser certains miARN comme marqueur pronostic de réponse au traitement. Ces miARN peuvent être impliqués dans les procédés apoptotiques, dans la progression du cycle cellulaire, dans la survie cellulaire, dans les procédés de réparation de l'ADN, dans le métabolisme des drogues ou dans la TEM.

1- A la gemcitabine

Il a par exemple été montré que l'inhibition des miR-21 et miR-221 par l'utilisation d'oligonucléotides anti-sens sensibilise les cellules issues de PDAC au traitement par la gemcitabine en augmentant la mort cellulaire apoptotique et en diminuant la prolifération cellulaire, en ciblant des protéines comme PTEN, p27 et Bcl-2 (J.-K. Park *et al.*, 2009; Dong *et al.*, 2011; Garajová *et al.*, 2014). De plus, une expression plus faible de miR-21 dans les tissus de patients atteints de PDAC est corrélée à un bénéfice au traitement chimiothérapeutique (Hwang *et al.*, 2010).

La surexpression de miR-10b dans le PDAC a été décrite comme un facteur de mauvais pronostic, et une expression plus faible dans les tissus de patients est corrélée à une meilleure réponse au traitement thérapeutique (Preis *et al.*, 2011; Frampton *et al.*, 2013).

On retrouve également une surexpression de miR-155 suite à un traitement par la gemcitabine et cette surexpression a également été corrélée à un mauvais pronostic (Greither *et al.*, 2010; Xia *et al.*, 2011). En plus de l'expression de miR-155, la surexpression de miR-203, miR-210 et miR-222 est également associée dans la même étude à un mauvais pronostic. Néanmoins leur implication dans la chimiorésistance n'a pas été évaluée.

La surexpression du miR-34 *in vitro* dans la lignée cellulaire pancréatique MiaPaCa-2 sensibilise celle-ci à un traitement par la gemcitabine et par le cisplatine (Ji *et al.*, 2009). De

la même façon, la surexpression de miR-200c est associée à une sensibilité à la gemcitabine dans la lignée MiaPaCa-2, et une inhibition des miR-200a/b/c est retrouvée dans les lignées résistantes à la gemcitabine (Li *et al.*, 2009). Une autre étude dans le cancer du sein, a pu mettre en évidence que miR-200c avait la capacité d'inhiber l'expression du canal détoxifiant *ABCC1* (MRP1) permettant ainsi l'accumulation de la doxorubicine. Ce canal est également emprunté par la gemcitabine ce qui fait de ce miARN une cible intéressante dans l'étude des mécanismes de chimiorésistance (Chen *et al.*, 2012).

A ce jour, aucune étude n'a mis en évidence de miARN impliqués dans la chimiorésistance aux nouvelles thérapies prometteuses du PDAC comme le FOLFIRINOX (Garofalo & Croce, 2013).

Concernant le nab-paclitaxel, une étude dans le cancer du poumon a comparé l'expression des miARN dans les lignées cancéreuses pulmonaires sensibles ou résistantes au paclitaxel. Il a pu être identifié que le miR-17-5p était sous-exprimé dans les cellules cancéreuses résistantes au paclitaxel (Chatterjee, Chattopadhyay, & Chakrabarti, 2014). La surexpression de ce miARN dans les lignées résistantes a permis de resensibiliser les cellules à cette drogue et d'induire la mort cellulaire. Cette relation ne semble pas se confirmer dans le PDAC puisque le miR-17-5p a été retrouvé surexprimé et cette surexpression serait associée à un mauvais pronostic (Yu *et al.*, 2010).

2- Dans la TEM

La TEM est un processus aujourd'hui clairement impliqué dans les mécanismes de chimiorésistance tumorale (Wang *et al.*, 2011; Bao *et al.*, 2014). La famille des miR-200 est particulièrement impliquée dans ce processus. Il a notamment été mis en évidence que cette famille avait la capacité d'inhiber les facteurs de transcription Zeb-1/2 et la vimentine, et de surexprimer la protéine E-cadhérine afin de favoriser une *mesenchymal epithelial transition* MET. De plus, une boucle de rétrocontrôle a été mise en évidence, où le complexe Zeb-1/MUC1 inhibe l'expression de miR-200c à leur tour pour favoriser la TEM (Rajabi *et al.*, 2013). Il a également été démontré que la surexpression de miR-200a permettait d'inhiber l'acquisition de marqueur de cellules souches de cellules ayant des propriétés mésenchymateuses par l'inhibition de la -caténine et de Zeb-2 (Xia *et al.*, 2010).

De façon similaire, la surexpression de Zeb-1 ou de Snail permet d'inhiber l'expression de miR-203 et de miR-183 afin de maintenir un phénotype de TEM (Gregory, Bracken, *et al.*, 2008; Wellner *et al.*, 2009; Xia *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2014). En contrepartie, il a été montré que miR-183, miR-200 et miR-203 avaient la capacité d'inhiber l'expression de facteurs de cellules souches comme *B-cell-specific Moloney murine leukemia virus insertion site 1* (Bmi-1) (Wellner *et al.*, 2009).

Finalement, un modèle de double boucle de rétrocontrôle favorisant la maintenance d'un phénotype épithéliale a été mis en évidence, la première faisant intervenir la famille des miR-200 et les facteurs Zeb-1/2, la seconde faisant intervenir le miR-203 et les facteurs SNAI-1/2 qui s'inhibent mutuellement (Moes *et al.*, 2012; Qu *et al.*, 2013).

Objectifs

Le cancer du pancréas est un cancer de mauvais pronostic souffrant de l'absence de détection de la maladie et d'un manque de traitement efficace. La surexpression de la mucine MUC1 dans 90% des PDAC, son association à un mauvais pronostic et à une diminution de la survie, son implication dans les mécanismes de chimiorésistance et dans tous les procédés biologiques des cellules, l'absence de thérapie conventionnelle efficace utilisant cette protéine, nous a amené à vouloir décrypter les mécanismes de régulation de MUC1 dans cette pathologie par de nouveaux régulateurs géniques innovants que sont les micro-ARN, afin de proposer de nouvelles cibles d'étude à visée thérapeutique.

Dans ce contexte les objectifs de ma thèse ont été:

- De sélectionner des miARN ciblant MUC1 et d'étudier leur expression dans le cancer du pancréas.
- D'étudier la régulation de MUC1 par les miARN ayant un potentiel thérapeutique dans le cancer du pancréas et de déterminer leurs fonctions.
- De déterminer l'implication des miARN régulateurs de MUC1 dans la chimiorésistance des cellules cancéreuses pancréatiques.

Résultats

Partie I : Sélection des miARN et étude de leur expression dans le PDAC

Dans cette première partie notre objectif est de sélectionner des miARN ciblant la mucine MUC1 en utilisant des bases de données informatiques de prédiction d'appariement entre les miARN et les ARNm. Dans un second temps notre objectif est d'étudier le profil d'expression des miARN prédits dans différents modèles de cancérogenèse pancréatique disponibles au laboratoire afin de sélectionner des miARN ayant un potentiel thérapeutique pour le traitement de ce cancer. Trois modèles ont été étudiés pour établir le profil d'expression des miARN dans cette étude.

- Des lignées cellulaires d'adénocarcinome pancréatique en comparaison avec une lignée pancréatique non tumorale.
- Un modèle murin de cancérogenèse pancréatique précoce.
- Une cohorte de 18 patients atteints de PDAC.

Deux critères ont été posés pour sélectionner un miARN :

- L'existence d'au moins un site de fixation sur l'ARNm de *MUC1*, en privilégiant les miARN possédant plusieurs sites potentiels de fixation.
- La dérégulation dans le PDAC.

I- Sélection des miARN et expression dans le PDAC

1- Sélection des miARN ciblant MUC1

Les séquences de l'ensemble des miARN des différentes espèces sont répertoriées dans la base de données miRBase. Afin de sélectionner des miARN ciblant MUC1, nous avons utilisé différentes bases de données de prédictions qui étaient complémentaires et dont nous avons comparé les résultats. Nous avons utilisé les bases de données TargetScan, microRNA.org et MirWalk.

Nous avons favorisé la sélection de miARN multi-locus sur l'ARNm de *MUC1* afin de maximiser nos chances de réussite, ainsi que de miARN présentant les meilleurs scores d'appariement prédits, même si le site de fixation est non canonique. Nous avons sélectionné les miARN récapitulés dans le Tableau 1.

miARN	TargetScan	miRanda	MirWalk	3'UTR	5'UTR	CDS
miR-29a	-	X	X	X	-	X
miR-330-5p	X	X	X	XX	-	X
miR-183	X	X	X	X	-	X
miR-200a	X	X	X	X	-	X
miR-203	-	-	X	-	X	-
miR-876-3p	-	-	X	-	X	-
miR-939	-	-	X	-	X	-
miR-455-3p	-	X	X	X	-	-
miR-652	-	-	X	X	-	-

Tableau 1 : Prédiction des miARN ciblant MUC1.

Les miARN miR-125b, miR-145 et miR-1226 déjà connus comme inhibant MUC1 nous ont servi de contrôle positif dans certaines expériences. Une seconde série de miARN miR-100, miR-150, miR-326, miR-328, miR-485-5p et miR-760 ont également été sélectionnés mais n'ont pas encore tous été testés.

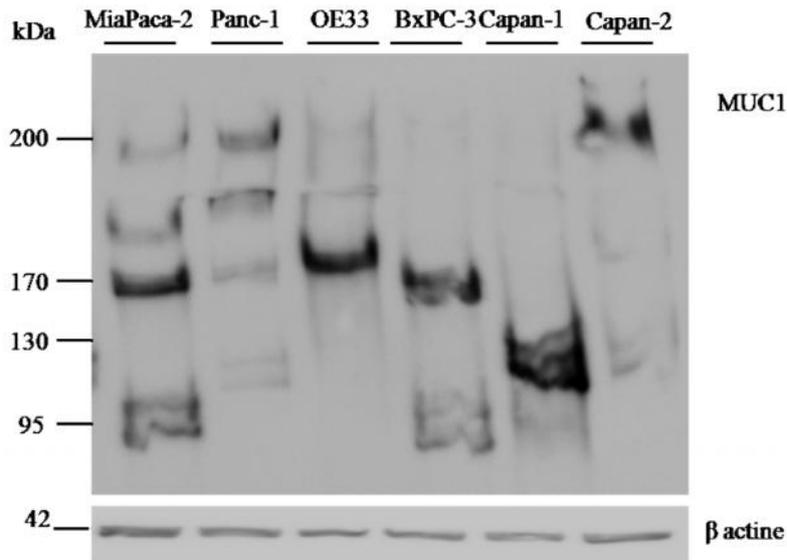


Figure 29 : Etude du profil d'expression de la mucine MUC1 dans les lignées cancéreuses pancréatiques humaines par western-blot.

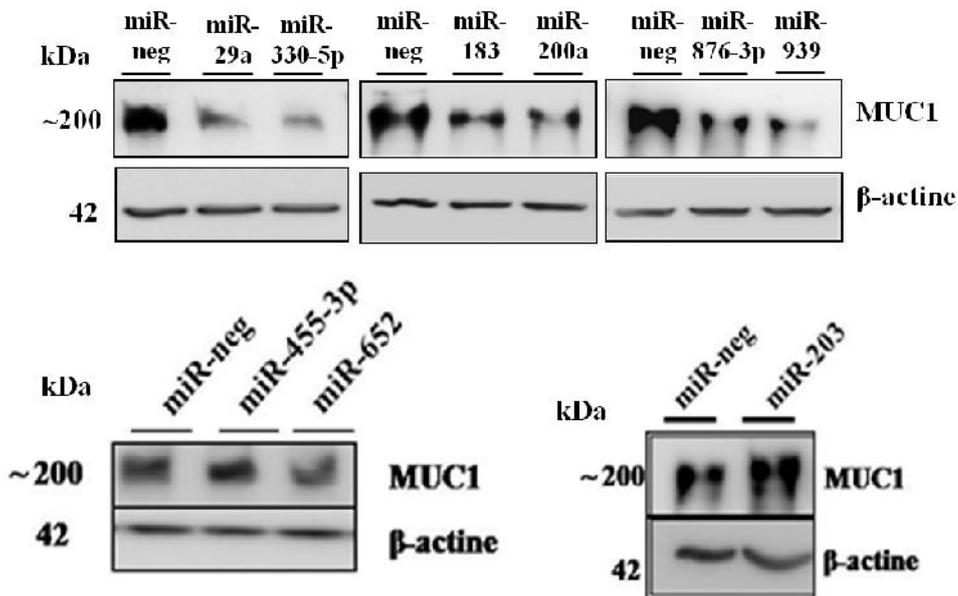


Figure 30 : Etude de l'expression de la mucine MUC1 par western-blot après surexpression des miARN possédant un site de fixation sur son ARNm dans la lignée Capan-2.

2- Effet des miARN sur l'expression de MUC1

Afin d'étudier l'effet de ces miARN sur l'expression protéique de MUC1, nous avons établi le profil d'expression de MUC1 dans nos modèles cellulaires. Nous les avons ensuite comparé à une lignée cancéreuse œsophagienne humaine OE33 précédemment étudiée au laboratoire et connue comme surexprimant la mucine MUC1 (Mariette *et al.*, 2004; Piessen *et al.*, 2007; Gronnier *et al.*, 2014), (Figure 29).

Les modèles cellulaires MiaPaCa-2, BxPC-3, Capan-1 et Capan-2 présentent le meilleur taux d'expression de MUC1. La masse moléculaire de MUC1 attendue varie en fonction des lignées cellulaires, avec plus de 200 kDa dans la lignée Capan-2 par exemple. Ces variations s'expliquent par un grand polymorphisme de la protéine, une taille variable du domaine VNTR de la protéine qui lui confère également un taux variable de glycosylation.

Pour la suite de l'étude nous avons sélectionné trois de lignées : la lignée MiaPaCa-2 issue d'une tumeur primaire et peu différenciée (Yunis, Arimura, & Russin, 1977), la lignée Capan-2 provenant d'une tumeur primaire bien différenciée (Kyriazis *et al.*, 1986) et la lignée Capan-1 bien différenciée et dérivant d'une métastase hépatique (Kyriazis *et al.*, 1982), pour leur complémentarité. Ces lignées sont décrites dans la section Matériel et Méthodes (M&M), § I, p190-191.

Nous avons réalisé des transfections cellulaires transitoires de ces miARN dans la lignée cellulaire Capan-2 afin d'étudier leur effet sur l'expression protéique de MUC1 (Figure 30). Nous avons pu mettre en évidence une inhibition de l'expression protéique de MUC1 par miR-29a, miR-330-5p, miR-183, miR-200a, miR-876-3p, et miR-939. Une surexpression de MUC1 par miR-203 a été constatée. Aucun effet n'a été mis en évidence lors de la surexpression de miR-445-3p ou de miR-652. D'autres miARN comme miR-100, miR-150, let-7, miR-155, miR-21 ont été également testés mais n'ont montré aucun effet sur l'expression de MUC1.

3- Expression des miARN dans le PDAC

Après avoir mis en évidence que certains des miARN sélectionnés permettaient d'inhiber l'expression protéique de MUC1, nous avons voulu savoir quels étaient les miARN dérégulés dans le PDAC afin de sélectionner seulement ceux avec un potentiel thérapeutique.

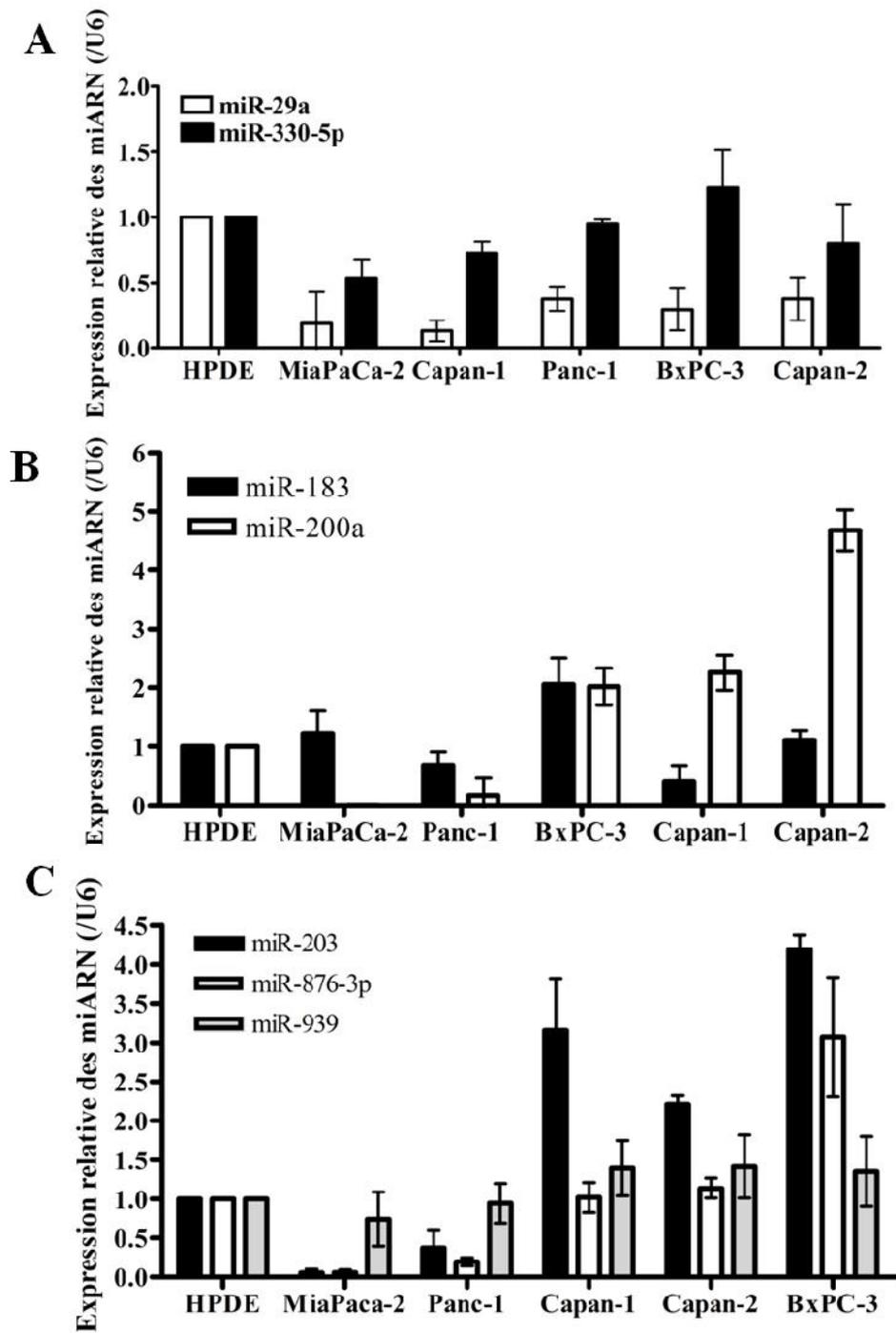


Figure 31 : Etude de l'expression des miARN dans les lignées cellulaires cancéreuses pancréatiques humaines MiaPaCa-2, Panc-1, Capan-1, Capan-2 et BxPC-3 en comparaison avec la lignée canalaire pancréatique humaine immortalisée HPDE.

- (A) miR-29a et miR-330-5p.
- (B) miR-183 et miR-200a.
- (C) miR-876-3p, miR-939 et miR-203.

a- Dans les lignées cellulaires

Nous avons étudié dans un premier temps l'expression de ces miARN dans cinq lignées cancéreuses pancréatiques MiaPaCa-2, Panc-1, Capan-1, Capan-2 et BxPC-3 en comparaison avec la lignée canalaire pancréatique humaine immortalisée *human pancreatic duct epithelial* (HPDE) non tumorigène (Furukawa *et al.*, 1996; Liu *et al.*, 1998). Les caractéristiques et les principales mutations de ces lignées sont décrites dans le Tableau 7 et dans le Tableau 8 de la partie M&M § I, p190-191. Ces lignées présentent toutes des caractéristiques différentes et complémentaires.

Nous avons pu mettre en évidence que seule l'expression du miR-29a était diminuée dans l'ensemble des modèles cellulaires cancéreux par rapport à la lignée de référence HPDE.

Le miR-330-5p présente un profil d'expression beaucoup plus variable avec une diminution de son expression uniquement dans les lignées MiaPaCa-2, Capan-1 et dans une moindre mesure Capan-2 en comparaison avec la lignée non tumorale HPDE (Figure 31).

Le miR-183 présente également un profil d'expression variable avec une diminution de son expression dans les lignées Panc-1, Capan-1 et Capan-2. Une surexpression est mise en évidence dans la lignée cancéreuse BxPC-3 par rapport à la lignée contrôle HPDE (Figure 31).

Le miR-200a, miR-876-3p et miR-203 sont quant à eux sous-exprimés dans les lignées peu différenciées MiaPaCa-2 et Panc-1 et surexprimés dans les lignées cancéreuses bien différenciées Capan-1, Capan-2 et BxPC-3 en comparaison avec la lignée de référence HPDE (Figure 31). L'expression de miR-939 ne varie pas.

L'ensemble de ces résultats suggère une dérégulation globale de miR-29a dans les modèles cellulaires, quelle que soit l'origine de la lignée, ce qui en fait une cible prometteuse. Le miR-330-5p également car il n'est pas dérégulé dans la lignée BxPC-3 qui ne présente pas la mutation Kras la plus commune du PDAC. La majorité des autres miARN semblent tous être sous-exprimés dans les lignées peu différenciées, MiaPaCa-2 et/ou Panc-1 et surexprimé dans les lignées bien différenciées. Ces résultats laissent à penser une implication possible de ces miARN dans les processus de TEM, voire de chimiorésistance.

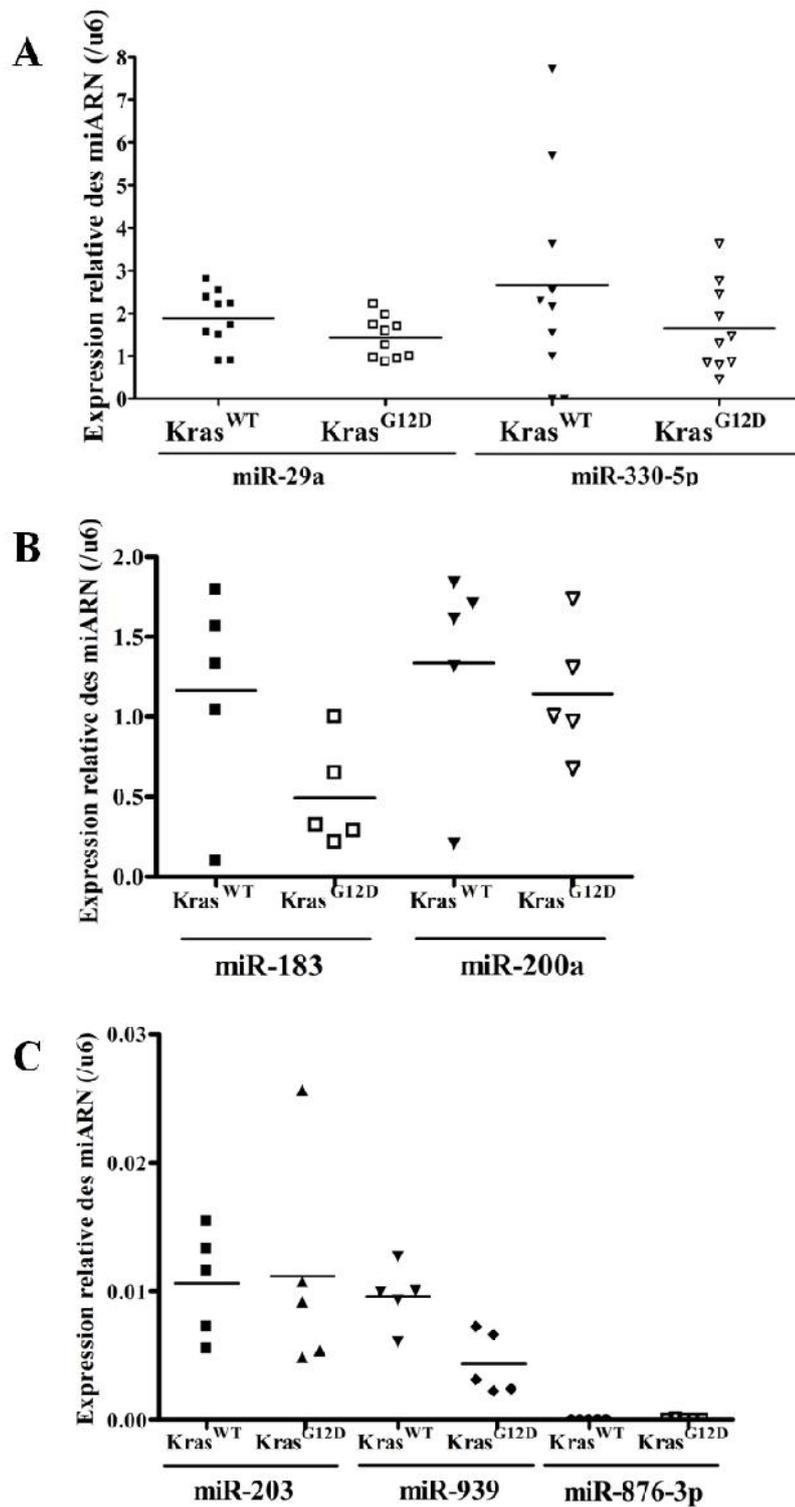


Figure 32 : Etude de l'expression des miARN dans le modèle murin de cancer pancréatique Pdx1-Cre; LstopL-Kras^{G12D} en comparaison avec le modèle murin Kras^{WT} contrôle.

(A) miR-29a et miR-330-5p.

(B) miR-183 et miR-200a.

(C) miR-203, miR-939 et miR-876-3p.

b- Dans les souris

Nous avons étudié le profil d'expression de ces miARN dans un modèle murin de cancérogenèse pancréatique précoce. Ces souris développent des lésions PanIN de bas et moyen grade grâce à la mutation constitutive de l'oncogène Kras présente au niveau de leur pancréas. Nous avons comparé l'expression des miARN extraits du pancréas de souris présentant la mutation activatrice constitutive Kras^{G12D} en comparaison avec les souris non mutées contrôles notées Kras^{WT}. Nous avons bénéficié d'une petite cohorte de 10 souris d'âges différents 3, 6, 9, 12, 15 mois et présentant une évolution de la séquence carcinogénétique PanIN représentée uniquement par des PanIN1 - PanIN2, dont la présence a été validée par une expertise anatomopathologiste (Dr. F. Renaud et Pr. E. Leteurre, Centre de Biologie et Pathologie de Lille, Inserm UMR837-Equipe 5). Le modèle murin est brièvement décrit dans la partie M&M § IX p212. Aucune différence significative n'a pu être mise en évidence concernant les variations d'expression de ces miARN (Figure 32). Néanmoins, nous avons pu constater une diminution modérée de l'expression de miR-29a, miR-330-5p, miR-183 et miR-939 dans le modèle Kras^{G12D} par rapport au modèle Kras^{WT}.

Ce modèle de cancérogenèse pancréatique est un modèle permettant une étude de l'expression des gènes de manière précoce reflétant une néoplasie de bas et moyen grade PanIN1 - PanIN2. Ce modèle est particulièrement intéressant pour le laboratoire puisqu'il a pu être mis en évidence une surexpression dès les stades les plus précoces de la mucine MUC1 que nous confirmons dans la figure 2 de l'article présenté p109. Ces résultats suggèrent que la dérégulation de l'expression de ces miARN n'intervient pas précocement au cours de la cancérogenèse pancréatique et nous supposons qu'elle devrait intervenir à un stade plus avancé de la maladie et donc qu'ils ne peuvent être utilisés comme marqueur précoce de cancer pancréatique.

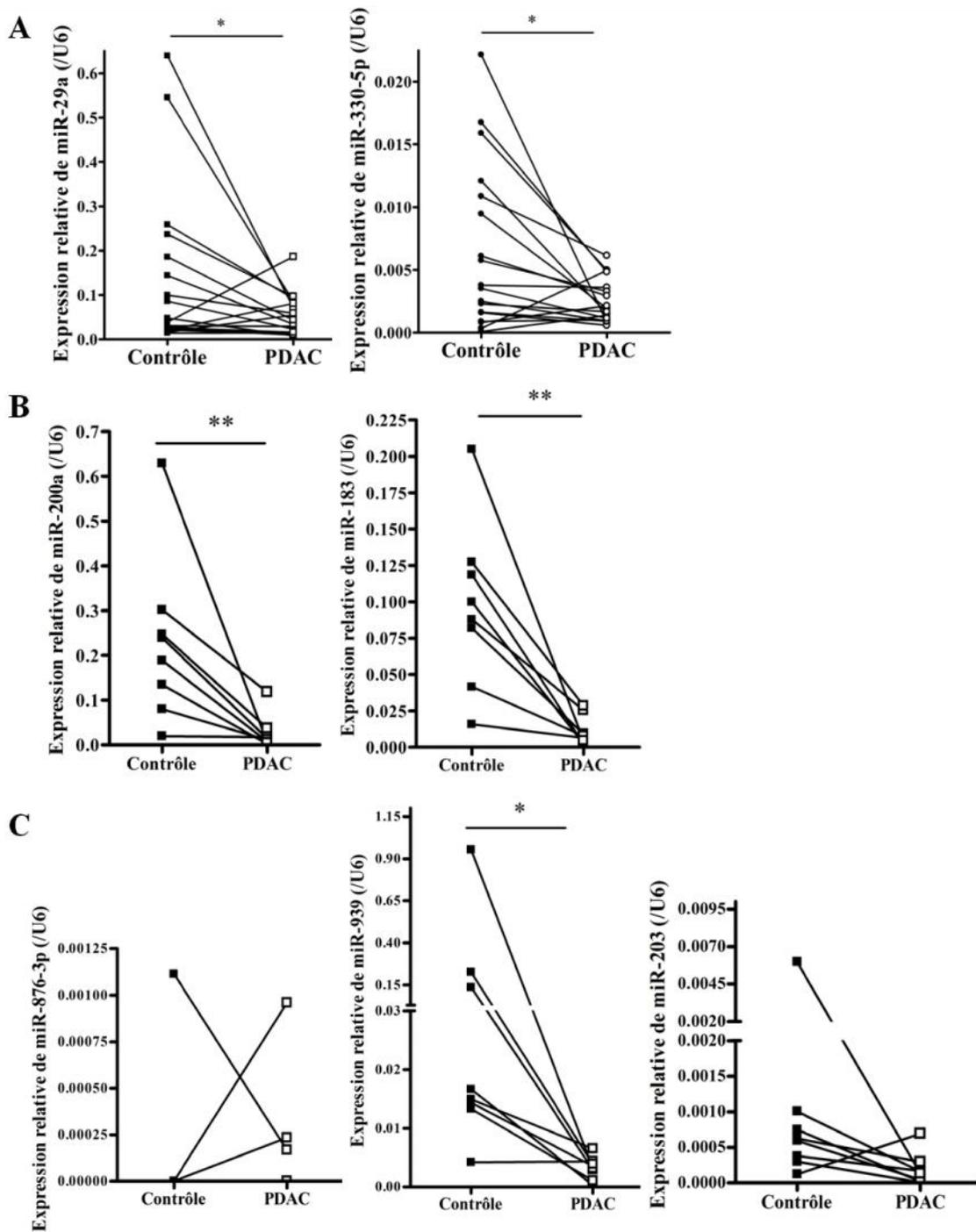


Figure 33 : Etude de l'expression des miARN chez des patients atteints d'adénocarcinome pancréatique infiltrant. Cohorte de 18 patients pour miR-29a et miR-330-5p. Cohorte de 8 patients pour les autres miARN.

- (A) miR-29a et miR-330-5p.
- (B) miR-183 et miR-200a.
- (C) miR-876-3p, miR-939 et miR-203.

c- Chez l'homme

Nous avons étudié le profil d'expression de ces miARN dans une cohorte de 18 patients atteints d'adénocarcinome pancréatique infiltrant. Les caractéristiques clinico-biologiques de ces patients sont décrites dans le tableau 2 de l'article présenté p107. La sélection de ces échantillons a été réalisée par une expertise anatomopathologiste (Dr. F. Renaud et Pr. E. Leteurtre, Centre de Biologie et Pathologie de Lille, Inserm UMR837-Equipe 5). Les données complémentaires concernant ces patients sont disponibles dans la section M&M § IX p213. Nous avons pu constater une inhibition de l'expression des miR-29a et miR-330-5p pour la majorité des patients en comparaison avec le tissu sain adjacent. Nous avons également remarqué que 22% de ces patients (4 cas sur 18) présentaient une surexpression de ces deux miARN (Figure 33).

Dans un second temps nous avons pu identifier une diminution globale de l'expression de miR-183, miR-200a et miR-939 dans une plus petite cohorte de 8 patients. L'expression de miR-203 ne varie pas chez les patients évalués (Figure 33). De façon intéressante, nous avons pu mettre en évidence que le miR-876-3p était exprimé chez seulement 3 patients sur les 8 évalués (moins de 40%) mais nous n'avons pas réellement constaté de variation de son expression. Parmi ces patients, deux présentant une expression de miR-876-3p ne présentent pas de diminution de l'expression de miR-29a et miR-330-5p (Figure 33).

Nous avons également étudié le profil d'expression de la mucine MUC1 par IHC par l'utilisation d'un anticorps (IgG1) dirigée contre la séquence peptidique DTR se situant au niveau du VNTR de MUC1. Les résultats sont présentés dans la figure 2E de l'article présenté p109. Nous avons constaté une surexpression de MUC1 chez l'ensemble de ces patients, ainsi qu'une délocalisation intracellulaire dans les tissus cancéreux. Une expression apicale dans les canaux du pancréas exocrine a été mise en évidence au niveau du tissu sain adjacent.

Ces résultats suggèrent donc une diminution globale de l'expression de miR-29a, miR-330-5p, miR-183, miR-200a et miR-939 chez les patients atteints d'adénocarcinome pancréatique infiltrant, ce qui représente un stade tardif de la maladie.

d- Conclusion-perspectives

En conclusion de cette première partie, nous avons identifié 6 miARN : miR-29a, miR-330-5p, miR-183, miR-200a, miR-876-3p et miR-939 comme potentiels régulateurs négatifs de l'expression de la mucine MUC1 dans le PDAC. Nous avons également mis en évidence qu'ils étaient dérégulés dans les lignées cellulaires, plus modérément dans le modèle murin de cancer pancréatique par rapport au souris contrôle, et qu'ils étaient sous-exprimés chez les patients atteints de cancer du pancréas. Enfin, nous avons mis en évidence que le miR-876-3p semble avoir une expression ponctuelle "spécifique" dont le rôle reste à identifier.

La suite de cette étude a pour objectif de déterminer quel miARN permet de réguler directement l'expression de la mucine MUC1 et de déterminer le rôle fonctionnel de ce/ces miARN dans le PDAC *in vitro* et *in vivo*.

Partie II : Etude de la régulation de MUC1 par les miARN et détermination de leurs fonctions dans le PDAC

Les objectifs de cette seconde partie ont été de déterminer si les miARN identifiés sont des régulateurs directs de l'expression de la mucine MUC1 et de déterminer leurs fonctions dans les cellules cancéreuses pancréatiques afin de proposer de nouvelles cibles thérapeutiques visant à réduire l'expression de la mucine MUC1 et afin de réduire la progression tumorale pancréatique.

La première partie du travail consiste à démontrer l'interaction de MUC1 avec les miARN identifiés précédemment. L'objectif était de démontrer le rôle suppresseur de tumeur de miR-29a et miR-330-5p que nous avons identifié comme régulateurs de l'expression de MUC1. Cette partie du travail fait l'objet d'un article actuellement soumis à publication (Tréhoux *et al.*, soumis à publication).

La seconde partie du travail concerne les résultats complémentaires obtenus en parallèle de cet article et qui portent sur l'effet de l'inhibition de miR-29a et miR-330-5p dans les lignées cancéreuses pancréatiques ainsi que sur la caractérisation d'une seconde lignée stable surexprimant le miR-330-5p.

II- Etude de la régulation de MUC1

1- Introduction de l'article

Pour démontrer que les miARN sélectionnés sont des régulateurs directs de l'expression de MUC1, nous avons utilisé deux stratégies :

- La première est « classique » et consiste à cloner la séquence contenant les sites de fixation pour le miARN, c'est-à-dire le 3'UTR ou le 5'UTR/exon1 dans notre cas, dans un vecteur rapporteur d'expression luciférase. La réalisation de co-transfections cellulaires du vecteur d'intérêt et du miARN puis la réalisation de mutagenèses dirigées sur les sites de fixation prédits pour chaque miARN permettent la mise en évidence des miARN ayant la capacité de moduler l'activité luciférase et donc d'interagir avec la séquence de *MUC1*.

- La seconde approche utilisée a été de réaliser des expériences de biotine *pull-down* afin de tenter de mettre en évidence le complexe miARN/ARNm *MUC1*.

Dans la seconde partie de l'article nous avons entrepris d'étudier les propriétés biologiques des miARN régulant directement *MUC1 in vitro* et *in vivo*. Pour cela nous avons utilisé les stratégies suivantes :

- Une surexpression transitoire des miARN dans les modèles cellulaires Capan-1, Capan-2 et MiaPaCa-2.

- Une surexpression stable des miARN dans le modèle cellulaire MiaPaCa-2.

L'ensemble de ces expériences a permis de mettre en évidence que dans les lignées cancéreuses pancréatiques la mucine *MUC1* est régulée par miR-29a et miR-330-5p et que ces deux miARN agissent comme des suppresseurs de tumeurs en ralentissant la prolifération cellulaire et la croissance tumorale et en diminuant les propriétés migratoires et invasives des cellules. Ils sensibilisent également les cellules à la gemcitabine mais pas aux drogues du protocole FOLFIRINOX.

2- Article (Tréhoux *et al.*, soumis à publication)

Micro-RNAs miR-29a and miR-330-5p function as tumor suppressors by targeting the MUC1 mucin in pancreatic cancer cells

Solange Tréhoux^{*-†-‡}, Yannick Delpu[§], Florence Renaud^{*-†-‡}, Emmanuelle Leteurtre^{*-†-‡}, Jérôme Torrisani[§], Nicolas Jonckheere^{*-†-‡} and Isabelle Van Seuningen^{*-†-‡-1}

* Inserm, UMR837, Jean-Pierre Aubert Research Center, Team 5 "Mucins, Epithelial Differentiation and Carcinogenesis", Rue Polonovski, 59045 Lille cedex, France.

† Université de Lille 2, 42 rue Paul Duez, 59000 Lille, France.

‡ Centre Hospitalier Régional et Universitaire de Lille, 59037 Lille cedex, France.

§ Inserm, UMR1037, Cancer Research Center of Toulouse, 1 avenue Jean Poulhes, 31432 Toulouse cedex 4, France.

Institut de Pathologie, Centre de Biologie Pathologie, Boulevard du Professeur Jules Leclercq, 59037 Lille, France.

¹ Correspondence to: Dr Isabelle Van Seuningen, Inserm, UMR837, Jean-Pierre Aubert Research Center, Team 5 "Mucins, Epithelial Differentiation and Carcinogenesis", Rue Polonovski, 59045 Lille cedex, France. E-mail : isabelle.vanseuningen@inserm.fr. Tel: +33 320 29 88 67. Fax: +33 320 53 85 62

Short title: MiR-29a and miR-330-5p inhibit MUC1 and PDAC progression.

Summary statement: MiR-29a and miR-330-5p are deregulated in pancreatic cancer, inhibit the oncogenic MUC1 expression and possess tumor suppressive activities on pancreatic cancer cells. These data expand our understanding about the regulation of MUC1 by miRNAs and identify new miRNAs as potential therapeutic targets in pancreatic cancer.

Abbreviations used: IC₅₀, concentration giving half-maximal inhibition; miRNA, microRNA; PDAC, pancreatic ductal adenocarcinoma; UTR, untranslated region.

ABSTRACT

MUC1 is an oncogenic mucin overexpressed in several epithelial cancers, including pancreatic ductal adenocarcinoma, and is considered as a potent target for cancer therapy. To control cancer progression, miRNAs became very recently, major targets and tools to inhibit oncogene expression. Inhibiting MUC1 using miRNAs appears thus as an attractive strategy to reduce cancer progression. However, potent miRNAs and associated mechanisms regulating MUC1 expression remain to be identified. To this aim, we undertook to study MUC1 regulation by miRNAs in pancreatic cancer cells and identify those with tumor suppressive activity. MiRNAs potentially targeting the 3'-UTR, the coding region, or the 5'-UTR of *MUC1* were selected using an *in silico* approach. Our *in vitro* and *in vivo* experiments indicate that miR-29a and miR-330-5p are strong inhibitors of MUC1 expression in pancreatic cancer cells through direct binding to *MUC1* 3'-UTR. *MUC1* regulation by the other selected miRNAs (miR-183, miR-200a, miR-876-3p and miR-939) was found to be indirect. MiR-29a and miR-330-5p are also deregulated in human pancreatic cancer cell lines and tissues and in pancreatic tissues of *Kras*^{G12D} mice. *In vitro*, miR-29a and miR-330-5p inhibit cell proliferation, cell migration, cell invasion and sensitize pancreatic cancer cells to gemcitabine. *In vivo* intra-tumoral injection of these two miRNAs in xenografted pancreatic tumors led to reduced tumor growth. Altogether, we have identified miR-29a and miR-330-5p as two new tumor suppressive miRNAs that inhibit the expression of MUC1 oncogenic mucin in pancreatic cancer cells.

Keywords: pancreatic cancer, MUC1, miRNA, chemoresistance, 3'UTR, carcinogenesis

INTRODUCTION

Pancreatic Ductal Adenocarcinoma (PDAC) is the fourth leading cause of death by cancer in Western countries and has a very poor prognosis due to a late diagnosis and a lack of efficient treatment. The five year survival rate is lower than five percent [1] and less than 20% of patients are entitled to surgical resection [2]. The remaining 80% of patients present a locally advanced metastatic PDAC and may benefit from palliative chemotherapy based either on gemcitabine or FOLFIRINOX [3]. Despite this, PDAC prognosis remains very poor and is highly resistant to chemotherapeutic treatments. It is thus mandatory to find early biomarkers, to better understand the molecular mechanisms underlying the disease and to identify new therapeutic targets/tools to allow better disease management and reduce pancreatic cancer progression.

The mucin MUC1 is a membrane-bound glycoprotein expressed at the apical pole of normal polarized epithelial cells. In most epithelial cancers including PDAC [4], MUC1 becomes oncogenic as it is overexpressed, circumferentially delocalized around the tumor cell surface and involved in several oncogenic pathways [5,6]. These properties are the consequence of MUC1 interaction with the epidermal growth factor receptor (EGFR) [7] which leads to the activation of several oncogenic pathways (MAPK, Wnt/ β -catenin) and increased cell proliferation and survival [8,9]. In PDAC it was shown that MUC1 participates in cell invasion through activation of Stat3 [10,11], or PDGFR- [12]. MUC1 also induces epithelial mesenchymal transition (EMT) [13] and increases resistance to gemcitabine [14], the major chemotherapeutic treatment for human PDAC. Lately, MUC1 was found as one robust predictive marker of PDAC survival [15]. For all these reasons, MUC1 appears as an attractive target to slow-down pancreatic tumorigenesis.

MUC1 is also translocated to the nucleus and associated with co-factors and/or transcription factors on gene promoters to modulate their expression. It was recently shown that MUC1 regulates miRNA expression by binding with ZEB1 to the promoter of miR-200c resulting in its inhibition and increased cell invasion and EMT [16]. Since miRNAs regulate a large number of human genes, targeting regulatory mechanisms mediated by miRNAs appears as an attractive strategy to inhibit oncogenic proteins and to propose new therapeutic approaches [17,18]. So far no miRNAs have been identified as directly targeting MUC1 in PDAC. MiRNAs are 18 to 25 nucleotide long small non-coding RNAs which regulate gene expression by binding to the 3'-UTR, 5'-UTR or coding regions of their target mRNAs [19]. MiRNAs can also inhibit the translation of their target or lead to the degradation of the mRNA and thereby protein expression [20]. MiRNAs are frequently deregulated in cancer, including PDAC. Several studies have investigated the expression profile of miRNAs in PDAC but few of them have studied their biological role and/or biological relevance [21,22].

To find new miRNAs regulating MUC1 expression in PDAC, we undertook to identify miRNAs directly binding to *MUC1* regulatory regions including the 5'-UTR, the coding region and the

3'-UTR. Using *in vitro* and *in vivo* approaches we show that miR-29a and miR-330-5p are direct negative regulators of MUC1 expression with tumor suppressive activity in pancreatic cancer. These two miRNAs appear thus as potential new actors to reduce pancreatic cancer progression.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Cell Culture

Capan-2, Capan-1, MiaPaCa-2 and BxPC-3 cell lines were purchased from ATCC and Panc-1 from ECACC. PDAC cell lines were cultured as described previously [22–24]. HPDE (Human Pancreatic Duct Epithelial) cells were obtained from Dr M.S. Tsao (UHN, Toronto, Canada) and were cultured as described previously [22].

Establishment of stable cell lines

MiaPaCa-2 stable cell lines overexpressing miR-29a, miR-330-5p or miR-neg (Table 1) were generated using lentiviral particles and miR-330-5p or miR-29a or miR-Neg pLenti4/TO/GFP-vectors and ViraPower lentiviral packaging mix (Life Technologies) as described before [21,22].

Transient cell transfection

Transfections of pre-miRTM (30 nM) miRNA precursors (Ambion) in the cell lines were performed in 6-well plates during 48h using siPORTTM NeoFXTM Transfection Agent (Ambion) and OptiMEM[®] (Life Technologies) according to the manufacturer's instructions. Pre-miRTM or anti-miRTM miRNA precursor Negative Control #1 (Ambion) were used as controls. Total RNA were extracted using miRNeasy Mini Kit with Qiazol[®] (Qiagen). Total proteins were extracted as above. Three independent experiments were performed in triplicate.

Cell proliferation, migration and invasion assays

Transfected cells or stable cell lines were seeded at 10^5 cells per well in 6-well plates. Cells were counted every day using a Malassez counting chamber using Trypan Blue exclusion dye (Life Technologies) during 72h for transfected cells and during 96h for stable cell lines. Invasion and migration assays were respectively performed using 24-well Boyden chambers (8 μ m pores) coated or not with MatrigelTM (Pharmingen, BD Biosciences). Briefly, 5×10^4 to 10^5 cells were seeded on the top chamber and FBS 10% (v/v) was used as a chemoattractant in the bottom chamber for 24h to 48h. Three independent experiments were performed in triplicate.

Cytotoxicity assay

10^4 cells were seeded in 96-well plates during 24h. Medium was refreshed with gemcitabine, 5-fluorouracil, oxaliplatin or SN-38 for 72h. The viability of cells was determined using 3-(4,5-

dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide assay (MTT, Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) as previously described [24]. Formazan crystals were solubilized in dimethylsulphoxide (Sigma-Aldrich) and analyzed at 570 nm with a microplate reader (Bio-Rad).

Human pancreatic tissues

Human PDAC samples were obtained from the Lille University Hospital with the approval of the Institutional Review Board. No patient received either chemotherapy or radiotherapy before the surgical resection except patient #8. Clinico-biological data of patients are described in table 2.

Pdx-1-Cre; LStopL-Kras^{G12D} mouse model of pancreatic carcinogenesis

Pdx1-Cre mice were obtained from the Mouse Models of Human Cancer Consortium (MMHCC, USA). LStopL-Kras^{G12D} mice were obtained from Dr D. Tuveson (Cambridge Research Institute, England). All procedures are in accordance with the guidelines of animal care ethical committee (Comité Ethique Expérimentation Animale Nord Pas-de-Calais, #AF042008) [22].

Subcutaneous xenografts

Subcutaneous (SC) xenografts (2×10^6 cells in 100 μ l of RPMI 1640 or DMEM media) of miR-neg, miR-29a or miR-330-5p, cell lines were carried out with 100 μ l of Matrigel™ (BD Biosciences) into the flank of severe-combined immunodeficient (SCID) male mice (CB-17, Charles Rivers) that were bred and maintained under pathogen-free conditions (6 mice/group). Tumor development was followed weekly. The tumor volume (mm^3) was determined by calculating $V=W^2 \times L$ in which W corresponds to the width (mm) and L to the tumor length (mm). Mice were sacrificed 28 days after inoculation. All procedures were performed in accordance with the guidelines and approved by the animal care ethical committee (Comité Ethique Expérimentation Animale Nord Pas-de-Calais, CEEA #122012). For intra-tumoral injection of miRNAs, 2×10^6 cells for Capan-2 and 3×10^6 cells for MiaPaCa-2 were xenografted. After 10 days, 20 μ g of miRNAs or miR-neg, cloned into the pCDNA6.2emGFP vector were injected into the SC tumors ($\sim 300 \text{ mm}^3$) using Exgen 500 (Euromedex) reagent and glucose 5% (v/v) as described by the manufacturer's instructions. Tumors were followed twice a week and mice were sacrificed 20 days after miRNA injection.

Cloning of MUC1 3'-UTR, MUC1 5'-UTR/first exon and luciferase assays

Human *MUC1* 3'-untranslated region (UTR) or *MUC1* first exon containing the 5'-UTR were cloned into the pGL3-promoter vector (Promega) using *Xba*I or *Hind*III restriction sites (Biolabs) (Table 1). Mutations were performed using the QuickChange® XL site-directed mutagenesis kit (Stratagene, Agilent Technologies) (Table 1). Luciferase activity and protein assays were performed as previously described [22,24]. Experiments were carried out three times in triplicate.

Biotin pull-down assay

10⁶ cells were transfected with miR-29a or miR-330-5p or scramble 3'-biotinylated miRNA (100 nM) (Dharmacon, Thermo Scientific) as described above. Biotin pull-down assay was performed as previously described [22,25]. Pulled-down RNA was directly extracted from the beads or from the input RNA using the miRNeasy Mini kit (Qiagen). Reverse transcription and qRT-PCR were then performed. Three independent experiments were performed.

Quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (qRT-PCR)

Total RNA including miRNAs from cells and formaldehyde-fixed paraffin-embedded tissues was extracted using miRNeasy Mini Kit with Qiazol[®] (Qiagen) and RecoverAll[™] Total Nucleic Acid Isolation Kit (Ambion, Life Technologies) according to the manufacturer's instructions. RNA (1 µg) was reverse transcribed with the QuantiMiR Reverse Transcription Kit (System Biosciences, Ozyme). For mRNA, cDNA was prepared as previously described [24]. qPCR was performed using SsoFast Evagreen[®] Supermix (Bio-Rad) and the CFX96 real time PCR system (Bio-Rad). Expression levels of *MUC1* and miRNAs of interest were respectively normalized to *GAPDH* and human *U6*/mouse *u6* (Table 1). MiRNAs universal primers were provided with the quantiMiR[™] kit (System Bioscience, Ozyme). Expression levels were calculated using the 2^{-Ct} method. Three independent experiments were performed in triplicate.

Protein extraction and Western-blot analysis

Total proteins were extracted, electro-transferred, immunostained, and visualized as described before [22,24,26]. Antibodies used are MUC1 (M8, 1/250, from Pr D. Swallow); -actin (A5441 AC15, 1/5000) from Sigma-Aldrich; cyclin D1 (sc-718, 1/250), CDK6 (sc-177, 1/250) from Santa Cruz; EGFR (#4267s, 1/500), Bcl-2 (#2872, 1/250), phospho P53 (#9284, 1/500), P53 (#9282, 1/500), phospho p42-44 MAPK (#9101, 1/500), p42-44 MAPK (#9102, 1/500), phospho Stat3 (#9145, 1/250), Stat3 (#9139, 1/500), -catenin (#8480s, 1/1000), phospho AKT (#4060, 1/500), AKT (#4691s, 1/500) from Cell Signaling, Ozyme. Three independent experiments were performed.

Immunohistochemistry

Human pancreatic tissues, tumor xenografts and mouse tissues were fixed in 10% (w/v) buffered formaldehyde, paraffin-embedded, cut at 4 µm thickness and applied on SuperFrost[®] slides (Menzel-Glaser, Thermo Scientific). Histology was assessed by staining tissues with Hematoxylin-Eosin. Manual immunohistochemistry (IHC) was carried out as described [28] and automatic IHC was performed with an automated immunostainer (ES, Ventana Medical System, Strasbourg, France) as described [29]. Detection of MUC1 in human tissues and xenografts was carried out with anti-MUC1 M8 Mab (1/50) and in mouse tissues with anti-MUC1 Ab5 (MH1, 1/200) (HM-1630P1, Neomarkers Labvision, Thermo Scientific)

Statistical analyses

Statistical analyses were performed using Graphpad Prism 4.0 software (Graphpad softwares Inc). Data are presented as mean \pm SD or \pm SEM. Differences in the mean of samples were analyzed by the student's t test or one way ANOVA test with selected comparison using Tukey's HSD post-hoc test or Wilcoxon signed-rank test. Differences less than 0.05 were considered significant and were indicated with a *. ** indicates $p < 0.01$, *** indicates $p < 0.001$.

RESULTS

In vitro regulation of MUC1 by miRNAs in PDAC cell lines. Using miRanda, miRWalk and mirBase softwares, we found several potential miRNAs binding sites on *MUC1* gene (Figure 1A). This led us to identify one potential binding site for miR-29a and two potential binding sites for miR-330-5p on *MUC1* 3'-UTR. Additionally, we found one binding site for miR-876-3p and miR-939 on *MUC1* 5'-UTR and one binding site in the 3'-UTR and the first exon of *MUC1* for miR-183 and miR-200a. Overexpression of these miRNAs in PDAC cells induced a strong decrease of MUC1 expression compared to miR-neg (Figure 1B). Co-transfection of *MUC1* 3'-UTR and the miRNAs of interest led to a significant decrease of luciferase activity in the presence of miR-29a or miR-330-5p (Figure 1C). Mutation of miR-29a or miR-330-5p binding sites into *MUC1* 3'-UTR led to luciferase activity restoration for miR-29a and miR-330-5p site #2 but not for miR-330-5p site #1 (Figure 1C). No significant variation of luciferase activity was found with any other miRNAs. To further validate the direct interaction between miR-29a, miR-330-5p and *MUC1* mRNA we used an affinity-based approach with biotinylated miRNAs. We show a 1.4 and 1.5 fold enrichment of *MUC1* mRNA in miR-29a and miR-330-5p pulldown, respectively (Figure 1D). Altogether these results demonstrate that miR-29a and miR-330-5p (site #2) negatively regulate *MUC1* expression by interacting directly with its 3'-UTR.

Expression of miR-29a, miR-330-5p and MUC1 in human and mouse PDAC cells and tissues. Having shown *in vitro* that miR-29a and miR-330-5p are direct negative regulators of MUC1 expression in PDAC cells, we undertook to study their expression in human PDAC cell lines and *ex vivo* in human and mouse pancreatic tissues. The measurement of miRNAs expression in MiaPaCa-2, Capan-1, Panc-1, BxPC-3, and Capan-2 PDAC cell lines and normal ductal HPDE cells indicated a decreased expression of both miR-29a and miR-330-5p in the five PDAC cell lines compared to normal HPDE cells (Figure 2A) except in BxPC-3 for miR-330-5p. Pancreatic expression was then studied in a mouse model of pancreatic carcinogenesis (Kras^{G12D}) in which we found a decreased expression of miR-29a and miR-330-5p compared to control mice (Kras^{WT}) (Figure 2B) whereas Muc1 was overexpressed (Figure 2C). In human PDAC samples (Table 2), a significant decreased expression of miR-29a and miR-330-5p was found compared to non tumoral adjacent tissues (Figure

2D). This was correlated to overexpression and cytoplasmic delocalization of MUC1 (Figure 2E). Altogether these results indicate a decreased expression of miR-29a or miR-330-5p, associated with MUC1 overexpression in human and mouse PDAC tissues.

Biological properties of PDAC cells transiently overexpressing miR-29a and miR-330-5p. To further study the functional activity of miR-29a and miR-330-5p, transient overexpression of miRNAs was realized in Capan-2, MiaPaCa-2 and Capan-1 cell lines (Figure 3A). MiRNAs overexpression led to a significant decreased expression of *MUC1* mRNA and protein in all cell lines compared to the miR-neg control (Figure 3B & C). Simultaneous overexpression of both miR-29a and miR-330-5p did not potentiate the effects. Overexpression of miR-29a or miR-330-5p in cells alone or in combination induced a significant decrease of cell proliferation (Figure 3D), cell migration (Figure 3E) and cell invasion (Figure 3F). Altogether these results indicate that both miR-29a and miR-330-5p alter PDAC cell proliferation, migration and invasion.

Biological properties of PDAC cells stably overexpressing miR-29a and miR-330-5p. Having shown that miR-29a, miR-330-5p and MUC1 had an inverse profile of expression in PDAC, and that these two miRNAs altered biological properties of PDAC cells, we established stable cell lines overexpressing either miR-29a or miR-330-5p in MiaPaCa-2 cells (Figure 4A) in order to further assess their biological effect in a stable cellular model. A strong decrease of MUC1 mRNA and protein expression was observed in stable cell lines compared to control cells (Figure 4B & C). Cells overexpressing miR-29a or miR-330-5p showed a statistically significant decrease of proliferation (Figure 4D), migration and invasion (Figure 4E). To identify the mechanisms underlying the alterations mediated by the overexpression of miR-29a or miR-330-5p and establish a relationship between miR-29a and miR-330-5p negative regulation of *MUC1* and their biological effects on PDAC cell behavior, we measured the activation of major signaling markers/pathways in these cellular models. Accordingly to the decreased of cell proliferation (Figure 4D), we observed a decrease of phospho p42-44 MAPK, cyclin D1 and β -catenin expression in the two cell lines and a decrease of CDK6 and EGFR in cells overexpressing miR-29a (Figure 4A). We also found an increased level of apoptotic marker phospho-P53 and a decrease of anti-apoptotic marker Bcl-2 in cell lines overexpressing miR-29a or miR-330-5p together with a decrease of phospho-Akt and phospho-Stat3 (Figure 4C). Altogether, these results indicate that PDAC cells overexpressing transiently or stably miR-29a or miR-330-5p harbor an altered PDAC cell behavior that is less tumorigenic.

Effect of miR29a and miR-330-5p on PDAC cell chemosensitivity. PDAC being an extremely chemoresistant cancer, we undertook to evaluate miR-29a and miR-330-5p effect on PDAC cell chemosensitivity. Measurement of cell survival following drug treatment indicated that overexpression of miR-29a or miR-330-5p led to a significant decrease of cell viability following treatment with

gemcitabine whereas no significant variation was found with drugs of the FOLFIRINOX protocol (oxaliplatin, 5-fluoro-uracil or SN-38) (Figure 5A & B). IC_{50} determination also indicated that stable cell lines overexpressing miR-29a (383 nM) or miR-330-5p (239 nM) were more sensitive to gemcitabine than miR-neg cells (646 nM) (Figure 5C). Altogether, these results indicate that PDAC cells overexpressing miR-29a or miR-330-5p are more sensitive to gemcitabine.

In vivo biological effects of miR-29a and miR-330-5p on PDAC tumor properties. Having shown *in vitro* that miR-29a and miR-330-5p possessed tumor suppressor activities on PDAC cells, we undertook to evaluate their activity *in vivo*. To this aim, subcutaneous (SC) xenografts of Capan-2 and MiaPaCa-2 cells were performed in SCID mice followed by an intra-tumoral injection of the miRNA of interest. A significant decrease of Capan-2 ($p<0.05$) and MiaPaCa-2 ($p<0.001$) tumor growth was found when compared to control miR-neg (Figure 6A). Tumor weights were also significantly decreased when injected with miR-29a in Capan-2 ($p<0.05$) or both miRNAs in MiaPaCa-2 ($p<0.05$) (Figure 6B). SC xenografts of the MiaPaCa-2 cells stably overexpressing miR-29a or miR-330-5p were carried out, again a significant decrease of tumor growth was observed ($p<0.01$) (Figure 6C). This was correlated to a strong decrease of MUC1 expression (Figure 6D). Altogether these results indicate that *in vivo* miR-29a and miR-330-5p possess tumor suppressive activities on PDAC tumors.

DISCUSSION

Pancreatic ductal adenocarcinoma suffers from a very poor prognosis and absence of early detection and efficient therapy [2,18]. Recently, miRNAs have emerged as very attractive molecules to target cancer since they regulate many genes encoding oncogenic proteins [19]. In PDAC, several studies have described the pattern of expression of miRNAs but their exact biological role and the identification of their targets remain largely unknown [21,22]. In this report, we have identified miR-29a and miR-330-5p as two new miRNAs directly targeting the 3'UTR of MUC1 oncogenic mucin in PDAC cells and demonstrate that these two miRNAs display tumor suppressive activities in PDAC both *in vitro* and *in vivo*. We thus propose miR-29a and miR-330-5p as appropriate targets to inhibit MUC1 expression in order to slow-down pancreatic carcinogenesis and develop new potential therapeutic tools.

MiR-29a and miR-330-5p were shown to inhibit MUC1 expression by directly binding to its 3'-UTR but interestingly we have also identified additional potential binding sites for miR-29a and miR-330-5p into MUC1 coding regions suggesting that the inhibition of MUC1 could also involve the binding of these two miRNAs to additional regions. The validation of these sites will be of particular interest especially because it was shown that MUC4 and MUC16, two other membrane-bound mucins, are regulated by miRNAs through their coding regions [30]. This could thus represent a general mechanism of mucin gene regulation by miRNAs.

In breast cancer cells, MUC1 is regulated by miR-145 [31], miR-1226 [32] and miR-125b [33]. In this report we show that, MUC1 is directly regulated by miR-29a and miR-330-5p and indirectly regulated by miR-876-3p, miR-939, miR-183 and miR-200a in PDAC cells. MiR-183 and miR-200 family are EMT inhibitors and favor epithelial differentiation [34] by inhibiting the Wnt/ -catenin signaling pathway [35,36]. The membrane-bound mucin MUC1 is an epithelial marker of polarized epithelial cells [4–6] but aberrant overexpression of MUC1 in cancer cells is correlated with an induction of EMT through the Wnt/ -catenin signaling pathway [13]. The indirect inhibition of MUC1 by miR-183 and miR-200a could be an additional mechanism to inhibit EMT in PDAC. The role of miR-876-3p and miR-939 is hardly known in cancer. The indirect mechanisms leading to MUC1 inhibition will have to be identified in future studies. The identification of predicted partners such as EGFR, cyclin D1, Stat3, indirectly regulating MUC1, that are potential targets of miR-876-3p or miR-939 (personal communication) suggests that targeting these miRNAs could represent an interesting approach to slow-down carcinogenesis.

We also demonstrate that miR-29a and miR-330-5p inhibit MUC1 expression and deregulate signaling pathways as well as PDAC cell proliferation, migration, invasion and tumor growth. It is well-established that MUC1 is involved in these pathways [37]. The mechanisms may involve p42-44 MAPK, cyclin D1, -catenin and EGFR. Moreover, the fact that proliferation is strongly altered by miR-29a and only moderately by miR-330-5p suggests that both miRNAs have additional targets. In

that matter, we confirmed the down-expression of CDK6 and Bcl-2, two known targets of miR-29a [38,39]. We also showed that overexpression of miR-29a or miR-330-5p increase P53 activity as previously proposed for miR-29a [40].

Contrarily to miR-330-5p, overexpression of miR-29a only had a modest effect on PDAC cell invasion. This could result from the inhibition of CDK6 that we observed in these cells, loss of CDK6 being a marker of several PDAC cell line invasiveness [41]. This may also be due to other properties of miR-29a that depend on the cellular context: increased invasion through MMP2, E-cadherin and KLF4 in colorectal cancer cells [42], decreased invasion in gastric [43], lung and pancreatic cancer cells [44], or decreased invasion and metastasis probably via inhibition of CEACAM6 in pancreatic cancer [45].

Additionally, we found that overexpression of miR-29a or miR-330-5p sensitizes PDAC cells to gemcitabine and induces a decrease of Akt pathway activation. Interestingly, MUC1 is known to mediate PDAC cell chemoresistance to gemcitabine by regulating *MRP1* gene expression through the PI3K/Akt pathway [14]. Although, miR-29a overexpression was previously shown to induce gemcitabine resistance in other PDAC cells (BxPC-3 and Panc-1) through the Wnt/ β -catenin signaling pathway [46]. Contrarily, it was shown in lung cancer that overexpression of miR-29a inhibit Wnt/ β -catenin signaling and β -catenin expression in accordance with our results suggest [47]. The decrease of Akt expression led us to propose also a MUC1/Akt dependent mechanism mediating miR-29a/miR-330-5p effects on MiaPaCa-2 cell sensitivity to gemcitabine. Interestingly, it was also previously shown that miR-29a inhibits Akt expression [48] and sensitizes ovarian cancer cells to cisplatin [49], thus highlighting the complex role of this miRNA in chemoresistance processes triggered by cancer cells. Further investigation will be needed to decipher the mechanisms underlying the sensitivity of PDAC cells to chemotherapeutic drugs in relation with MUC1, miRNAs and Akt expression.

We also show that miR-29a and miR-330-5p are deregulated in human PDAC cell lines and tissues, and in the Kras^{G12D} mouse model of pancreatic cancer. Expression studies in a cohort of 18 human PDAC tissues showed inhibition of miR-29a and miR-330-5p which is in accordance with previous studies showing that miR-29a is frequently deregulated in cancerous tissues. This confirms the potential of miR-29a as a target for cancer therapy as it was previously proposed [50] and highlights the interest for miR-330-5p in PDAC.

In conclusion, we show (i) that MUC1 is regulated by miRNAs in PDAC cells by direct and indirect mechanisms, (ii) that miR-29a and miR-330-5p are deregulated in PDAC and that PDAC cells overexpressing transiently or stably either miR-29a or miR-330-5p possess similar biological properties: *in vitro* decreased proliferative, migrating, and invasive properties and *in vivo* decreased tumor growth, (iii) that miR-29a and miR-330-5p sensitize PDAC cells to gemcitabine. Based on that, we propose that oncosuppressive miR-29a and miR-330-5p may represent attractive targets to inhibit the expression of the oncogenic MUC1 mucin and decrease pancreatic cancer progression.

Author contribution:

Solange Tréhoux conceived and designed the project, performed experiments, data analysis and interpretation, and wrote the paper. Isabelle Van Seuningen conceived and designed the project, provided financial support, data analysis and interpretation and wrote the paper. Nicolas Jonckheere performed *in vivo* experiments in mice models, data analysis and interpretation, and revised the manuscript. Florence Renaud and Emmanuelle Leteurtre performed anatomopathological analyses and revised the manuscript. Yannick Delpu and Jérôme Torrisani raised stable cell lines overexpressing miR-29a and miR-330-5p and revised manuscript.

Conflicts of Interest: Authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements: We thank D. Tuveson (Cambridge Research Institute, England) for the kind gift of *LStopL-Kras^{G12D}* mouse model; M. S. Tsao (University Health Network, Toronto, Canada) for the kind gift of HPDE cells; D. Swallow (MRC, London, UK) for providing MUC1 M8 antibody, and A. Lansiaux and S. Meignan (Centre Oscar Lambret and Inserm UMR837, team 3) for the chemotherapeutic drugs. We are grateful to B. Barbot and B. Duchêne (Inserm UMR837, team 5) and M.H. Gevaert and R. Siminsky (Department of Histology, Faculty of Medicine, University of Lille 2) for their excellent technical help. We thank the IFR114/IMPRT (University of Lille 2) facilities for luciferase measurements (A.S. Drucbert) and animal experimentation (D. Taillieu).

Funding: Solange Tréhoux is a recipient of a PhD fellowship of the University of Lille 2. Isabelle Van Seuningen is the recipient of a “Contrat Hospitalier de Recherche Translationnelle” (AVIESAN/CHRT 2010). This work was supported by grants from la Ligue Nationale Contre le Cancer (Equipe Labellisée Ligue 2011-2013, IVS), from SIRIC ONCOLille, Grant INCa-DGOS-Inserm 6041 (IVS) and from "Contrat de Plan Etat Région" CPER Cancer 2007-2013 (IVS).

REFERENCES

- 1 Jemal, A., Bray, F., Center, M. M., Ferlay, J., Ward, E. and Forman, D. (2011) Global cancer statistics. *CA. Cancer J. Clin.* **61**, 69–90.
- 2 Vincent, A., Herman, J., Schulick, R., Hruban, R. H. and Goggins, M. (2011) Pancreatic cancer. *The Lancet* **378**, 607–620.
- 3 Conroy, T., Desseigne, F., Ychou, M., Bouché, O., Guimbaud, R., Bécouarn, Y., Adenis, A., Raoul, J.-L., Gourgou-Bourgade, S., de la Fouchardière, C., et al. (2011) FOLFIRINOX versus gemcitabine for metastatic pancreatic cancer. *N. Engl. J. Med.* **364**, 1817–1825.
- 4 Jonckheere, N. and Van Seuning, I. (2008) The membrane-bound mucins: how large O-glycoproteins play key roles in epithelial cancers and hold promise as biological tools for gene-based and immunotherapies. *Crit. Rev. Oncog.* **14**, 177–196.
- 5 Hollingsworth, M. A. and Swanson, B. J. (2004) Mucins in cancer: protection and control of the cell surface. *Nat Rev Cancer* **4**, 45–60.
- 6 Kufe, D. W. (2009) Mucins in cancer: function, prognosis and therapy. *Nat. Rev. Cancer* **9**, 874–885.
- 7 Schroeder, J. A., Thompson, M. C., Gardner, M. M. and Gendler, S. J. (2001) Transgenic MUC1 Interacts with Epidermal Growth Factor Receptor and Correlates with Mitogen-activated Protein Kinase Activation in the Mouse Mammary Gland. *J. Biol. Chem.* **276**, 13057–13064.
- 8 Besmer, D. M., Curry, J. M., Roy, L. D., Tinder, T. L., Sahraei, M., Schettini, J., Hwang, S.-I., Lee, Y. Y., Gendler, S. J. and Mukherjee, P. (2011) Pancreatic ductal adenocarcinoma mice lacking mucin 1 have a profound defect in tumor growth and metastasis. *Cancer Res.* **71**, 4432–4442.
- 9 Rajabi, H., Ahmad, R., Jin, C., Kosugi, M., Alam, M., Joshi, M. D. and Kufe, D. (2012) MUC1-C oncoprotein induces TCF7L2 transcription factor activation and promotes cyclin D1 expression in human breast cancer cells. *J. Biol. Chem.* **287**, 10703–10713.
- 10 Ahmad, R., Rajabi, H., Kosugi, M., Joshi, M. D., Alam, M., Vasir, B., Kawano, T., Kharbanda, S. and Kufe, D. (2011) MUC1-C oncoprotein promotes STAT3 activation in an autoinductive regulatory loop. *Sci. Signal.* **4**, ra9.
- 11 Gao, J., McConnell, M. J., Yu, B., Li, J., Balko, J. M., Black, E. P., Johnson, J. O., Lloyd, M. C., Altiok, S. and Haura, E. B. (2009) MUC1 is a downstream target of STAT3 and regulates lung cancer cell survival and invasion. *Int. J. Oncol.* **35**, 337–345.
- 12 Singh, P. K., Wen, Y., Swanson, B. J., Shanmugam, K., Kazlauskas, A., Cerny, R. L., Gendler, S. J. and Hollingsworth, M. A. (2007) Platelet-Derived Growth Factor Receptor –Mediated Phosphorylation of MUC1 Enhances Invasiveness in Pancreatic Adenocarcinoma Cells. *Cancer Res.* **67**, 5201–5210.

- 3 Roy, L. D., Sahraei, M., Subramani, D. B., Besmer, D., Nath, S., Tinder, T. L., Bajaj, E., Shanmugam, K., Lee, Y. Y., Hwang, S. I. L., et al. (2011) MUC1 enhances invasiveness of pancreatic cancer cells by inducing epithelial to mesenchymal transition. *Oncogene* **30**, 1449–1459.
- 14 Nath, S., Daneshvar, K., Roy, L. D., Grover, P., Kidiyoor, A., Mosley, L., Sahraei, M. and Mukherjee, P. (2013) MUC1 induces drug resistance in pancreatic cancer cells via upregulation of multidrug resistance genes. *Oncogenesis* **2**, e51.
- 15 Winter, J. M., Tang, L. H., Klimstra, D. S., Brennan, M. F., Brody, J. R., Rocha, F. G., Jia, X., Qin, L.-X., D'Angelica, M. I., DeMatteo, R. P., et al. (2012) A novel survival-based tissue microarray of pancreatic cancer validates MUC1 and mesothelin as biomarkers. *PloS One* **7**, e40157.
- 16 Mohr, A. M., Bailey, J. M., Lewallen, M. E., Liu, X., Radhakrishnan, P., Yu, F., Tapprich, W. and Hollingsworth, M. A. (2013) MUC1 regulates expression of multiple microRNAs involved in pancreatic tumor progression, including the miR-200c/141 cluster. *PloS One* **8**, e73306.
- 17 Kasinski, A. L. and Slack, F. J. (2011) MicroRNAs en route to the clinic: progress in validating and targeting microRNAs for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* **11**, 849–864.
- 18 Humeau, M., Torrisani, J. and Cordelier, P. (2013) miRNA in clinical practice: pancreatic cancer. *Clin. Biochem.* **46**, 933–936.
- 19 Iorio, M. V. and Croce, C. M. (2012) MicroRNA dysregulation in cancer: diagnostics, monitoring and therapeutics. A comprehensive review. *EMBO Mol. Med.* **4**, 143–159.
- 20 Bartel, D. P. (2004) MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* **116**, 281–297.
- 21 Delpu, Y., Lulka, H., Sicard, F., Saint-Laurent, N., Lopez, F., Hanoun, N., Buscail, L., Cordelier, P. and Torrisani, J. (2013) The Rescue of miR-148a Expression in Pancreatic Cancer: An Inappropriate Therapeutic Tool. *PloS One* **8**, e55513.
22. Lahdaoui F, Delpu Y, Vincent A, Renaud F, Messenger M, Duchêne B, et al. miR-219-1-3p is a negative regulator of the mucin MUC4 expression and is a tumor suppressor in pancreatic cancer. *Oncogene*. 2014; **0**: 1–9.
- 23 Jonckheere, N., Perrais, M., Mariette, C., Batra, S. K., Aubert, J.-P., Pigny, P. and Van Seuning, I. (2004) A role for human MUC4 mucin gene, the ErbB2 ligand, as a target of TGF-beta in pancreatic carcinogenesis. *Oncogene* **23**, 5729–5738.
- 24 Skrypek, N., Duchêne, B., Hebbar, M., Leteurtre, E., van Seuning, I. and Jonckheere, N. (2013) The MUC4 mucin mediates gemcitabine resistance of human pancreatic cancer cells via the Concentrative Nucleoside Transporter family. *Oncogene* **32**, 1714–1723.
- 25 Lal, A., Thomas, M. P., Altschuler, G., Navarro, F., O'Day, E., Li, X. L., Concepcion, C., Han, Y.-C., Thiery, J., Rajani, D. K., et al. (2011) Capture of microRNA-bound mRNAs identifies the tumor suppressor miR-34a as a regulator of growth factor signaling. *PLoS Genet.* **7**, e1002363.

- 26 Jonckheere, N., Skrypek, N., Merlin, J., Dessein, A. F., Dumont, P., Leteurtre, E., Harris, A., Desseyn, J.-L., Susini, C., Frénois, F., et al. (2012) The mucin MUC4 and its membrane partner ErbB2 regulate biological properties of human CAPAN-2 pancreatic cancer cells via different signalling pathways. *PloS One* **7**, e32232.
- 27 Piessen, G., Jonckheere, N., Vincent, A., Hémon, B., Ducourouble, M.-P., Copin, M.-C., Mariette, C. and Van Seuningen, I. (2007) Regulation of the human mucin MUC4 by taurodeoxycholic and taurochenodeoxycholic bile acids in oesophageal cancer cells is mediated by hepatocyte nuclear factor 1alpha. *Biochem. J.* **402**, 81–91.
28. Van der Sluis M, Melis MHM, Jonckheere N, Ducourouble M-P, Büller HA, Renes I, et al. The murine Muc2 mucin gene is transcriptionally regulated by the zinc-finger GATA-4 transcription factor in intestinal cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004; **325**: 952-960.
29. Mariette C, Perrais M, Leteurtre E, Jonckheere N, Hémon B, Pigny P, et al. Transcriptional regulation of human mucin MUC4 by bile acids in oesophageal cancer cells is promoter-dependent and involves activation of the phosphatidylinositol 3-kinase signalling pathway. *Biochem J.* 2004; **377**: 701-708.
- 30 Radhakrishnan, P., Mohr, A. M., Grandgenett, P. M., Steele, M. M., Batra, S. K. and Hollingsworth, M. A. (2013) MicroRNA-200c Modulates the Expression of MUC4 and MUC16 by Directly Targeting Their Coding Sequences in Human Pancreatic Cancer. *PloS One* **8**, e73356.
- 31 Sachdeva, M. and Mo, Y.-Y. (2010) MicroRNA-145 suppresses cell invasion and metastasis by directly targeting mucin 1. *Cancer Res.* **70**, 378–387.
- 32 Jin, C., Rajabi, H. and Kufe, D. (2010) miR-1226 targets expression of the mucin 1 oncoprotein and induces cell death. *Int. J. Oncol.* **37**, 61–69.
33. Rajabi, H., Jin, C., Ahmad, R., McClary, C., Joshi, M. D., and Kufe, D. (2010) MUCIN 1 oncoprotein expression is suppressed by the miR-125b oncomirR. *Genes Cancer* **1**, 62–68
- 34 Wellner, U., Schubert, J., Burk, U. C., Schmalhofer, O., Zhu, F., Sonntag, A., Waldvogel, B., Vannier, C., Darling, D., zur Hausen, A., et al. (2009) The EMT-activator ZEB1 promotes tumorigenicity by repressing stemness-inhibiting microRNAs. *Nat. Cell Biol.* **11**, 1487–1495.
- 35 Xia, H., Cheung, W. K. C., Sze, J., Lu, G., Jiang, S., Yao, H., Bian, X.-W., Poon, W. S., Kung, H. and Lin, M. C. (2010) miR-200a Regulates Epithelial-Mesenchymal to Stem-like Transition via ZEB2 and -Catenin Signaling. *J. Biol. Chem.* **285**, 36995 – 37004.
- 36 Chen, C., Xiang, H., Peng, Y.-L., Peng, J. and Jiang, S.-W. (2014) Mature miR-183, negatively regulated by transcription factor GATA3, promotes 3T3-L1 adipogenesis through inhibition of the canonical Wnt/ -catenin signaling pathway by targeting LRP6. *Cell. Signal.* **26**, 1155–1165.

- 37 Kufe, D. W. (2013) MUC1-C oncoprotein as a target in breast cancer: activation of signaling pathways and therapeutic approaches. *Oncogene* **32**, 1073–1081.
- 38 Zhao, J.-J., Lin, J., Lwin, T., Yang, H., Guo, J., Kong, W., Dessureault, S., Moscinski, L. C., Reznia, D., Dalton, W. S., et al. (2010) microRNA expression profile and identification of miR-29 as a prognostic marker and pathogenetic factor by targeting CDK6 in mantle cell lymphoma. *Blood* **115**, 2630–2639.
- 39 Xiong, Y., Fang, J.-H., Yun, J.-P., Yang, J., Zhang, Y., Jia, W.-H. and Zhuang, S.-M. (2010) Effects of microRNA-29 on apoptosis, tumorigenicity, and prognosis of hepatocellular carcinoma. *Hepatology* **51**, 836–845.
- 40 Park, S.-Y., Lee, J. H., Ha, M., Nam, J.-W. and Kim, V. N. (2009) miR-29 miRNAs activate p53 by targeting p85 alpha and CDC42. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **16**, 23–29.
- 41 Liu, F. and Korc, M. (2012) Cdk4/6 inhibition induces epithelial-mesenchymal transition and enhances invasiveness in pancreatic cancer cells. *Mol. Cancer Ther.* **11**, 2138–2148.
- 42 Tang, W., Zhu, Y., Gao, J., Fu, J., Liu, C., Liu, Y., Song, C., Zhu, S., Leng, Y., Wang, G., et al. (2013) MicroRNA-29a promotes colorectal cancer metastasis by regulating matrix metalloproteinase 2 and E-cadherin via KLF4. *Br. J. Cancer.*
- 43 Gong, J., Li, J., Wang, Y., Liu, C., Jia, H., Jiang, C., Wang, Y., Luo, M., Zhao, H., Dong, L., et al. (2013) Characterization of microRNA-29 family expression and investigation of their mechanistic roles in gastric cancer. *Carcinogenesis* **33**, 337–347.
- 44 Muniyappa, M. K., Dowling, P., Henry, M., Meleady, P., Doolan, P., Gammell, P., Clynes, M. and Barron, N. (2009) MiRNA-29a regulates the expression of numerous proteins and reduces the invasiveness and proliferation of human carcinoma cell lines. *Eur. J. Cancer* **45**, 3104–3118.
- 45 Chen, J., Li, Q., An, Y., Lv, N., Xue, X., Wei, J., Jiang, K., Wu, J., Gao, W., Qian, Z., et al. (2013) CEACAM6 induces epithelial-mesenchymal transition and mediates invasion and metastasis in pancreatic cancer. *Int. J. Oncol.* **43**, 877–885.
- 46 Nagano, H., Tomimaru, Y., Eguchi, H., Hama, N., Wada, H., Kawamoto, K., Kobayashi, S., Mori, M. and Doki, Y. (2013) MicroRNA-29a induces resistance to gemcitabine through the Wnt/ β -catenin signaling pathway in pancreatic cancer cells. *Int. J. Oncol.* **43**, 1066–1072.
- 47 Tan, M., Wu, J. and Cai, Y. (2013) Suppression of Wnt signaling by the miR-29 family is mediated by demethylation of WIF-1 in non-small-cell lung cancer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **438**, 673–679.
- 48 Wei, W., He, H.-B., Zhang, W.-Y., Zhang, H.-X., Bai, J.-B., Liu, H.-Z., Cao, J.-H., Chang, K.-C., Li, X.-Y. and Zhao, S.-H. (2013) miR-29 targets Akt3 to reduce proliferation and facilitate differentiation of myoblasts in skeletal muscle development. *Cell Death Dis.* **4**, e668.

- 49 Yu, P.-N., Yan, M.-D., Lai, H.-C., Huang, R.-L., Chou, Y.-C., Lin, W.-C., Yeh, L.-T. and Lin, Y.-W. (2014) Downregulation of miR-29 contributes to cisplatin resistance of ovarian cancer cells. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* **134**, 542–551.
- 50 Wang, Y., Zhang, X., Li, H., Yu, J. and Ren, X. (2013) The role of miRNA-29 family in cancer. *Eur. J. Cell Biol.* **92**, 123–128.

FIGURE LEGENDS

Figure 1: MUC1 regulation by miRNAs in PDAC cell lines (A) Sequence of *MUC1* 3'-UTR and position of miR-29a, miR-330-5p, miR-183, miR-200a potential binding sites (left) and sequence of *MUC1* first exon containing its 5'-UTR and position of miR-876-3p, miR-939, miR-183, miR-200a potential binding sites (right). (B) Study of the expression of MUC1 in Capan-2 cells transfected with the miRNA of interest or miR-neg by Western-blot. MUC1/ β -actin ratio is indicated. (C) Measurement of luciferase activity in Capan-2 cells co-transfected with miRNAs of interest and *MUC1* 3'-UTR or *MUC1* Exon1 containing the 5'-UTR. The miR-neg luciferase activity is arbitrarily set to 1. (D) Biotinylated miR-29a or miR-330-5p or scramble miRNAs (miR-neg) were transfected in Capan-2 cells. Enrichment of *MUC1* mRNA in miRNA pulldown was assessed by qRT-PCR. The *MUC1/GAPDH* ratio was calculated and normalized to the input.

Figure 2: MiRNAs expression in PDAC cells and tissues. (A) Expression of miRNAs in HPDE, MiaPaCa-2, Capan-1, Panc-1, BxPC-3, and Capan-2 cell lines was studied by qRT-PCR. MiRNAs expression was normalized to control *U6* RNA. MiRNAs level in normal pancreatic ductal cells HPDE was arbitrarily set to 1. (B) MiRNAs expression in control *Kras*^{WT} and *Kras*^{G12D} mice studied by qRT-PCR. MiRNAs expression was normalized to control *U6* RNA. Expression in *Kras*^{WT} mice was arbitrarily set to 1. (C) MUC1 expression was evaluated by IHC in control *Kras*^{WT} and in *Kras*^{G12D} mice. (D) MiR-29a and miR-330-5p expression was evaluated in a cohort of 18 patients with PDAC by qRT-PCR. MiRNAs expression was normalized to control *U6* RNA and expressed as a ratio of PDAC/non tumoral adjacent tissues (control). (E) MUC1 expression was evaluated by IHC in non tumoral adjacent tissues (control) and in tumors (PDAC). As an illustration, results with patient #1 are shown.

Figure 3: Biological properties of PDAC cells transiently overexpressing miR-29a or miR-330-5p. (A) Expression of miR-29a and miR-330-5p was measured after transient overexpression in Capan-2, MiaPaCa-2 and Capan-1 cells by qRT-PCR. MiRNAs expression was normalized to control *U6* RNA. The miR-neg expression was arbitrarily set to 1. (B) Analysis of *MUC1* mRNA expression in Capan-2, MiaPaCa-2 and Capan-1 cells transfected with pre-miRNAs of interest or miR-neg by qRT-PCR. *MUC1* expression was normalized to control *GAPDH*. The miR-neg expression was arbitrarily set to 1. (C) Analysis of MUC1 protein expression in Capan-2, MiaPaCa-2 and Capan-1 cells transfected with pre-miRNAs of interest or miR-neg by Western-blot. (D) Cell proliferation, (E) cell migration and (F) cell invasion were measured in Capan-2, MiaPaCa-2 and Capan-1 cells transfected with pre-miRNAs. (E, F) Results are expressed as a percentage of migration or invasion in miR-transfected cells compared to the control miR-neg (100%).

Figure 4: Biological properties of PDAC cells stably overexpressing miR-29a or miR-330-5p. (A) Expression of miR-29a and miR-330-5p was measured after stable overexpression in MiaPaCa-2, by qRT-PCR. MiRNAs expression was normalized to control *U6* RNA. The miR-neg expression was arbitrarily set to 1. (B) Analysis of *MUC1* mRNA expression in MiaPaCa-2 overexpressing miR-29a, miR-330-5p or miR-neg by qRT-PCR. *MUC1* expression was normalized to control *GAPDH*. The miR-neg expression was arbitrarily set to 1. (C) Analysis of MUC1, EGFR, β -catenin, cyclin D1, phospho-p42-44 MAPK, p42-44 MAPK, CDK6, phospho-AKT, AKT, phospho Stat3, Stat3, phospho-P53, P53 and Bcl-2 expression by western-blot in cells stably overexpressing either miR-29a or miR-330-5p (D) Measurement of cell proliferation in cells stably overexpressing miR-29a or miR-330-5p. (E) Migration and invasion in MiaPaCa-2 cells stably overexpressing miR-29a or miR-330-5p. Results are expressed as a percentage of migration or invasion of cells compared to the control miR-neg or Mock cells (100%).

Figure 5: Chemosensitivity of PDAC cells overexpressing miR-29a or miR-330-5p. (A) Treatment of PDAC cells overexpressing miR-29a (A) or miR-330-5p (B) compared to miR-neg with different concentration ranges of gemcitabine, 5-fluoro-uracil, oxaliplatin or SN-38 for 72h. (C) IC₅₀ rates after 72h of gemcitabine treatment.

Figure 6: In vivo effects of miR-29a and miR-330-5p on PDAC tumor properties. Subcutaneous (SC) xenografts of Capan-2 (left panel) and MiaPaCa-2 (right panel) cells in SCID mice. Intra-tumoral injection of miR-neg, miR-29a or miR-330-5p was performed 10 days post-xenografting (~300 mm³). (A) Tumor growth (mm³) was measured for 20 days after miRNA injection. (B) Tumor weight (g) was measured at the sacrifice in Capan-2 (left panel) and MiaPaCa-2 (right panel) injected for miR-neg, miR-29a or miR-330-5p. (C) SC xenografts of MiaPaCa-2 cells stably overexpressing either miR-neg, miR-29a or miR-330-5p in SCID mice. Tumor growth (mm³) was evaluated during 20 days. (D) Analysis of MUC1 expression in SC tumors was carried out by IHC.

Table 1: Characteristics of the primers used for qRT-PCR, cloning and site-directed mutagenesis.

Gene	Forward/reverse	Sequences 5' 3'
<i>MUC1</i>	Forward	TGCCGCCGAAAGAACTACG
	Reverse	TGGGGTACTCGCTCATAGGAT
<i>GAPDH</i>	Forward	CCACATCGCTCAGACACCAT
	Reverse	CCAGGCGCCCAATACG
U6	Forward	CGCAAGGATGACACGCAA
u6	Forward	TGGCCCTGCGCAAGGATG
hsa-miR-330-5p	Forward	TCTCTGGGCCTGTGTCTTAGGC
hsa-miR-29a	Forward	TAGCACCATCTGAAATCGGTTA
hsa-miR-183	Forward	TATGGCACTGGTAGAATTCACT
hsa-miR-200a	Forward	TAACACTGCTGGTAACGATGT
hsa-miR-876-3p	Forward	TGGTGGTTTACAAAGTAATTCA
hsa-miR-939	Forward	TGGGGAGCTGAGGCTCTGGGGTG
<i>MUC1</i> 3'-UTR <i>Xba</i> I	Forward	CGCTCTAGATCTGCCAACTTGTAG
	Reverse	CGCTCTAGATTGGCGCAGTGGGAGA
<i>MUC1</i> 3'-UTR mut miR-330-5p #1	Forward	CCCAGGAGGACTGAAGCAACAAGCCCTGAGATAGC
	Reverse	GCTATCTCAGGGCTTGTGTCTCAGTCCTCTGGG
<i>MUC1</i> 3'-UTR mut miR-29a	Forward	CTGTTTGGGCTGGTGAGCTGGGAGTCACGGTGGGCAATCACAGCCTCCTT
	Reverse	AAGGAGGCTGTGATTGGCCCACCGTGACTCCCAGCTCACCAGCCAAACAG
<i>MUC1</i> 3'-UTR mut miR-330-5p #2	Forward	CTCAGGTTCTCAGGGCGCCGGCCCTGCACCCTGTTT
	Reverse	AAACAGGGTGCAGGGGCGCGCCCTGAAGAACCTGAG
<i>MUC1</i> 5'UTR <i>Hind</i> III	Forward	CGCAAGCTTCCACCTCTCAAGCAGCCA
	Reverse	CGCAAGCTTCTGTAAGCACTGTGAGGAGC
<i>MUC1</i> 5'-UTR mut miR-876-3p	Forward	CCTCCCCACCCATTTCACTCTAACCATGACACCCGGGCACC
	Reverse	GGTGCCCGGTGTCATGGTTAGAGTGAAATGGGTGGGGAGG
<i>MUC1</i> 5'-UTR mut miR-939	Forward	GTGGTGGTGAAATGGGTTATAAGGGGGCAGAACAGATTCAGGCAG
	Reverse	CTGCCTGAATCTGTTCTGCCCCCTTATAACCCATTTACCACCAC
LV-hsa-miR-29a	Forward	TGCTGTAGCACCATCTGAAATCGGTTAGTTTTGGCCACTGACTGACTAACCGATTTTCATGGTGCTA
	Reverse	CCTGTAGCACCATGAAATCGGTTAGTCAGTCAGTGCCAAAACCTAACCGATTTCA
LV-hsa-miR-330-5p	Forward	TGCTGTCTCTGGGCCTGTGTCTTAGGCGTTTTGGCCACTGACTGACGCCTAAGACACACCCAGAGA
	Reverse	CCTGTCTCTGGGTGTGTCTTAGGCGTCAGTCAGTGCCAAAACGCCTAAGACACAGGCCAGAGAC
LV-hsa-miR-neg	Forward	AAATGTACTGCGTGGAGACGTTTTGGCCACTGACTGACGTCTCCACGCAGTACATTT
	Reverse	AAATGTACTGCGTGGAGACGTCAGTCAGTGCCAAAACGTCTCCACGCAGTACATTT

Table 2: Clinico-biological data of the 18 PDAC patients. TNM was determined following the Union for International Control Cancer (UICC) 7th edition 2009.

Samples	Age (year)	Sex	Tumor size (cm)	TNM	Differentiation	Nodal status	Lympho vascular invasion	Perineural invasion
1	54	M	2.5	pT3N0	well	7N-/7N	No	Yes
2	57	M	2.5	pT3N1	moderate	4N+/5N	Yes	No
3	66	M	4	pT3N1	moderate	4N+/7N	Yes	Yes
4	66	M	3.5	pT2N0	moderate	8N-/8N	Yes	No
5	75	F	2.5	pT2N1	moderate	1N+/2N	No	No
6	74	F	3	pT3N1	well	2N+/11N	Yes	Yes
7	60	M	4.5	pT3N1	moderate	4N+/11N	No	Yes
8	72	M	3	ypT3N1	moderate	1N+/6N	No	Yes
9	65	M	2.3	pT3N0	moderate	13N-/13N	No	Yes
10	72	M	6	pT3N1	poor	5N+/11N	Yes	Yes
11	63	M	2.1	pT2N0	well	11N-/11N	No	Yes
12	73	M	3.4	pT4N1	moderate	1N+/8N	No	Yes
13	54	M	4	pT2N1	well	2N+/7N	No	Yes
14	68	F	2.5	pT3N1	moderate	2N+/14N	Yes	Yes
15	52	M	4	pT3N0	moderate	5N-/5N	No	No
16	65	M	4	pT3N1M1	moderate	1N+/4N	Yes	Yes
17	73	M	nd	pT3N1	moderate	7N+/9N	No	Yes
18	73	F	4	pT3N1	well	1N+/3N	Yes	Yes

Figure 1

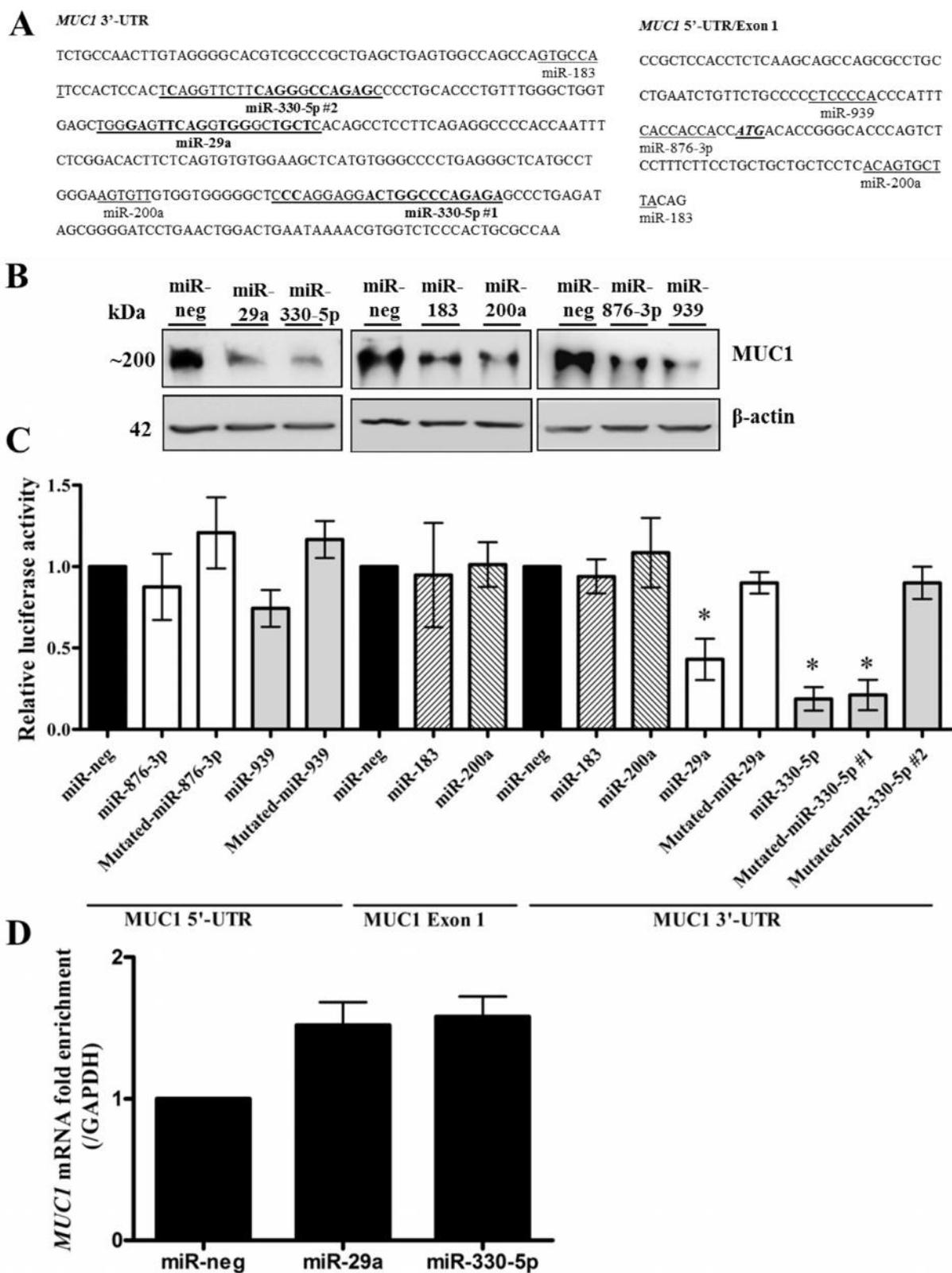


Figure 2

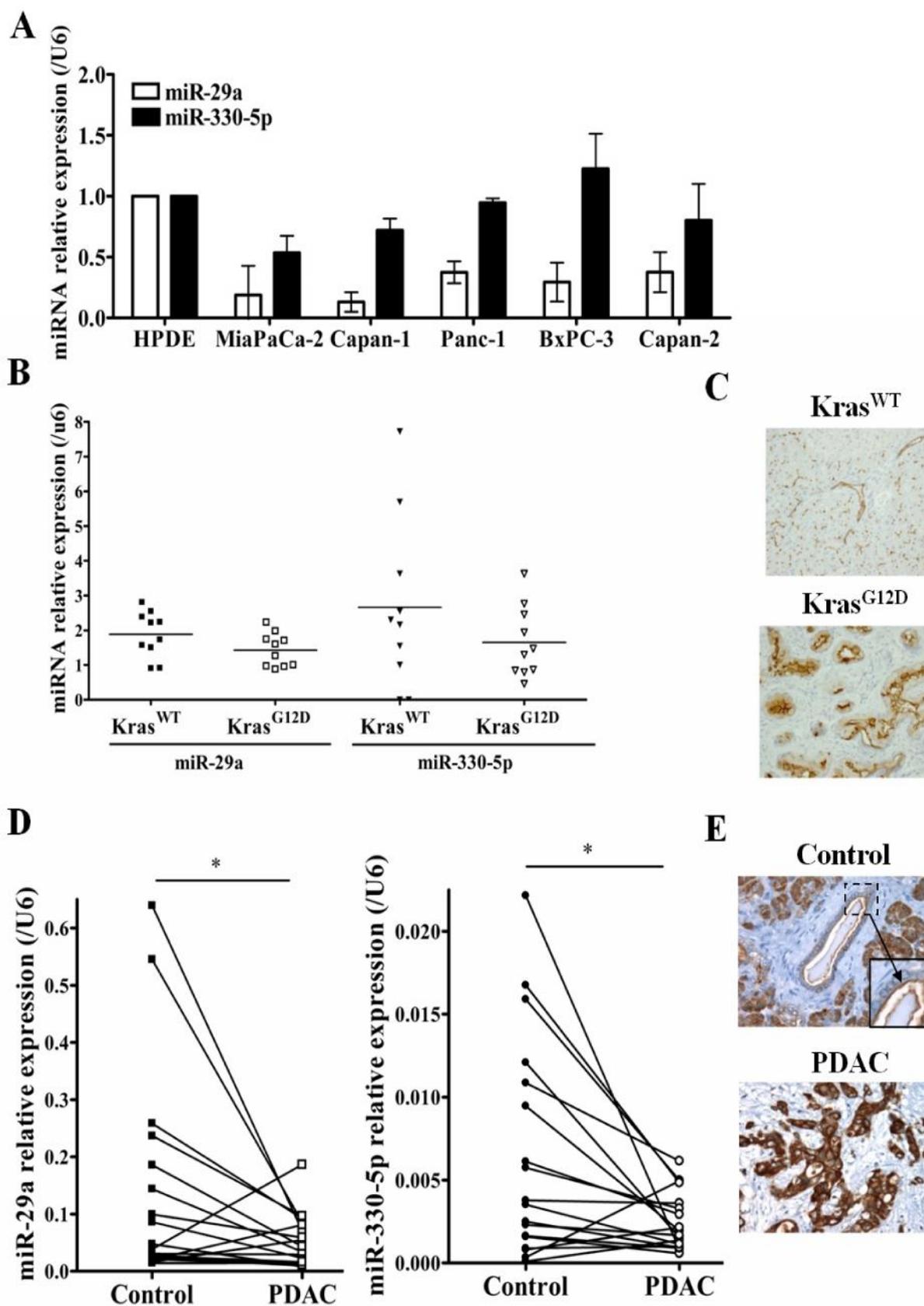


Figure 3

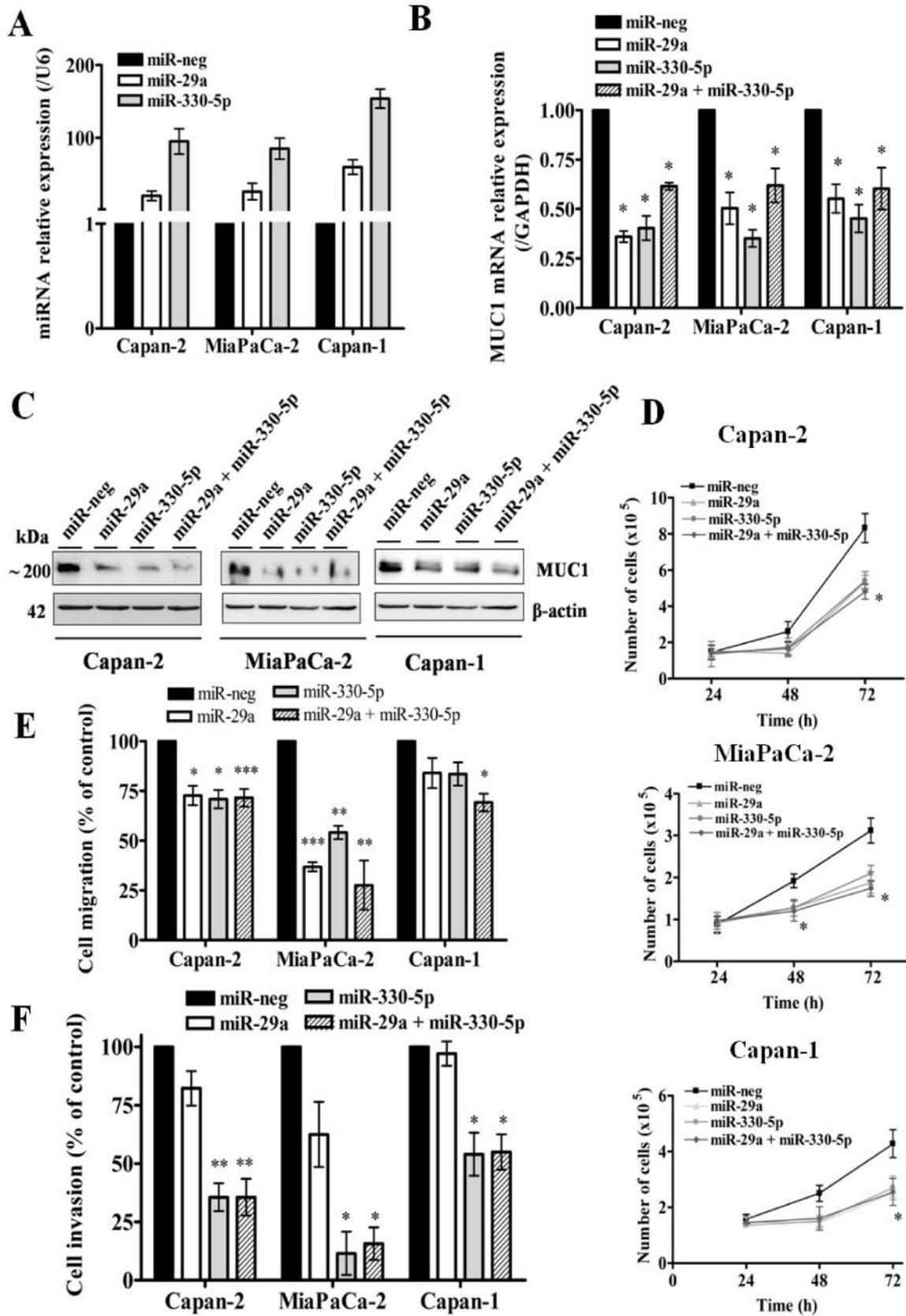


Figure 4

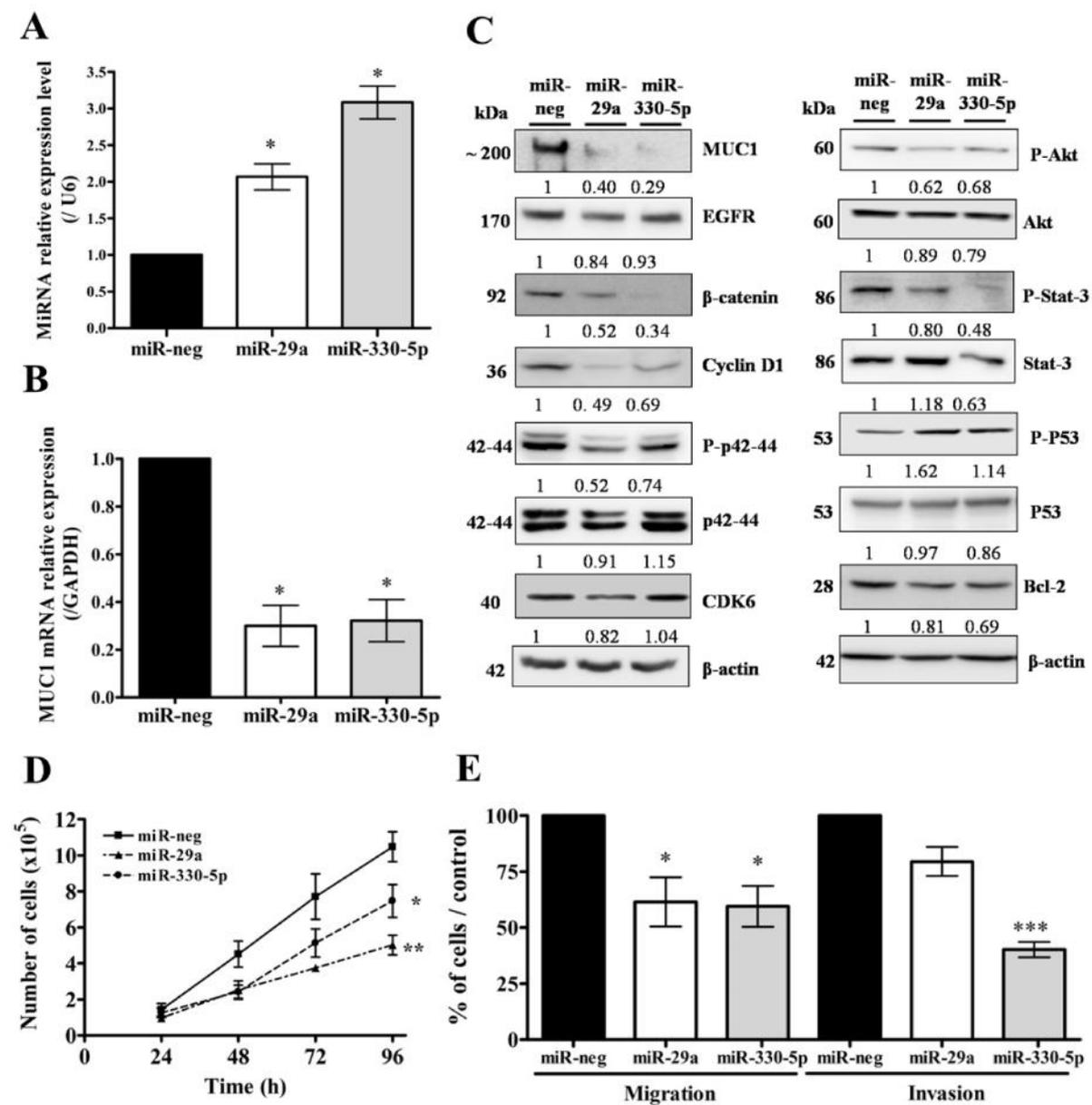


Figure 5

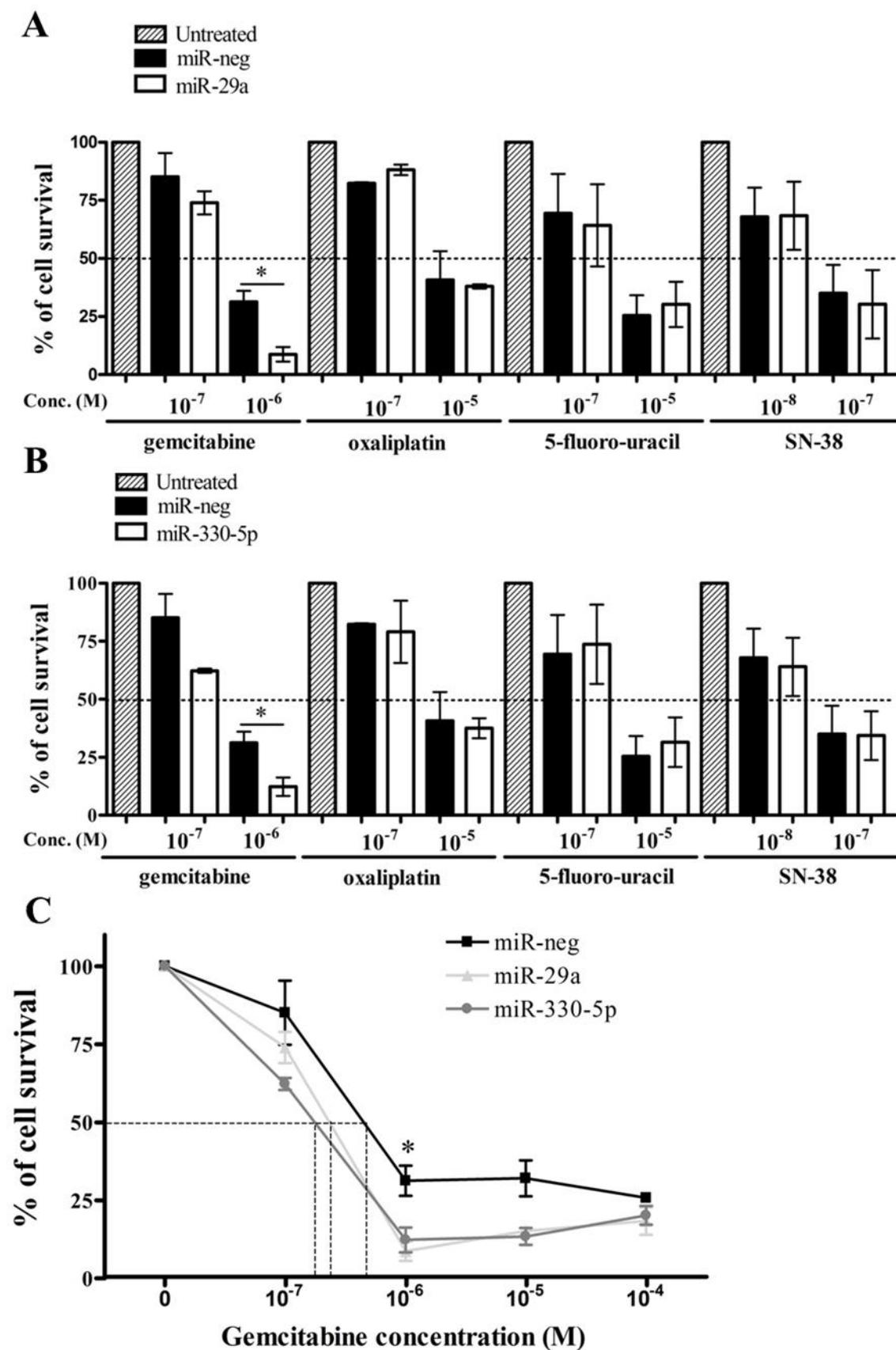
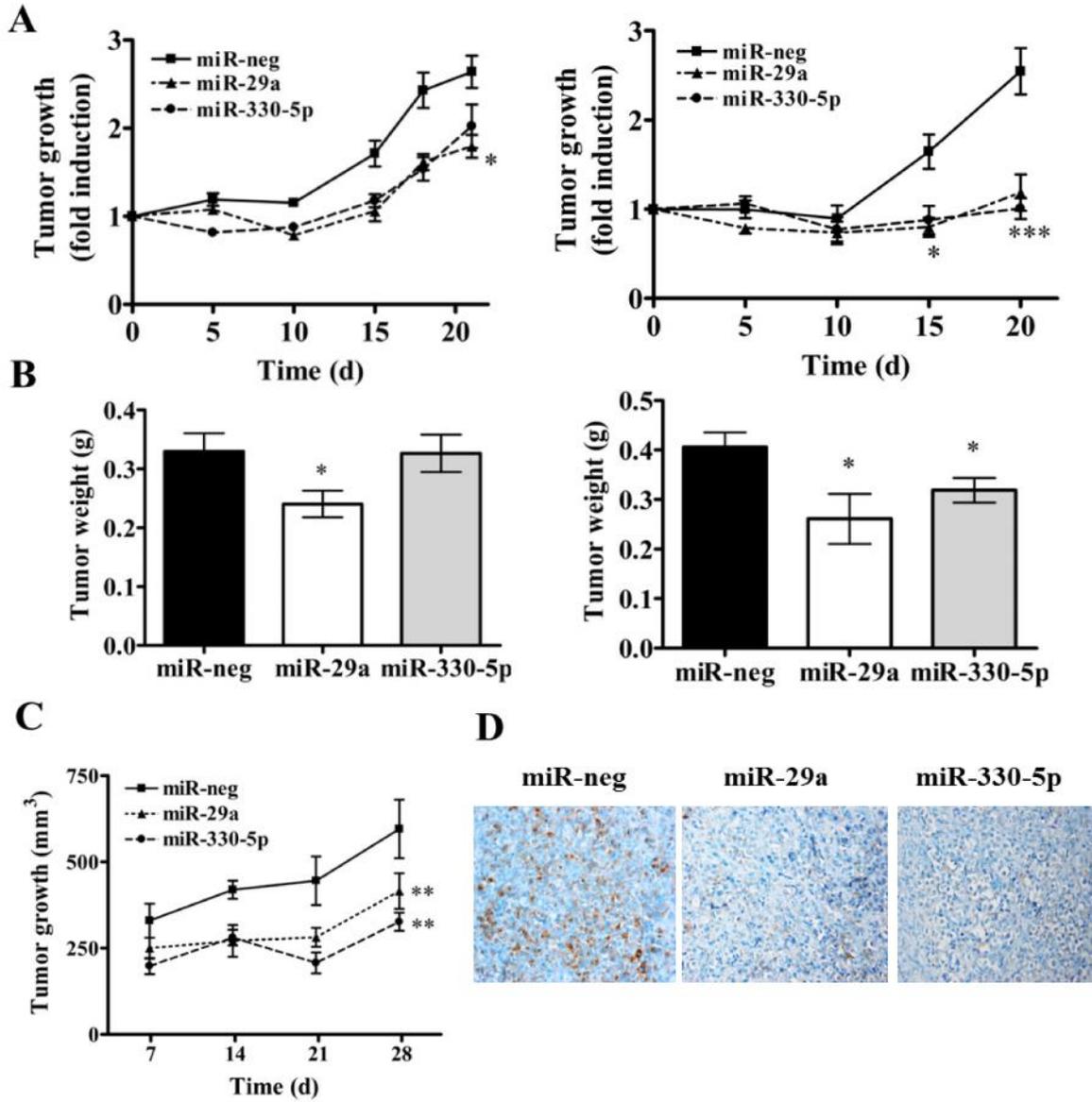


Figure 6



3- Conclusion-perspectives

Nous avons montré que la mucine MUC1 est régulée par le miR-29a et le miR-330-5p et que ces deux miARN agissent comme des suppresseurs de tumeurs en ralentissant la prolifération cellulaire et la croissance tumorale, ainsi qu'en diminuant les propriétés migratoires et invasives des cellules cancéreuses pancréatiques humaines. Ils sensibilisent également les cellules à la gemcitabine mais pas aux drogues du protocole FOLFIRINOX.

Les perspectives de ce travail sont de confirmer le mécanisme général de régulation de la mucine MUC1 dans d'autres modèles cellulaires ainsi que d'étudier l'impact de l'inhibition de l'expression de ces miARN dans les lignées cellulaires cancéreuses pancréatiques. Ces perspectives font l'objet des résultats complémentaires p115 à 120.

Les perspectives plus générales de ce travail sont de décrypter le mécanisme impliqué dans la chimiosensibilité des cellules surexprimant le miR-29a et le miR-330-5p à la gemcitabine. Des résultats préliminaires ont été obtenus p146 à 158 et les perspectives envisagées détaillées dans les perspectives générales p182.

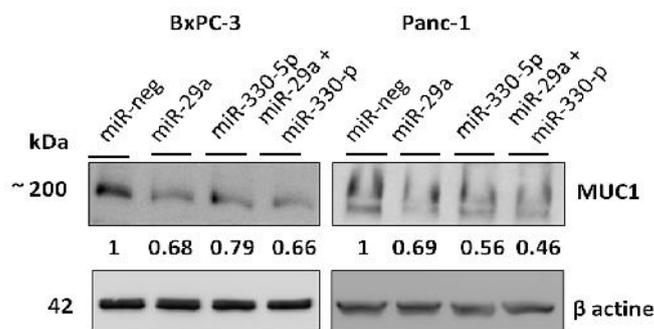


Figure 34 : Etude de l'expression de MUC1 dans les lignées BxPC-3 et Panc-1 par western-blot.

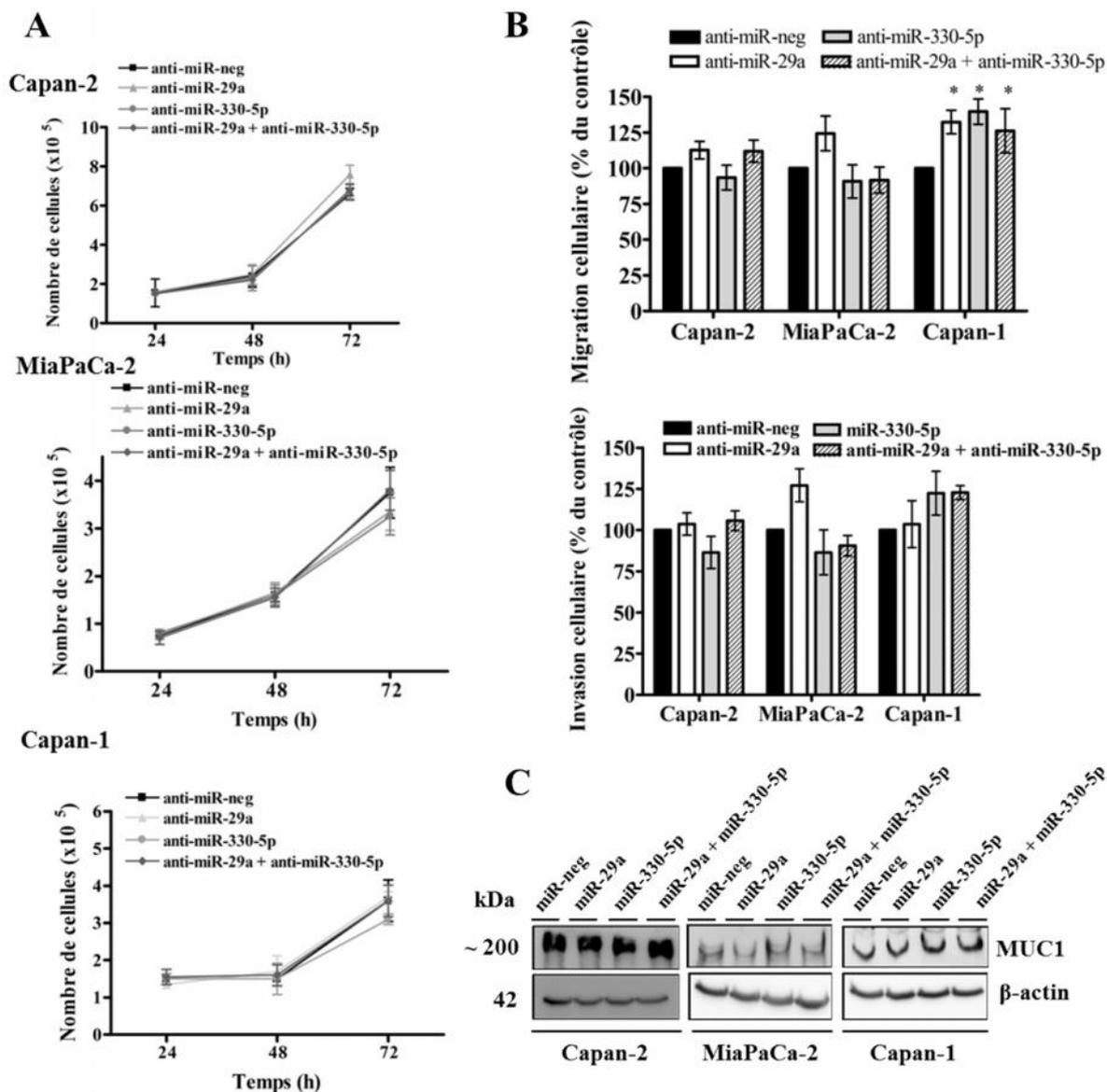


Figure 35 : Etude de l'inhibition de miR-29a et miR-330-5p sur les propriétés des cellules cancéreuses pancréatiques humaines par transfection transitoire.

- (A) Etude de la prolifération cellulaire par comptage toutes les 24h pendant 72h.
 (B) Etude de la migration cellulaire et de l'invasion cellulaire en chambre de Boyden.
 (C) Etude de l'expression de MUC1 par western-blot.

4- Résultats complémentaires

Nous avons pu montrer que l'inhibition protéique de MUC1 pouvait avoir lieu dans les lignées Panc-1 et BxPC-3 suite à la surexpression de miR-29a et miR-330-5p (Figure 34) permettant de proposer que ce mécanisme peut avoir lieu dans plusieurs types cellulaires. Ce résultat permet d'émettre l'hypothèse que la régulation de MUC1 par ces miARN est un mécanisme général *in vitro* dans le PDAC.

a- Inhibition transitoire de miR-29a et miR-330-5p

Nous avons étudié l'effet de l'inhibition transitoire de miR-29a et/ou de miR-330-5p dans les lignées cellulaires Capan-2, MiaPaCa-2 et Capan-1. Cette approche est couramment utilisée au laboratoire (Lahdaoui *et al.*, 2014) et est présentée comme complémentaire à celle de surexpression transitoire. L'absence de résultats significatifs dans les trois modèles cellulaires ne nous a pas permis de publier ce travail.

L'inhibition transitoire de ces deux miARN seuls ou conjointement n'a pas permis de mettre en évidence de différence dans la capacité des cellules à proliférer dans les lignées cellulaires utilisées (Figure 35).

Nous avons étudié la migration cellulaire en chambre de Boyden et l'invasion cellulaire en chambre de Boyden recouverte de Matrigel™ (M&M § VIII p212). Nous avons mis en évidence une augmentation significative ($p < 0,05$) de la migration cellulaire dans la lignée Capan-1 lors de l'inhibition de miR-29a et/ou miR-330-5p.

Nous avons également constaté une augmentation de l'invasion cellulaire lors de l'inhibition de miR-29a dans la lignée MiaPaCa-2 et dans la lignée Capan-1 pour le miR-330-5p (Figure 35).

Nous n'avons pas pu mettre en évidence de variation dans l'expression protéique de MUC1 suite à l'inhibition de miR-29a et/ou miR-330-5p dans les lignées cellulaires Capan-2, MiaPaCa-2 et Capan-1 (Figure 35).

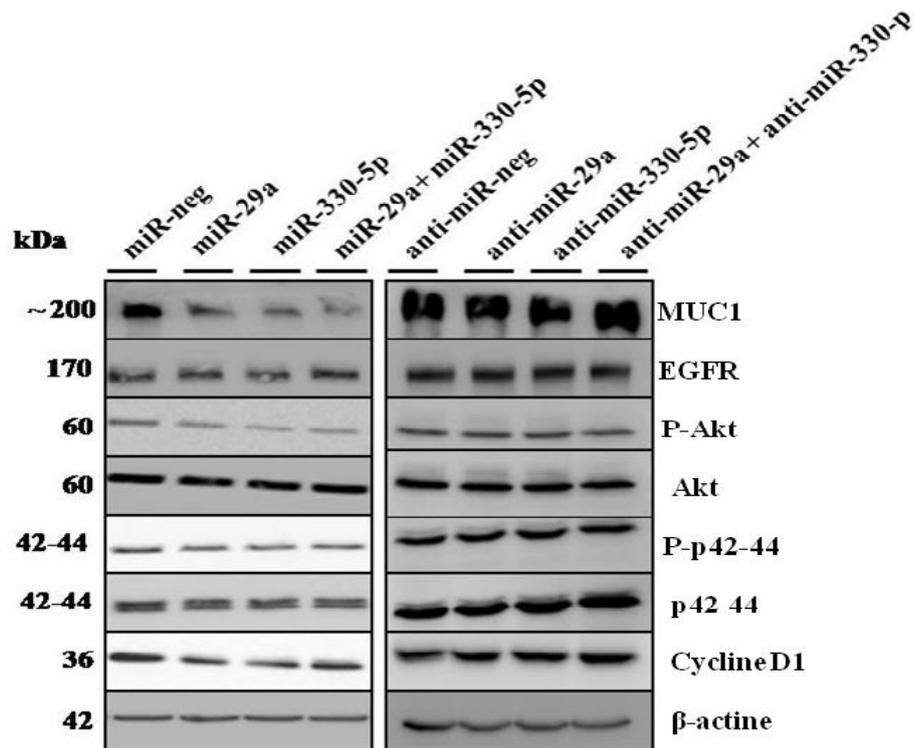


Figure 36 : Voies de signalisation impliquées suite à la surexpression ou l'inhibition de miR-29a et miR-330-5p dans la lignée Capan-2.

Etude de l'expression de MUC1, EGFR, P-Akt, Akt, P-p42-44, p42-44, Cycline D1 par western blot après surexpression/inhibition de miR-29a et/ou miR-330-5p.

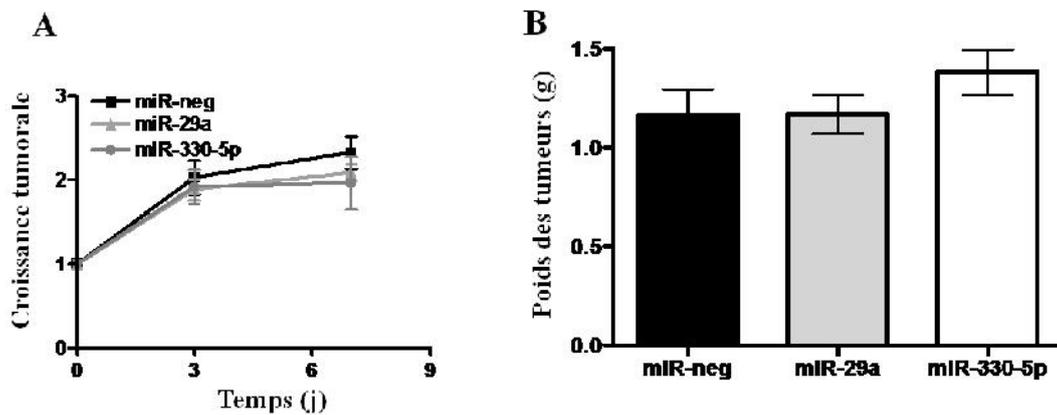


Figure 37 : Etude du rôle de miR-29a et miR-330-5p *in vivo* dans la lignée Capan-1.

(A) Etude de la croissance tumorale après injection des miARN en intratumoral.

(B) Mesure du poids des tumeurs après sacrifice.

b- Voies de signalisations impliquées lors de la surexpression ou de l'inhibition de miR-29a et miR-330-5p

Nous avons entrepris d'évaluer l'expression de voies de signalisation impliquées de manière transitoire lors de la surexpression ou de l'inhibition de miR-29a et/ou miR-330-5p.

Nous avons pu mettre en évidence une diminution de la phosphorylation d'Akt et de l'expression de la cycline D1 lors de la surexpression de miR-29a et miR-330-5p.

L'inhibition de l'expression de ces miARN ne modifie pas l'expression des marqueurs de ces voies de signalisation (Figure 36).

c- Rôle *in vivo* de miR-29a et miR-330-5p

Nous avons montré dans la figure 6 de l'article p113 que la réalisation de xénogreffes sous-cutanées des lignées Capan-2 et MiaPaCa-2 suivi de la surexpression transitoire du miR-29a ou du miR-330-5p par injection intratumorale permet de ralentir la croissance tumorale. La procédure est détaillée dans le M&M § XI p216. Nous avons également réalisé cette expérience dans la lignée Capan-1 mais nous n'avons observé aucun effet (Figure 37). L'agressivité de cette lignée étant telle qu'au bout d'une semaine l'ensemble des xénogreffes mesuraient de façon homogène une taille de 1 cm³. Afin de respecter au mieux l'expérience ainsi que les règles éthiques concernant l'utilisation des animaux en expérimentation animale nous avons dû adapter le protocole expérimental. L'injection a été réalisée à 1 cm³ au lieu de 300 mm³ et avec 20 µg de vecteur au lieu de 10 µg. Néanmoins, les ajustements techniques obligatoire afin de réaliser une injection la plus proportionnelle possible par rapport à la taille de la tumeur dans ces conditions n'ont pas permis de mettre en évidence un effet des miARN dans la lignée Capan-1.

Ces résultats suggèrent que l'inhibition de ces miARN dans les lignées cancéreuses pancréatiques n'impacte que très peu sur la prolifération cellulaire, la migration ou l'invasion cellulaires, indiquant ainsi que leur inhibition pourrait avoir un rôle dans d'autres procédés biologiques comme la survie cellulaire et/ou la mort cellulaire, la chimiorésistance ou encore la TEM. Ces procédés seront donc à étudier pour poursuivre l'étude du rôle fonctionnel de ces deux miARN dans le PDAC.

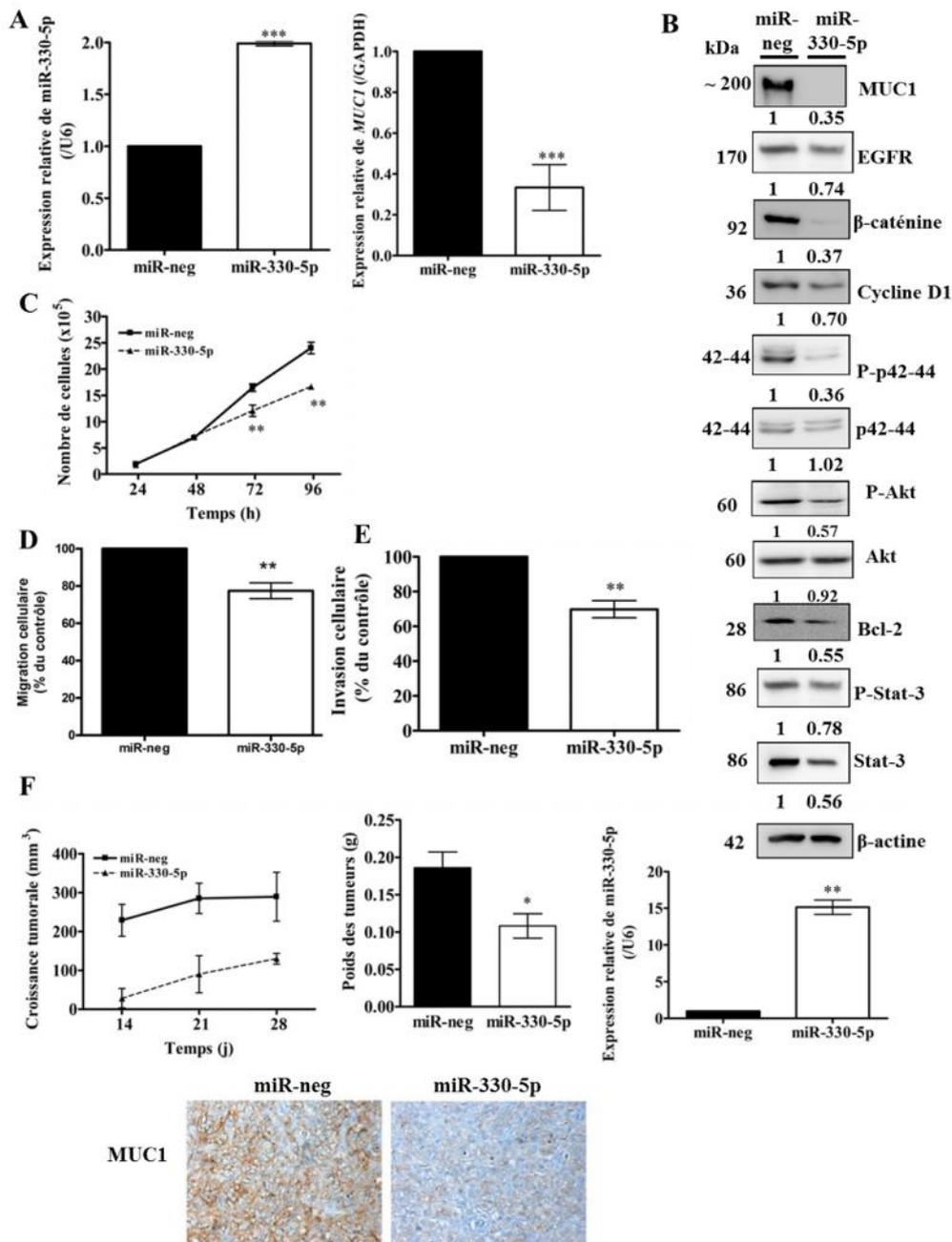


Figure 38 : Etude des propriétés biologiques de la lignée stable Capan-2 surexprimant le miR-330-5p en comparaison à son contrôle miR-neg.

(A) Etude de l'expression de miR-330-5p et de MUC1 par qRT-PCR.

(B) Etude de l'expression de MUC1, EGFR, -caténine, cycline D1, phospho-p42-44, p42-44, Bcl-2, phospho-Stat3, Stat-3, par Western-blot. Les ratios protéines/ -actine sont indiqués.

(C) Mesure de la prolifération cellulaire.

(D) Mesure de la migration. Les résultats sont indiqués comme un % de migration par rapport au miR-neg.

(E) Mesure de l'invasion cellulaire. Les résultats sont indiqués comme un % d'invasion par rapport au miR-neg.

(F) Xénogreffes sous cutanées. La croissance tumorale (mm³) a été mesuré pendant 28 jours et le poids des tumeurs (g) après sacrifice. Analyse de l'expression de MUC1 dans les tumeurs par IHC.

d- Propriétés de la lignée stable Capan-2 surexprimant miR-330-5p

Nous avons établi plusieurs modèles cellulaires stables surexprimant les miARN en collaboration avec le Dr J. Torrisani (Inserm UMR 1037, CRCT). La réalisation de cette approche permet de confirmer de façon encore plus importante le rôle de ces miARN dans le PDAC. Seule la surexpression stable de miR-330-5p a été possible dans la lignée Capan-2. Les lignées surexprimant le miR-29a n'étaient pas "viabiles" et il n'était pas possible de combiner une surexpression efficace du miARN avec une survie des cellules en culture cellulaire. Ceci suggère un rôle très délétère de ce miARN dans ce modèle cellulaire. Nous avons donc caractérisé la lignée cellulaire Capan-2 surexprimant le miR-330-5p en comparaison avec son contrôle la lignée Capan-2 miR-neg, comme nous l'avions fait pour les lignées stables MiaPaCa-2 dont les résultats sont décrits dans la figure 4 de l'article p111.

Nous avons pu montrer que la surexpression stable de miR-330-5p dans la lignée Capan-2 permettait également d'inhiber l'expression protéique de la mucine MUC1. Nous avons ensuite constaté un ralentissement significatif ($p < 0,01$) de la prolifération cellulaire à 72h et à 96h, ainsi qu'une diminution significative ($p < 0,01$) de la migration cellulaire et de l'invasion cellulaire. Enfin la réalisation de xénogreffes sous-cutanées a permis de mettre en évidence une latence dans le démarrage de la croissance tumorale en comparaison avec le contrôle la lignée Capan-2 miR-neg (Figure 38).

Les voies de signalisation que nous avons étudiées ont permis de mettre en évidence comme dans la lignée MiaPaCa-2 surexprimant stablement le miR-330-5p, une diminution de l'expression de la β -caténine, de la cycline D1, ainsi que de la phosphorylation de p42-p44 MAPK, de Akt, et de Stat3.

En conclusion la lignée Capan-2 stable surexprimant miR-330-5p reproduit des résultats similaires obtenus de façon transitoire dans les lignées Capan-2, MiaPaCa-2 et Capan-1 et de façon stable dans la lignée MiaPaCa-2 suggérant un rôle de suppresseur de tumeur pour miR-330-5p.

Partie III : Rôle de MUC1 dans les propriétés biologiques des cellules de PDAC

La mucine MUC1 est une protéine qui possède de multiples fonctions cellulaires. Afin de mieux comprendre le rôle biologique de MUC1 dans le PDAC nous avons entrepris d'étudier les effets de l'inhibition de MUC1 à la fois *in vitro* et *in vivo* et d'identifier les mécanismes moléculaires mis en jeu. Cette étude a été réalisée de façon complémentaire à l'étude du rôle de miR-29a et miR-330-5p dans le PDAC présentée précédemment p85 à 120.

Pour cela, nous avons établi un modèle cellulaire stablement déficient en MUC1 par ShARN (Dr D. Bernard, IBL et Dr N. Jonckheere, JPARC) dont la procédure est détaillée dans la partie M&M § III p195. Nous avons caractérisé *in vitro* et *in vivo* les lignées cellulaires Capan-2 déficientes en MUC1 et dénommées MUC1-KD1 et MUC1-KD2 en comparaison avec leur contrôle (lignée Mock).

Cette étude nous a permis de cibler de façon plus précise les voies de signalisation que nous avons mises en évidence dans l'article p87. Les deux études ont été menées conjointement. Cette troisième partie fait l'objet d'un article publié récemment dans la revue *Biochemical and Biophysical Research Communications* (Tréhoux *et al.*, Biochem. Biophys. Res. Commun. 2014, doi:10.1016/j.bbrc.2014.12.025).

Les résultats obtenus dans cet article confirment l'intérêt d'inhiber l'expression de la mucine MUC1 dans le PDAC et d'utiliser MUC1 comme cible thérapeutique afin de ralentir la progression de ce cancer.

III- Rôle de MUC1 dans les propriétés biologiques des cellules cancéreuses pancréatiques

1- Introduction de l'article

Nous avons caractérisé les lignées cellulaires Capan-2 déficientes en MUC1 et dénommées MUC1-KD1 et MUC1-KD2 en comparaison avec leur contrôle (lignée Mock).

Nous avons étudié la prolifération cellulaire et la croissance tumorale *in vitro* et *in vivo* ainsi que les propriétés de migration et d'invasion cellulaires *in vitro*. Enfin, nous avons étudié la chimiosensibilité des lignées MUC1-KD1/2 à la gemcitabine et aux drogues du protocole FOLFIRINOX.

2- Article

The MUC1 oncomucin regulates pancreatic cancer cell biological properties and chemoresistance. Implication of p42-44 MAPK, Akt, Bcl-2 and MMP13 pathways.

Solange Tréhoux¹⁻²⁻³, Bélanda Duchêne¹⁻²⁻³, Nicolas Jonckheere¹⁻²⁻³ and Isabelle Van Seuningen¹⁻²⁻³

¹ Inserm, UMR837, Jean-Pierre Aubert Research Center, Team 5 "Mucins, Epithelial Differentiation and Carcinogenesis", Rue Polonovski, 59045 Lille cedex, France.

² Université de Lille 2, 42 rue Paul Duez, 59000 Lille, France.

³ Centre Hospitalier Régional et Universitaire de Lille, 59037 Lille cedex, France.

Running title: MUC1 and pancreatic cancer cell tumorigenicity.

Correspondence to: Dr Isabelle Van Seuningen, Inserm, UMR837, Jean-Pierre Aubert Research Center, Team 5 "Mucins, Epithelial Differentiation and Carcinogenesis", Rue Polonovski, 59045 Lille cedex, France. E-mail : isabelle.vanseuningen@inserm.fr. Tel: +33 320 29 88 67. Fax: +33 320 53 85 62

Abstract

MUC1 is an oncogenic mucin overexpressed in several epithelial cancers, including pancreatic ductal adenocarcinoma, and is considered as a potent target for cancer therapy. To this aim, we undertook to study MUC1 biological effects on pancreatic cancer cells and identify pathways mediating these effects. Our *in vitro* experiments indicate that inhibiting MUC1 expression decreases cell proliferation, cell migration and invasion, cell survival and increases cell apoptosis. Moreover lack of MUC1 in these cells profoundly alters their sensitivity to gemcitabine and 5-Fluorouracil chemotherapeutic drugs. *In vivo* MUC1-KD cell xenografts in Scid mice grew slower. Altogether, we show that MUC1 oncogenic mucin alters proliferation, migration, and invasion properties of pancreatic cancer cells and that these effects are mediated by p42-44 MAPK, Akt, Bcl-2 and MMP13 pathways.

Keywords: pancreatic cancer, MUC1, migration, proliferation, invasion, chemoresistance.

Introduction

The mucins are family of large O-glycoproteins divided into two groups: secreted mucins and membrane-bound mucins [1]. Secreted mucins are involved in the protection of epithelial cells to external influences such as inflammation, pathogens or pH variations by forming the mucus gel which is a physical protective barrier of epithelia. Membrane-bound mucins are involved in cell interactions and cell signaling by transmitting intracellular signals of cell survival and cell growth under stress condition. The mucin MUC1 is a membrane-bound mucin expressed at the apical pole of normal epithelial polarized cells [2,3]. In cancer cells, MUC1 is frequently overexpressed, internalized, circumferentially delocalized around the tumor cell surface when cells lose polarity. MUC1 becomes oncogenic as it is involved in several oncogenic pathways leading to altered cell properties such as cell growth, cell migration and invasion [4]. These profound modifications result from the interaction of MUC1 with tyrosine kinase receptors such as EGFR and the activation of oncogenic signaling pathways like MAPK, Akt or Wnt/ β -catenin [5–7].

Pancreatic Ductal Adenocarcinoma (PDAC) is the fourth leading cause of death by cancer in Western countries and has a very poor prognosis due to a late diagnosis and a lack of efficient treatment. PDAC have a dramatic outcome with the five year survival rate lower than five percent [8]. Less than 20% of patients are entitled to surgical resection and the remaining 80% of patients present a locally advanced metastatic PDAC [9]. They may benefit from palliative chemotherapy based either on gemcitabine or FOLFIRINOX composed of 5-Fluorouracil (5-Fu), oxaliplatin and SN-38 [10]. In 90% of PDAC, the mucin MUC1 is overexpressed and MUC1 was proposed as one of the most robust predictive marker of PDAC survival [11,12]. It was shown that MUC1 induced EMT [13] and resistance to gemcitabine [14] and also increased cell invasion through Stat3 [15] and PDGFR- β [16]. For these reasons MUC1 appears as an attractive target to moderate pancreatic cancer progression.

To better understand MUC1 biological effects on PDAC cells, we undertook to study its effects both *in vitro* and *in vivo* and the underlying cellular mechanisms mediating these effects. We generated stable cell lines knocked-down for MUC1 and showed *in vitro* that inhibiting MUC1 decreased cell proliferation via p42-44 MAPK, cell migration and invasion via MMP13, cell survival and apoptosis via Akt and Bcl2, and tumor growth *in vivo*. These results confirmed the potential of MUC1 as an attractive target to slow-down PDAC progression.

Material and Methods

Cell Culture and establishment of MUC1-KD stable cell lines

Capan-2 cell line was purchased from ATCC and was cultured as described previously [17]. Capan-2 stable cell lines Knocked-Down (KD) for MUC1 (Capan-2 MUC1-KD1/2) were generated by retroviral infection as previously described [18] using MUC1-Sh1 primers FP: GATCCCCACCTCCAGTTTAATTCCTCTTCAAGAGAGAGGAATTAAACTGGAGGTT TTTTA and RP: GGGTGGAGGTCGAATTAAGGAGAAGTTCTCTCTCCTTAATTCGACCTCCAAAAA TTCGA. MUC1-Sh2 primers FP: GATCCCCATGTTTTTGCAGATTTATATTCAAGAGATATAAATCTGCAAAAACATTT TTTA and RP: GGGTACAAAAACGTCTAAATATAAGTTCTCTATATTTAGACGTTTTTGTAAAAA TTCGA.

Cell proliferation, migration and invasion assays

Stable cell lines were seeded at 10^5 cells per well in 6-well plates. Cells were counted daily using a Malassez counting chamber using Trypan Blue exclusion dye (Life Technologies) during 96h. Invasion and migration assays were respectively performed using 24-well Boyden chambers (8 μ m pores) coated or not with Matrigel™ (Pharmingen, BD Biosciences). Briefly, 5×10^4 cells were seeded on the top chamber and FBS 10% (v/v) was used as a chemoattractant in the bottom chamber for 24h. Staining were performed using Vectashield hard set mounting medium with DAPI H-1500 (4',6'-diamidino-2-phénylindole) (Vector labs). Three independent experiments were performed in triplicate.

Cytotoxicity assay

10^4 cells were seeded in 96-well plates during 24h. Medium was refreshed with gemcitabine, 5-Fu, oxaliplatin or SN-38 for 72h. The viability of cells was determined using 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide assay (MTT, Sigma-Aldrich, Saint Quentin Fallavier, France) as previously described [17]. Formazan crystals were solubilized in dimethylsulphoxide (Sigma-Aldrich) and analyzed at 570 nm with a microplate reader (Bio-Rad).

Quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (qRT-PCR)

Total RNA was extracted using miRNeasy Mini Kit with Qiazol® (Qiagen) according to the manufacturer's instructions. cDNA was prepared as previously described. qPCR was performed using SsoFast Evagreen® Supermix (Bio-Rad) and the CFX96 real time PCR system (Bio-Rad). Expression levels of MUC1 (FP: TGCCGCCGAAAGAACTACG and RP: TGGGGTACTCGCTCATAGGAT) were normalized to GAPDH (FP: CCACATCGCTCAGACACCAT and RP: CCAGGCGCCCAATACG). Expression levels were calculated using the 2^{-Ct} method. Three independent experiments were performed.

Protein extraction and Western-blot analysis

Total proteins were extracted, electro-transferred, immunostained, and visualized as described before [19]. Antibodies used were MUC1 (M8, 1/250, from Pr D. Swallow); β -actin (A5441 AC15, 1/5000) from Sigma-Aldrich; cyclin D1 (sc-718, 1/250), CDK6 (sc-177, 1/250) from Santa Cruz; Bcl-2 (#2872, 1/250), phospho p42-44 MAPK (#9101, 1/500), p42-44 MAPK (#9102, 1/500), β -catenin (#8480s, 1/1000), phospho AKT (#4060, 1/500), AKT (#4691s, 1/500) from Cell Signaling, Ozyme; MMP13 (Ab39012, 1/1000) from Abcam. Bands were quantified with image J analysis software Three independent experiments were performed.

Subcutaneous xenografts

Subcutaneous (SC) xenografts (2×10^6 cells in 100 μ l of RPMI 1640) of MUC1-Mock, MUC1-KD1 and MUC1-KD2 cell lines were carried out with 100 μ l of Matrigel™ (BD Biosciences) into the flank of severe-combined immunodeficient (SCID) male mice (CB-17, Charles Rivers) that were bred and maintained under pathogen-free conditions (6 mice/group). Tumor development was followed weekly. The tumor volume (mm^3) was determined by calculating $V=W^2 \times L$ in which W corresponds to the width (mm) and L to the tumor length (mm). Mice were sacrificed 28 days after inoculation. All procedures were performed in accordance with the guidelines and approved by the animal care ethical committee (Comité Ethique Expérimentation Animale Nord Pas-de-Calais, CEEA #122012).

Immunohistochemistry

Tumor xenografts were fixed in 10% (w/v) buffered formaldehyde, paraffin-embedded, cut at 4 μm thickness and applied on SuperFrost® slides (Menzel-Glaser, Thermo Scientific). Histology was assessed by staining tissues with Hematoxylin-Eosin. Automatic IHC was performed with an automated immunostainer (ES, Ventana Medical System, Strasbourg, France) as described [20]. Immunostainings in xenografts were carried out with anti-MUC1 M8 Mab (1/50) antibodies.

Gene Expression Omnibus microarray

Public PC microarrays were analysed from the NCBI Gene Expression Omnibus (GEO) database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>). A set of gene-expression profiles from GEO containing both normal pancreas and PC tissue were used: 45 tumors and adjacent non-tumor tissues from PDAC cases (GSE28735). Data were analysed using GEO2R software. The dataset GSE28735 used Affymetrix GeneChip Human Gene 1.0 ST array.

Statistical analyses

Statistical analyses were performed using Graphpad Prism 4.0 software (Graphpad softwares Inc). Data are presented as mean \pm SD or \pm SEM. Differences in the mean of samples were analyzed by the student's t test or one way ANOVA test with selected comparison using Tukey's HSD post-hoc test. Differences less than 0.05 considered significant and were indicated with a *. ** indicates $p < 0.01$, *** indicates $p < 0.001$.

Results

Silencing of MUC1 in Capan-2 PDAC cell line

In order to study the functional role of MUC1 in PDAC we generated two stable cell lines knocked-down for MUC1 by short-hairpin RNA (Sh-RNA) approach. The MUC1 decreased expression in MUC1-KD cells compared to control Mock cells was confirmed by qRT-PCR (Figure 1A) ($p < 0.05$) and by western-blot (Figure 1B).

Inhibiting MUC1 decreased PDAC cell growth in vitro

Cells knocked-down for MUC1 showed a statistically significant decrease of cell proliferation (Figure 1C), at 72h and 96h ($p < 0.001$). To identify the mechanisms underlying the alterations of cell proliferation mediated by MUC1 knock-down, we measured the activation of the major signaling markers/pathways in the three cell lines. Accordingly to the decreased cell proliferation, we observed a decrease of phospho p42-44 MAPK, cyclin D1 and β -catenin that was more pronounced in the MUC1-KD2 cell line than in the MUC1-KD1 (Figure 1D).

Inhibiting MUC1 decreased PDAC cell migration and invasion in vitro

Next to cell proliferation, we decided to evaluate MUC1 properties on migration and invasion capacity of PDAC cells. Using Boyden chambers and DAPI staining we showed a statistically significant decrease of cell migration in MUC1-KD2 cells ($p < 0.01$) (Figure 2A). Invasive capacities of MUC1-KD cells were statistically decreased both in MUC1-KD1 ($p < 0.05$) and in MUC1-KD2 ($p < 0.01$) cells when compared to Mock cells (Figure 2A). In order to identify the molecular mechanisms involved in the alteration of cell migration and invasion through MUC1 inhibition, we measured the expression level of metalloprotease MMP13. Accordingly to the inhibition of cell migration and invasion, we observed a decrease of MMP13 expression both in MUC1-KD1 and MUC1-KD2 cells compared to Mock cells (Figure 2B).

Inhibiting MUC1 decreased PDAC cell survival, increased apoptosis and gemcitabine and 5-Fu sensitivity in vitro

Investigation of the implication of MUC1 in survival and apoptosis pathways using western-blotting, indicated a decrease of phospho-Akt expression and a decrease of anti-apoptotic marker Bcl-2 in MUC1-KD cells compared to Mock cells (Figure 2C). PDAC being an extremely chemoresistant cancer, we undertook to evaluate MUC1 effect on PDAC cell chemosensitivity to gemcitabine or FOLFIRINOX drugs (5-Fu, oxaliplatin and SN-38).

Measurement of cell survival following drug treatment indicated that inhibition of MUC1 led to a mild (MUC1-KD1) and a strong (MUC1-KD2) decrease of cell viability following treatment with gemcitabine or 5-Fu ($p < 0.5$ and $p < 0.01$) (Figure 2D). We did not observe variation on sensitivity after treatment with oxaliplatin or SN-38. Altogether, these results indicate that PDAC cells down-expressing MUC1 harbor altered cell survival and apoptosis *in vitro* and are more sensitive to gemcitabine and 5-Fu chemotherapeutic drugs.

In vivo biological properties of PDAC cells stably knocked-down for MUC1

Having shown *in vitro* that MUC1 plays a role in Capan-2 cell growth, we undertook to evaluate their activity *in vivo*. To this aim, subcutaneous (SC) xenografts of Capan-2 MUC1-KD cells were performed in SCID mice. A significant decrease of tumor growth ($p < 0.01$) was found 28 days post xenografts when compared to control Mock cells (Figure 3A). Tumor weights were also significantly decreased for MUC1-KD1 ($p < 0.05$) and for MUC1-KD2 ($p < 0.01$) (Figure 3B). We confirmed by IHC the down-expression of MUC1 in SC xenografts (Figure 3C). Altogether these results indicate that inhibiting MUC1 *in vivo* slow-down pancreatic tumor growth.

Expression of MUC1 and MMP13 in human PDAC samples

To correlate our MUC1/MMP13 data obtained in PDAC cell lines with human PDAC samples we used PDAC datasets of the NCBI Gene Expression Omnibus (GEO, GSE28735) database. *MUC1* and *MMP13* mRNA expression was measured in 45 tumors (PDAC) and adjacent non tumor tissues (Control). We observed that *MUC1* and *MMP13* expression was significantly increased in PDAC tumors ($p < 0.001$) compared to control samples (Figure 3D) indicating a correlation between MUC1 and MMP13 overexpression in human PDAC.

Discussion

The oncomucin MUC1 is overexpressed in several epithelial cancers [12] including PDAC in which MUC1 overexpression is associated with a short survival rate [11]. In this report we have shown that stable inhibition of MUC1 in Capan-2 human pancreatic cancer cells decreased both their *in vitro* and *in vivo* behavior including cell proliferation, migration and invasion, increased apoptosis and gemcitabine sensitivity, and decreased tumor growth.

Our results suggest that the inhibition of cell migration and invasion may be mediated through the down-expression of MMP13 (collagenase 3) observed in PDAC cells. It was previously shown that the inhibition of MUC1 in esophageal carcinoma decreased MMP13 expression and cell proliferation and migration [18]. MUC1 is composed of two subunits MUC1-N and MUC1-C. MUC1-C is able in a tumorigenic context to be internalized and translocated to the nucleus and act as a co-factor of gene expression. Moreover, it was demonstrated that the MUC1-C subunit is able to bind with Runx-2 to the promoter of MMP13 and increases its expression in esophageal cancer [21]. In human PDAC samples, we observed a similar expression profile of both *MUC1* and *MMP13* as observed in esophageal carcinoma suggesting that in PDAC MUC1 could also be an activator of MMP13 expression. Indeed like MUC1, MMP13 overexpression was linked to increased metastasis capacity of several cancers. We thus propose that the simultaneous overexpression of both MUC1 and MMP13 would increase PDAC aggressiveness.

The results of our study also suggest that inhibiting MUC1 decreases both *in vitro* cell proliferation and *in vivo* tumor growth. Additionally, we observed a decrease of cell proliferation markers such as cyclin D1, β -catenin and p42-44 MAPK. It was previously identified that MUC1 is able to co-activate the expression of cyclin D1 through its interaction with β -catenin on the promoter of *cyclin D1* gene thus favoring cell proliferation [22]. Moreover, MUC1 is able to activate the p42-44 MAPK pathway through its interaction with tyrosine kinase receptor [5]. Thus inhibiting MUC1 leads to decreased cell proliferation through the Wnt/ β -catenin and the p42-44 MAPK pathways.

The mucin MUC1 is able to activate the PI3K/Akt survival pathway [7]. Thus the activation of this pathway may result from an increase of cell chemoresistance through the up-regulation of MDR-related Protein (MRP) detoxifying channels by the co-binding of MUC1 on the *MRP1* promoter with an unknown factor [14]. Thus the inhibition of MUC1 and the decrease of both Akt and gemcitabine resistance in MUC1-KD cells confirms this hypothesis

We also observed an increase of cell sensitivity to 5-Fu in MUC1-KD cells. It was previously shown that inhibition of mucin O-glycosylation with benzyl-alpha-GalNAc is important to 5-Fu sensitization [23,24]. However, for the first time we show a direct implication of MUC1 protein in cancer cell sensitivity to 5-Fu. Additionally, our results showed that the down-expression of MUC1 is able to increase cell apoptosis through the inhibition of anti-apoptotic Bcl-2 protein. Interestingly, it was previously shown that MUC1 is able to interact with Bax to block its pro-apoptotic function [25] or to increase Bcl-x_L anti-apoptosis protein level to increase cell survival and apoptosis [7]. Thus we propose that Capan-2 MUC1-KD cells decrease cell survival, increase cell apoptosis and gemcitabine and 5-Fu sensitivity through Akt and Bcl-2 pathways.

In conclusion, our results show that inhibiting MUC1 in human pancreatic cancer cells alter profoundly their behavior: i) decreased cell proliferation and tumor growth through the Wnt/ β -catenin and the p42-44 MAPK pathways; ii) decreased cell migration and invasion through MMP13; iii) decreased cell survival and increased apoptosis and gemcitabine and 5-Fu sensitivity through the Akt and Bcl-2 pathways. Altogether, these results confirm the interest in inhibiting MUC1 expression in pancreatic cancer and to use MUC1 as a therapeutic target to slow-down PDAC progression.

Conflicts of Interest: Authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements: We thank D. Swallow (MRC, London, UK) for providing MUC1 M8 antibody. We are grateful to M.H. Gevaert and R. Siminsky (Department of Histology, Faculty of Medicine, University of Lille 2) for their technical help. We thank the IFR114/IMPRT (University of Lille 2) animal facility (D. Taillieu).

Grant Support: Solange Tréhoux is a recipient of a PhD fellowship of the University of Lille 2. Isabelle Van Seuningen is the recipient of a “Contrat Hospitalier de Recherche Translationnelle” (AVIESAN/CHRT 2010). This work was supported by grants from la Ligue Nationale Contre le Cancer (Equipe Labellisée Ligue 2011-2013, IVS), from SIRIC ONCOLille, Grant INCa-DGOS-Inserm 6041 (IVS) and from "Contrat de Plan Etat Région" CPER Cancer 2007-2013 (IVS).

References

- [1] N. Jonckheere, I. Van Seuningen, The membrane-bound mucins: how large O-glycoproteins play key roles in epithelial cancers and hold promise as biological tools for gene-based and immunotherapies, *Crit. Rev. Oncog.* 14 (2008) 177–196.
- [2] M.A. Hollingsworth, B.J. Swanson, Mucins in cancer: protection and control of the cell surface, *Nat Rev Cancer.* 4 (2004) 45–60. doi:10.1038/nrc1251.
- [3] D.W. Kufe, Mucins in cancer: function, prognosis and therapy, *Nat. Rev. Cancer.* 9 (2009) 874–885. doi:10.1038/nrc2761.
- [4] N. Jonckheere, I. Van Seuningen, The membrane-bound mucins: From cell signalling to transcriptional regulation and expression in epithelial cancers, *Biochimie.* 92 (2010) 1–11. doi:10.1016/j.biochi.2009.09.018.
- [5] J.A. Schroeder, M.C. Thompson, M.M. Gardner, S.J. Gendler, Transgenic MUC1 Interacts with Epidermal Growth Factor Receptor and Correlates with Mitogen-activated Protein Kinase Activation in the Mouse Mammary Gland, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 13057–13064. doi:10.1074/jbc.M011248200.
- [6] J.A. Schroeder, M.C. Adriance, M.C. Thompson, T.D. Camenisch, S.J. Gendler, MUC1 alters beta-catenin-dependent tumor formation and promotes cellular invasion, *Oncogene.* 22 (2003) 1324–1332. doi:10.1038/sj.onc.1206291.
- [7] D. Raina, S. Kharbanda, D. Kufe, The MUC1 oncoprotein activates the anti-apoptotic phosphoinositide 3-kinase/Akt and Bcl-xL pathways in rat 3Y1 fibroblasts, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 20607–20612. doi:10.1074/jbc.M310538200.
- [8] R. Siegel, D. Naishadham, A. Jemal, Cancer statistics, 2013, *CA. Cancer J. Clin.* 63 (2013) 11–30. doi:10.3322/caac.21166.
- [9] A. Vincent, J. Herman, R. Schulick, R.H. Hruban, M. Goggins, Pancreatic cancer, *The Lancet.* 378 (2011) 607–620. doi:10.1016/S0140-6736(10)62307-0.
- [10] T. Conroy, F. Desseigne, M. Ychou, O. Bouché, R. Guimbaud, Y. Bécouarn, et al., FOLFIRINOX versus gemcitabine for metastatic pancreatic cancer, *N. Engl. J. Med.* 364 (2011) 1817–1825. doi:10.1056/NEJMoa1011923.
- [11] J.M. Winter, L.H. Tang, D.S. Klimstra, M.F. Brennan, J.R. Brody, F.G. Rocha, et al., A novel survival-based tissue microarray of pancreatic cancer validates MUC1 and mesothelin as biomarkers, *PLoS One.* 7 (2012) e40157. doi:10.1371/journal.pone.0040157.
- [12] R.E. Beatson, J. Taylor-Papadimitriou, J.M. Burchell, MUC1 immunotherapy, *Immunotherapy.* 2 (2010) 305–327. doi:10.2217/imt.10.17.
- [13] L.D. Roy, M. Sahraei, D.B. Subramani, D. Besmer, S. Nath, T.L. Tinder, et al., MUC1 enhances invasiveness of pancreatic cancer cells by inducing epithelial to mesenchymal transition, *Oncogene.* 30 (2011) 1449–1459. doi:10.1038/onc.2010.526.
- [14] S. Nath, K. Daneshvar, L.D. Roy, P. Grover, A. Kidiyoor, L. Mosley, et al., MUC1 induces drug resistance in pancreatic cancer cells via upregulation of multidrug resistance genes, *Oncogenesis.* 2 (2013) e51. doi:10.1038/oncsis.2013.16.
- [15] J. Gao, M.J. McConnell, B. Yu, J. Li, J.M. Balko, E.P. Black, et al., MUC1 is a downstream target of STAT3 and regulates lung cancer cell survival and invasion, *Int. J. Oncol.* 35 (2009) 337–345.
- [16] P.K. Singh, Y. Wen, B.J. Swanson, K. Shanmugam, A. Kazlauskas, R.L. Cerny, et al., Platelet-Derived Growth Factor Receptor –Mediated Phosphorylation of MUC1 Enhances Invasiveness in Pancreatic Adenocarcinoma Cells, *Cancer Res.* 67 (2007) 5201–5210. doi:10.1158/0008-5472.CAN-06-4647.
- [17] N. Skrypek, B. Duchêne, M. Hebbar, E. Leteurtre, I. van Seuningen, N. Jonckheere, The MUC4 mucin mediates gemcitabine resistance of human pancreatic cancer cells

- via the Concentrative Nucleoside Transporter family, *Oncogene*. 32 (2013) 1714–1723. doi:10.1038/onc.2012.179.
- [18] C. Gronnier, E. Bruyère, F. Lahdaoui, N. Jonckheere, M. Perrais, E. Leteurtre, et al., The MUC1 mucin regulates the tumorigenic properties of human esophageal adenocarcinomatous cells, *Biochim. Biophys. Acta.* (2014). doi:10.1016/j.bbamcr.2014.06.021.
- [19] N. Jonckheere, N. Skrypek, J. Merlin, A.F. Dessein, P. Dumont, E. Leteurtre, et al., The mucin MUC4 and its membrane partner ErbB2 regulate biological properties of human CAPAN-2 pancreatic cancer cells via different signalling pathways, *PloS One*. 7 (2012) e32232. doi:10.1371/journal.pone.0032232.
- [20] C. Mariette, M. Perrais, E. Leteurtre, N. Jonckheere, B. Hémon, P. Pigny, et al., Transcriptional regulation of human mucin MUC4 by bile acids in oesophageal cancer cells is promoter-dependent and involves activation of the phosphatidylinositol 3-kinase signalling pathway, *Biochem. J.* 377 (2004) 701–708. doi:10.1042/BJ20031132.
- [21] Q. Ye, Z. Yan, X. Liao, Y. Li, J. Yang, J. Sun, et al., MUC1 induces metastasis in esophageal squamous cell carcinoma by upregulating matrix metalloproteinase 13, *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* 91 (2011) 778–787. doi:10.1038/labinvest.2011.12.
- [22] H. Rajabi, R. Ahmad, C. Jin, M. Kosugi, M. Alam, M.D. Joshi, et al., MUC1-C oncoprotein induces TCF7L2 transcription factor activation and promotes cyclin D1 expression in human breast cancer cells, *J. Biol. Chem.* 287 (2012) 10703–10713. doi:10.1074/jbc.M111.323311.
- [23] A.V. Kalra, R.B. Campbell, Mucin overexpression limits the effectiveness of 5-FU by reducing intracellular drug uptake and antineoplastic drug effects in pancreatic tumours, *Eur. J. Cancer*. 45 (2009) 164–173. doi:10.1016/j.ejca.2008.10.008.
- [24] A.V. Kalra, R.B. Campbell, Mucin impedes cytotoxic effect of 5-FU against growth of human pancreatic cancer cells: overcoming cellular barriers for therapeutic gain, *Br. J. Cancer*. 97 (2007) 910–918. doi:10.1038/sj.bjc.6603972.
- [25] R. Ahmad, M. Alam, H. Rajabi, D. Kufe, The MUC1-C oncoprotein binds to the BH3 domain of the pro-apoptotic BAX protein and blocks BAX function, *J. Biol. Chem.* 287 (2012) 20866–20875. doi:10.1074/jbc.M112.357293.

Figure legends

Figure 1: Establishment of Capan-2 MUC1-KD cells. (A) Analysis of *MUC1* mRNA expression in Capan-2 MUC1-KD1 and MUC1-KD2 cell lines by qRT-PCR. MUC1 expression was normalized to control GAPDH. MUC1 expression in Mock cells was arbitrarily set to 1. ($p < 0.05$ *). (B) Analysis of MUC1 protein expression by western-blot. (C) Measurement of cell proliferation for 96h by cell counting and trypan blue exclusion dye. ($p < 0.01$ **). (D) Analysis of MUC1, β -catenin, cyclin D1, phospho-p42-44 MAPK, p42-44 MAPK, and CDK6 expression by western-blot. β -actin was used as internal control.

Figure 2: *In vitro* biological properties of Capan-2 MUC1-KD cells. (A) Results are expressed as a percentage of migration or invasion of cells compared to the control Mock cells (100%). The DAPI staining is shown. ($p < 0.05$ * or $p < 0.01$ **). (B) Analysis of MMP13 protein expression by western-blot. (C) Analysis of P-Akt, Akt and Bcl-2 protein expression by western-blot. (D) Measurement of cell survival after 72h of treatment of Capan-2 MUC1-KD cells with 40 nM of gemcitabine or 1 μ M of 5-Fu, 1 μ M of oxaliplatin and 3 nM of SN-38 ($p < 0.05$ * or $p < 0.01$ **).

Figure 3: *In vivo* effects of MUC1 on PDAC tumor properties. (A) SC xenografts of Capan-2 cells stably knocked-down for MUC1 in SCID mice. Tumor growth (mm³) was evaluated during 28 days. ($p < 0.05$ *, $p < 0.01$ **). (B) Tumor weight (g) was measured at the sacrifice. ($p < 0.05$ *, $p < 0.01$ **). (C) Analysis of MUC1 expression in SC tumors was carried out by IHC. Magnification x20. (D) *MUC1* and *MMP13* mRNA expression was evaluated in PDAC datasets of the NCBI Gene Expression Omnibus (GEO, GSE28735) database ($p < 0.001$ ***).

Figure 1

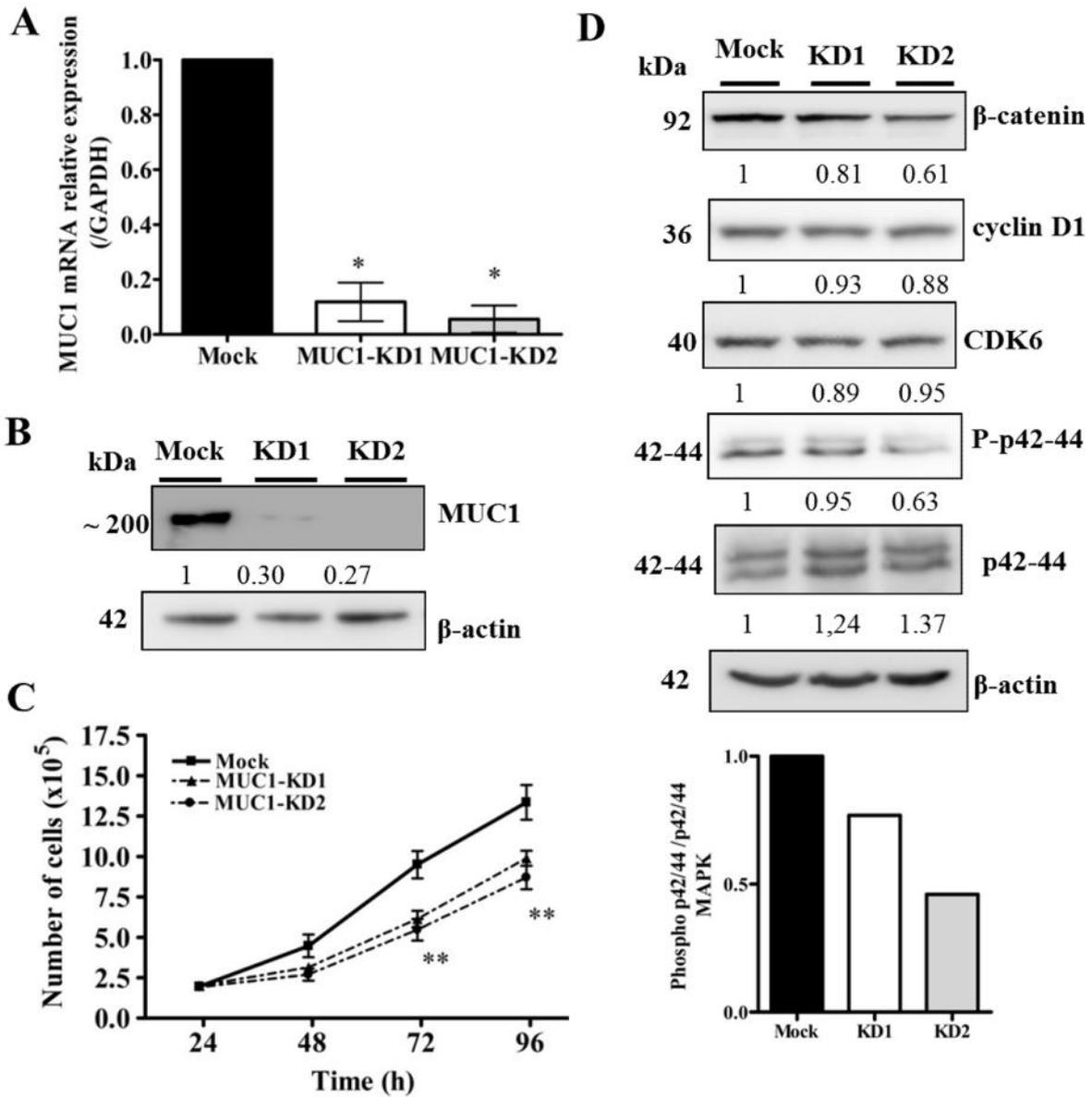


Figure 2

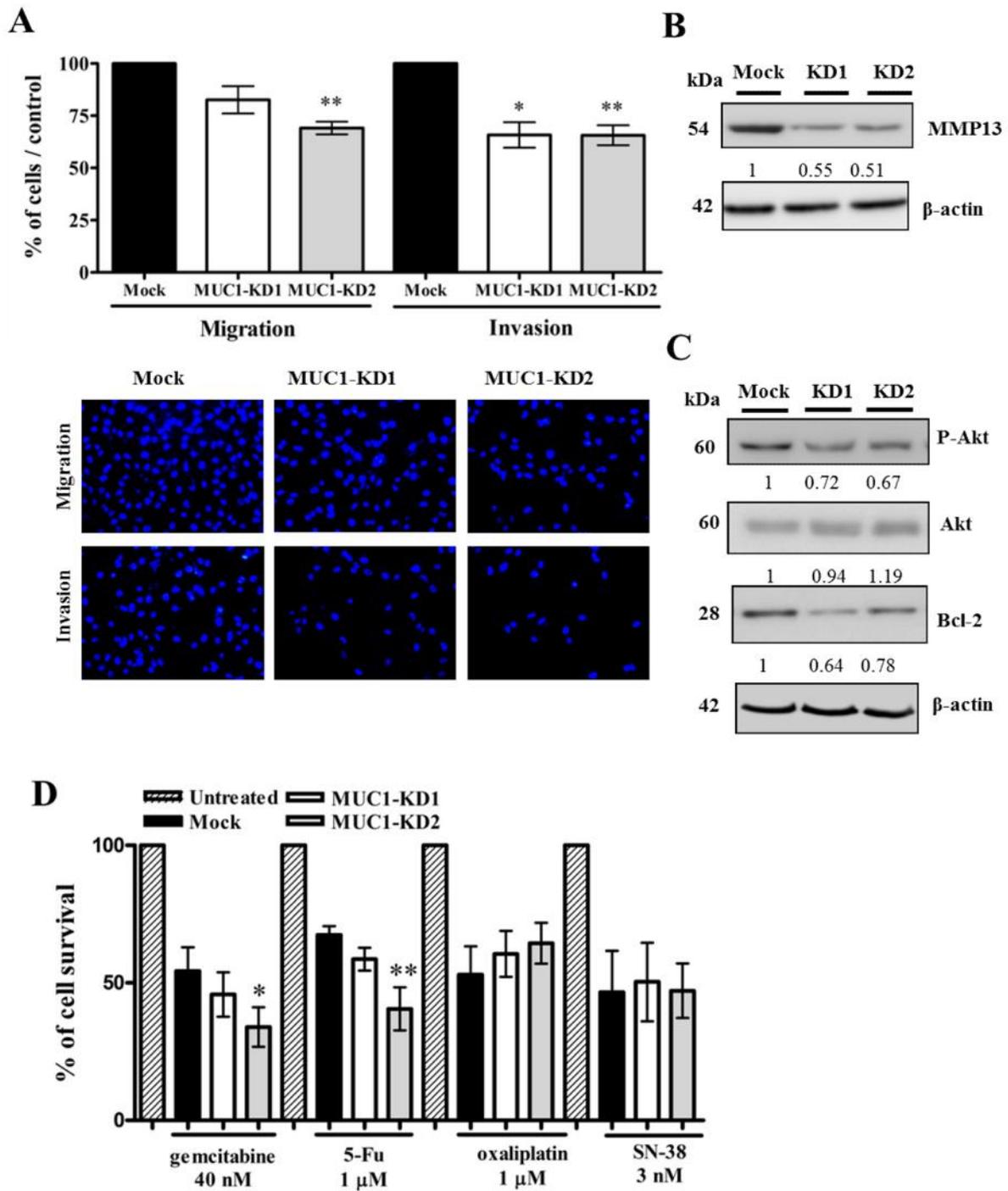
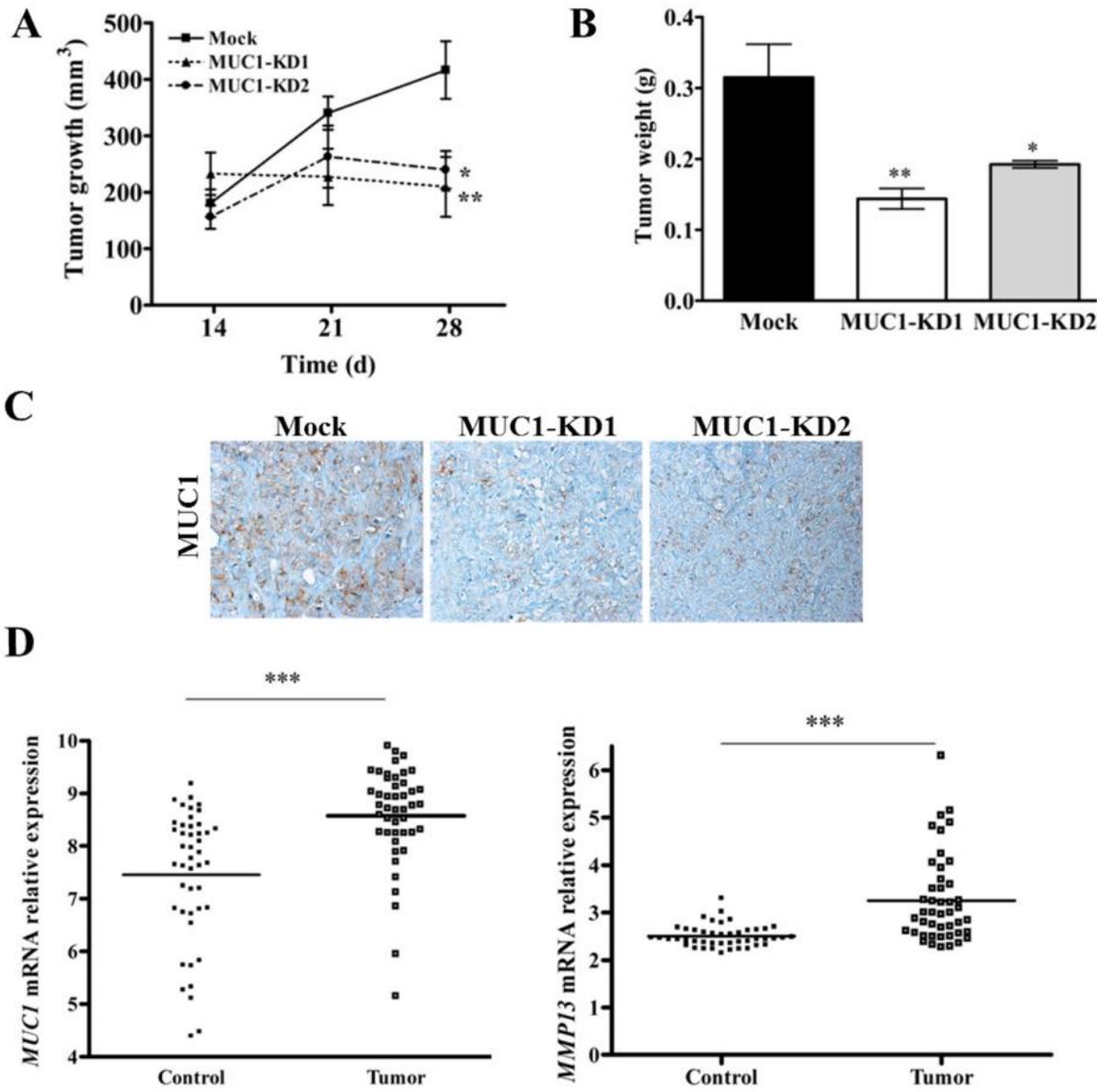


Figure 3



3- Conclusion-Perspectives

Nous avons mis en évidence que l'inhibition de l'expression de MUC1 permet :

- De ralentir la prolifération cellulaire et la croissance tumorale en altérant l'expression des voies Wnt/ β -caténine et p42-44 MAPK.

- De diminuer la migration et l'invasion cellulaires ainsi que l'expression de la métalloprotéase MMP13.

- De diminuer la survie cellulaire et d'augmenter la mort cellulaire en altérant l'expression des protéines Akt et Bcl2 et d'augmenter la chimiosensibilité à la gemcitabine et au 5-Fu.

Ces résultats confirment l'intérêt de cibler la protéine MUC1 dans le PDAC afin de ralentir la progression du cancer pancréatique et de diminuer la chimiorésistance de ces tumeurs.

La suite de cette étude consistera à étudier le mécanisme de chimiorésistance au 5-Fu médiée par la mucine MUC1.

Ce modèle cellulaire permettra de déterminer si les effets que nous avons mis en évidence dans les deux articles présentés p87 et p123 seraient dû soit à la régulation de la mucine MUC1 par le miR-29a et par le miR-330-5p soit à la régulation de cibles additionnelles par ces miARN.

Partie IV : Identification des *off-targets* de miR-29a et miR-330-5p

Tenant compte du fait que MUC1 n'est certainement pas l'unique cible de miR-29a et de miR-330-5p nous avons débuté une étude préliminaire avec pour objectif l'identification des cibles additionnelles de miR-29a et miR-330-5p ainsi que les autres miARN sélectionnés dans cette étude.

L'objectif de cette étude est de mieux comprendre le rôle et les fonctions des miARN régulateurs de l'expression de la mucine MUC1 dans le PDAC.

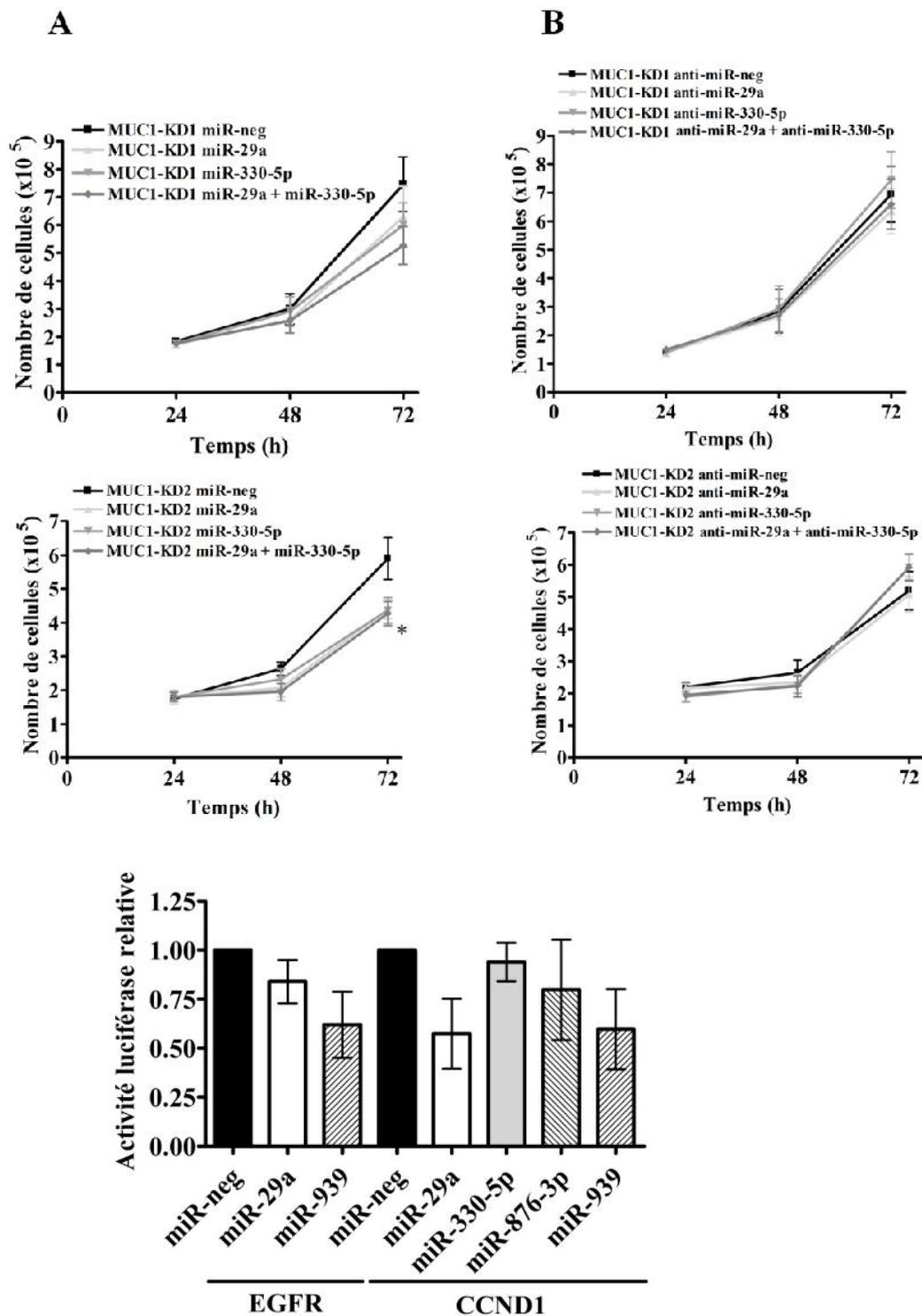


Figure 39 : Propriétés de miR-29a et miR-330-5p dans les lignées Capan-2 MUC1-KD.

(A) Etude de la prolifération cellulaire par comptage cellulaire toutes les 24h pendant 72h après surexpression de miR-29a et/ou miR-330-5p.

(B) Etude de la prolifération cellulaire par comptage cellulaire toutes les 24h pendant 72h après inhibition de miR-29a et/ou miR-330-5p.

(C) Test d'activité luciférase sur le 3'UTR de l'*EGFR* et de la *cycline D1*.

IV- Identification des off-targets de miR-29a et miR-330-5p

1- Fonction de miR-29a et miR-330-5p dans les lignées MUC1-KD1/2

Nous avons dans un premier temps étudié si les variations d'expression de miR-29a ou de miR-330-5p pouvaient avoir un effet dans les lignées cellulaires indépendamment de leur capacité à réguler l'expression de MUC1.

Dans ce but, nous avons utilisé les lignées déficientes en MUC1 (MUC1-KD1/2) et nous avons mis en évidence que la surexpression de miR-29a ou de miR-330-5p dans les lignées MUC1-KD2 permettaient de ralentir de manière plus importante la prolifération cellulaire suggérant que ces miARN ont d'autres cibles dans les lignées cancéreuses pancréatiques (Figure 39). Dans la lignée MUC1-KD1 nous n'avons pas constaté de ralentissement significatif de la prolifération lors de la surexpression de miR-29a et/ou de miR-330-5p. L'inhibition de miR-29a et/ou de miR-330-5p n'a pas permis non plus de mettre en évidence de différences quant à la capacité des cellules à proliférer.

2- Identification des cibles additionnelles de miR-29a et miR-330-5p

Nous avons dans un second temps réalisé des prédictions sur les bases de données permettant de mettre en évidence les sites de fixations pour les miARN décrits dans le Tableau 2 p144. Ces prédictions ont été réalisées en se basant sur les variations d'expression protéique que nous avons obtenues en western-blot et qui ont été décrites dans les deux articles p87 et p123, ainsi que par la réalisation d'une analyse protéomique (M&M § V p206).

Parmi l'ensemble des cibles nous avons sélectionné la cycline D1 et l'EGFR connues pour interagir avec la mucine MUC1 (Kufe *et al.*, 2009; 2013). Nous avons testé la capacité des miARN à interagir avec leur 3'UTR selon le protocole expérimental décrit dans la section M&M § VII p210.

Nous avons constaté lors de la réalisation de co-transfections cellulaires transitoires du 3'UTR des cibles et du miARN d'intérêt, une diminution de l'activité luciférase avec le miR-939 pour le 3'UTR de l'EGFR et de la cycline D1. Une diminution de l'activité luciférase par miR-29a sur le 3'UTR de la cycline D1 a également été mise en évidence (Figure 39).

Cibles	3'-UTR	miR-29a	miR-330-5p	miR-876-3p	miR-939	miR-183	miR-200a	miR-203
MUC1	326	1	2	0	0	1	1	0
Cycline D1	3191	1	2	1	2	1	2	1
EGFR	1720	1	0	0	1	0	1	1
ERK-2	4590	2	5	1	0	0	1	3
-caténine	1106	0	0	0	0	0	1	1
Bcl-2	5279	1	3	0	1	1	1	2
Bcl-xL	1489	0	2	1	2	0	0	0
Stat3	2420	2	0	1	2	0	0	0
CDK6	10217	3	1	2	0	2	7	5
GSK3-	4831	1	4	1	2	0	1	4

Tableau 2 : Prédiction de la présence de séquences cibles pour les miARN d'intérêt sur le 3'UTR des gènes cibles.

3- Conclusion-Perspectives

Ces résultats suggèrent une possible interaction entre ces miARN et les cibles identifiées.

Les perspectives de ce travail préliminaire sont de muter les sites de fixation au niveau du 3'UTR de la *cycline D1* et de l'*EGFR* pour le miR-939 et de muter le site de fixation pour le miR-29a sur le 3'UTR de la *cycline D1* afin de valider les interactions identifiées.

La détermination des cibles régulées par les miARN est une étape primordiale afin de comprendre leur rôle dans le PDAC afin de déterminer leur implication potentielle comme cible thérapeutique.

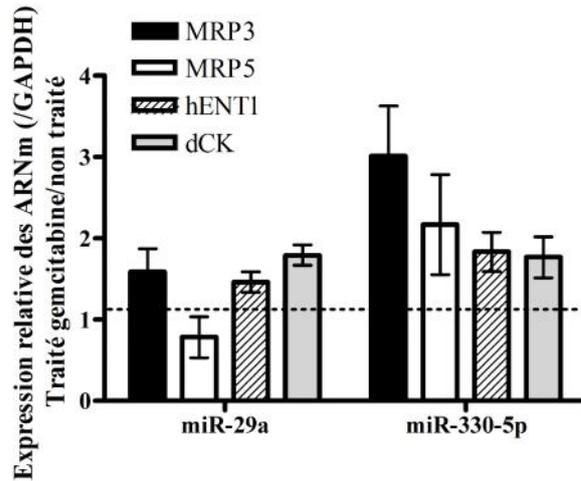
Partie V : Rôle de miR-29a et miR-330-5p dans la chimiosensibilité à la gemcitabine

Nous avons montré que la surexpression de miR-29a ou de miR-330-5p permettait d'inhiber l'expression protéique de MUC1, qu'ils étaient dérégulés dans le cancer pancréatique et qu'ils agissaient comme des miARN suppresseurs de tumeurs. Nous avons mis en évidence que ces deux miARN sensibilisaient les cellules uniquement à la gemcitabine mais pas aux drogues utilisées dans le protocole FOLFIRINOX. Nous avons également montré que l'inhibition de MUC1 permettait de sensibiliser les cellules cancéreuses pancréatiques à la gemcitabine et au 5-Fu. Nous avons entrepris de décrypter le mécanisme par lequel la surexpression de ces deux miARN permettait de sensibiliser les cellules à la gemcitabine. Deux hypothèses ont été émises :

- La mucine MUC1 est impliquée dans les mécanismes de chimiorésistance à la gemcitabine comme nous l'avons décrit dans l'introduction partie B § V p47 ainsi que dans la TEM partie B § III p41, deux mécanismes impliqués dans la chimiorésistance du PDAC (introduction partie A § V p19 et 20). La première hypothèse est que la sensibilité observée dans les lignées surexprimant le miR-29a ou le miR-330-5p serait médiée par les mécanismes identifiés pour MUC1, à savoir la régulation du métabolisme de la gemcitabine par le canal MRP1 par exemple et/ou la TEM ? Afin de commencer à répondre à cette question, le profil d'expression des acteurs du métabolisme de la gemcitabine et de la TEM ont été établis dans les lignées stables surexprimant le miR-29a ou le miR-330-5p.

- Enfin la deuxième hypothèse serait l'implication d'un nouveau mécanisme de chimiorésistance dans le PDAC. Pour étudier cette hypothèse, nous avons commencé à déterminer l'implication des miARN dans ce mécanisme de chimiorésistance.

A



B

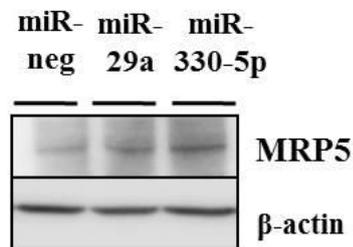


Figure 40 : Profil d'expression des acteurs du métabolisme de la gemcitabine dans les lignées stables MiaPaCa-2 surexprimant le miR-29a ou le miR-330-5p.

(A) Etude de l'expression de MRP3, MRP5, hENT1, dCK par qRT-PCR. L'expression dans les cellules traitées par la gemcitabine pendant 72h par rapport aux cellules non traitées est indiquée. L'expression dans la lignée miR-neg a été arbitrairement fixée à 1.

(B) Etude de l'expression de MRP5 par western-blot des cellules traitées par la gemcitabine pendant 72h.

V- Rôle de miR-29a et miR-330-5p dans la chimiosensibilité à la gemcitabine

1- Expression des acteurs du métabolisme de la gemcitabine

MUC1 étant une protéine impliquée dans la chimiorésistance nous avons établi le profil d'expression des acteurs du métabolisme de la gemcitabine dans les lignées stables MiaPaCa-2 surexprimant le miR-29a ou le miR-330-5p.

Dans un premier temps le profil d'expression a été réalisé dans les cellules non traitées par la gemcitabine. Nous avons mis en évidence que seuls les transporteurs hENT1 et les canaux détoxifiants MRP3 et MRP5 étaient exprimés. Nous n'avons pas pu mettre en évidence d'expression du canal MRP1-2-4 ou de hCNT1-3 dans nos conditions expérimentales suggérant que la chimiosensibilité observée dans ce modèle ne passe pas par la régulation du canal MRP1 par MUC1.

Nous avons ensuite étudié l'expression des marqueurs impliqués dans le métabolisme de la gemcitabine après un traitement des cellules par la gemcitabine pendant 72h à l'IC₅₀ déterminée dans l'article p95. Nous avons ensuite comparé l'expression des marqueurs du métabolisme de la gemcitabine dans les cellules traitées par cette drogue par rapport aux cellules non traitées. Nous avons constaté une augmentation de l'expression de *MRP3* pour miR-29a (x1,5) et miR-330-5p (x3). Pour MRP5 nous avons observé une augmentation de l'expression lors de la surexpression de miR-29a et de miR-330-5p par western-blot, ce qui est en faveur d'une résistance à la gemcitabine (Figure 40). A l'inverse, nous avons constaté une augmentation de l'expression du transporteur *hENT1* (x1,5 et x1,8) et de la *dCK* (x1,8 et x1,7) des cellules surexprimant le miR-29a ou le miR-330-5p respectivement. Ces résultats sont en faveur d'une chimiosensibilité.

Nous devons maintenant valider ces expressions par western-blot afin de déterminer leur possible implication dans la chimiosensibilité des lignées stables surexprimant le miR-29a ou le miR-330-5p. Le résumé de l'implication de ces marqueurs dans la chimiorésistance est indiqué dans le Tableau 3 p151.

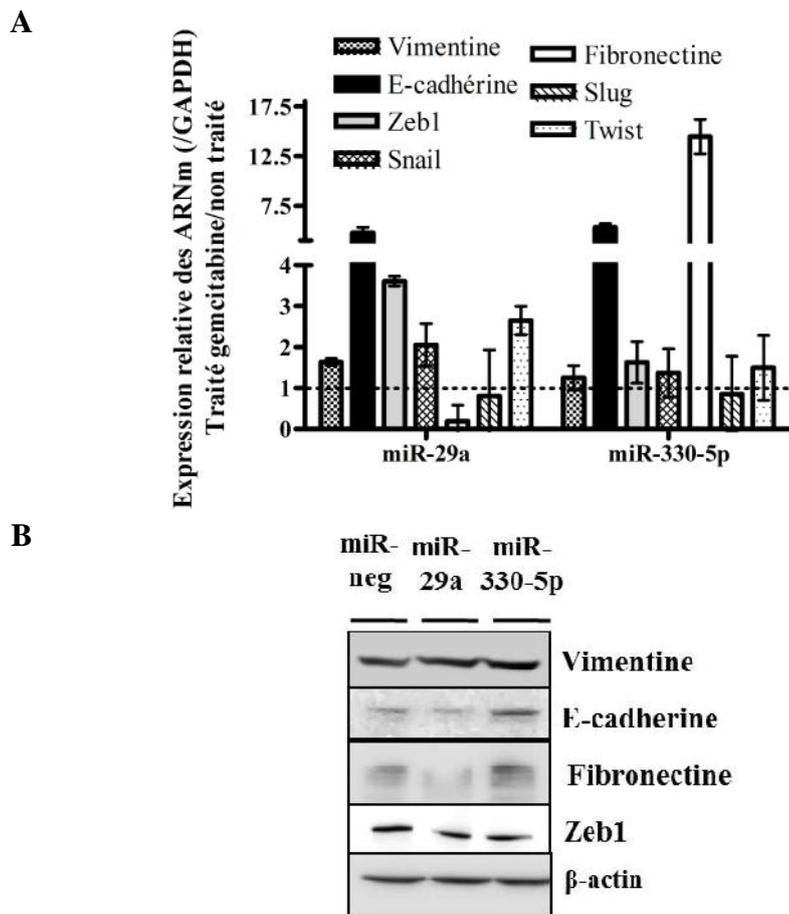


Figure 41 : Profil d'expression des acteurs de la TEM dans les lignées stables MiaPaCa-2 surexprimant le miR-29a ou le miR-330-5p.

(A) Etude de l'expression de la vimentine, de la E-cadhérine, de Zeb1, Snail, fibronectine, Twit et Slug par qRT-PCR. L'expression dans les cellules traitées par la gemcitabine pendant 72h par rapport aux cellules non traitées est indiquée. L'expression dans la lignée miR-neg a été arbitrairement fixée à 1.

(B) Etude de l'expression de MRP5, Vimentine, E-cadhérine, Fibronectine et Zeb1 par western-blot des cellules traitées par la gemcitabine pendant 72h.

2- Expression des acteurs de la TEM

Dans un second temps, nous avons évalué l'expression des marqueurs de la TEM dans les lignées stables MiaPaCa-2 surexprimant le miR-29a ou le miR-330-5p. Il est connu que la lignée MiaPaCa-2 dans laquelle nous travaillons exprime très peu la E-cadhérine et fortement la vimentine (Deer *et al.*, 2010; Salnikov *et al.*, 2012). Cette lignée est par ailleurs considérée comme une lignée « mésenchymateuse » chimiorésistante (Funamizu *et al.*, 2012).

Nous avons établi le profil d'expression avant et après traitement par la gemcitabine de 72h. Nous avons ensuite comparé l'expression des marqueurs de TEM dans les cellules traitées par la gemcitabine par rapport aux cellules non traitées. Nous avons mis en évidence une augmentation de l'expression de la *vimentine* (x1,6), de la *E-cadhérine* (x4,8), de *Zeb1* (x3,6), de *Snail* (x2) et de *twist* (x2,6) dans la lignée surexprimant le miR-29a. A l'inverse, nous avons mis en évidence une diminution de l'expression de la *fibronectine* (x0,2) et de *Slug* (x0,8) (Figure 41). Par western-blot nous avons confirmé la diminution de l'expression de la fibronectine et nous avons observé à l'encontre de ce que nous avons vu par qRT-PCR une légère diminution de *Zeb1* et aucune surexpression de la E-cadhérine. L'évaluation de l'expression protéique des autres marqueurs est à réaliser (Figure 41).

Pour la lignée surexprimant le miR-330-5p, nous avons constaté par qRT-PCR une augmentation de l'expression de la *vimentine* (x1,2), de la *E-cadhérine* (x5,3), de *Zeb1* (x1,6), de *Snail* (x1,4), de *twist* (x1,5) et de la *fibronectine* (x14). A l'inverse nous avons mis en évidence une diminution de l'expression de *Slug* (x0,85) (Figure 41). Par western-blot nous avons confirmé la surexpression de la vimentine et de la fibronectine ceci étant en faveur d'une TEM. A l'inverse, nous avons observé une augmentation de la E-cadhérine et une légère diminution de *Zeb-1* ce qui serait plutôt en faveur d'une MET. Le profil d'expression des marqueurs de la TEM est résumé dans le Tableau 4 p151.

L'ensemble de ces résultats permet de proposer un profil d'expression des acteurs de la TEM et du métabolisme de la gemcitabine dans le modèle cellulaire MiaPaCa-2 surexprimant miR-29a ou miR-330-5p. Ces résultats indiquent qu'il existe une modification de l'expression de ces acteurs. En conséquence, la détermination de l'implication de ces acteurs dans les lignées stables surexprimant miR-29a ou miR-330-5p dans la sensibilité à la gemcitabine sera à déterminer en évaluant leur implication fonctionnelle dans la survie cellulaire par une

Cibles	R	S	miR-29a	miR-330-5p
hENT1	-	+	+	+
MRP3	+	-	+	+
MRP5	+	-	+	+
dCK	-	+	+	+

Tableau 3 : Bilan de l'expression des acteurs du métabolisme de la gemcitabine.
R : Profil d'expression lié à une résistance, S: profil d'expression lié à une sensibilité.

Cibles	TEM	MET	miR-29a	miR-330-5p
Vimentine	+	-	+	+
E-cadhérine	-	+	=	+
Zeb-1	+	-	-	-
Snail	+	-	+	+
Twist	+	-	+	+
Slug	+	-	=	=
Fibronectine	+	-	-	+

Tableau 4 : Bilan de l'expression des marqueurs de la TEM.

TEM : Profil d'expression lié à une résistance, MET: profil d'expression lié à une sensibilité.

approche siARN. Leur localisation cellulaire notamment pour les acteurs de la TEM est encore à confirmer par microscopie confocale.

3- Implication des miARN dans la chimiosensibilité

Etant donné que la surexpression de MUC1 permet de réprimer l'expression de certains miARN (Mohr *et al.*, 2013), nous avons voulu savoir si son inhibition ou la surexpression de miR-29a ou de miR-330-5p pouvait permettre l'expression/l'inhibition de miARN impliqués dans la chimiorésistance.

Nous avons établi le profil d'expression des miARN dans les lignées stables MiaPaCa-2 surexprimant miR-29a ou miR-330-5p. Dans les deux lignées de façon intéressante nous avons constaté une grande variation dans l'expression des miARN impliqués dans la TEM telle la surexpression de miR-200a (x10 et x15), de miR-203 (x18 et x38) et de miR-183 (x2 dans la lignée miR-29a) (Figure 42). L'expression de miR-939 augmente dans les deux lignées (x2,5 et x1,8) et l'expression de miR-876-3p augmente que dans la lignée miR-29a (x5) (Figure 42).

Ces résultats suggèrent une implication de ces miARN dans les propriétés des cellules et/ou dans les mécanismes de chimiosensibilité des lignées stables MiaPaCa-2 surexprimant le miR-29a ou le miR-330-5p. Ces résultats permettent de supposer que le miR-29a et le miR-330-5p ou l'inhibition de MUC1 pourrait permettre de réguler l'expression de certains miARN comme c'est le cas pour le cluster miR-200c/miR-141 dont l'expression est réprimée par la mucine MUC1 pour favoriser le processus de TEM (Rajabi *et al.*, 2013).

Nous avons dans un second temps étudié le profil d'expression des miARN dans les lignées stables MiaPaCa-2 surexprimant miR-29a ou miR-330-5p après traitement par la gemcitabine pendant 72h. Nous avons ensuite comparé l'expression des miARN dans les cellules traitées par la gemcitabine par rapport aux cellules non traitées. Nous avons mis en évidence une surexpression de miR876-3p (x1,8) pour les lignées miR-29a et miR-330-5p (x14). Nous avons également constaté une diminution importante de l'expression du miR-203 dans les lignées miR-29a (-1) et miR-330-5p (-0,95). Nous avons observé une diminution de l'expression du miR-200a dans les lignées miR-29a (-0,78) et miR-330-5p (-0,8) (Figure 42). En l'absence de traitement nous avons observé une augmentation de l'expression de miR-200a et de miR-203. A l'inverse, nous n'avons pas observé d'augmentation de l'expression

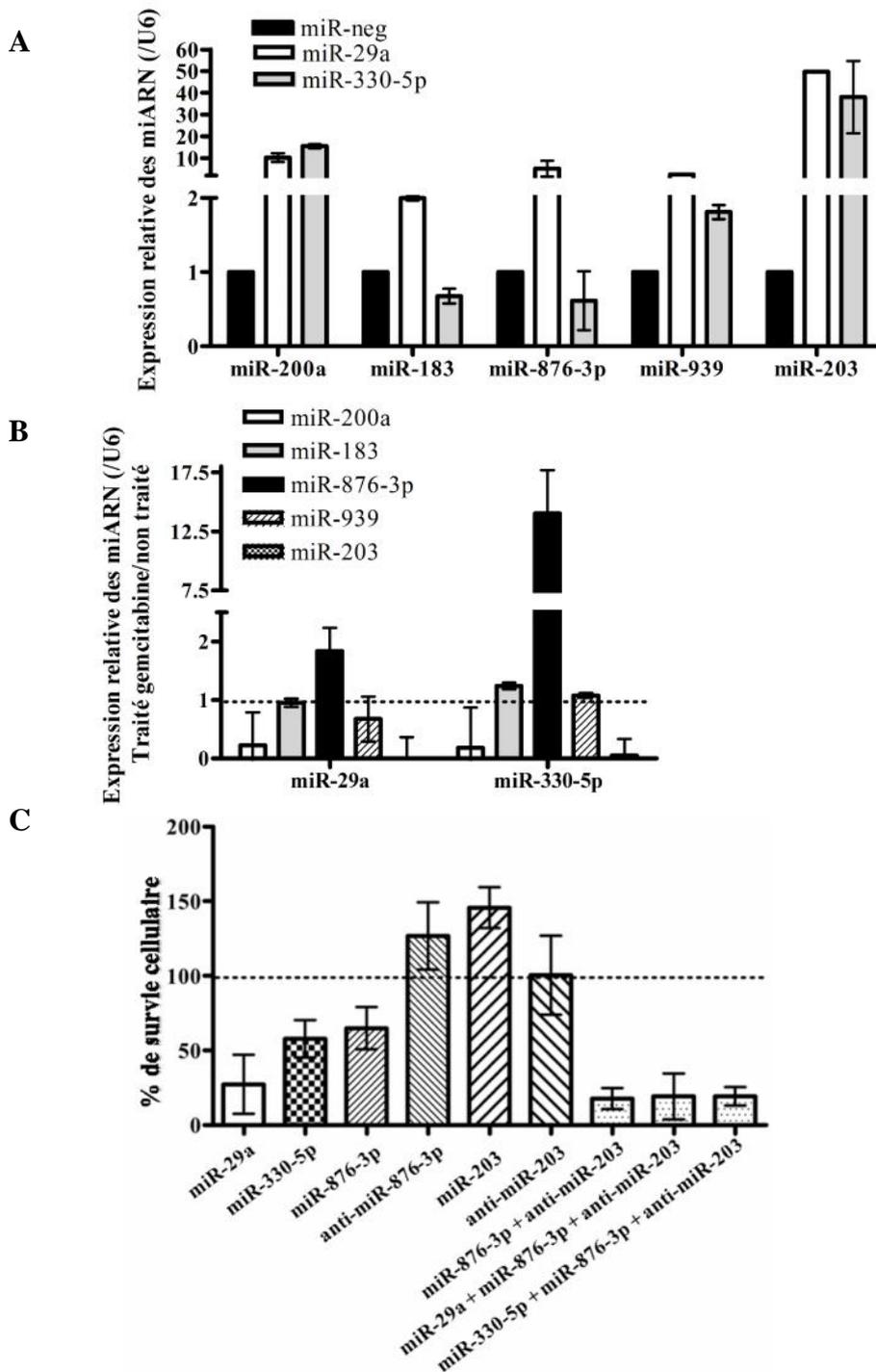


Figure 42 : Implication des miARN dans la chimiosensibilité.

(A) Etude de l'expression des miARN dans les cellules MiaPaCa-2 surexprimant le miR-29a ou le miR-330-5p par qRT-PCR.

(B) Etude de l'expression des miARN dans les cellules MiaPaCa-2 surexprimant le miR-29a ou le miR-330-5p par qRT-PCR. L'expression des cellules traitées par la gemcitabine pendant 72h par rapport aux cellules non traitées est indiquée. L'expression dans la lignée miR-neg a été arbitrairement fixée à 1.

(C) Etude de la survie cellulaire après transfection des combinaisons de miARN et traitement de la lignée Capan-2 par la gemcitabine durant 72h.

de miR-876-3p alors que nous l'observons après traitement pour le miR-330-5p. Ces résultats suggèrent une implication de ces miARN dans la chimiosensibilité à la gemcitabine des lignées surexprimant miR-29a ou miR-330-5p.

Nous avons ensuite évalué si la surexpression ou l'inhibition de ces miARN seuls ou en combinaison avec le miR-29a ou le miR-330-5p pouvait avoir un rôle dans la chimiorésistance en réalisant des tests de survie cellulaire après traitement par la gemcitabine durant 72h dans la lignée Capan-2. Nous avons testé l'efficacité de chaque miARN seul et nous avons mis en évidence que la surexpression de miR-29a, miR-330-5p et miR-876-3p permettait de sensibiliser les cellules à la gemcitabine. L'inhibition de miR-876-3p ou la surexpression de miR-203 entraîne une résistance à la gemcitabine. L'inhibition de miR-203 n'a aucun effet sur la sensibilité à la gemcitabine (Figure 42).

Nous avons par la suite réalisé des combinaisons de miARN afin d'identifier le/les miARN importants dans la chimiosensibilité à la gemcitabine. Nous avons constaté que l'ensemble des combinaisons étaient efficaces, et nous avons observé que la surexpression de miR-876-3p et l'inhibition de miR-203 permettait d'augmenter la sensibilité à la gemcitabine par rapport à l'effet du miR-29a ou du miR-330-5p seul.

En conclusion, nous avons montré qu'un traitement par la gemcitabine dans les lignées stables surexprimant miR-29a ou miR-330-5p entraînait une surexpression de miR-876-3p et une inhibition de miR-203 qui permettent seuls ou en combinaison de modifier la chimiosensibilité des cellules Capan-2 à la gemcitabine. Les résultats sont à confirmer dans la lignée MiaPaCa-2.

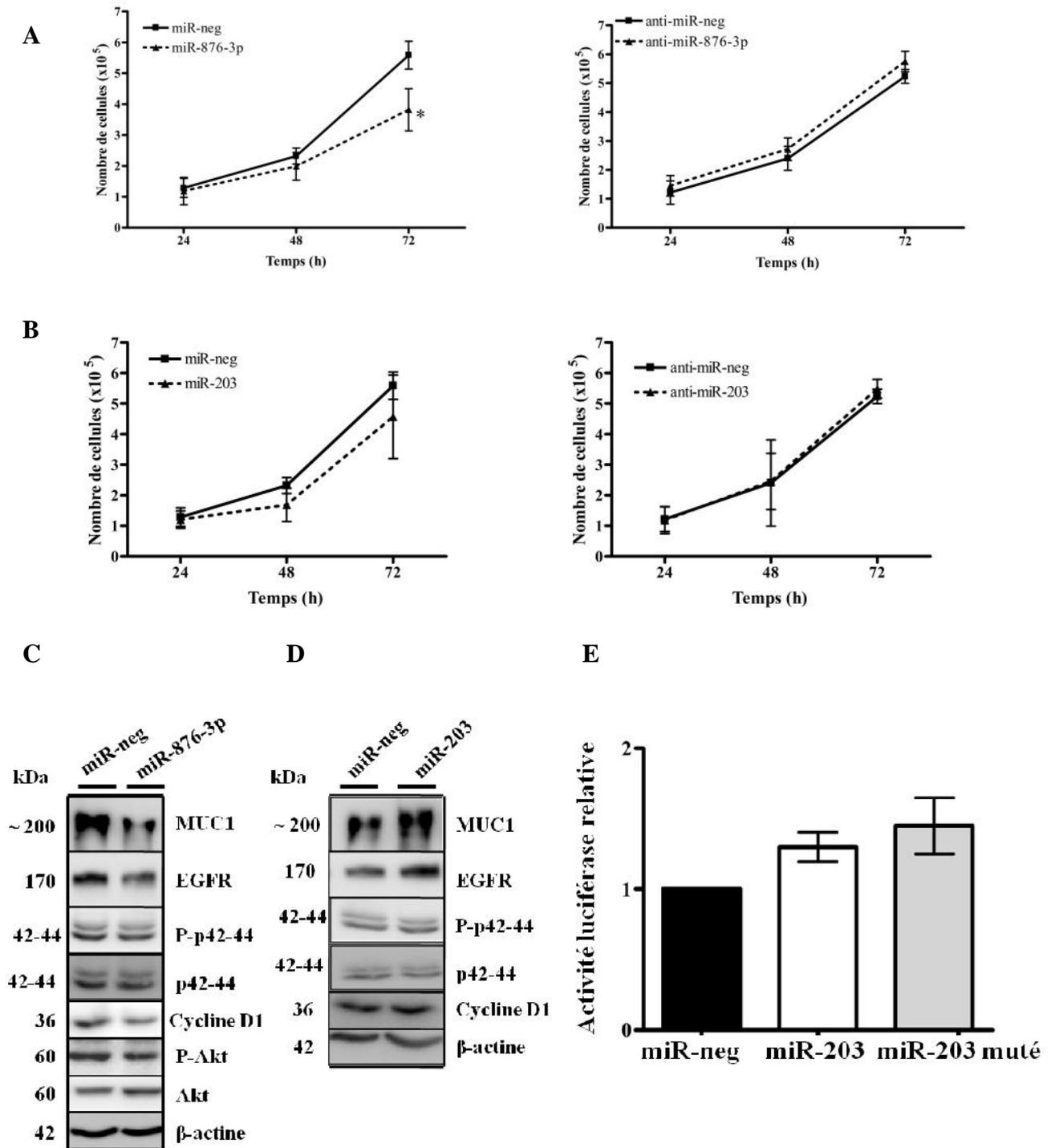


Figure 43 : Propriétés biologiques de la lignée Capan-2 surexprimant/inhibant miR-876-3p et miR-203.

(A) Etude de la prolifération cellulaire après surexpression ou inhibition de miR-876-3p.

(B) Etude de la prolifération cellulaire après surexpression ou inhibition de miR-203.

(C) Etude de l'expression par western-blot de MUC1, EGFR, P-p42-44 MAPK, p42-44 MAPK, cycline D1, P-Akt, Akt après la surexpression de miR-876-3p.

(D) Etude de l'expression par western-blot de MUC1, EGFR, P-p42-44 MAPK, p42-44 MAPK, après la surexpression de miR-203.

(E) Etude de l'activité luciférase du 5'UTR de *MUC1* muté ou non pour le site de fixation du miR-203.

4- Fonctions biologiques de ces miARN

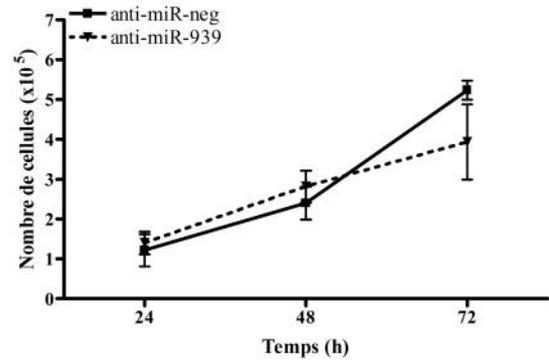
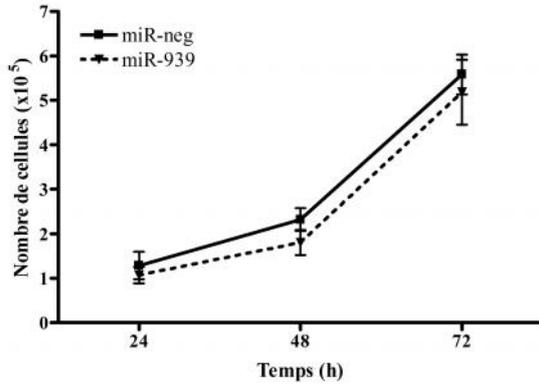
Après avoir montré l'implication de miR-876-3p et de miR-203 dans la chimiosensibilité à la gemcitabine, nous avons décidé d'évaluer leur implication dans les propriétés biologiques des cellules cancéreuses pancréatiques humaines. Nous avons évalué leur rôle sur la prolifération cellulaire dans les lignées Capan-2 et MiaPaCa-2. Nous avons constaté que seule la surexpression de miR-876-3p permettait de ralentir la prolifération cellulaire à 72h de façon significative ($p < 0,05$) alors que la surexpression ou l'inhibition de miR-203 n'avait aucun effet (Figure 43).

Nous avons étudié dans un second temps les voies de signalisation impliquées lors de la surexpression de miR-876-3p ou de miR-203. Nous avons constaté qu'en plus de l'inhibition de MUC1 par miR-876-3p, nous visualisons une diminution de l'expression de l'EGFR, de la cycline D1 et de l'activité d'Akt, confirmant ainsi un rôle sur la prolifération cellulaire de ce miARN (Figure 43, Figure 44).

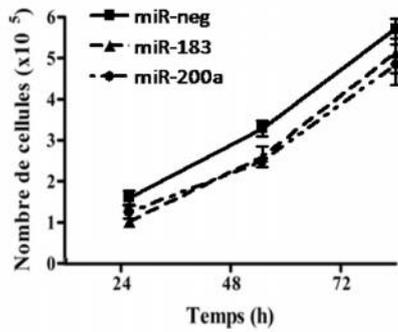
La surexpression de miR-203 a été corrélée à une augmentation de l'expression de MUC1, de l'EGFR, mais aucune variation de l'activité de p42-44 MAPK ou de la cycline D1 n'a été constatée confirmant ainsi que ce miARN n'a pas d'effet sur la prolifération cellulaire. L'expression d'Akt reste à évaluer afin de savoir si sa surexpression pourrait impacter cette voie de survie cellulaire. Nous avons voulu savoir ensuite si le miR-203 pouvait être un régulateur de MUC1. La réalisation d'un test d'activité luciférase contenant le 5'UTR de *MUC1* muté ou non pour le site de fixation du miR-203 n'a pas permis de mettre en évidence de variation de l'activité luciférase (Figure 43).

Finalement, nous avons commencé à évaluer l'implication de miR-939, miR-183 et miR-200a sur les propriétés biologiques des cellules puisque nous avons montré qu'ils inhibaient l'expression protéique de MUC1. La surexpression de miR-939, miR-183 ou miR-200a n'a aucun effet sur la prolifération cellulaire. Nous avons constaté que seule l'inhibition de miR-939 permettait de ralentir la prolifération cellulaire. Nous avons mis en évidence un ralentissement de la migration cellulaire évalué par test de blessure lors de la surexpression de miR-183 ou de miR-200a (Figure 44) (M&M § VIII p212). Il reste à évaluer l'effet de miR-183 et miR-200a sur l'invasion cellulaire; de miR-876-3p, miR-203 et miR-939 sur la migration et l'invasion cellulaires.

A



B



C

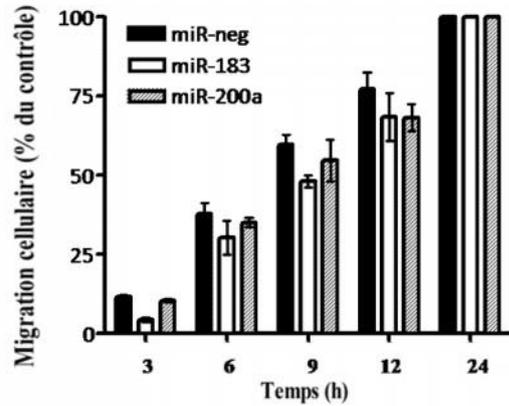


Figure 44 : Propriétés biologiques de la lignée Capan-2 surexprimant transitoirement miR-939, miR-183 et miR-200a.

(A) Etude de la prolifération cellulaire après surexpression et inhibition de miR-939.

(B) Etude de la prolifération cellulaire après surexpression de miR-183 et miR-200a.

(C) Etude de la migration cellulaire après surexpression de miR-183 et miR-200a.

5- Conclusion

Dans cette partie du travail nous avons commencé à décrypter les mécanismes conférant la capacité des cellules surexprimant miR-29a ou miR-330-5p à devenir plus sensibles à la gemcitabine.

Nous avons montré que la surexpression de miR-29a et de miR-330-5p n'était pas un marqueur de chimiosensibilité des cellules traitées par la gemcitabine car leur expression ne varie pas lors d'un traitement par la gemcitabine.

Dans un second temps nous avons montré que le métabolisme de la gemcitabine et la TEM pouvaient être impliqués dans ce phénomène de chimiosensibilité. Cette sensibilité ne semble impliquer un mécanisme inconnu pour MUC1 puisque le canal MRP1 n'est pas exprimé dans le modèle cellulaire.

Finalement nous mettons en évidence un nouveau mécanisme de sensibilité dans le cancer pancréatique qui suite à la surexpression de miR-29a ou de miR-330-5p permet de sensibiliser les cellules à la gemcitabine par la surexpression de miR-876-3p et l'inhibition de miR-203. De plus nous montrons que la surexpression seule de miR-876-3p est suffisante pour induire la sensibilité à la gemcitabine et pour ralentir la prolifération cellulaire. Néanmoins, les rôles et les cibles directes de miR-876-3p et de miR-203 restent encore à identifier, ainsi que le mécanisme permettant leur surexpression/inhibition respective dans les lignées surexprimant miR-29a ou miR-330-5p.

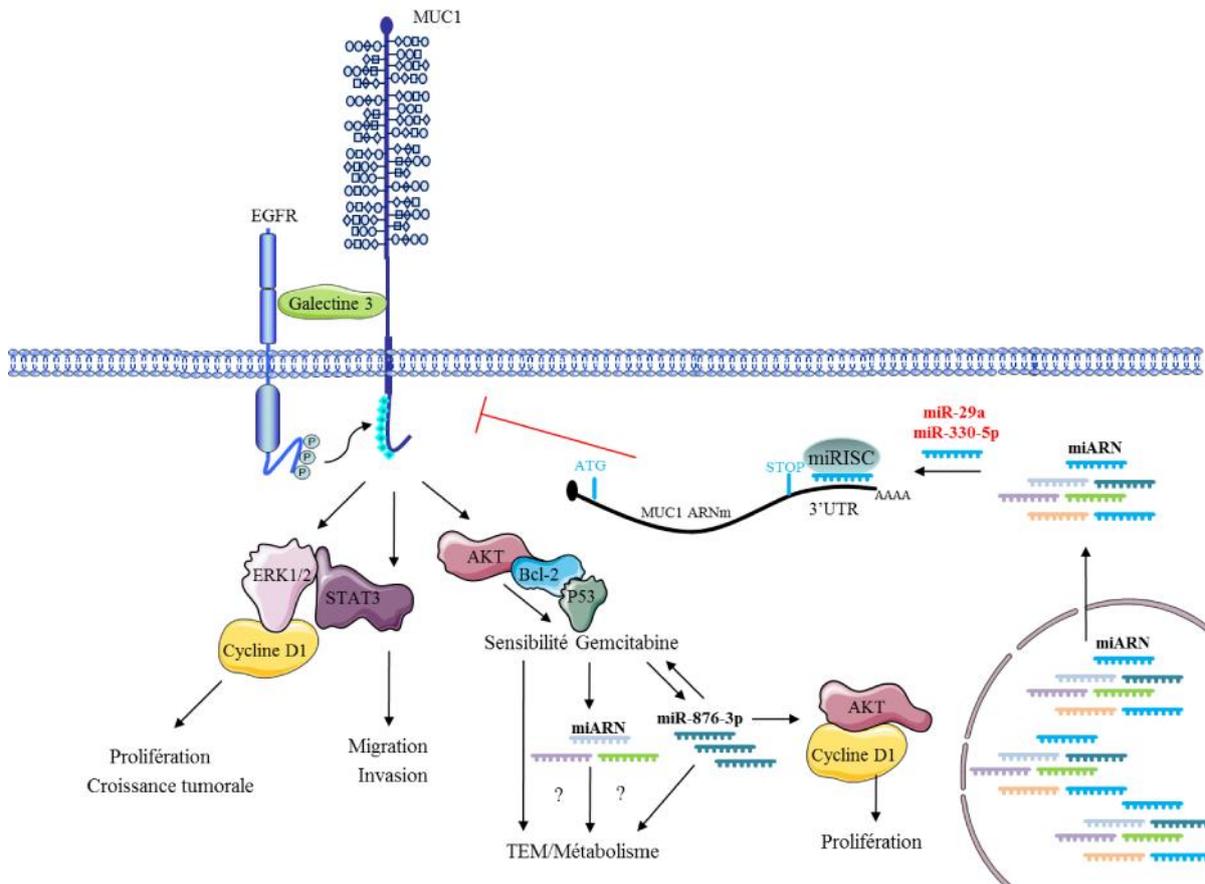


Figure 45 : Schéma sur les mécanismes identifiés ou hypothétiques médiant les effets de miR-29a et miR-330-5p sur les propriétés des cellules cancéreuses pancréatiques.

Conclusion

L'ensemble de nos travaux a permis de mettre en évidence un ensemble de miARN dérégulés dans le cancer du pancréas et ayant la capacité de réguler négativement l'expression de la mucine MUC1.

Nous avons également montré que le miR-29a et le miR-330-5p étaient les seuls à réguler négativement et directement l'expression de MUC1 et qu'ils agissaient comme des suppresseurs de tumeurs en altérant les propriétés biologiques des cellules cancéreuses pancréatiques :

- *In vitro* : en diminuant la prolifération, la migration et l'invasion cellulaires
- *In vivo* : en ralentissant la croissance tumorale.

De plus, la surexpression de miR-29a et de miR-330-5p permet de sensibiliser les cellules à la gemcitabine :

- Par la surexpression de miR-876-3p qui permet de ralentir la prolifération cellulaire
- Et/ou par l'inhibition de miR-203.

Ces données nous permettent de proposer miR-29a et miR-330-5p comme deux nouveaux miARN suppresseurs de tumeurs et comme deux nouvelles cibles thérapeutiques potentielles pour le traitement du PDAC (Figure 45).

Discussion

Le PDAC est un cancer hétérogène, invasif possédant un stroma dense et très chimiorésistant. Son diagnostic est tardif, la médiane de survie est de 6 mois et il n'existe pas de traitement médical efficace (Siegel *et al.*, 2013). Il est donc urgent de découvrir de nouvelles thérapies.

Il a été montré que la surexpression de MUC1 dans le PDAC est associée à un mauvais pronostic (Winter *et al.*, 2012). L'implication de MUC1 dans les propriétés de croissance, de migration, d'invasion cellulaire, de TEM et de chimiorésistance fait de cette mucine une cible idéale de traitement (Kufe, 2013). Malheureusement, les thérapies visant MUC1 manquent d'efficacité pour le moment, et il est donc utile de développer de nouvelles stratégies la ciblant (Kimura & Finn, 2013).

La découverte des miARN comme nouveaux acteurs de la régulation génique, comme acteurs de l'agressivité des tumeurs, comme marqueurs pronostics ou prédictifs, et leur grand potentiel comme outil thérapeutique (Garofalo *et al.*, 2014) nous a amené à vouloir étudier la régulation de la mucine MUC1 par les miARN dérégulés dans le PDAC afin d'identifier de nouvelles cibles ayant un potentiel thérapeutique.

I- Sélection des miARN

Dans ce travail nous avons dans un premier temps sélectionné de nombreux miARN à partir de base de données de prédictions. Afin de prédire l'appariement d'un miARN à une cible différents critères existent et sont utilisés par les sites de prédictions. On peut relever notamment :

- La complémentarité des séquences de fixation.
- La conservation entre espèces de cette séquence de fixation.
- L'énergie de liaison favorable à l'hybridation.
- L'évaluation des structures secondaires formées.
- L'existence de bases d'appariement complémentaires à l'extrémité 3' du miARN permettant de compenser un mésappariement en 5' ou une petite séquence *seed*.

Une base de données n'utilise pas l'ensemble de ces critères. C'est pourquoi il est nécessaire d'utiliser plusieurs bases de prédictions. Nous avons fait le choix de choisir des

3' auuggCUAAAGUCUACC--ACGAu 5' **hsa-miR-29a** score miRSVR : -0.1372
 || |||||:|||| ||||
 99:5' gcuggGAGUUCAGGUGGGCUGCUc 3' **MUC1**

3' cgGAUUCU-GUGUCCGGGUCUCu 5' **hsa-miR-330-5p** score miRSVR : -0.1780
 | |:|| || |||||
 228:5' ucCCAGGAGGACUGGCCAGAGa 3' **MUC1 #1**

3' cggauucuguGUCCGGGUCUCu 5' **hsa-miR-330-5p** score miRSVR : -0.0005
 |||| |||||
 52:5' ucagguucuuCAGGGCCAGAGc 3' **MUC1 #2**

3' ucACUUA--AGAUGGUCACGGUAu 5' **hsa-miR-183** score miRSVR : -0.1983
 |||:| | :|||||||
 19:5' gcUGAGUGGCCAGCCAGUGCCAUu 3' **MUC1**

3' uguAGCAAUGGUCUGUCACAAu 5' **hsa-miR-200a** score miRSVR : -0.0007
 || | |::|: |||||
 196:5' ggUCAUGCCUGGAAGUGUUg 3' **MUC1**

Figure 46 : Sites de fixation des miARN sur le 3'UTR de MUC1 d'après microRNA.org.

Le score miRSVR est indiqué.

bases de données complémentaires. Nous avons utilisé la base de données TargetScan, permettant de voir les appariements les plus conservés, en termes de séquence de fixation et de conservation entre espèces.

En second nous avons utilisé la base de données microRNA.org utilisant l'algorithme miRanda qui génère un score de prédiction d'appariement (score *micro-RNA support vector regression algorithm* miRSVR), et dont l'avantage majeur est de pouvoir prédire en plus des sites canoniques classiques, des sites marginaux, supplémentaires et complémentaires (non canoniques), tout en permettant de choisir entre l'utilisation de miARN et de sites de fixation conservés ou non (Enright *et al.*, 2003; John *et al.*, 2004). L'ensemble des miARN combinant une bonne conservation et un bon score miRSVR par l'algorithme miRanda pour le 3'UTR de *MUC1* se sont tous avérés comme étant capable d'inhiber l'expression protéique de *MUC1* (miR-183, miR-200a, miR-29a et miR-330-5p). Seul cet algorithme a permis d'identifier le miR-29a comme ciblant *MUC1* au niveau de son 3'UTR. Effectivement, la séquence d'appariement entre miR-29a et le 3'UTR de *MUC1* correspond à un appariement complémentaire puisqu'il existe un mésappariement dans la séquence *seed* qui est compensé par un appariement au niveau 3' du miARN. Ce type d'appariement, même s'il est rare, fait partie des six meilleurs prédictions retrouvé par l'algorithme miRanda en terme de score miRSVR pour le 3'UTR de *MUC1* (Figure 46).

Enfin, nous avons utilisé la base de données MirWalk qui compare les résultats de plusieurs bases de prédictions et qui contrairement aux deux précédentes, permet de prédire la fixation d'un miARN sur l'ensemble de l'ARNm et non pas seulement sur le 3'UTR classiquement étudié, mais au niveau du 5'UTR et de la région codante (Dweep *et al.*, 2011).

Malgré l'utilisation de plusieurs bases de données il est courant que des miARN prédits ne fonctionnent pas et que des miARN non prédits fonctionnent en fonction du contexte cellulaire/tissulaire. On peut relever par exemple que l'efficacité d'inhibition par les miARN peut être modulée par l'expression de protéines du complexe de terminaison de la transcription et du complexe d'initiation de la traduction. En effet, Walters et collaborateurs ont montré que l'expression de la protéine PABP était inversement corrélée à l'efficacité d'inhibition par les miARN, en influant sur la polyadénylation des ARNm cibles (Walters, Bradrick, & Gromeier, 2010). L'expression de PABP n'a pas été vérifiée dans nos

lignées cellulaires, mais l'évaluation de l'expression de ce type de protéine pourrait être intéressante dans le cas où une inhibition apparaîtrait comme dépendante du type de lignée ou du tissu.

II- Expression des miARN dans le PDAC

De nombreuses études ont permis de définir le miRnome du PDAC, mais en fonction des expériences et méthodes utilisées nous pouvions mettre en évidence une dérégulation de nouveaux miARN qui n'avaient pas pu être mis en évidence précédemment. Nous avons choisi d'utiliser trois modèles de cancérogènes pancréatiques :

- un modèle cellulaire comparant 5 lignées cancéreuses humaines proposant toutes des origines, mutations et propriétés complémentaires que nous comparons à des cellules pancréatiques humaines immortalisées.

- un modèle murin de cancérogénèse pancréatique précoce développant des lésions PanIN de bas et moyen grade.

- une cohorte de 18 patients atteints d'adénocarcinome pancréatique infiltrant.

1- Expression de miR-29a

La famille des miARN miR-29 est composée de trois membres miR-29a/b/c. MiR-29a et miR-29b1 proviennent du même locus situé en 7q32 ; miR-29c et miR-29b2 sont situés en 1q32. Cette famille de miARN est fortement dérégulée dans les pathologies cancéreuses (Y. Wang *et al.*, 2013; Jiang *et al.*, 2014). On retrouve par exemple une diminution de l'expression de miR-29a dans le cancer du poumon (Yanaiharu *et al.*, 2006; Fabbri *et al.*, 2007), dans les ostéosarcomes (Namløs *et al.*, 2012), dans le cancer de la vessie (Wang *et al.*, 2010), dans le cancer du rein métastatique (Heinzelmann *et al.*, 2011), dans le cancer de l'estomac (Gong *et al.*, 2013), dans les carcinomes hépatiques (Xiong *et al.*, 2010) et dans certaines pathologies du système hématopoïétique comme les leucémies (Garzon, Garofalo, *et al.*, 2008; Garzon, Volinia, *et al.*, 2008; Zhao *et al.*, 2010). A l'inverse miR-29a est surexprimé dans les leucémies myéloïdes aiguës et notamment dans les cellules souches (Han *et al.*, 2010). Dans le cancer du sein, miR-29a a été identifié comme sous-exprimé dans la tumeur (Z. Wu *et al.*, 2013) alors qu'il est surexprimé dans le sérum (Wu *et al.*, 2012). Dans le cancer colorectal son expression est également controversée (Ng, Dong, & Yu, 2014). On peut retrouver aussi bien une sous-expression de miR-29a et sa surexpression serait associée

à un meilleur pronostic et une survie sans récurrence plus longue (Kuo *et al.*, 2012; Weissmann-Brenner *et al.*, 2012) ou alors une surexpression dans le sérum (Brunet Vega *et al.*, 2013) ou dans la tumeur qui seraient alors associées à un mauvais pronostic (W. Tang *et al.*, 2014). Une étude a montré une dérégulation de son expression dans le PDAC (Nagano *et al.*, 2013). Cette étude de Nagano et collaborateurs, a montré que le miR-29a était surexprimé dans le PDAC dans les lignées BxPC-3, Panc-1, MiaPaCa-2, et PSN-1 en normalisant leur expression à la lignée cancéreuse tumorigène BxPC-3. Nous avons durant nos travaux mis en évidence une dérégulation de l'expression de miR-29a dans les lignées Capan-2, Capan-1, MiaPaCa-2, Panc-1 et BxPC-3. Contrairement à l'étude de Nagano et collaborateurs, nous avons choisi de rapporter nos expressions par rapport à une lignée pancréatique non tumorale, la lignée HPDE, ce qui peut expliquer cette différence de résultats. Nous avons de plus constaté une légère diminution de son expression dans le modèle murin et surtout dans la cohorte de patients atteints d'adénocarcinome pancréatique. Ces résultats suggèrent que la dérégulation de miR-29a intervient à un stade plus tardif de la maladie. Néanmoins, l'évaluation de son expression dans une cohorte plus importante est nécessaire puisque nous avons observé une augmentation de son expression chez certains patients, sans pouvoir établir de lien avec les données clinico-pathologiques.

La forte dérégulation de l'expression de cette famille de miARN a amené de nombreuses études étudiant les mécanismes de leur régulation transcriptionnelle et post-transcriptionnelle. Le miR-29a/b1 possède son propre promoteur et est régulé par de nombreux facteurs de transcriptions. On peut relever par exemple, que son expression est inhibée par la fixation sur son promoteur des facteurs, c-myc, Hedgehog (Hh) ou encore NF- κ B (Mott *et al.*, 2010). Les facteurs CCAAT/*enhancer-binding protein-1* CEBPA (Eyholzer *et al.*, 2010) et P53 (Ugalde *et al.*, 2011) sont capables d'induire l'expression du miR-29a. A l'inverse un traitement cellulaire par le TGF- β 1/2 inhibe l'expression du miR-29a (Luna *et al.*, 2011; Zhou *et al.*, 2012). Dans le cancer du poumon, l'expression du miR-29a a été retrouvée diminuée dans des lignées déficientes en récepteur EGFR ou en récepteur c-Met, suggérant également que miR-29a pourrait être régulé par ces deux voies de signalisation (Garofalo *et al.*, 2011). Le complexe HDAC-EZH2 (*enhancer of zeste homolog 2*), une histone-lysine N-méthyltransférase, est également recruté au niveau du promoteur de miR-29a suggérant ainsi une régulation épigénétique de miR-29a (Zhang *et al.*, 2012). De plus, un traitement à base d'un agent inhibiteur de la méthylation de l'ADN comme le 5-aza-2'-désoxycytidine (5-aza)

ou un traitement à base de trichostatine A (TSA) qui inhibe les HDAC augmente son expression dans les lignées cancéreuses pancréatiques (Lee *et al.*, 2007). Il serait donc intéressant d'étudier les mécanismes de régulation de miR-29a dans le PDAC afin de comprendre le mécanisme de dérégulation de ce miARN dans cette pathologie. Ces mécanismes pourraient aussi bien faire intervenir les mécanismes de régulation épigénétiques, être sous la dépendance du TGF- β , de NF- κ B, Hh ou des récepteurs EGFR et c-Met car ils sont tous impliqués/surexprimés dans le cancer du pancréas (Morris *et al.*, 2010).

2- Expression de miR-330-5p

Le miR-330-5p se situe sur le chromosome 19q13 dans le premier intron du gène *echinoderm microtubule associated protein like 2 EML2* aussi connu sous le nom d'EMAP. Cette famille de protéine a été identifiée comme favorisant la dynamique des microtubules et favorisant l'attachement des ribosomes aux microtubules (Suprenant *et al.*, 1993; Hamill *et al.*, 1998). Aucune étude n'a spécifiquement pu mettre en évidence une dérégulation de l'expression de ce miARN dans le cancer mais il a été mis en évidence que le miR-330-5p était surexprimé dans des cellules entrant en sénescence, cette dernière étant caractérisée par un arrêt irréversible du cycle cellulaire (Yoo *et al.*, 2014). Il a également été identifié comme exprimé dans les reins et les muscles lisses (Medrano *et al.*, 2011). Nous avons identifié que le miR-330-5p était sous exprimé dans les lignées cancéreuses pancréatiques, légèrement dans le modèle murin de cancer du pancréas et dans la cohorte de patients atteints de PDAC, proposant ainsi que ce miARN est dérégulé dans le cancer du pancréas.

La régulation de l'expression de miR-330-5p n'a pas été étudiée. Celle-ci pourrait être sous le contrôle du promoteur du gène *EML2* comme ce qui est couramment décrit, ou alors être transcrit de manière indépendante comme cela a pu être suggéré pour 35% des miARN situés dans les introns de gène hôte, grâce à l'existence de séquences de régulation en amont dont 30% correspondent à une transcription par la polymérase II et 5% par la polymérase III (Monteys *et al.*, 2010). L'étude de la régulation du miR-330-5p dans PDAC semble donc être une piste d'étude intéressante.

3- Expression de miR-200a

Le miR-200a appartient à la grande famille des miR-200 qui est composée de deux clusters : le cluster miR-200c/miR-141 localisé en 13p13 dont nous avons déjà parlé et le

cluster miR-200a/b/miR-429 localisé en 1p36. En termes de séquence, la séquence *seed* du miR-200a est identique de celle du miR-141. Il a été montré par Li et collaborateurs que lors de la cancérogenèse pancréatique le miARN miR-200a est retrouvé hypométhylé et surexprimé au sein des cellules cancéreuses pancréatiques (Li *et al.*, 2010), mais il est également retrouvé élevé dans le sérum de patients atteints de pancréatite chronique ou de PDAC (Yu *et al.*, 2012). Nous avons dans notre profil d'expression retrouvé une diminution de l'expression de miR-200a dans les lignées MiaPaCa-2 et Panc-1 et une augmentation dans les lignées Capan-2, Capan-1 et BxPC-3 ce qui corrèle avec le profil mis en évidence dans l'étude de Soubani et collaborateurs (Soubani *et al.*, 2012). De plus, un traitement par le 5-aza entraîne une augmentation de l'expression de miR-200a dans les lignées MiaPaCa-2 et Panc-1 (Li *et al.*, 2010). En revanche, nous avons constaté une diminution de son expression chez 8 patients atteints de PDAC ce qui ne corrèle pas avec les données de cet article. L'établissement d'une cohorte bien plus importante est absolument nécessaire afin d'évaluer correctement le profil d'expression de ce miARN chez les patients. De plus contrairement à ces articles nous n'avons pas réalisé de microdissection laser des lésions cancéreuses mais une macrodissection locale couplée à un contrôle morphologique anatomopathologique, ce qui peut expliquer ces résultats différents.

Le PDAC n'est pas le seul à être caractérisé par une dérégulation de l'expression de ce miARN. Dans le cancer du sein, il a été montré que l'expression du miR-200a était diminuée dans l'étude de Yao et collaborateurs (Yao *et al.*, 2014) alors que l'étude de Madhavan et collaborateurs a identifié une surexpression de miR-200a dans les cellules tumorales circulantes de patientes atteintes de cancer du sein métastatique (Madhavan *et al.*, 2012). Dans le cancer de l'œsophage il a également été mis en évidence une surexpression de ce miARN (Liu *et al.*, 2013) ainsi que dans le cancer de l'ovaire (Ying Chen, Zhang, & Hao, 2013) et du poumon (Pacurari *et al.*, 2013). A l'inverse on retrouve une sous-expression de ce miARN dans le cancer du rein, le cancer gastrique, et dans le carcinome hépatocellulaire (Cong *et al.*, 2013; Yoshino *et al.*, 2013; Dhayat *et al.*, 2014).

Le miR-200a est régulé par des facteurs de transcriptions dont les plus connus sont Zeb1/2 (Wellner *et al.*, 2009; Feng *et al.*, 2014), mais également grâce à l'association du facteur Zeb1 avec MUC1-C (Mohr *et al.*, 2013; Rajabi *et al.*, 2013). Son expression est également régulée par épigénétique par méthylation de son promoteur et notamment par la triméthylation

de la lysine 27 de l'histone H3 (Vrba *et al.*, 2011; Davalos *et al.*, 2012). Enfin, un traitement cellulaire par le TGF- β inhibe l'expression du miR-200a dans la fibrose rénale. On peut alors proposer que dans le PDAC l'expression de miR-200a pourrait, en plus d'être régulé par le complexe Zeb/MUC1-C être sous la dépendance du TGF- β et des mécanismes épigénétiques.

4- Expression de miR-183

Le miR-183 est localisé sur le chromosome 7q32 et fait partie d'une famille de trois miARN homologues miR-183, miR-182 et miR-96 exprimés à partir du même locus. Le miR-183 est décrit comme dérégulé dans plusieurs cancers (Q.-H. Zhang *et al.*, 2013). Une diminution de son expression dans les lignées cellulaires cancéreuses pancréatiques et dans le PDAC a pu être mise en évidence et la diminution de son expression dans le PDAC est associée à une diminution de la survie des patients par rapport à ceux ayant une forte expression du miR-183 (L. Zhou *et al.*, 2014). Dans notre étude nous avons mis en évidence une diminution de son expression dans la lignée Panc-1 et Capan-1, ainsi que dans une petite cohorte de 8 patients ce qui est en accord avec les données précédentes. De façon intéressante, ce miARN est surexprimé dans la lignée BxPC-3, seule lignée non mutée pour Kras et il est diminué dans le pancréas des souris Kras^{G12D} développant des lésions PanIN ce qui pourrait suggérer une dérégulation précoce de ce miARN dans le PDAC. Dans le cancer du sein, il a été mis en évidence une dérégulation de son expression, avec une sous-expression dans les cancers du sein récepteurs aux œstrogènes et à la progestérone (ER-PR) positifs par rapport aux négatifs et une surexpression dans les cancers du sein Her2/neu positifs dont l'expression corrèle avec l'expression du récepteur Her2/neu (Lowery *et al.*, 2010). Il est également surexprimé dans le cancer du rein, le cancer de l'estomac et le cancer colorectal (Bandrés *et al.*, 2006; Ren *et al.*, 2014; Qiu *et al.*, 2014).

La régulation de l'expression de cette famille de miARN se ferait d'une part par la fixation répressive de Zeb-1 au niveau de son promoteur (Li *et al.*, 2014) mais également par la fixation activatrice de la β -caténine/TCF/LEF-1 qui est réprimée par la GSK3- β (X. Tang *et al.*, 2014). Une régulation épigénétique par méthylation de son promoteur disposant de nombreux îlots CpG a également été rapporté dans le PDAC (Li *et al.*, 2010).

5- Expression de miR-876-3p

Le miR-876 se situe au niveau du chromosome 9p21. L'expression du miR-876-3p a été retrouvée diminuée dans les cancers papillaires de la thyroïde (Huang *et al.*, 2013). Le profil d'expression que nous avons obtenu dans les lignées cellulaires montre une sous-expression de ce miARN dans les lignées MiaPaCa-2 et Panc-1, alors que nos résultats sur le modèle murin ou les tissus de patients nous suggèrent plutôt une expression présente ou absente chez le patient plutôt qu'une dérégulation. Cette présence/absence pourrait avoir un lien avec la réponse au traitement chimiothérapeutique ou servir de marqueur ce qui sera discuté dans la partie chimiorésistance. De ce fait il serait intéressant d'évaluer sur une cohorte plus importante la présence ou l'absence d'expression de ce miARN chez les patients. De plus, la régulation de l'expression de ce miARN est inconnue, et aucun îlot CpG ne se situe à proximité excluant la possibilité d'une régulation par méthylation.

6- Expression de miR-939

Le miR-939 se situe en 8q34 dans le 7e intron du gène *Cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 1* (CPSF1). Les facteurs CPSF interagissent avec le spliceosome et sont nécessaires pour l'épissage des introns, dans la maturation des ARNm et la polyadénylation (McCracken *et al.*, 1997; Rozenblatt-Rosen *et al.*, 2009; Evsyukova *et al.*, 2013). Il a été identifié que l'expression du miR-939 pouvait être altérée dans le cancer du poumon. MiR-939 a été identifié comme l'un des miARN les plus surexprimés dans le sérum de patients atteints d'adénocarcinome pulmonaire (Rani *et al.*, 2013). A l'opposé, son expression dans les tumeurs solides pulmonaires a été retrouvée diminuée lors de cancers liés à une exposition à l'amiante (Nymark *et al.*, 2011). De façon intéressante, il a été montré que le facteur CPSF4 pouvait être dérégulé dans le cancer du poumon (W. Chen *et al.*, 2013). Nous avons constaté une dérégulation de l'expression de ce miARN dans le modèle murin de cancérogenèse pancréatique et une diminution dans 8 tissus de patients atteints de PDAC. Nous n'avons vu aucune dérégulation dans les lignées cellulaires. Il serait intéressant d'évaluer son expression dans des cohortes murines et humaines plus importantes au vu de nos premiers résultats intéressants. De plus, la régulation de l'expression de ce miARN est encore inconnue. Plusieurs îlots CpG se trouvent à proximité de la région codant pour ce miARN suggérant une possible régulation par méthylation.

7- Expression de miR-203

Le miR-203 se situe en 14q32. Il a été mis en évidence que le miR-203 était surexprimé dans le PDAC, dans les lignées cellulaires pancréatiques Capan1, Capan-2 et BxPC-3, mais également dans les lignées de cancer du côlon, de cancer de l'estomac, de cancer du sein, et il a été proposé comme nouveau marqueur pronostic (Ikenaga *et al.*, 2010). De plus la surexpression de miR-203 y a été associée à une diminution de la survie cellulaire. Nous avons comme Ikenaga et collaborateurs observé une surexpression de ce miARN dans ces lignées cellulaires mais nous avons observé en plus une diminution dans les lignées MiaPaCa-2 et Panc-1. En revanche, nous n'avons pas observé de dérégulation chez les patients mais notre cohorte est bien plus petite que celle comptant 115 patients d'Ikenaga et collaborateurs (Ikenaga *et al.*, 2010). Dans la littérature, on retrouve d'une part une sous-expression du miR-203 dans les pathologies cancéreuses comme le cancer de l'œsophage (Zhang *et al.*, 2014), le cancer du poumon (C. Wang *et al.*, 2013; N. Wang *et al.*, 2014), dans le cancer de la prostate (Siu *et al.*, 2014). Son expression est augmentée dans le sérum de patients atteints de cancer colorectal (J. Wang *et al.*, 2014), dans le cancer ovarien (S. Wang *et al.*, 2013) et dans le cancer du sein métastatique (Madhavan *et al.*, 2012).

L'expression de ce miARN est régulé par méthylation de son promoteur contenant de nombreux îlots CpG (Taube *et al.*, 2013; Huang *et al.*, 2014). Son expression est inhibée par le facteur de transcription SNAI2 mais favorisée par le facteur de transcription E2F1 (Zhang *et al.*, 2014). Son expression est inhibée suite à un traitement par le TGF- (Ding *et al.*, 2013). Il semblerait également que son expression soit dépendante de la voie du récepteur c-Met puisque des lignées pulmonaires déficientes en c-Met surexpriment le miR-203 (Garofalo *et al.*, 2011).

II- Etude de la régulation de MUC1 et des fonctions des miARN dans le PDAC

1- Sites de fixation

Nous avons mis en évidence que miR-29a et miR-330-5p inhibent directement l'expression de la mucine MUC1 en interagissant avec son 3'UTR. Nous avons mis en évidence que seul un des deux sites de fixation pour le miR-330-5p était fonctionnel dans nos modèles d'études. Nous avons identifié par ailleurs des sites de fixation dans la région codante pour miR-29a et miR-330-5p. Mais il nous reste encore à tester ces sites qui représentent un réel intérêt puisqu'il a été montré que les mucines membranaires MUC4 et

MUC16 sont régulées par le miR-200c au niveau de leur région codante dans le PDAC (Radhakrishnan *et al.*, 2013).

Dans un second temps, nous avons mis en évidence le complexe miARN-MUC1 en utilisant la technique développée par Ørom et collaborateurs et repris par Lal et collaborateurs en utilisant des miARN biotinylés (Ørom & Lund, 2007; Lal *et al.*, 2011). Cette technique permet simplement de mettre en évidence un enrichissement en ARNm cible et reste relativement controversée dû au rendement très faible obtenu et au manque de spécificité impacté à la biotine et ne peut constituer à elle seule une preuve de l'interaction miARN-ARNm (Martinez-Sanchez & Murphy, 2013). L'avantage majeur de cette technique est sa simplicité de réalisation en comparaison aux autres techniques disponibles aujourd'hui comme le HITS-CLIP (*High-throughput sequencing of RNAs isolated by Crosslinking and Immunoprecipitation*), (Licatalosi *et al.*, 2008; Chi *et al.*, 2009) ou encore le PAR-CLIP (*Photoactivatable-Ribonucleoside-Enhanced Crosslinking and Immunoprecipitation*) (Hafner *et al.*, 2012). Ces techniques reposent sur l'immunoprécipitation des complexes miRISC en ciblant par exemple la protéine Ago2. Les méthodes de CLIP permettent d'identifier les sites de fixation des miARN au niveau de l'ARNm grâce au séquençage précis qu'il est possible de réaliser ensuite. Elles ont notamment pu mettre en évidence que 25% des miARN se fixent au niveau des séquences codantes des ARNm, moins de 1% au niveau du 5'UTR et la majorité restante au niveau du 3'UTR. Ces résultats confirment encore l'importance d'étudier la fonctionnalité des sites de fixation identifiés dans la région codante de *MUC1*. Enfin, ces méthodes ont permis de mettre en évidence un nombre non négligeable d'interactions indépendamment de l'existence d'une séquence *seed* de fixation entre le miARN et sa cible suggérant comme il a été ensuite démontré des régulations alternatives (Chi, Hannon, & Darnell, 2012).

2- Fonctions de miR-29a

De nombreuses cibles ont déjà été identifiées pour la famille des miR-29. Nous avons montré que l'inhibition de MUC1 par miR-29a entraîne une diminution de l'expression de P-p42-44 MAPK, de la cycline D1 et de la β -caténine. Nous avons constaté une diminution de la prolifération plus importante avec le miR-29a que par le miR-330-5p. De manière additionnelle nous avons identifié deux cibles déjà connues de miR-29a qui sont CDK6 et Bcl-2, ce qui pourrait expliquer cette différence (Xiong *et al.*, 2010; Zhao *et al.*, 2010).

La surexpression de miR-29a a un effet modeste sur l'invasion cellulaire. Ceci peut provenir de l'inhibition de CDK6 par miR-29a puisque la diminution de l'expression de CDK6 est liée à une augmentation de l'invasion cellulaire dans certaines lignées cancéreuses pancréatiques (Liu & Korc, 2012). Mais cela peut provenir également d'autres propriétés de miR-29a du fait du contexte tissulaire/cellulaire. Il a par exemple été mis en évidence dans le cancer colorectal que le miR-29a peut augmenter l'invasion cellulaire par l'induction de l'expression de la métalloprotéase matricielle MMP2 et l'inhibition de la E-cadhérine en inhibant l'expression du facteur de transcription KLF4 important pour la différenciation cellulaire des cellules caliciformes (W. Tang *et al.*, 2014). A l'inverse miR-29a diminue l'invasion cellulaire dans le cancer de l'estomac, du poumon et du pancréas (Muniyappa *et al.*, 2009; Gong *et al.*, 2013). De plus, miR-29a inhibe, dans le PDAC, la protéine oncogénique d'adhésion cellulaire *carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 6* CEACAM6 qui permet quant à elle d'augmenter l'invasion cellulaire et les propriétés métastatiques des cellules cancéreuses pancréatiques (Duxbury *et al.*, 2005; J. Chen *et al.*, 2013). Il serait donc opportun d'étudier l'expression de ce marqueur dans nos modèles cellulaires et d'étudier si miR-29a peut inhiber l'expression de CEACAM6 et de MMP2 pour vérifier son rôle dans l'invasion cellulaire. Enfin il a été mis en évidence que miR-29a interagit avec la voie Wnt/ -caténine, en diminuant l'expression de la -caténine, comme nous l'avons mis en évidence, afin de ralentir la prolifération et la migration cellulaire, et dans un second temps de favoriser l'expression de *Wnt inhibitory factor 1* (WIF-1) un inhibiteur sécrété de la voie Wnt/ -caténine, grâce à l'inhibition de Dnmt3a/3b dans le cancer du poumon (Tan, Wu, & Cai, 2013b). A l'inverse, dans l'étude de Nagano et collaborateurs, le miR-29a semble augmenter l'activité de la voie Wnt/ -caténine dans le PDAC (Nagano *et al.*, 2013). Lors de l'inhibition de miR-29a nous avons pu mettre en évidence une augmentation de la migration cellulaire et de l'invasion cellulaire dans la lignée Capan-1 mais nous n'avons pas constaté d'effet sur la prolifération cellulaire. Il serait opportun d'étudier la voie Wnt/ -caténine dans ces modèles cellulaires afin de comparer ces résultats avec ceux de Nagano et collaborateurs.

3- Fonctions de miR-330-5p

L'inhibition de MUC1 par miR-330-5p entraîne une diminution de la prolifération et de la croissance tumorale, et permet de diminuer l'expression de P-p42-44 MAPK, de Stat-3, de la cycline D1 et de la -caténine Une des cibles connue de miR-330-5p est la tyrosinase TYR

responsable des premières étapes de production de la mélanine. Son inhibition entraîne une dépigmentation dans le mélanome sans affecter la prolifération, la migration ou la survie cellulaire (Rambow *et al.*, 2014). Une seconde étude a montré que le miR-330-5p inhibe la protéine smootheline (Smtn) dans les muscles lisses où cette protéine s'associe avec les fibres et le cytosquelette (Medrano *et al.*, 2011). Enfin une étude dans le cancer colorectal a permis de montrer que la surexpression de miR-330-5p permet de ralentir la prolifération cellulaire, la croissance tumorale et de diminuer l'expression de P-Akt, de la cycline D1 et d'inhiber directement la protéine *Cell division control protein 42* Cdc42 (Li *et al.*, 2013). Ces données corrélient avec les propriétés que nous avons observées dans les lignées cancéreuses pancréatiques.

4- Fonctions de miR-200a

Nous avons montré que dans les lignées cancéreuses pancréatiques, miR-200a inhibe l'expression de MUC1 mais n'influe pas sur la prolifération cellulaire, alors qu'il ralentit légèrement la migration cellulaire. Il a été montré que miR-200a était capable d'inhiber l'expression de la β -caténine et de diminuer ainsi la migration, l'invasion et la prolifération cellulaire dans les cellules cancéreuses de l'estomac (Su *et al.*, 2012). Dans le cancer du sein, il a été montré que miR-200a pouvait réguler *Kelch-like ECH-associated protein 1* (Keap-1) et ainsi favoriser l'expression de *Nuclear factor (erythroid-derived 2)-like 2* Nrf2 qui régule l'expression de protéines anti-oxydantes afin de protéger contre le stress et les dommages oxydatifs déclenchés par les blessures ou l'inflammation (Eades, Yang, *et al.*, 2011). Le miR-200a peut inhiber la prolifération cellulaire en ciblant le facteur de transcription mitochondrial A (Yao *et al.*, 2014) ou enfin inhiber la croissance cellulaire et la migration en inhibant l'expression de la sirtuine 1 (Sirt1) une protéine désacétylase nicotinamide adénine dinucléotide (NAD⁺) dépendante dans le cancer du sein (Eades, Yao, *et al.*, 2011). A l'inverse dans le cancer du poumon il a été mis en évidence que la surexpression de miR-200a favorise la migration et l'invasion cellulaire en favorisant l'expression de la tétraspanine 1 (TSPAN-1), une protéine exprimée à la surface des cellules et pouvant favoriser la croissance et la motilité (Yaqing Chen *et al.*, 2013). Il a également été prouvé que miR-200a pouvait inhiber l'expression de *Smad interacting protein 1* (Sip1), Zeb1 et Zeb2, afin d'inhiber la TEM (Park *et al.*, 2008; Gregory, Bert, *et al.*, 2008; Korpala *et al.*, 2008; Bracken *et al.*, 2008). L'inhibition de MUC1 par miR-200a va donc dans le même sens puisque nous avons expliqué en introduction le rôle de MUC1 dans la TEM. De plus, au vu de l'inhibition

indirecte de MUC1 par ce miARN il serait intéressant de réévaluer cette interaction dans d'autres organes, afin de déterminer si celle-ci peut se faire dans un autre contexte tissulaire.

5- Fonctions de miR-183

Plusieurs cibles du miR-183 ont été identifiées dans la littérature et il lui a été proposé à la fois un rôle oncogénique et un rôle de suppresseur de tumeur lui conférant des fonctions spécifiques du type tissulaire et cellulaire. Dans un premier temps, miR-183 possède un rôle de suppresseur de tumeur, il est capable par exemple de réguler la protéine EZRIN un membre de la famille des protéines *Moesin-Ezrin-Radixin-Like protein* (MERLIN) qui contrôle le cytosquelette d'actine, l'adhésion et la mobilité cellulaire dans des cellules cancéreuses pulmonaires (Wang, Mao, & Zheng, 2008). La surexpression du miR-183 dans ces cellules entraîne un ralentissement de la migration cellulaire. Dans les cellules cancéreuses mammaires, la surexpression du miR-183 entraîne une inhibition de la migration cellulaire (Lowery *et al.*, 2010). Les données obtenues lors de ce travail ont permis de montrer que miR-183 avait la capacité d'inhiber l'expression protéique de MUC1 et de diminuer la migration cellulaire par un test de blessure. Son rôle dans les propriétés de migration et d'invasion cellulaire en chambre de Boyden reste encore à évaluer. Plus récemment, il a été décrit que miR-183 pouvait inhiber l'expression de Bmi-1 et de ralentir la croissance cellulaire en diminuant l'expression de la cycline D1, de CDK4 et de CDK6 dans le PDAC (L. Zhou *et al.*, 2014). De plus, une corrélation inverse entre l'expression de miR-183 et Bmi-1 a pu être mise en évidence. Dans le cancer de l'estomac l'inhibition de Bmi-1 par miR-183 a en plus été associée à un ralentissement de l'invasion cellulaire (Xu *et al.*, 2014). Il est intéressant de rappeler que MUC1 est un co-activateur de la transcription de la cycline D1 et qu'il est courant de retrouver une diminution de l'expression de cette cycline lors de la perte d'expression de MUC1. Néanmoins nous n'avons évalué l'effet de miR-183 que sur une lignée cellulaire, ces données sont donc encourageantes dans le but d'étudier le rôle de miR-183 dans le PDAC. Enfin et comme pour miR-200a, nous avons montré que miR-183 est impliqué dans la TEM (Wellner *et al.*, 2009), l'inhibition de MUC1 ne fait alors que favoriser son rôle comme inhibiteur de la TEM.

A l'inverse, plusieurs rôles pro-oncogéniques lui ont été attribués. Ce miARN est par exemple capable d'inhiber spécifiquement le facteur de transcription *Early Growth Response protein-1* (EGR1) dans des lignées issues de sarcome (Sarver, Li, & Subramanian, 2010). La

surexpression du miR-183 dans ces lignées est également corrélée à une variation d'expression de MUC1 et à une augmentation de la migration des cellules. Dans le cancer de l'œsophage il a été montré que ce miARN inhibe l'expression de la protéine *programmed cell death 4* (PDCD4) et augmente la prolifération et l'invasion cellulaire (Ren *et al.*, 2014). Dans le cancer du rein, la surexpression du miR-183 entraîne une augmentation de la prolifération, de la migration et de l'invasion cellulaires en ciblant la phosphatase 2A (Qiu *et al.*, 2014).

6- Fonctions de miR-876-3p

Aucune cible n'est connue pour le miR-876-3p et aucun rôle ne lui a encore été identifié. Nous avons mis en évidence que sa surexpression permet de ralentir la croissance cellulaire *in vitro* et d'inhiber l'expression protéique de MUC1, ainsi que l'expression de la cycline D1, de l'EGFR et de la phosphorylation d'Akt. Nous n'avons pas pu mettre en évidence de régulation directe de la *cycline D1* ou de *MUC1* par ce miARN en testant sa fixation sur leur 3'UTR et il est donc opportun de poursuivre la recherche de cibles de ce miARN afin de mieux comprendre son rôle dans la cancérogenèse et notamment dans le PDAC.

7- Fonctions de miR-939

Une seule cible du miR-939 a été identifiée pour le moment, il s'agit du *human inducible nitric oxide synthase* (hiNOS) dans les hépatocytes primaires humains (Guo *et al.*, 2012). L'expression de hiNOS est induite préférentiellement dans un contexte inflammatoire suite à une exposition au lipopolysaccharide (LPS) ou aux cytokines ce qui va permettre la synthèse d'un neurotransmetteur le monoxyde d'azote ou oxyde nitrique (NO) (Bogdan, 2001; Hussain, Hofseth, & Harris, 2003). Le rôle de ces radicaux libres est complexe dans les pathologies cancéreuses et dépend de la concentration à laquelle ils sont retrouvés. A faible concentration le NO favoriserait la croissance tumorale alors qu'à forte concentration il jouerait un rôle inhibiteur (Bogdan, 2001; Hussain *et al.*, 2003). De façon intéressante il a été montré que l'expression de hiNOS était dépendante du facteur de transcription NF- κ B et de la voie Wnt/ β -caténine en fonction du contexte tissulaire. L'interaction de la β -caténine avec NF- κ B dans le cancer du côlon et du sein inhibe l'expression de hiNOS par exemple (Du *et al.*, 2009). De plus, une corrélation inverse de son expression a été montrée avec la β -caténine et NF- κ B. Nous avons montré dans notre étude que la surexpression de miR-939 inhibe de façon indirecte l'expression de la mucine MUC1. MUC1 favorise l'expression des

gènes de la voie Wnt/ -caténine (Huang *et al.*, 2003) et il serait propice de déterminer son rôle dans l'expression du NO et d'en évaluer l'impact dans la cancérogenèse.

8- Fonctions de miR-203

Le miR-203 est considéré comme un miARN suppresseur de tumeur. MiR-203 a la capacité d'inhiber l'expression de Bmi-1 dans le cancer de l'œsophage et du sein et de ralentir la prolifération et le renouvellement cellulaire (Taube *et al.*, 2013; Huang *et al.*, 2014). Il inhibe également la protéine kinase C-alpha (PKC-) et Src dans le cancer du poumon afin de ralentir la prolifération, la migration cellulaire et d'augmenter la mort cellulaire (C. Wang *et al.*, 2013; N. Wang *et al.*, 2014). Dans le PDAC le miR-203 inhibe la cavéoline-1 une protéine transmembranaire contenue dans les radeaux lipidiques et sa surexpression diminue la prolifération, la migration et l'invasion cellulaire (Miao *et al.*, 2014). Nous n'avons pas constaté d'effet sur la prolifération cellulaire suite à la surexpression ou l'inhibition de ce miARN malgré les modifications d'expression de la mucine MUC1 et de l'EGFR. Néanmoins nous n'avons pas évalué son effet sur la migration et l'invasion cellulaire, la survie et la mort cellulaire, ce qui n'exclut donc pas un rôle de ce miARN lié ou non à MUC1.

III- Rôle des miARN dans la chimiorésistance

Nous avons mis en évidence que miR-29a et miR-330-5p inhibaient l'expression protéique de MUC1 et agissaient comme des suppresseurs de tumeurs. Nous avons alors voulu déterminer si l'inhibition de MUC1 par miR-29a et miR-330-5p pouvait être impliquée dans les mécanismes de chimiorésistance puisqu'il a été montré que la surexpression de MUC1 entraîne une résistance à la gemcitabine (Nath *et al.*, 2013), favorise le processus de TEM (Roy *et al.*, 2011), et inhibe l'expression des miARN impliqués dans la TEM (Mohr *et al.*, 2013) dans les cellules cancéreuses pancréatiques. Nous avons montré que la surexpression de miR-29a et miR-330-5p sensibilisent les cellules cancéreuses pancréatiques à la gemcitabine mais pas aux drogues utilisées dans le protocole FOLFIRINOX (Conroy *et al.*, 2011).

1- Implication de miR-29a

Il a été montré que la surexpression de miR-29a permet d'augmenter l'expression de P53 est d'induire une mort cellulaire dépendante de P53 en inhibant l'expression de p85a et cdc42 (S.-Y. Park *et al.*, 2009). De plus miR-29a inhibe l'expression de Bcl-2 et de *myeloid cell leukemia 1* Mcl-1, et favorise l'expression de BIM (BCL2L11) et *tumor suppressor*

programmed cell death-4 (PDCD4) augmentant encore son implication dans la mort cellulaire (Xiong *et al.*, 2010). Nous avons observé une diminution de Bcl-2 et une augmentation de la phosphorylation de P53 lors de la surexpression stable de miR-29a. Il serait alors intéressant de vérifier si un traitement par la gemcitabine permet toujours de maintenir son rôle dans la mort cellulaire ou si celle-ci pourrait être due à la surexpression de miR-876-3p ou l'inhibition de miR-203 dont le rôle dans la mort cellulaire n'a pas été exploré.

Il a été montré que miR-29a pouvait inhiber l'expression des Dnmt3a/3b qui sont fréquemment surexprimées dans les cancers. Cette inhibition permet par exemple de surexprimer indirectement des gènes suppresseurs de tumeurs comme PTEN et *WW domain-containing oxidoreductase* (WWOX) dans le cancer du poumon (Fabbri *et al.*, 2007). Il a alors été suggéré qu'une forte expression de miR-29a induit une hypométhylation globale des gènes et en conséquence une réexpression de gènes suppresseurs de tumeurs. Nous avons observé hors traitement chimiothérapeutique une forte altération de l'expression des miARN et notamment de ceux régulé par méthylation dans le PDAC comme miR-200a, miR-203 et miR-183 dans les lignées stables surexprimant miR-29a et miR-330-5p. Ceci pourrait alors être une conséquence de l'inhibition des Dnmt3a/3b par miR-29a, ce qui favoriserait alors une surexpression de ces miARN pouvant être régulés par méthylation. Au vu des différentes caractéristiques des lignées pancréatiques et du fait que nous avons visualisé chez peu de patients une surexpression de miR-29a, il semble tout à fait envisageable qu'en fonction du contexte individuel ou cellulaire et du taux d'expression de miR-29a, une dualité fonctionnelle existe puisque les patients surexprimant miR-29a surexpriment également MUC1. De façon intéressante cette dualité a déjà été proposée concernant le rôle de miR-29a dans la TEM. On peut retrouver d'une part un rôle pro-TEM de miR-29a et pro-métastatique comme dans le cancer du sein lorsqu'il inhibe la tristétraprolone (TTP) (Gebeshuber, Zatloukal, & Martinez, 2009) ou en surexprimant les protéines de la MEC comme MMP2 dans le cancer colorectal (W. Tang *et al.*, 2014). D'autre part on observe un rôle anti-TEM de miR-29a où il a été montré qu'il inhibe l'expression du collagène I et IV (Kwiecinski *et al.*, 2011; Ramdas *et al.*, 2013) et l'expression des protéines ADAM12 et 19 qui sont fortement associées au processus d'invasion cellulaire et de métastases (Li *et al.*, 2011). Ce double rôle pourrait exister simultanément dans le PDAC caractérisé comme nous l'avons expliqué comme étant un cancer hétérogène, invasif et chimiorésistant. Enfin, il a été montré que miR-29a régule la voie du TGF- (Winbanks *et al.*, 2011; Luna *et al.*, 2011). Il est effectivement décrit que le TGF- favorise l'induction de la TEM (Derynck, Akhurst, & Balmain, 2001),

et les études de Winkanks et Luna et collaborateurs montrent que miR-29a inhibe le TGF- β 1/2 ainsi que la signalisation du TGF- β probablement par l'inhibition de Smad3. De plus, il existe une corrélation inverse entre l'expression du TGF- β et de miR-29a. Ce mécanisme est intéressant puisqu'il suggère que le miR-29a pourrait avoir un rôle dépendant de la voie du TGF- β . Il serait donc intéressant d'étudier le rôle de ce miARN suite à des traitements par le TGF- β . Nos résultats concernant l'implication de la TEM et de miR-29a dans la chimiosensibilité à la gemcitabine ne nous permettent pas encore de conclure quant à son implication dans ce mécanisme.

Il est déjà proposé que le miR-29a soit impliqué dans la chimiorésistance. Son inhibition est par exemple corrélée à une augmentation de la résistance au cisplatine dans le cancer de l'ovaire (Yu *et al.*, 2014). Dans le cancer du sein, sa surexpression entraîne une résistance à l'adriamycine et au docétaxel et entraîne également une inhibition de l'expression de la protéine PTEN (Zhong *et al.*, 2013). Dans le PDAC son inhibition dans les lignées MiaPaCa-2 et PSN-1 sensibilise les cellules à la gemcitabine alors que sa surexpression dans les lignées BxPC-3 et Panc-1 entraîne une résistance à la gemcitabine (Nagano *et al.*, 2013). Nous avons montré que la surexpression stable de miR-29a dans la lignée MiaPaCa-2 sensibilise les cellules à la gemcitabine ainsi que sa surexpression transitoire dans la lignée Capan-2. Ce résultat suggère alors que la sensibilité ne proviendrait pas du modèle cellulaire stable mais nous devons vérifier l'ensemble des combinaisons surexpression/inhibition de miR-29a dans les 5 lignées cancéreuses pancréatiques disponibles au laboratoire afin de statuer quant au rôle de miR-29a dans la résistance à la gemcitabine. De plus, nous avons montré que la surexpression de miR-29a permet de diminuer la phosphorylation d'Akt tout comme l'inhibition de MUC1. L'implication de MUC1 dans la chimiorésistance des cellules de PDAC peut être dépendante ou indépendante d'Akt et favorise l'expression du canal détoxifiant MRP1 (Nath *et al.*, 2013). De plus, il est décrit que miR-29a est un inhibiteur de l'expression d'Akt3 (Wei *et al.*, 2013). Nous avons utilisé un anticorps Pan Akt et n'avons donc pas regardé spécifiquement si miR-29a pouvait inhiber l'expression d'Akt3. Nous pouvons alors suggérer que la sensibilité à la gemcitabine passerait par la diminution de l'activité de la voie Akt dans notre modèle cellulaire, mais n'entraînerait pas de dérégulation de l'expression de MRP1 qui n'est pas exprimé dans ce modèle mais pourrait faire intervenir d'autres acteurs du métabolisme de la gemcitabine comme la surexpression de la dCK, de hENT1 ou encore l'inhibition du canal MRP5.

2- Implication de miR-330-5p

Nous avons montré que la surexpression de miR-330-5p sensibilise les cellules à la gemcitabine. Il a été identifié que la surexpression du miR-330-3p permet d'inhiber l'expression de la dCK (Hodzic *et al.*, 2011). De plus, une forte expression de miR-330-3p entraîne une résistance à la gemcitabine alors qu'une faible expression est en faveur d'une sensibilité. Nous n'avons pas évalué l'expression du miR-330-3p dans nos modèles, mais nous avons observé une augmentation de l'expression de la dCK ce qui est en faveur d'une sensibilité à la gemcitabine comme nous l'avons identifié. De plus, il n'existe aucun site de fixation sur le 3'UTR de la dCK pour le miR-330-5p. La sensibilité observée pour miR-330-5p pourrait aussi bien faire intervenir le métabolisme de la gemcitabine et la surexpression de hENT1 et de la dCK ou alors les acteurs de la TEM.

3- Implication de miR-876-3p

Chez un faible nombre de patients nous avons observé une augmentation de l'expression de miR-29a et miR-330-5p. De même, nous avons observé une expression ponctuelle du miR-876-3p qui ne semble s'exprimer que chez 3 patients sur les 8 testés. Ce phénomène est particulièrement intéressant, puisque parmi ces 3 patients 2 surexpriment également miR-29a et miR-330-5p. Il serait envisageable de suggérer que cette surexpression ponctuelle pourrait servir de marqueur prédictif/pronostic si nous pouvions établir un lien entre la surexpression et la sensibilité à la gemcitabine. Nous avons observé que la surexpression de miR-29a/miR-330-5p couplé à la surexpression de miR-876-3p sensibilise de façon plus importante les cellules à la gemcitabine que lors de la surexpression de miR-29a ou miR-330-5p seulement, ce qui est alors en faveur de cette hypothèse. De plus, le miR-876-3p est capable seul de ralentir la prolifération cellulaire et de diminuer la phosphorylation d'Akt et de la cycline D1 ce qui est en accord avec ce que nous observons pour miR-29a et miR-330-5p. Il est alors possible que la sensibilité à la gemcitabine passe par la surexpression du miR-876-3p qui en combinaison avec miR-29a ou miR-330-5p inhiberait l'activité de MUC1, Akt et de la cycline D1 afin de ralentir la prolifération cellulaire et d'agir soit sur le métabolisme de la gemcitabine soit sur la TEM. Il serait intéressant d'étudier la combinaison de ces trois miARN, sur les propriétés biologiques des cellules cancéreuses pancréatiques.

4- Implication de miR-203

La surexpression de miR-203 a été identifiée dans les lignées résistantes à la gemcitabine dans le cancer du poumon, conjointement à une activation de la voie Wnt/ β -caténine et à la surexpression de MUC1 (H.-H. Zhang *et al.*, 2013). De façon intéressante nous avons identifié que miR-203 surexprime indirectement MUC1, et que la surexpression de miR-203 seule augmente la résistance à la gemcitabine mais que son inhibition seule ne la modifie pas. L'absence de surexpression de miR-203 semble donc importante pour observer une sensibilité mais son inhibition ne semble pas indispensable. De plus, nous avons pu mettre en évidence des sites de fixations potentielles sur le 3'UTR de la dCK (Tableau 5 p183) à la fois pour miR-203 et pour miR-200a. Nous pouvons émettre l'hypothèse que la surexpression de la dCK que nous observons après un traitement par la gemcitabine permettrait d'augmenter la sensibilité des cellules grâce à la perte d'expression de miR-203 et/ou de miR-200a entraînant ainsi une perte de contrôle repressif. De plus il a déjà été montré que le miR-203 est impliqué dans la chimiorésistance. Sa surexpression dans le cancer colorectal induit une résistance à l'oxaliplatine par l'inhibition de la kinase *Ataxia telangiectasia mutated* (ATM) permettant d'activer par exemple P53 lors de dommages à l'ADN (Y. Zhou *et al.*, 2014). A l'inverse, dans le cancer du sein sa surexpression permet d'inhiber l'expression de Bmi-1 et de sensibiliser les cellules au 5-Fu (Yin *et al.*, 2013). Nous n'avons pas étudié l'expression de ce miARN après un traitement par le 5-Fu ou par l'oxaliplatine mais nous observons une augmentation de l'expression du miR-203 dans les lignées surexprimant miR-29a ou miR-330-5p. Cette surexpression pourrait avoir un lien avec les résultats obtenus avec les drogues du protocole FOLFIRINOX où aucunes modifications de la sensibilité n'avaient pu être observées. Néanmoins nous n'avons pas encore établi si miR-203 pourrait avoir un rôle dans la survie ou la mort cellulaire. Il a également été montré que la surexpression de miR-203 favorise l'expression de marqueurs épithéliaux comme Zo-1 et la β -caténine et à l'inverse diminue l'expression de marqueurs mésenchymateux comme la vimentine, la fibronectine et Zeb-1 dans la lignée cancéreuse pancréatique Panc-1 (Miao *et al.*, 2014). Ces résultats sont donc en faveur d'un rôle anti-TEM du miR-203, bien qu'il soit fortement surexprimé dans le cancer du pancréas et que cela soit associé à un mauvais pronostic (Ikenaga *et al.*, 2010). Nous n'avons pas évalué le rôle de miR-203 sur la TEM, mais nous avons étudié les marqueurs de la TEM dans les lignées stables surexprimant miR-29a ou miR-330-5p. Les résultats obtenus ne nous permettent pas de conclure sur l'implication de ce mécanisme dans notre modèle cellulaire, il serait alors intéressant d'étudier le rôle de l'inhibition de miR-203 sur les acteurs de la TEM.

Perspectives

Cibles	miR-29a	miR-330-5p	miR-876-3p	miR-203	miR-200a	miR-183	miR-939
MRP1	1	4	2	1	3	-	2
MRP2	-	-	-	1	-	-	-
MRP3	1	-	-	-	1	-	-
MRP4	1	-	-	-	-	1	1
MRP5	-	-	-	1	-	1	2
hCNT1	-	1	-	-	-	-	4
hCNT3	-	-	-	-	-	-	-
hENT1	-	-	-	-	-	-	2
dCK	-	-	-	3	1	-	-
RRM1	-	-	-	1	-	-	-
RRM2	-	-	-	3	-	-	-
CDA	-	1	-	-	-	-	-

Tableau 5 : Prédiction de la présence de séquences cibles pour les miARN identifiés dans cette étude sur le 3'UTR des gènes d'intérêts impliqués dans le métabolisme de la gemcitabine.

Cibles	miR-29a	miR-330-5p	miR-876-3p	miR-203	miR-200a	miR-183	miR-939
E-cadhérine	1	1	-	1	1	1	1
Vimentine	-	-	-	-	-	-	-
Fibronectine	-	-	-	-	-	-	-
Zeb1	-	-	-	2	4	2	-
Zeb2	-	-	1	3	3	1	-
Snail	1	1	-	2	-	1	1
Slug	-	-	-	3	-	1	-
Twist1	-	1	-	-	-	-	-
Twist2	1	-	-	-	1	-	2

Tableau 6 : Prédiction de la présence de séquences cibles pour les miARN identifiés dans cette étude sur le 3'UTR des gènes d'intérêts impliqués dans la TEM.

Les perspectives de ce travail portent sur l'identification des cibles des miARN utilisés dans cette étude ainsi que sur la régulation de MUC1 *in vitro* et *in vivo*. La seconde partie traitera de l'implication des miARN dans la chimiorésistance du PDAC.

I- Identification des cibles des miARN

Validation des sites de fixation additionnels

Les mucines sont régulées par les miARN *via* leur région codante et 25% des ARNm sont régulés au niveau de cette région par les miARN (Martinez-Sanchez & Murphy, 2013; Radhakrishnan *et al.*, 2013). Nous avons identifié des sites additionnels de fixation pour le miR-29a et le miR-330-5p dans la région codante de MUC1. Nous souhaitons cloner ces régions dans un vecteur rapporteurs codant la luciférase afin d'identifier si ces sites sont fonctionnels en réalisant des expériences de co-transfections cellulaires du vecteur et du miARN d'intérêt complété par une mutagenèse dirigée des sites de fixation pour chacun des miARN.

Identification des offs-targets

Nous avons montré une diminution de l'activité luciférase suite à la co-transfection du miR-29a ou du miR-939 et du vecteur contenant le 3'UTR de la *cycline D1*. De plus, nous avons identifié grâce à l'expérience de biotine *pull-down*, un enrichissement en *cycline D1* pour le miR-29a mais pas pour le miR-330-5p (résultats non présentés). Nous voulons donc réaliser des mutations au niveau de la séquence de fixation pour le miR-29a et le miR-939 sur le 3'UTR de la *cycline D1*. De la même façon nous souhaitons réaliser des mutations au niveau de la séquence de fixation pour le miR-939 sur le 3'UTR de l'*EGFR*.

L'identification des cibles de miR-876-3p et de miR-203 qui semblent tous les deux être impliqués dans la chimiosensibilité à la gemcitabine apparaît comme une perspective de choix. Dans ce but, nous avons réalisé des prédictions bio-informatiques présentées dans les tableaux 5 et 6 en évaluant la possibilité pour ces miARN d'interagir avec le 3'UTR des acteurs du métabolisme de la gemcitabine ou de la TEM. Ces prédictions nous permettent d'émettre l'hypothèse que le miR-203 pourrait être un régulateur de l'expression de la dCK, la première enzyme permettant la phosphorylation de la gemcitabine. Ainsi, l'inhibition de miR-203 observée dans les lignées surexprimant miR-29a et miR-330-5p pourrait permettre la levée du contrôle repressif exercé par le miR-203 sur la dCK. Ceci permettrait de favoriser l'expression de la dCK et la sensibilité à la gemcitabine. L'étude de cette hypothèse permettra d'établir un lien entre les profils d'expression des acteurs du métabolisme de la gemcitabine

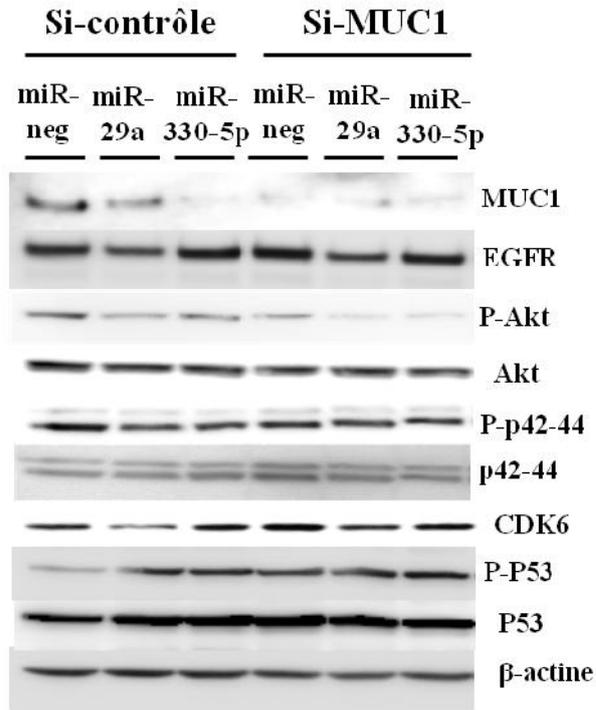


Figure 47 : Etude des voies de signalisation après transfection transitoire par siARN-MUC1 des lignées stables surexprimant miR-29a ou miR-330-5p.

Etude de l'expression de MUC1, EGFR, P-Akt, Akt, P-p42-44 MAPK, p42-44 MAPK, CDK6, P-P53, P53 par western-blot.

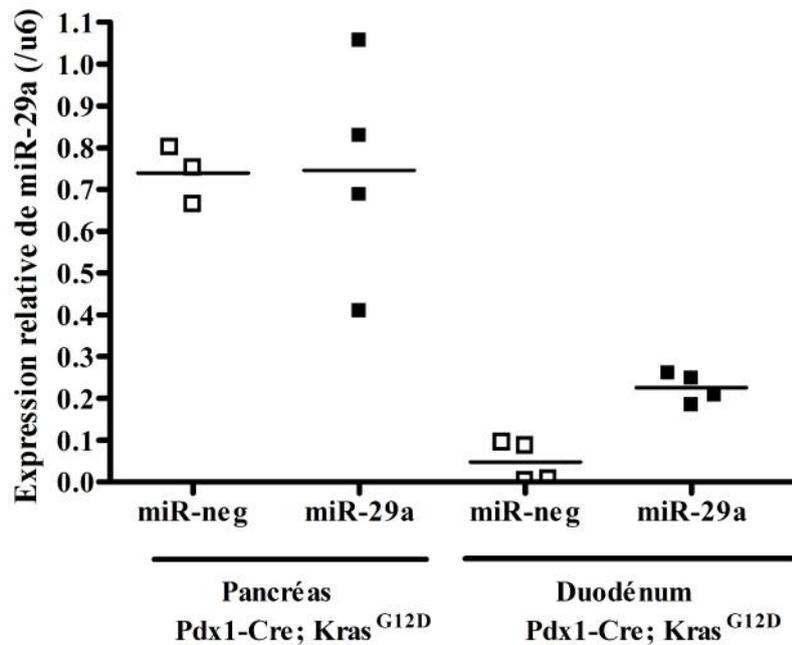


Figure 48 : Etude de l'expression de miR-29a par qRT-PCR dans le pancréas et le duodénum après injection intra-péritonéale de miR-29a dans les souris Pdx1-Cre; Kras^{G12D}.

p147 et celui des miARN p153.

L'identification des cibles et la validation des sites de fixations des miARN nous permettraient de mieux comprendre les fonctions des miARN dans le PDAC.

II- Régulation de MUC1 *in vitro* et *in vivo*

*Régulation de MUC1 *in vitro**

Nous avons montré que la surexpression de miR-29a et miR-330-5p inhibe l'expression de MUC1 et altère les propriétés biologiques des cellules cancéreuses pancréatiques. Afin de déterminer si les effets observés sont dûs à la régulation de MUC1, nous voulons utiliser différentes stratégies de surexpression (vecteur d'expression de MUC1) ou d'inhibiteur de MUC1 (lignées MUC1-KD, siARN-MUC1) et réaliser des surexpressions/inhibitions de miR-29a et miR-330-5p afin de valider si les effets observés au niveau des voies de signalisation passent par la régulation de MUC1 par ces miARN. Nous avons réalisé des siARN-MUC1 dans les lignées surexprimant miR-29a ou miR-330-5p et nous avons identifié une diminution de la phosphorylation d'Akt, d'Erk et une augmentation de la phosphorylation de P53. Nous observons également que la surexpression de miR-29a permet de diminuer légèrement l'expression de l'EGFR et de CDK6 indépendamment de l'inhibition de MUC1 (Figure 47).

L'étude de la régulation de MUC1 permettrait de déterminer précisément les voies de signalisation régulées par ces miARN et de confirmer l'intérêt de cibler MUC1 dans la cancérogenèse pancréatique.

*Régulation de MUC1 *in vivo**

Au vu des résultats encourageants obtenu durant ce travail sur les fonctions de miR-29a et miR-330-5p, nous avons voulu déterminer s'il était possible de surexprimer les miARN *in vivo* dans le modèle murin de cancérogenèse pancréatique Pdx1-Cre ; LstopL-Kras^{G12D}. Dans un second temps nous voulons étudier si la surexpression du miARN permettrait d'inhiber *in vivo* l'expression de la mucine MUC1. Nous avons commencé les mises au point en réalisant dans un premier temps des injections hebdomadaires en intra-péritonéal du miARN en solution saline durant 4 semaines. Nous n'avons constaté aucune surexpression du miARN dans le pancréas des souris, en revanche nous observons une augmentation de l'expression de miR-29a dans le duodénum (Figure 48). Nous souhaitons donc injecter les miARN cette

fois-ci dans la veine de la queue de souris et étudier si on est capable de surexprimer efficacement les miARN dans le pancréas et d'étudier si *in vivo* les miARN peuvent inhiber l'expression de MUC1 par immunohistochimie.

Cette étude nous permettrait de déterminer si le miR-29a et le miR-330-5p pourraient avoir un rôle thérapeutique dans le PDAC et cibleraient MUC1 in vivo.

III- Etude de la chimiorésistance dans le PDAC

MiARN comme marqueur prédictif ?

Nous voulons établir un profil d'expression des miARN miR-29a, miR-330-5p, miR-876-3p et miR-203 avant et après traitement par la gemcitabine ou le FOLFIRINOX (5-Fu, SN-38 et oxaliplatine) pendant 72h dans les lignées cellulaires Capan-2, MiaPaCa-2 et Capan-1. Dans un second temps nous voulons établir l'implication de ces miARN dans la sensibilité à ces drogues en déterminant l'IC₅₀ pour ces miARN après traitement par la gemcitabine ou le FOLFIRINOX.

Nous voulons étudier ensuite l'expression des miARN miR-29a, miR-330-5p, miR-876-3p et miR-203 dans une cohorte de patients atteints de PDAC et de tenter de mettre en évidence un profil d'expression des miARN en fonction de la réponse au traitement chimiothérapeutique utilisé (gemcitabine/FOLFIRINOX) en établissant un profil répondeur/non répondeur.

L'étude de l'expression des miARN nous permettrait de déterminer s'ils peuvent être utilisés comme marqueurs prédictifs de réponse aux traitements chimiothérapeutiques du PDAC et de déterminer leur implication dans la chimiosensibilité aux différentes drogues.

Implication du métabolisme de la gemcitabine et de la TEM

Nous avons montré que lors d'un traitement par la gemcitabine nous observons une augmentation de l'expression de la dCK et de hENT1 en faveur d'une sensibilité et à l'inverse une augmentation de l'expression de MRP3/5 en faveur d'une résistance. Nous voulons utiliser des siARN dirigées contre ces acteurs et réaliser ensuite des tests de survie cellulaire après traitement par la gemcitabine afin de déterminer précisément quels sont les acteurs

impliqués dans la chimiosensibilité à la gemcitabine lors de la surexpression de miR-29a et miR-330-5p.

Nous avons également montré une diminution de l'expression de Zeb-1 et de Snail en faveur d'une sensibilité. Nous observons pour le miR-330-5p une augmentation de l'expression de la E-cadhérine en faveur d'une sensibilité. Nous voulons confirmer ce résultat en déterminant la localisation cellulaire de la E-cadhérine par microscopie confocale. Nous avons observé une augmentation de l'expression de la vimentine et de slug pour miR-29a et miR-330-5p et de la fibronectine pour les cellules surexprimant miR-330-5p. Nous voulons donc utiliser des siARN dirigés contre ces acteurs et réaliser ensuite des tests de survie cellulaires après traitement par la gemcitabine afin de déterminer les acteurs impliqués dans la chimiosensibilité à la gemcitabine.

L'étude des acteurs du métabolisme de la gemcitabine et de la TEM nous permettrait de décrypter les mécanismes de chimiosensibilité mis en jeu lors de l'inhibition de MUC1 par miR-29a et miR-330-5p.

Fonctions biologiques de miR-876-3p et miR-203

Nous avons montré que la surexpression de miR-876-3p seul ou en combinaison avec l'inhibition de miR-203 et/ou à la surexpression de miR-29a ou miR-330-5p permet de sensibiliser les cellules à la gemcitabine. Nous avons également montré que la surexpression de miR-876-3p permet de ralentir la prolifération cellulaire et diminue l'expression de MUC1, P-Akt et de la cycline D1. Nous voulons poursuivre l'étude des fonctions biologiques (migration, invasion, croissance tumorale, survie et mort cellulaire) de ces miARN seuls ou en combinaison afin de déterminer s'ils peuvent être impliqués dans les modifications des propriétés biologiques des cellules cancéreuses pancréatiques.

L'étude des propriétés biologiques de ces miARN nous permettrait de déterminer leur fonction dans le PDAC.

Matériel et méthodes

Lignée	Différenciation	Tumorigénicité	Source	N°ATCC	Genre/Age
Capan-2	Bien	Oui	Tumeur Primaire	HTB-80	H56
Capan-1	Bien	Oui	Métastase Hépatique	HTB-79	H40
MiaPaCa-2	Peu	Oui	Tumeur Primaire	CRL-1420	H65
Panc-1	Peu	Oui	Tumeur Primaire	CRL-1469	F56
BxPC-3	Modéré	Oui	Tumeur Primaire	CRL-1687	F61

Tableau 7 : Caractéristiques des lignées cellulaires cancéreuses pancréatiques humaines.

Lignée	Mutations				Expression
	K-ras	TP53	DPC4/SMAD4	CDKN2a/P16	MUC1
Capan-2	MT	WT	WT	WT	+++
Capan-1	MT	MT	MT	MT	+++
MiaPaCa-2	MT	MT	WT	MT	++
Panc-1	MT	MT	WT	MT	+
BxPC-3	WT	MT	MT	WT	+/-

Tableau 8 : Mutations décrites et expression de la mucine MUC1 dans les lignées cellulaires cancéreuses pancréatiques humaines.

I- Lignées cellulaires

L'ensemble de ces travaux a été réalisé dans 5 lignées cellulaires cancéreuses pancréatiques humaines exprimant toutes la protéine MUC1 à des niveaux d'expression différente et dans une lignée pancréatique humaine non tumorigène *human pancreatic duct epithelial* HPDE. Les cellules sont cultivées dans un incubateur humide à 5% de CO₂ et à 37°C et maintenu dans des conditions stériles. Le Tableau 7 résume les caractéristiques des lignées cancéreuses pancréatiques humaines, le Tableau 8 les principales mutations connues. Les conditions de cultures cellulaires sont résumées dans le Tableau 9.

La lignée cellulaire Capan-2 est issue d'une tumeur primaire d'un adénocarcinome pancréatique de la tête du pancréas infiltrant l'anse du duodénum et l'ampoule de Water. C'est une lignée bien différenciée, tumorigène, polygonale, adhérente qui pousse en monocouche (Kyriazis *et al.*, 1986; Deer *et al.*, 2010).

La lignée Capan-1 est issue d'une métastase hépatique d'un adénocarcinome pancréatique de la tête du pancréas. C'est une lignée bien différenciée, tumorigène, prismatique, adhérente qui pousse en monocouche (Kyriazis *et al.*, 1982; Deer *et al.*, 2010).

La lignée BxPC-3 est issue d'un adénocarcinome du corps du pancréas. C'est une lignée modérément différenciée, arrondi et forme quelques îlots, tumorigène, adhérente et qui pousse en monocouche (Tan *et al.*, 1986; Deer *et al.*, 2010).

La lignée MiaPaCa-2 est issue d'un adénocarcinome pancréatique du corps et de la queue infiltrant la zone péri-aortique. C'est une lignée peu différenciée, les cellules sont larges, fusiformes, adhérentes, et peuvent pousser les unes sur les autres (Yunis *et al.*, 1977; Deer *et al.*, 2010).

La lignée Panc-1 est issue d'un carcinome de la tête du pancréas envahissant la paroi du duodénum. Les cellules sont rondes, poussent en monocouche et sont adhérentes (Lieber *et al.*, 1975; Deer *et al.*, 2010).

Lignées	Composition du milieu de culture
Capan-2	RPMI 1640 L-glutamine 2mM, SVF 10% (v/v), 100 unités/ml de pénicilline, 100 µg/ml streptomycine
Capan-1	RPMI 1640 L-glutamine 2mM, SVF 15% (v/v), 100 unités/ml de pénicilline, 100 µg/ml streptomycine
MiaPaCa-2	DMEM L-glutamine 2mM, SVF 10% (v/v), 100 unités/ml de pénicilline, 100 µg/ml streptomycine
Panc-1	DMEM L-glutamine 2mM, SVF 10% (v/v), 100 unités/ml de pénicilline, 100 µg/ml streptomycine
BxPC-3	RPMI 1640 L-glutamine 2mM, SVF 10% (v/v), pyruvate 1mM, 100 unités/ml de pénicilline, 100 µg/ml streptomycine
HPDE	Keratinocyte serum-free (KSF) Extrait pituitaire bovin 12,5 mg/ml, EGF recombinant 10 ng/ml, 100 unités/ml de pénicilline, 100 µg/ml streptomycine

Tableau 9 : Milieux de cultures utilisés pour la culture des lignées cellulaires pancréatiques humaines.

La lignée HPDE est issue d'une résection duodéno-pancréatique selon la procédure de Whipple. Les canaux pancréatiques ont été manuellement isolés et disséqués et maintenus en culture (fragment de 1 mm). Les cellules ont été immortalisées par infection avec les gènes E6/E7 du papillomavirus humain 16 (HPV). Les cellules sont polygonales non tumorigènes et poussent en monocouche (Furukawa *et al.*, 1996; Liu *et al.*, 1998) et proviennent du Dr. M. S. Tsao (Université Health Network, Toronto, Canada).

II- Transfections transitoires

1- Transfection inverse transitoire siPORT™ NeoFX™ (Ambion®)

La solution stock lyophilisée de miARN (pre-miARN et anti-miARN) de 5 nmoles est reprise par 500 µl d'eau stérile *RNase-free* afin d'obtenir une concentration mère de 10 µM. La transfection s'effectue en plaque de 96, 24, 12 ou 6 puits. L'agent de transfection SiPORT™, NeoFx™, (Ambion®) est mis à incuber pendant 10 min à température ambiante (T° amb.) à raison de 4 µl dans 30 µl de milieu Opti-MEM® (Invitrogen™). Ce mélange est ensuite incubé pendant 10 min à T°C amb avec le miARN d'intérêt dans des tubes à centrifuger de 1,5 ml siliconnés à une concentration finale de 30 nM (pre-miARN) ou 60 nM (anti-miARN) et/ou le vecteur d'intérêt à une concentration de 1 µg, excepté pour la lignée Capan-2 à une concentration de 5 µg. Les cellules sont ajoutées à ce mélange puis incubées pendant 10 min à T° amb. Du milieu complet adapté au volume du puits est apporté et les cellules sont placées dans l'incubateur.

2- Transfection transitoire Lipofectamine (Invitrogen)

La quantité désirée de plasmide ou de miARN est diluée dans 100 µl de milieux Opti-MEM® (Invitrogen™) dans lequel est ajouté 1 µl de plus Reagent (Invitrogen) et mis en incubation 5 min à T° amb. L'agent de transfection Lipofectamine LTX est ajouté à ce mélange à raison de 3 µl et incubé 30 min à T° amb puis distribué sur les cellules qui sont ensuite placées dans l'incubateur.

Gène	Sens Antisens	Séquences 5'-3'
hsa-miR-29a	Sens	TGCTGTAGCACCATCTGAAATCGGTTAGTTTTGGC CACTGACTGACTAACCGATTTTCATGGTGCTA
	Antisens	CCTGTAGCACCATGAAATCGGTTAGTCAGTCAGT GGCCAAAACCTAACCGATTTCA
hsa-miR-330-5p	Sens	TGCTGTCTCTGGGCCTGTGTCTTAGGCGTTTTGGCCACTGACT GACGCCTAAGACACACCCAGAGA
	Antisens	CCTGTCTCTGGGTGTGTCTTAGGCGTCAGTCAGTGGCCAAA ACGCCTAAGACACAGGCCAGAGAC
hsa-miR-neg	Sens	AAATGTACTGCGCGTGGAGACGTTTTGGCCACTG ACTGACGTCTCCACGCAGTACATTT
	Antisens	AAATGTACTGCGTGGAGACGTCAGTCAGTGGCC AAAACGTCTCCACGCAGTACATTT
MUC1-sh1	Sens	GATCCCCACCTCCAGTTTAATTCCTCTTCAAGAG AGAGGAATTAACCTGGAGGTTTTTA
	Antisens	GGGTGGAGGTCGAATTAAGGAGAAGTTCTCTC TCCTTAATTCGACCTCCAAAAAATTCGA
MUC1-sh2	Sens	GATCCCCATGTTTTTGCAGATTTATATTCAAGA GATATAAATCTGCAAAAACATTTTTTA
	Antisens	GGGTACAAAAACGTCTAAATATAAGTTCT CTATATTTAGACGTTTTTTGTAAAAAATTCGA

Tableau 10 : Séquences des amorces utilisées pour l'établissement des modèles cellulaires stables.

III- Etablissement des lignées stables

1- Inhibant MUC1

La lignée cellulaire Capan-2 a été rendue déficiente en MUC1 par shARN. Le plasmide pRetroSuper contenant deux séquences différentes ciblant la mucine MUC1, et le gène de résistance à la néomycine ont été transfectés par infection rétrovirale (Dr D. Bernard, IBL Lille, UMR 8161). Les séquences sont décrites dans le Tableau 10. Les clones ont ensuite été sélectionnés par une pression de sélection en cultivant les cellules avec de la généticine (G418) à 600 µg/µl et isolés par dilution limite (Dr N. Jonckheere, JPARC Lille, UMR837). Les clones sont ensuite maintenus sous G418 à 300 µg/µl.

2- Surexprimant le miARN d'intérêt

Les lignées MiaPaCa-2 et Capan-2 surexprimant le miR-29a, miR-330-5p ou miR-neg ont été générées par infection lentivirale par le système Gateway, en collaboration avec le Dr J. Torrisani (CRCT, Toulouse, Inserm UMR1037). Les particules lentivirales ont été produites avec les vecteurs pLenti4/TO/GFP-miR-330-5p ou miR-29a et pLenti4/TO/GFP-miR-Neg contenant les séquences pour les miARN répertoriés dans le Tableau 10 à l'aide du kit *ViraPower lentiviral packaging mix* (Life Technologies). Les lignées cellulaires ont été sélectionnées avec de la zéocine à 100 µg/ml. Les lignées cellulaires sont ensuite maintenues sous zéocine.

IV- Rétro-transcription et amplification par Polymerase Chain Reaction semi-quantitative

1- Extraction des ARN totaux

Les ARN totaux cellulaires comprenant les ARNm et les petits ARN sont extraits à 48h post-transfection ou à confluence et purifiés à l'aide du kit *miRNeasy Mini Kit* avec du *Qiazol*® (Qiagen) selon le protocole du fournisseur. Les ARN totaux de tissus humains ou murins sont extraits à partir de copeaux de paraffine (3 à 5 copeaux de 10 µm) à l'aide du kit *RecoverAll™ Total Nucleic Acid Isolation Kit* (Ambion, Life Technologies) selon le protocole du fournisseur. Les ARN sont ensuite dosés au Nanodrop1000 (Thermo-Scientific). Les rapports A_{260}/A_{280} et A_{260}/A_{230} permettent de déterminer la qualité des échantillons. Les ARN sont conservés à -80°C.

2- Rétro-transcription en ADNc

La rétro-transcription s'effectue à partir de 1 µg d'ARN.

Etape 1: dénaturation, ajout de l'adaptateur

ARNm volume final	14 µl	}	5 min à 70°C
Oligo (dT) ₁₅	1 µl		

Etape 2: rétro-transcription

H ₂ O <i>RNase free</i>	14 µl	}	Synthèse 1h à 42°C
dNTP 20 mM	5 µl		
Tampon M-MLV RT 5x	5 µl		Arrêt de la synthèse
Rétro-transcriptase 200 U	1 µl		5 min 94°C

Tampon M-MLV RT 5x : tampon Tris-HCl 50 mM, pH 8,3, KCl 75 mM, MgCl₂ 3 mM, DTT 10 mM.

Etape 3: dilution recommandée

Ajout de 60 µl d' H₂O *RNase free*.

Les solutions de rétro-transcription sont conservées à -20°C. Les ADNc sont conservés à -80°C.

3- RT miARN

La rétro-transcription des petits ARN s'effectue à partir de 10 pg jusque 1µg d'ARN totaux et est composée de trois étapes selon le kit QuantiMir™ RT Kit (System Biosciences).

Etape 1 : ajout d'un tag polyA

ARN totaux volume final	5 µl	}	Incubation 30 min à 37°C
Poly A buffer 5x	2 µl		
MnCl ₂ 25 mM	1 µl		
ATP 5mM	1,5 µl		
PolyA polymérase	0,5 µl		

Nom du gène	Sens-Antisens	Séquences 5'-3'	Taille de l'amplicon (pb)	Tm (°C)
MUC1	Sens	GAACTACGGGCAGCTGGACATC	454	60
	Antisens	GCTCTCTGGGCCAGTCCTCCTG		
28S	Sens	GCAGGGCGAAGCAGAAGGAAACT	231	60
	Antisens	TGAGATCGTTTCGGCCCCAA		
MUC1 3'UTR XbaI	Sens	CGCTCTAGATCTGCCAACTTGTAG	326	60
	Antisens	CGCTCTAGATTGGCGCAGTGGGAGA		
MUC1 3'UTR mut miR-330-5p #1	Sens	CCCAGGAGGACTGAAGCAACAAGCCCT GAGATAGC	-	79,71
	Antisens	GCTATCTCAGGGCTTGTGCTTCAGTCC TCCTGGG		
MUC1 3'UTR mut miR-29a	Sens	CTGTTTGGGCTGGTGAGCTGGGAGTCA CGGTGGGCCAATCACAGCCTCCTT	-	79,01
	Antisens	AAGGAGGCTGTGATTGGCCCACCGTGA CTCCCAGCTCACCAGCCCAAACAG		
MUC1 3'UTR mut miR-330-5p #2	Sens	CTCAGGTTCTTCAGGGCGCCGGCCCCCTG CACCTGTTT	-	78,3
	Antisens	AAACAGGGTGCAGGGGCCGGCGCCCTG AAGAACCTGAG		
MUC1 5'UTR HindIII	Sens	CGCAAGCTTCCACCTCTCAAGCAGCCA	130	59,2
	Antisens	CGCAAGCTTCTGTAAGCACTGTGAGGA GC		
MUC1 5'UTR mut miR-876-3p	Sens	CCTCCCCACCCATTCTACTTAACCATG ACACCGGGCACC	-	78,2
	Antisens	GGTGCCCGGTGTCATGGTTAGAGTGAA ATGGGTGGGGAGG		
MUC1 5'UTR mut miR-939	Sens	GTGGTGGTCAAATGGGTTATAAGGGGG CAGAACAGATTCAGGCAG	-	78,5
	Antisens	CTGCCTGAATCTGTTCTGCCCCCTTATA ACCCATTTACCACCAC		
MUC1 5'UTR mut miR-203	Sens	GTTCTGCCCCCTCCCCACCCACCGAGCC ACCACCATGACACCG	-	78,9
	Antisens	CGGTGTCATGGTGGTGGCTCGGTGGGT GGGAGGGGGCAGAAC		

Tableau 11 : Liste des amorces de PCR et de mutagenèse dirigée.

Etape 2: ajout de l'adaptateur

Cette étape consiste en l'ajout de 0,5 µl d'oligo dT.

Incubation 5 min à 60°C

Puis 2 min à T°amb

Etape 3: rétro-transcription

RT buffer 5x 4 µl

dNTP mix 2 µl

DTT 0,1 M 1,5 µl

H₂O *RNase free* 1,5 µl

Transcriptase inverse 1 µl

Synthèse 1h à 42°C

Arrêt de la synthèse 10 min à 95°C

Etape 4: dilution recommandée

Une dilution au demi est recommandée lors d'une rétro-transcription réalisée de 10 pg à 100 ng d'ARN totaux, et au 1/100^e pour une rétro-transcription de 100 ng à 1µg d'ARN. Les solutions de rétro-transcription sont conservées à -20°C. Les ADNc sont conservés à -80°C.

4- PCR

La PCR est réalisée en présence de *Taq DNA Polymerase* à 1 U/µl (Roche Diagnostics) et de son tampon 1X contenant du MgCl₂ à 1,5 mM, des dNTP à 50 mM (Eurogentec), des amorces sens et anti-sens à 5 nmoles/µl (Eurogentec), de l'eau stérile et une matrice d'ADNc issues des lignées cancéreuses pancréatiques selon les conditions décrites précédemment (Piessen *et al.*, 2007). Les amorces utilisées sont décrites dans le Tableau 11 et les conditions de PCR dans le Tableau 12.

1 cycle		25-30 cycles			1 cycle	
94°C	94°C	Tm°C	72°C	72°C	8°C	
2 min	45 s	1 min	20 s à 1 min	10 min	infini	

Tableau 12 : Programme de PCR

5- Migration électrophorétique

Les produits de PCR sont visualisés en gel d'agarose à 1,5% (p/v) en présence de bromure d'éthidium (BET) à 10 µg/ml dans du tampon Tris-Borate-EDTA à pH 8,0. Les produits de

Nom du gène	Sens- Antisens	Séquences 5'-3'	Taille de l'amplicon (pb)	Tm (°C)
MUC1	Sens	TGCCGCCGAAAGAAGTACG	76	60
	Antisens	TGGGGTACTCGCTCATAGGAT		
GAPDH	Sens	CCACATCGCTCAGACACCAT	70	58
	Antisens	CCAGGCGCCCAATACG		
Cycline D1	Sens	TTCGTGGCCTCTAAGATGAAGG	108	60
	Antisens	GAGCAGCTCCATTTGCAGC		
CDK6	Sens	TCTTCATTACACCGAGTAGTGC	130	60
	Antisens	TGAGGTTAGAGCCATCTGGAAA		
CDK1	Sens	GGATGTGCTTATGCAGGATTCC	100	60
	Antisens	CATGTACTGACCAGGAGGGATAG		
EGFR	Sens	TTGCCGCAAAGTGTGTAACG	142	60
	Antisens	GTCACCCCTAAATGCCACCG		
c-Met	Sens	AGCGTCAACAGAGGGACCT	78	60
	Antisens	GCAGTGAACCTCCGACTGTATG		
PDGFRA	Sens	TTGAAGGCAGGCACATTTACA	119	60
	Antisens	GCGACAAGGTATAATGGCAGAAT		
PDGFRB	Sens	TGATGCCGAGGAACTATTCATCT	103	60
	Antisens	TTTCTTCTCGTGCAGTGTAC		
Mcl-1	Sens	TGCTTCGGAAACTGGACATCA	135	60
	Antisens	TAGCCACAAAGGCACCAAAAG		
Bcl-2	Sens	GGTGGGGTCATGTGTGTGG	89	60
	Antisens	CGGTTTCAGGTAAGTCAATCC		
PTEN	Sens	AGGGACGAACTGGTGTAAATGA	100	60
	Antisens	CTGGTCCTTACTTCCCATAGAA		
MMP2	Sens	GATACCCCTTTGACGGTAAGGA	112	60
	Antisens	CCTTCTCCCAAGGTCCATAGC		
MMP9	Sens	TGTACCGCTATGGTTACACTCG	97	60
	Antisens	GGCAGGGACAGTTGCTTCT		
MMP13	Sens	CCAGACTTCACGATGGCATTG	137	60
	Antisens	GGCATCTCCTCCATAATTTGGC		
E-cadhérine	Sens	CAGCACGTACACAGCCCTAA	159	60
	Antisens	ACCTGAGGCTTTGGATTC		
Vimentine	Sens	AGTCCACTGAGTACCGGAGAC	98	60
	Antisens	CATTTACGCATCTGGCGTTC		
Fibronectine	Sens	CGGTGGCTGTCAGTCAAAG	130	60
	Antisens	AAACCTCGGCTTCTCCATAA		
Zeb-1	Sens	CAGCTTGATACCTGTGAATGGG	106	60
	Antisens	TATCTGTGGTTCGTGTGGGACT		
Zeb-2	Sens	GCGATGGTCATGCAGTCAG	138	60
	Antisens	CAGGTCGCAGGTCATTTTCTT		

PCR sont déposés à raison de 10 µl par puits avec 3 µl d'OrangeG 6X (Promega), (tampon Tris-HCl 10 mM, pH 7,6, contenant de l'Orange G 0,1% (p/v), du Ficoll 400 15% (p/v) et 60 mM d'EDTA, pH 8,0). La migration s'effectue pendant 45 min à 110 volts. La lecture du gel d'agarose s'effectue sur plaque à Ultra-Violet (GelDoc, Biorad).

6- qPCR

a- qPCR classique

La qPCR classique est réalisée selon le protocole suivant dans un mélange réactionnel final de 20 µl.

SsoFast™ EvaGreen® supermix 2x	10 µl	} + 2 µl d'ADNc par puits
amorce sens 5 µM	1 µl	
amorce antisens 5 µM	1 µl	
H ₂ O RNase free	6 µl	

L'amplification se fait sur l'appareil CFX96™ Real-Time System (Bio-Rad) selon le protocole décrit dans le tableau suivant. Une courbe de fusion est réalisée à la fin de l'amplification pour vérifier la spécificité de la qPCR selon le programme décrit Tableau 13. Le gène GAPDH est utilisé comme contrôle de normalisation. L'expression du gène testé est calculée selon la formule du $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Les amorces utilisées sont décrites dans le Tableau 14.

Normalisation $2^{-\Delta Ct}$ avec $Ct = Ct_{\text{gène}} - Ct_{\text{GAPDH}}$

Comparaison $2^{-\Delta\Delta Ct}$ avec $Ct = Ct_{\text{échantillon}} - Ct_{\text{contrôle}}$

1 cycle	30-50 cycles		Courbe de fusion
95°C	95°C	T _m °C	55 à 95°C
30 s	0,5 s	0,5 s	0,2 s

Tableau 13 : Programme de qPCR.

Nom du gène	Sens-Antisens	Séquences 5'-3'	Taille de l'amplicon (pb)	Tm (°C)
Twist	Sens	GTCCGCAGTCTTACGAGGAG	196	60
	Antisens	TGGAGGACCTGGTAGAGGAA		
Snail	Sens	TCGGAAGCCTAACTACAGCGA	140	60
	Antisens	AGATGAGCATTGGCAGCGAG		
Slug	Sens	CGAACTGGACACACATACAGTG	82	60
	Antisens	CTGAGGATCTCTGGTTGTGGT		
MRP1	Sens	GTCACGTGGAATACCAGCAAC	142	58
	Antisens	ACATGACCGAGGCTACATTCA		
MRP2	Sens	ACAGAGGCTGGTGGCAACC	129	58
	Antisens	GTGGATCTAGAGACAGACAAC		
MRP3	Sens	GGAGGACATTTGGTGGGCTTT	90	58
	Antisens	CCCTCTGAGCACTGGAAGTC		
MRP4	Sens	AAGTGAACAACCTCCAGTTCCAG	119	58
	Antisens	GGCTCTCCAGAGCACCATCT		
MRP5	Sens	AGAACTCGACCGTTGGAATGC	104	58
	Antisens	TCATCCAGGATTCTGAGCTGAG		
hCNT1	Sens	CCTCACCTGTGTGGTCTCA	86	58
	Antisens	AGACCCCTCTTAAACCAGAGC		
hCNT3	Sens	CTTTTCTGGAGTACACAGATGCT	108	58
	Antisens	CGGCAGGACCTTAAATGCAAA		
hENT1	Sens	CTCTCAGCCCACCAATGAAAG	123	58
	Antisens	CTCAACAGTCACGGCTGGAA		
dCK	Sens	GAGAAACCTGAACGATGGTCTT	102	58
	Antisens	TCTCTGCATCTTTGAGCTTGC		

Tableau 14 : Liste des amorces de qPCR.

Nom du miARN	Séquences 5'-3'	Tm (°C)
U6	CGCAAGGATGACACGCAA	59
u6	TGGCCCCTGCGCAAGGATG	63
hsa-miR-330-5p	TCTCTGGGCCTGTGTCTTAGGC	63
hsa-miR-200a	TAACACTGTCTGGTAACGATGT	56
hsa-miR-183	TATGGCACTGGTAGAATTCCT	56
hsa-miR-29a	TAGCACCATCTGAAATCGGTTA	56
hsa-miR-652	AATGGCGCCACTAGGGTTGTG	61
hsa-miR-455-3p	GCAGTCCATGGGCATATACAC	60
hsa-miR-203	GTGAAATGTTTAGGACCACTAG	56
hsa-miR-876-3p	TGGTGGTTTACAAAGTAATTCA	53
hsa-miR-939	TGGGGAGCTGAGGCTCTGGGGGTG	69
hsa-miR-1226	TCACCAGCCCTGTGTTCCCTAG	63
hsa-miR-125b	TCCCTGAGACCCTAACTTGTGA	60
hsa-miR-34a	TGGCAGTGTCTTAGCTGGTTGT	60
hsa-miR-145	GTCCAGTTTTCCAGGAATCCCT	62

Tableau 15 : Liste des amorces des miARN et de l'ARN U6/u6.

b- qPCR miARN

La qPCR pour les miARN est réalisée selon le protocole suivant dans un mélange réactionnel final également de 20 µl. La séquence du miARN est utilisée comme brin sens (convertie en séquence ADN U → T). L'amorce antisens est la séquence universelle fournie avec kit de rétrotranscription QuantiMir™ RT Kit.

SsoFast™ EvaGreen® supermix 2x	10 µl	} + 2 µl d'ADNc par puits
amorce sens 5 µM	1 µl	
amorce antisens 10 µM	0,5 µl	
H ₂ O RNase-free	6,5 µl	

L'amplification et le calcul de l'expression du miARN testé se font comme décrit précédemment. L'ARN U6/u6 est utilisé comme contrôle de normalisation. Les amorces sont décrites dans le Tableau 15.

V- Extraction de protéines totales et Western-blot

1- Extraction des protéines

Les protéines sont extraites 48h post-transfection ou à confluence. Les cellules sont rincées au *Dulbecco's Phosphate Buffered Saline* 1X (D-PBS), puis le tapis cellulaire est lysé avec 100 µl (plaque 6 puits) 250 µl (T25) ou 500 µl (T75) de tampon *Radio-Immunoprecipitation Assay buffer* (RIPA, Sigma-Aldrich, tampon Tris-HCl 50 mM, pH 8,0, contenant du NaCl 150 mM, du NP40 1% (v/v) et du désoxycholate de sodium 0,5% (v/v)) contenant un cocktail d'inhibiteurs de protéases et de phosphatases (Complete Mini, Roche), et incubé 5 min sur la glace. Les cellules sont grattées et transférées dans un tube à centrifuger de 1,5 ml, à 8 000 g à 4°C pendant 10 min. Les surnageants sont transférés dans des tubes à centrifuger stériles puis conservés à -80°C. Les protéines sont dosées par la méthode à l'acide bicinchoninique (BCA™ *Protein Assay*, Pierce) par spectrophotométrie à 570 nm (lecteur de microplaque BIO-RAD Model 680).

	Gel de concentration (%)		Gel de séparation (%)			
	5	5	8	10	12	15
Polyacrylamide 40% (ml)	1,9	5	8	10	12	15
Polyacrylamide 30% (ml)	2	6,7	10,7	13,3	16	20
Tris-HCl 0,5 M pH 6,8 SDS 0,4 % (v/v) (ml)	3,75	-	-	-	-	-
Tris-HCl 1,5 M pH 8,8 SDS 0,4 % (v/v) (ml)	-	10	10	10	10	10
Persulfate d'ammonium (APS) 10% (p/v) (µl)	150	400	400	400	400	400
Tétraméthyléthylènediamine (TEMED) (µl)	15	24	16	16	16	16
H₂O (ml)	11	24,2	21,2	19,2	17,2	14,2
Bleu de bromophénol 0,1% (µl)	50	-	-	-	-	-
Volume final (ml)	15	40	40	40	40	40

Tableau 16 : Composition des gels de polyacrylamide.

2- Préparation des gels

La réticulation du gel de séparation varie de 5 à 15% de polyacrylamide selon la taille des protéines étudiées, le gel de concentration est à 5%. La composition de chaque gel est récapitulée dans le Tableau 16.

3- Western-blot

Selon la protéine étudiée, 8 à 40 µg de protéines sont dénaturées à 100°C pendant 5 min avec du tampon de charge SDS 2X (tampon Tris-HCl 0,25 mM, pH 6,8, contenant du SDS 0,1% (v/v), du -mercaptoéthanol 10% (v/v), du glycérol 20% (v/v) et du bleu de bromophénol 0,5% (p/v)). Les échantillons sont ensuite brièvement centrifugés pour être bien homogénéisés avant d'être déposés.

a- Migration électrophorétique et transfert

i- Système "manuel"

La migration s'effectue à courant constant de 35 mA par gel dans une solution Tris-HCl 25 mM, pH 8,3, contenant de la glycine 190 mM, et du SDS 0,05% (v/v), sous refroidissement. Le gel est transféré sur une membrane de fluorure de polyvinylidène (PVDF 0,45 µm, Millipore), à voltage constant de 100V pendant 1h. Le transfert est réalisé dans une solution Tris-HCl 25 mM, pH8,3, contenant de la glycine 192 mM, du méthanol 20% (v/v) et du SDS 0,005% (v/v) sous refroidissement.

ii- Système Invitrogen

La migration s'effectue à partir du système de cuve XCell SureLock® Mini-Cell selon les indications du fournisseur, avec des gels pré-coulés Tris-acétate 3-8% ou bis-Tris 4-12% dans du tampon de migration Tris-Acétate-SDS 1X ou du tampon MOPS-SDS 1X respectivement. Le transfert s'effectue comme précédemment indiqué.

Protéine	Anticorps primaire	Fournisseur	Anticorps secondaire	Dilution	Masse (kDa)
MUC1	M8 (LICR-LON-M8)	Dr D. Swallow, Londres	souris	1/250e - 1/500e	~200
-actine	A5441 AC15	Sigma	souris	1/5000e	45
Bax	sc-493	Santa Cruz	lapin	1/500e	23
Bcl-xL	sc-8392	Santa Cruz	souris	1/500e	34
Caspase 3	8g10 9665	Cell Signaling	lapin	1/250	35, 17- 19
Caspase 3 clivée	#9661	Cell Signaling	lapin	1/250e	17-19
Bcl-2	#2872	Cell Signaling	lapin	1/250e	28
Cycline D1	#2926	Cell Signaling	souris	1/500e	36
Cycline D1	sc-718	Santa Cruz	Rabbit	1/250e	36
p-P53	#9284	Cell Signaling	lapin/souris	1/500e	53
P53	#9282	Cell Signaling	lapin	1/500e	53
P-EGFR	#4407s	Cell Signaling	lapin	1/500e	170
EGFR	#4267s	Cell Signaling	lapin	1/500e	170
EGFR	1005 sc3	Santa Cruz	lapin	1/500e	170
Akt	c67e7 4691	Cell Signaling	lapin	1/500e	60
P-Akt	d9e 4060	Cell Signaling	lapin	1/500e	60
P-p44-42 MAPK	#9101	Cell Signaling	lapin	1/500e	44-42
p44-42 MAPK	#9102	Cell Signaling	lapin	1/500e	44-42
P-p38 MAPK	#9215	Cell Signaling	lapin	1/500e	40
p38 MAPK	#9212	Cell Signaling	lapin	1/500e	40
p27	9019p0	neomarkers	lapin	1/500e	27
P-SAPK/JNK	#9251	Cell Signaling	lapin	1/500e	46-54
SAPK/JNK	56g8	Cell Signaling	lapin	1/500e	46-54
-caténine	# 8480S	Cell Signaling	lapin	1/1000	92
CDK6	sc-177	Santa Cruz	lapin	1/500	40
MMP2	#4022	Cell Signaling	lapin	1/500	72
MMP9	#3852	Cell Signaling	lapin	1/500	92
MMP13	ab 39012	Abcam	lapin	1/1000	54
p-Stat3 tyr 705	#9145	Cell Signaling	lapin	1/500	86
Stat3	#9139	Cell Signaling	souris	1/500	86
p-c-jun ser63	#2361	Cell Signaling	lapin	1/500	48
c-jun	#9165	Cell Signaling	lapin	1/500	48
c-iap1	#7065	Cell Signaling	lapin	1/500	62
c-iap2	#3130	Cell Signaling	lapin	1/500	70
xiap	#2045	Cell Signaling	lapin	1/500	53
survinine	#2808	Cell Signaling	lapin	1/500	16
livine	#5471	Cell Signaling	lapin	1/500	34-36

Tableau 17 : Liste des anticorps utilisés pour les western-blots.

b- Révélation immunologique

La membrane est saturée par 10% (p/v) de lait écrémé lyophilisé en tampon TBS-T (tampon Tris-HCl 50 mM, pH 8,3, contenant du NaCl 150 mM et du Tween20™ 0,05% (v/v)) pendant une heure. La membrane est ensuite rincée 3 fois 5 min avec du tampon TBS-T. Puis la membrane est incubée avec l'anticorps primaire dilué dans du tampon TBS-T durant 2h à T° amb ou pendant une nuit à +4°C. La liste des anticorps est décrite dans le Tableau 17. La membrane est ensuite lavée 3 fois 5 min avec du tampon TBS-T, puis incubée durant 45 min avec l'anticorps secondaire dilué au 10 000e couplé à la Peroxydase de Raifort dilué dans du tampon TBS-T. La membrane est ensuite lavée 3 fois 5 min avec du tampon TBS-T puis incubée pendant 5 min avec un mélange identique de luminol/enhancer (v/v) et peroxyde (v/v) Super Signal Pico (Pierce, Thermo Scientific). L'image est acquise par chimioluminescence à l'aide du Las4000 Fugifilm. La membrane peut ensuite être deshybridée à l'aide d'un tampon glycine (0,1M, pH 2,9). On peut également inhiber la peroxydase à l'aide d'une solution d'azide de sodium 10% (p/v) diluée en D-PBS 1X, et utiliser 2 µl de cette solution pour 1 ml de TBST-lait 5% (p/v) pendant une heure à T° amb. La membrane est ensuite rincée 3 fois 5 min avec du tampon TBS-T en vue d'une nouvelle hybridation. Deux litres de TBST 20X peuvent être préparés (utilisation TBST 1X) contenant du NaCl 5M (1,5 l), du Tris-HCl 3M pH 7,5 (833 ml) et de l'eau (167 ml).

4- Proteome prolifer array™

Les kits *Human Phospho kinase antibody array*, *Human apoptosis antibody array*, et *human receptor tyrosine kinase array* (RnDSytem) ont été utilisés selon les indications du fournisseur. Brièvement, des membranes de nitrocellulose contenant des spots d'anticorps par « thématique » sont incubées avec un lysat cellulaire total (200 à 600 µg) durant une nuit. Les membranes sont rincées 3 fois 5 minutes avec un tampon de lavage puis incubés avec un cocktail d'anticorps biotinylés. L'anticorps secondaire est couplé à la streptavidine-HRP et la détection est réalisée par chimioluminescence de la même façon que décrit ci-dessus pour les western-blots.

VI- Clonage du 3'UTR de MUC1 et du 5'-UTR

1- Obtention de la séquence du 3'UTR et du 5'UTR de MUC1

La séquence du 3'UTR de *MUC1* a été obtenue à partir de la base de données *Ensembl*. Le 3'UTR de *MUC1* a été amplifié selon les conditions de PCR décrites dans le Tableau 12 et les amorces décrites dans le Tableau 11. Les amorces contiennent à l'extrémité 5' un site de restriction *XbaI* pour permettre le clonage en aval de la luciférase dans le vecteur rapporteur d'expression luciférase pGL3-promoteur (Promega). La taille de l'insert obtenu est de 326 pb. Le 5'UTR de *MUC1* contenant le 1^{er} exon de *MUC1* également a été obtenu de façon similaire avec les amorces décrites dans le Tableau 11 et un site de restriction *HindIII* pour le clonage en amont de la luciférase dans le vecteur pGL3-promoteur (130 pb).

2- Clonage dans le vecteur pGL3-promoteur (Promega)

a- Préparation de l'insert

Le produit de PCR est purifié grâce au kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) selon les conditions du fournisseur et il est élué dans 30 µl d'eau stérile. Ces 30 µl de produit de PCR sont digérés pendant 24h à 37°C avec 2 µl d'enzyme de restriction *XbaI* (BioLabs®), son tampon 10X et 0,5 µl de BSA 10X (1 mg/ml). Suite à la digestion, le produit de PCR est de nouveau purifié et élué dans 15 µl d'eau stérile.

b- Préparation du vecteur

Le vecteur pGL3-promoteur (Promega) (2 µl) est digéré pendant 2h à 37°C avec 2 µl d'enzyme de restriction *XbaI* (BioLabs®), son tampon 10X et 0,5 µl de BSA 10X (1 mg/ml) dans un volume final de 30 µl. Un traitement à la phosphatase est ensuite réalisé pendant 1h à 37°C en ajoutant au mélange précédent 2 µl d'Antartic phosphatase (BioLabs®) et son tampon 10X. Suite à ce traitement, le vecteur est purifié grâce au kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System (Promega) selon les conditions du fournisseur et il est élué dans 25 µl d'eau stérile. Les produits sont visualisés après électrophorèse sur gel d'agarose 1% (p/v).

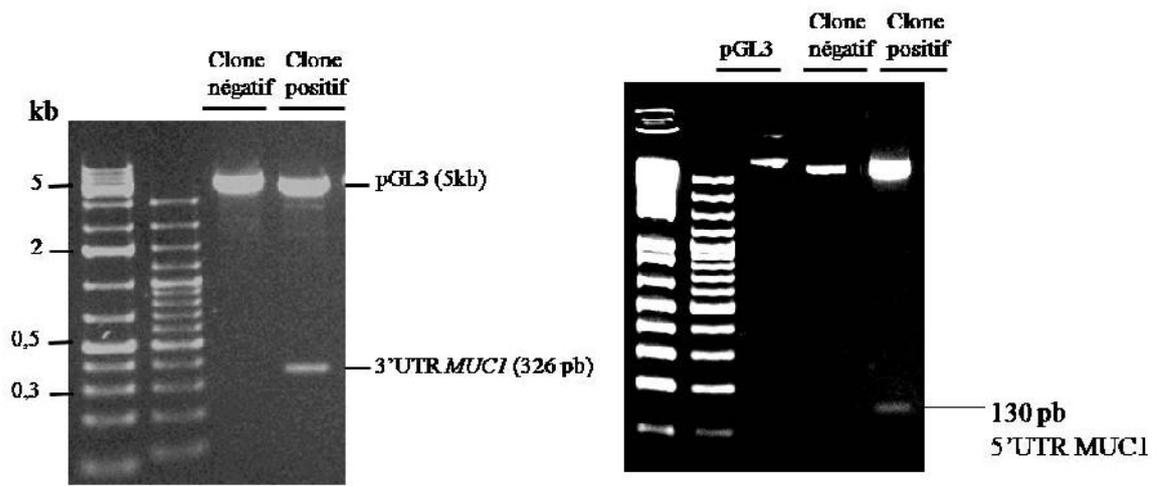


Figure 49 : Clonage du 3'UTR et du 5'UTR de *MUC1*.

c- Ligation et transformation bactérienne

La ligation s'effectue dans un volume de 10 µl avec 1 µl de T4 *DNA ligase* (BioLabs®) et de son tampon 10X pendant 16h à 20°C. De nombreux ratios insert/vecteur ont été testés. Les bactéries compétentes JM109 (Promega) sont incubées avec 3 µl de produit de ligation pendant 10 min sur glace puis transformées par choc thermique pendant 45 s à 42°C. 1 ml de milieu LB est ajouté aux bactéries transformées et elles sont mises en incubation sous légère agitation orbitale pendant 1h. Ce mélange (200 µl) est ensuite étalé sur des boîtes de Pétri contenant 100 µg/ml d'ampicilline pendant une nuit à 37°C. Les clones sont repiqués le lendemain dans 5 ml de milieu LB en présence d'ampicilline à une concentration de 100 µg/ml et ils sont incubés une nuit à 37°C sous légère agitation orbitale.

d- PCR sur colonie

Les colonies sont piquées avec un cône stérile et déposées dans 30 µl d'eau stérile. Les bactéries sont dénaturées pendant 5 min à 100°C et une PCR est réalisée en utilisant les colonies comme matrice selon les conditions décrites Tableau 11 et Tableau 12. La présence de l'insert est visualisée après électrophorèse sur gel d'agarose 1% (p/v).

e- Extraction plasmidique et séquençage

Les plasmides contenant l'insert sont préparés à l'aide du kit *QIAprep® Spin Miniprep* (Qiagen) puis digérés par l'enzyme *XbaI* (BioLabs®) pendant 2h à 37°C. La présence de l'insert est visualisée après électrophorèse sur gel d'agarose 1% (p/v) (Figure 49). Le séquençage des plasmides présentant l'insert se fait sur les deux brins d'ADN grâce à l'utilisation des amorces suivantes : sens 5' 3' AGACGATGACGGA et anti-sens 5' 3' CTGAACCTGAAACA (GATC Biotech, Mulhouse, France) pour le 3'UTR et les amorces sens 5' 3' TGCATCTCAATTAGTCAGC et anti-sens 5' 3' GTAGGCTGCGAAATGCCCAT pour le 5'UTR. Les alignements de séquences sont effectués dans Blast (NCBI). Les clones positifs sont conservés à -80°C dans du glycérol (1/2 v/v). Afin de réaliser les expériences de co-transfections cellulaires, les vecteurs sont préparés en grande quantité à l'aide du kit NucleoBond® Xtra Maxi Plus EF (Macherey-Nagel) selon les conditions du fournisseur.

f- Mutagenèse dirigée

Les mutations des bases de fixation pour les miARN sur le 3'UTR ou le 5'UTR de *MUC1* ont été réalisées à l'aide du kit QuickChange® XL *site-directed mutagenesis kit* (Stratagene, Agilent Technologies) selon les indications du fournisseur. Les amorces ont été réalisées à l'aide des outils disponibles sur le site internet de Stratagene.

VII- Validation des cibles des miARN

1- Test d'activité luciférase Firefly luciférase (*Promega*)

Les cellules sont rincées au D-PBS 1X puis 110 µl de Reporter Lysis Buffer 1X (*RLB Promega*) sont ajoutés sur le tapis cellulaire et incubés pendant 15 min à T°C amb sous légère agitation. Le tapis cellulaire est ensuite gratté puis vortexé durant quelques secondes. L'extrait est ensuite centrifugé à 16 000 g pendant 5 min. Les surnageants sont transférés dans des tubes à centrifuger stériles et sont ensuite conservés à -80°C. Les protéines sont dosées par la méthode à l'acide bicinchoninique (*BCA™ Protein Assay, Thermo Scientific*) par spectrophotométrie à 570 nm (lecteur de microplaque BIO-RAD Model 680). L'activité luciférase est ensuite mesurée à partir de 20 µl d'extrait sur un luminomètre (Mithras LB 940, IFR114-IMPRT, A-S Drucbert) en présence de luciférine et d'ATP. L'activité luciférase est mesurée puis rapportée à la quantité de protéines totales dans l'échantillon.

2- Test d'activité luciférase Renilla (*Active motif*)

Les cellules sont transfectées en plaque 96 puits avec 30 nM de pre-miARN 100 ng de vecteur contenant le 3'-UTR de la *cycline D1*, de l'*EGFR*, de *Stat3* ou de *Bcl-x_L* pendant 48h. Les cellules sont ensuite lysées à l'aide de 100 µl de solution fraîchement préparé de substrat et de son tampon (1X), pendant 30 minutes à T° amb. Le lysat est transféré dans une plaque blanche puis est lu sur un luminomètre (Mithras LB 940, IFR114-IMPRT, A-S Drucbert).

3- Biotin pull-down assay

Les cellules ont été transfectées par le miARN biotinylé ou le miR-neg biotinylé en 3' (Dharmacon) pendant 24 h. Les cellules sont trypsinisées et centrifugées 5 min à 500g. Le culot cellulaire est lavé deux fois avec du PBS 1X avant d'être repris par 700 µl de tampon de

lyse composé de Tris-HCl 20 mM pH 7,5 ; KCl 100 mM ; MgCl₂ 5mM ; NP-40 0,3% (v/v) ; 50 U de RNase OUT (Invitrogen), une pastille de cocktail d'inhibiteurs de protéases (Roche), et incubé sur la glace pendant 5 min.

Les billes magnétiques de streptavidine (Invitrogen) sont bloquées pendant 2h à 4°C dans le tampon de lyse contenant de l'ARN de transfert de levure à 1 mg/ml (Life Technologies) et de la BSA (*Bovine Serum Albumin*) à 1 mg/ml. Les billes sont lavées deux fois avec le tampon de lyse. Le lysat est centrifugé à 10 000 g pendant 10 min avant d'être ajouté aux billes et incubé pendant 4h à 4°C. Les billes sont ensuite lavées à 5 reprises avec le tampon de lyse. Les ARN totaux sont extraits avec 350 µl de qiazol à partir du kit miRNeasy® Mini (Qiagen) et rétro-transcripts comme décrit précédemment (Lal *et al.*, 2011; F Lahdaoui *et al.*, 2014).

VIII- Activités biologiques des miARN

1- Test de survie cellulaire et chimiorésistance

L'expérience s'effectue sur 10⁴ cellulesensemencées en plaque 96 puits. Le lendemain les traitements par les drogues de chimiothérapies (gemcitabine, 5-fluorouracile, oxaliplatine et SN-38, (A. Lansiaux et S. Meignan Equipe 3 JPARC)) sont effectués en réalisant une gamme de concentration croissante de 10⁻⁹ à 10⁻⁴ M. 72h post-traitement, le sel de tétrazolium (MTT : bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium) est repris à 5 mg/ml en PBS1X. Puis, 200 µl de MTT à 0,5 mg/ml repris dans du milieu de culture cellulaire est mis en contact avec les cellules pendant 2h à 37°C. Le milieu contenant le MTT est ensuite retiré et 100 µl de diméthylsulfoxyde (DMSO) sont ajoutés. L'absorbance à 570 nm est mesurée par spectrophotométrie (lecteur de microplaque BIO-RAD Model 680). Après détermination de l'IC₅₀ (Inhibitory Concentration 50) des extraits d'ARN totaux et de protéines sont réalisés en traitant les cellules pendant 72h.

2- Test de prolifération cellulaire

10⁵ cellules transfectées ou stables sontensemencées en plaque 6 ou 12 puits. Des comptages cellulaires sont réalisés à 24h, 48h, 72h post-transfection et jusque 96h pour les lignées stables, au microscope ou au compteur de cellules *Countess™ Cell* Invitrogen avec du Bleu Trypan 0,1% (v/v) (Invitrogen™) afin de ne compter uniquement les cellules vivantes.

3- Test de migration cellulaire

L'expérience s'effectue sur 225 000 cellules transfectées et ensemencées en plaque 24 puits. Les blessures sont réalisées manuellement, à confluence, 48h post-transfection, avec un cône de P200. La migration des cellules a été observée au microscope et les mesures sont réalisées grâce au logiciel NIS-Elements BR2-30 (Nikon Corporation) toutes les 3h jusque 12h post-blessure puis à 24h.

4- Test de migration et d'invasion en chambre de Boyden

Les chambres de Boyden permettent de mesurer la migration ou l'invasion des cellules à travers une membrane poreuse de 8 µM attirées par chimiotactisme par l'utilisation de SVF 10% (v/v). Pour l'invasion cellulaire la membrane est recouverte de Matrigel™ (BD Biosciences). Les cellules sont ensemencées à raison de 50 000 à 100 000 cellules par chambre selon la lignée cellulaire, pendant 24 à 48h 37 °C sous 5 % CO₂ en suivant les instructions du fournisseur. Les cellules n'ayant pas traversé la membrane sont grattées avec un coton-tige. La fixation des cellules est ensuite réalisée avec du méthanol pendant 5 min puis rincées dans du D-PBS 1X pendant 5 min. La coloration et le montage sont réalisés avec le liquide de montage Vectashiel® *HardSet Mounting Medium* (Vector Labs) contenant du 4',6' diamidino-2-phénylindole (DAPI) permettant le marquage des noyaux. Celui-ci va permettre de compter les cellules à l'aide d'un microscope et d'une lampe à ultra-violet.

IX- Tissus

1- Modèles murins

Le modèle murin Pdx1-Cre ; LstopL-Kras^{G12D} est un modèle de cancérogenèse pancréatique qui développe des lésions préneoplasiques PanIN de bas grade à partir de 5-6 semaines et de moyen grade à partir de 9-12 semaines semblable à celles retrouvées chez l'homme. A plus faible fréquence on peut retrouver des lésions de haut grade PanIN3 à partir de 12 à 15 semaines et dans moins de 10% des cas un adénocarcinome pancréatique peut se développer. Ce modèle a été développé et décrit par Hingorani et collaborateurs (Hingorani *et al.*, 2003) et le modèle provenant du Dr. D. Tuveson (Cambridge Research Institute, England) est disponible au laboratoire. *Pancreatic and duodenal homeobox 1* (Pdx1) est un facteur de transcription essentiel au développement embryonnaire et il exprimé dans les

cellules progénitrices pancréatiques et donc par toutes les cellules pancréatiques pendant le développement embryonnaire. Le système Cre-lox permet une recombinaison au niveau des sites loxP lorsque la recombinaison Cre est exprimée. Ceci va permettre d'exprimer un Kras constitutivement actif dans l'ensemble des cellules pancréatiques sous la dépendance du promoteur de *Pdx1* qui par la suite ne s'exprime qu'au niveau des cellules canalaire.

Le pancréas de ces souris âgées de 5, 9, 12 et 15 mois a été fixé en formaldéhyde et des copeaux ont été réalisés afin d'étudier l'expression des miARN ou l'expression de MUC1 par qRT-PCR ou immunohistochimie.

2- Modèles Humains

Les tissus humains utilisés proviennent de la Tumorotheque de Lille grâce au Pr E. Leteurtre et au Dr F. Renaud (Centre de Biologie et Pathologie de Lille, Anatomopathologistes, Inserm UMR837-Equipe 5). Vingt tissus inclus en paraffine ont été sélectionnés représentant des adénocarcinomes pancréatiques infiltrants résectionnés. Deux cas de pancréatites chroniques ont été inclus. Les contrôles morphologiques et le recueil des données cliniques et des consentements ont été réalisés. Dix-huit tissus ont pu être exploités. L'expression des miARN a été rapportée au pourcentage de noyaux tumoraux. Le pourcentage de noyaux tumoraux (de 17,5 à 66,5%) correspond au pourcentage de cellules tumorales (de 25 à 70%) multiplié par le pourcentage de tumeur (de 70 à 95%) présent sur chaque lame. Ce rapport peut être utilisé lors de la présence de stroma important comme dans le PDAC et ses échantillons (de 33,5 à 82,5%).

X- Immunohistochimie

1- Manuel : tissus murins

Déparaffinage

Les lames (5 µm) sont déparaffinées par deux bains successifs de xylène pendant 5 min ; puis deux bains d'éthanol 100% (v/v) pendant 5 min ; un bain d'éthanol 95% (v/v) 5 min et enfin un bain d'H₂O pendant 5 min.

Démasquage antigénique

Le démasquage des sites antigéniques est réalisé dans du tampon citrate 1X à pH 6,0 (Dako *Target Retrieval Solution*) durant 1 min 30 en cocotte puis laissé à refroidir pendant 30 min dans le tampon et enfin sous un filet d'H₂O pendant 5 min.

Inhibition des peroxydases endogènes

Les peroxydases endogènes sont inhibées par un traitement pendant 30 min dans un tampon de PBS 1X contenant de l'H₂O₂ 3% (v/v), puis rincées deux fois pendant 5 min dans du PBS 1X.

Saturation - Perméabilisation

Aucune saturation n'est nécessaire avec l'anticorps utilisé dans cette expérience. Les biotines endogènes peuvent être bloquées en utilisant le kit *endogenous biotin blocking kit* (Ventana), afin de réduire le bruit de fond.

Incubation de l'anticorps primaire puis secondaire

L'anticorps primaire (anti-Muc1 Ab5 (MH1), dirigée contre la séquence peptidique SSSLSTNPAAVAATSANL de MUC1-C) est dilué au 1/200^e dans du PBS 1X contenant 1% de BSA (v/v) pendant une heure à T° amb puis rincé 4 fois 5 min avec du PBS 1X. L'anticorps secondaire anti-hamster arménien biotinylé est dilué au 1/1000^e dans du PBS 1X et incubé pendant 1h à T° amb puis rincé 4 fois 5 min avec du PBS 1X.

Complexe tertiaire : avidine-biotine-peroxydase

Les lames sont incubées pendant 5 min à T° amb dans la solution VECTASTAIN® Elit ABC kit (Vector Laboratories) un complexe avidine-biotine couplé à la peroxydase HRP pendant 30 min pour amplifier le signal , puis rincées 6 fois 5 min dans du PBS 1X.

Révélation

La révélation s'effectue avec le 3,3'-diaminobenzidine DAB (Sigma-Aldrich) pendant 1 à 2 min en suivant l'apparition du marquage (marron) au microscope par l'oxydation du DAB par la peroxydase. La réaction est arrêtée par une immersion pendant 1 min de la lame dans de l'eau.

Contre-coloration

La contre-coloration (noyau cellulaire bleu) s'effectue par une solution d'hématoxyline II (Mayer) non diluée (Sigma-Aldrich) pendant 1 min. La lame est rincée abondamment sous l'eau courante puis 2 s dans une solution saturée de carbonate de lithium puis rincée à l'eau.

Montage des lames

Les lames sont déshydratées par un bain d'éthanol 95% (v/v) 5min, puis deux bains d'éthanol 100% (v/v) pendant 5 min ; et deux bains successifs de xylène pendant 5 min. Les lames sont montées avec une lamelle 24x50 et du liquide de montage Pertex (Histolabs).

2- Automatique : xénogreffes et tissus humains

Les lames sont déparaffinées par deux bains successifs de xylène pendant 5 min ; puis deux bains d'éthanol 100% (v/v) pendant 5 min ; un bain d'éthanol 95% (v/v) 5min et enfin un bain d'H₂O pendant 5 min. Le démasquage des sites antigéniques est réalisé dans du tampon citrate à pH 6,0 (Dako *Target Retrieval Solution*) durant 20 min au micro-onde à 700 watts puis laissé à refroidir pendant 30 min dans le tampon et enfin sous un filet d'H₂O pendant 5 min. L'immunohistochimie MUC1 ou MUC4, suivi d'une révélation DAB (*iVIEW detection kit*), suivie d'une contre-coloration à l'hématoxyline I (Gill, *Bluing Reagent*, Vantana) est réalisée sur un automate Nexes (ES, Ventana Medical Systems). La mise au point des anticorps est également en cours sur le Benchmark modèle GX (Ventana). Seul l'ajout de l'anticorps primaire n'est pas automatisé sur l'appareil et doit être fait manuellement en plus des deux premières étapes. L'anticorps primaire anti-MUC1 (M8, Dr D. Swallow) est dilué au 1/50^e et l'anticorps anti-MUC4 (8G7, sc-53945, Santa Cruz) est dilué au 1/100^{ème} dans la solution de dilution commerciale (*Antibody diluent*, Ventana). Les lames sont ensuite déshydratées et montées comme précédemment décrit.

XI- Xénogreffes, injections intratumorales et intrapéritonéales

1- Lignées stables

Les cellules sont reprises dans du milieu RPMI ou DMEM (Invitrogen™) sans SVF ni antibiotiques à raison de 2x10⁶ cellules pour les Capan-2 stables et 3x10⁶ pour les MiaPaCa-2 dans 100 µl de milieu. Du Matrigel™ (BD Bioscience) maintenu sur glace y est ajouté à raison de 100 µl. Le mélange cellules-Matrigel de 200 µl est ensuite injecté avec une seringue stérile sur le flanc des souris Scid C57BL6 (Charles River) âgées de 8 semaines. Les souris

sont maintenues dans un environnement stérile. La taille des tumeurs est mesurée deux fois par semaine à l'aide d'un pied à coulisse électronique. Le sacrifice des souris s'effectue par dislocation cervicale. Une exploration histologique et une recherche d'éventuelles métastases sont effectuées en parallèle du prélèvement de la tumeur. La tumeur est fixée en formaldéhyde pour extraction de miARN et immunohistochimie, un morceau peut être congelé en azote liquide puis conservé à -80°C pour l'étude de l'expression des ARNm.

2- Lignées parentales suivi d'une injection intratumorale

Le protocole est similaire à celui décrit pour les lignées stables. Les cellules xenogreffées correspondent aux lignées parentales Capan-2 (2×10^6 cellules), Capan-1 (1×10^6 cellules) et MiaPaCa-2 (3×10^6 cellules). Lorsque la tumeur atteint 300 mm^3 environ, une injection en intratumoral du miARN contenu dans un vecteur d'expression est réalisée à raison de $10 \mu\text{g}$ par tumeur. Brièvement, $10 \mu\text{g}$ de vecteur est dilué dans $25 \mu\text{l}$ de glucose 5% (v/v) stérile à une concentration finale de $0,4 \mu\text{g}$ d'ADN par μl de glucose. A cette solution est ajouté $1,8 \mu\text{l}$ d'ExGen 500 (polymère de polyéthylèneimine, PEI 22kDa) selon le protocole du fournisseur Euromedex. Ce mélange est injecté avec une seringue stérile dans la tumeur.

3- Injection en intrapéritonéal de miARN

Une injection de $20 \mu\text{g}$ de miARN (comme décrit précédemment) par semaine pendant 4 semaines en intrapéritonéal dans le modèle murin Pdx1-Cre ; LstopL-Kras^{G12D} couplé à un traitement chronique de céruléine (injection de $0,1 \text{ ml}$ d'une solution à $5 \mu\text{g/ml}$ en PBS 1X) est réalisée sur des souris âgées de 5 mois. La céruléine est un analogue de la cholécystokinine qui stimule l'activation des enzymes digestives, ce qui entraîne l'auto-digestion pancréatique et des dommages cellulaires associés à l'inflammation. Ce traitement procure un terrain favorable au développement accéléré des lésions PanIN dans ce modèle murin (Hingorani *et al.*, 2003; Guerra *et al.*, 2007). Le pancréas, le duodénum et le foie ont été fixés en formaldéhyde et analysés afin de valider la surexpression du miARN et d'étudier l'expression de MUC1 en immunohistochimie.

XII- Tests statistiques

Les tests statistiques ont été réalisés grâce au logiciel GraphPad Prism 4. Un test statistique One-Way ANOVA est réalisé, suivi d'un test « post hoc » Tukey ; ou un t-test de student ; ou un test Wilcoxon. La différence est considérée comme significative si $p < 0,05$ (*) ou $p < 0,01$ (**) ou $p < 0.001$ (***)).

Bibliographie

A

- ABBA, M.C., NUNEZ, M.I., COLUSSI, A.G., CROCE, M.V., SEGAL-EIRAS, A. & ALDAZ, C.M. (2006) GATA3 protein as a MUC1 transcriptional regulator in breast cancer cells. *Breast cancer research: BCR* **8**, R64.
- ABE, M., SIDDIQUI, J. & KUFU, D. (1989) Sequence analysis of the 5' region of the human DF3 breast carcinoma-associated antigen gene. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **165**, 644–649.
- AHMAD, R., ALAM, M., RAJABI, H. & KUFU, D. (2012) The MUC1-C Oncoprotein Binds to the BH3 Domain of the Proapoptotic BAX Protein and Blocks BAX Function. *The Journal of biological chemistry*.
- AHMAD, R., RAINA, D., JOSHI, M.D., KAWANO, T., REN, J., KHARBANDA, S. & KUFU, D. (2009) MUC1-C oncoprotein functions as a direct activator of the nuclear factor-kappaB p65 transcription factor. *Cancer Research* **69**, 7013–7021.
- AHMAD, R., RAINA, D., TRIVEDI, V., REN, J., RAJABI, H., KHARBANDA, S. & KUFU, D. (2007) MUC1 oncoprotein activates the I kappa B kinase beta complex and constitutive NF-kappaB signalling. *Nature Cell Biology* **9**, 1419–1427.
- AHMAD, R., RAJABI, H., KOSUGI, M., JOSHI, M.D., ALAM, M., VASIR, B., KAWANO, T., KHARBANDA, S. & KUFU, D. (2011) MUC1-C oncoprotein promotes STAT3 activation in an autoinductive regulatory loop. *Science signaling* **4**, ra9.
- AMBROS, V. (2003) A uniform system for microRNA annotation. *RNA* **9**, 277–279.
- AMUNDADOTTIR, L., KRAFT, P., STOLZENBERG-SOLOMON, R.Z., FUCHS, C.S., PETERSEN, G.M., ARSLAN, A.A., ET AL. (2009) Genome-wide association study identifies variants in the ABO locus associated with susceptibility to pancreatic cancer. *Nature Genetics* **41**, 986–990.
- ANASTAS, J.N. & MOON, R.T. (2013) WNT signalling pathways as therapeutic targets in cancer. *Nature Reviews. Cancer* **13**, 11–26.
- ARKLIE, J., TAYLOR-PAPADIMITRIOU, J., BODMER, W., EGAN, M. & MILLIS, R. (1981) Differentiation antigens expressed by epithelial cells in the lactating breast are also detectable in breast cancers. *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer* **28**, 23–29.
- ARSLAN, A.A., HELZLSOUER, K.J., KOOPERBERG, C., SHU, X.-O., STEPLOWSKI, E., BUENO-DE-MESQUITA, H.B., ET AL. (2010) Anthropometric measures, body mass index, and pancreatic cancer: a pooled analysis from the Pancreatic Cancer Cohort Consortium (PanScan). *Archives of Internal Medicine* **170**, 791–802.
- AUBERT, S., FAUQUETTE, V., HÉMON, B., LEPOIVRE, R., BRIEZ, N., BERNARD, D., VAN SEUNINGEN, I., LEROY, X. & PERRAIS, M. (2009) MUC1, a new hypoxia inducible factor target gene, is an actor in clear renal cell carcinoma tumor progression. *Cancer Research* **69**, 5707–5715.

B

- BALAGUÉ, C., AUDIÉ, J.-P., PORCHET, N. & REAL, F.X. (1995) In situ hybridization shows distinct patterns of mucin gene expression in normal, benign, and malignant pancreas tissues. *Gastroenterology* **109**, 953–964.
- BANDRÉS, E., CUBEDO, E., AGIRRE, X., MALUMBRES, R., ZÁRATE, R., RAMIREZ, N., ABAJO, A., NAVARRO, A., MORENO, I., MONZÓ, M. & GARCÍA-FONCILLAS, J. (2006) Identification by Real-time PCR of 13 mature microRNAs differentially expressed in colorectal cancer and non-tumoral tissues. *Molecular Cancer* **5**, 29.
- BAO, B., ALI, S., AHMAD, A., LI, Y., BANERJEE, S., KONG, D., ABOUKAMEEL, A., MOHAMMAD, R., VAN BUREN, E., AZMI, A. & SARKAR, F.H. (2014) Differentially expressed miRNAs in cancer stem like cells: Markers for tumor cell aggressiveness of pancreatic cancer. *Stem cells and development*.
- BARDEESY, N. & DEPINHO, R.A. (2002) Pancreatic cancer biology and genetics. *Nature Reviews Cancer* **2**, 897–909.
- BARTEL, D.P. (2004) MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* **116**, 281–297.
- BARTEL, D.P. (2009) MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* **136**, 215–233.
- BEATSON, R.E., TAYLOR-PAPADIMITRIOU, J. & BURCHELL, J.M. (2010) MUC1 immunotherapy. *Immunotherapy* **2**, 305–327.
- BERA, A., VENKATASUBBARAO, K., MANOHARAN, M.S., HILL, P. & FREEMAN, J.W. (2014) A miRNA Signature of Chemoresistant Mesenchymal Phenotype Identifies Novel Molecular Targets Associated with Advanced Pancreatic Cancer. *PloS One* **9**, e106343.
- BESMER, D.M., CURRY, J.M., ROY, L.D., TINDER, T.L., SAHRAEI, M., SCHETTINI, J., HWANG, S.-I., LEE, Y.Y., GENDLER, S.J. & MUKHERJEE, P. (2011) Pancreatic ductal adenocarcinoma mice lacking mucin 1 have a profound defect in tumor growth and metastasis. *Cancer Research* **71**, 4432–4442.
- BLIXT, O., BUETI, D., BURFORD, B., ALLEN, D., JULIEN, S., HOLLINGSWORTH, M., GAMMERMAN, A., FENTIMAN, I., TAYLOR-PAPADIMITRIOU, J. & BURCHELL, J.M. (2011) Autoantibodies to aberrantly glycosylated MUC1 in early stage breast cancer are associated with a better prognosis. *Breast cancer research: BCR* **13**, R25.
- BLOOMSTON, M., FRANKEL, W.L., PETROCCA, F., VOLINIA, S., ALDER, H., HAGAN, J.P., LIU, C.-G., BHATT, D., TACCIOLI, C. & CROCE, C.M. (2007) MicroRNA Expression Patterns to Differentiate Pancreatic Adenocarcinoma From Normal Pancreas and Chronic Pancreatitis. *JAMA: The Journal of the American Medical Association* **297**, 1901–1908.
- BOGDAN, C. (2001) Nitric oxide and the immune response. *Nature Immunology* **2**, 907–916.

- BOMMER, G.T., GERIN, I., FENG, Y., KACZOROWSKI, A.J., KUICK, R., LOVE, R.E., ZHAI, Y., GIORDANO, T.J., QIN, Z.S., MOORE, B.B., MACDOUGALD, O.A., CHO, K.R. & FEARON, E.R. (2007) p53-mediated activation of miRNA34 candidate tumor-suppressor genes. *Current biology: CB* **17**, 1298–1307.
- BORCHERT, G.M., LANIER, W. & DAVIDSON, B.L. (2006) RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nature Structural & Molecular Biology* **13**, 1097–1101.
- BOSETTI, C., BERTUCCIO, P., NEGRI, E., LA VECCHIA, C., ZEEGERS, M.P. & BOFFETTA, P. (2012) Pancreatic cancer: overview of descriptive epidemiology. *Molecular Carcinogenesis* **51**, 3–13.
- BRACKEN, C.P., GREGORY, P.A., KOLESNIKOFF, N., BERT, A.G., WANG, J., SHANNON, M.F. & GOODALL, G.J. (2008) A double-negative feedback loop between ZEB1-SIP1 and the microRNA-200 family regulates epithelial-mesenchymal transition. *Cancer Research* **68**, 7846–7854.
- BRAMWELL, M.E., WISEMAN, G. & SHOTTON, D.M. (1986) Electron-microscopic studies of the CA antigen, epitectin. *Journal of Cell Science* **86**, 249–261.
- BRUNET VEGA, A., PERICAY, C., MOYA, I., FERRER, A., DOTOR, E., PISA, A., CASALOTS, À., SERRA-ARACIL, X., OLIVA, J.-C., RUIZ, A. & SAIGÍ, E. (2013) microRNA expression profile in stage III colorectal cancer: circulating miR-18a and miR-29a as promising biomarkers. *Oncology Reports* **30**, 320–326.
- BUC, E. & SAUVANET, A. (2011) Duodénopancréatectomie céphalique. *EMC - Techniques chirurgicales - Appareil digestif* **6**, 1–24.
- BURRIS, H.A., MOORE, M.J., ANDERSEN, J., GREEN, M.R., ROTHENBERG, M.L., MODIANO, M.R., CRIPPS, M.C., PORTENOY, R.K., STORNILO, A.M., TARASSOFF, P., NELSON, R., DORR, F.A., STEPHENS, C.D. & VON HOFF, D.D. (1997) Improvements in survival and clinical benefit with gemcitabine as first-line therapy for patients with advanced pancreas cancer: a randomized trial. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* **15**, 2403–2413.
- BURRIS, H. & STORNILO, A.M. (1997) Assessing clinical benefit in the treatment of pancreas cancer: gemcitabine compared to 5-fluorouracil. *European Journal of Cancer (Oxford, England: 1990)* **33 Suppl 1**, S18–S22.
- BUTTS, C., SOCINSKI, M.A., MITCHELL, P.L., THATCHER, N., HAVEL, L., KRZAKOWSKI, M., ET AL. (2014) Tecemotide (L-BLP25) versus placebo after chemoradiotherapy for stage III non-small-cell lung cancer (START): a randomised, double-blind, phase 3 trial. *The Lancet Oncology* **15**, 59–68.

C

- CARRAWAY, K.L., PRICE-SCHIAVI, S.A., KOMATSU, M., IDRIS, N., PEREZ, A., LI, P., JEPSON, S., ZHU, X., CARVAJAL, M.E. & CARRAWAY, C.A. (2000) Multiple facets of sialomucin complex/MUC4, a membrane mucin and erbb2 ligand, in tumors and tissues (Y2K update). *Frontiers in Bioscience: A Journal and Virtual Library* **5**, D95–D107.

- CARTWRIGHT, T.H., COHN, A., VARKEY, J.A., CHEN, Y.-M., SZATROWSKI, T.P., COX, J.V. & SCHULZ, J.J. (2002) Phase II study of oral capecitabine in patients with advanced or metastatic pancreatic cancer. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* **20**, 160–164.
- CHAIKA, N.V., GEBREGIWORGIS, T., LEWALLEN, M.E., PUROHIT, V., RADHAKRISHNAN, P., LIU, X., ZHANG, B., MEHLA, K., BROWN, R.B., CAFFREY, T., YU, F., JOHNSON, K.R., POWERS, R., HOLLINGSWORTH, M.A. & SINGH, P.K. (2012) MUC1 mucin stabilizes and activates hypoxia-inducible factor 1 alpha to regulate metabolism in pancreatic cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**, 13787–13792.
- CHARI, S.T., LEIBSON, C.L., RABE, K.G., RANSOM, J., DE ANDRADE, M. & PETERSEN, G.M. (2005) Probability of pancreatic cancer following diabetes: a population-based study. *Gastroenterology* **129**, 504–511.
- CHATTERJEE, A., CHATTOPADHYAY, D. & CHAKRABARTI, G. (2014) miR-17-5p downregulation contributes to paclitaxel resistance of lung cancer cells through altering beclin1 expression. *PloS One* **9**, e95716.
- CHEEVER, M.A., ALLISON, J.P., FERRIS, A.S., FINN, O.J., HASTINGS, B.M., HECHT, T.T., MELLMAN, I., PRINDIVILLE, S.A., VINER, J.L., WEINER, L.M. & MATRISIAN, L.M. (2009) The prioritization of cancer antigens: a national cancer institute pilot project for the acceleration of translational research. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* **15**, 5323–5337.
- CHEN, C., XIANG, H., PENG, Y.-L., PENG, J. & JIANG, S.-W. (2014) Mature miR-183, negatively regulated by transcription factor GATA3, promotes 3T3-L1 adipogenesis through inhibition of the canonical Wnt/ -catenin signaling pathway by targeting LRP6. *Cellular signalling* **26**, 1155–1165.
- CHENDRIMADA, T.P., GREGORY, R.I., KUMARASWAMY, E., NORMAN, J., COOCH, N., NISHIKURA, K. & SHIEKHATTAR, R. (2005) TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature* **436**, 740–744.
- CHEN, J., LI, Q., AN, Y., LV, N., XUE, X., WEI, J., JIANG, K., WU, J., GAO, W., QIAN, Z., DAI, C., XU, Z. & MIAO, Y. (2013) CEACAM6 induces epithelial-mesenchymal transition and mediates invasion and metastasis in pancreatic cancer. *International Journal of Oncology* **43**, 877–885.
- CHEN, J., TIAN, W., CAI, H., HE, H. & DENG, Y. (2012) Down-regulation of microRNA-200c is associated with drug resistance in human breast cancer. *Medical Oncology (Northwood, London, England)* **29**, 2527–2534.
- CHEN, W., GUO, W., LI, M., SHI, D., TIAN, Y., LI, Z., WANG, J., FU, L., XIAO, X., LIU, Q.Q., WANG, S., HUANG, W. & DENG, W. (2013) Upregulation of Cleavage and Polyadenylation Specific Factor 4 in Lung Adenocarcinoma and Its Critical Role for Cancer Cell Survival and Proliferation. *PLoS ONE* **8**, e82728.

- CHEN, Y., PENG, W., LU, Y., CHEN, J., ZHU, Y.Y. & XI, T. (2013) MiR-200a enhances the migrations of A549 and SK-MES-1 cells by regulating the expression of TSPAN1. *Journal of Biosciences* **38**, 523–532.
- CHEN, Y., ZHANG, L. & HAO, Q. (2013) Candidate microRNA biomarkers in human epithelial ovarian cancer: systematic review profiling studies and experimental validation. *Cancer Cell International* **13**, 86.
- CHEN, Y., ZHU, X., ZHANG, X., LIU, B. & HUANG, L. (2010) Nanoparticles modified with tumor-targeting scFv deliver siRNA and miRNA for cancer therapy. *Molecular Therapy: The Journal of the American Society of Gene Therapy* **18**, 1650–1656.
- CHI, S.W., HANNON, G.J. & DARNELL, R.B. (2012) An alternative mode of microRNA target recognition. *Nature Structural & Molecular Biology* **19**, 321–327.
- CHI, S.W., ZANG, J.B., MELE, A. & DARNELL, R.B. (2009) Argonaute HITS-CLIP decodes microRNA[mRNA] interaction maps. *Nature* **460**, 479–486.
- CIMMINO, A., CALIN, G.A., FABBRI, M., IORIO, M.V., FERRACIN, M., SHIMIZU, M., WOJCIK, S.E., AQEILAN, R.I., ZUPO, S., DONO, M., RASSENTI, L., ALDER, H., VOLINIA, S., LIU, C.-G., KIPPS, T.J., NEGRINI, M. & CROCE, C.M. (2005) miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**, 13944–13949.
- CONG, N., DU, P., ZHANG, A., SHEN, F., SU, J., PU, P., WANG, T., ZJANG, J., KANG, C. & ZHANG, Q. (2013) Downregulated microRNA-200a promotes EMT and tumor growth through the wnt/ -catenin pathway by targeting the E-cadherin repressors ZEB1/ZEB2 in gastric adenocarcinoma. *Oncology Reports* **29**, 1579–1587.
- CONROY, T., DESSEIGNE, F., YCHOU, M., BOUCHE, O., GUIMBAUD, R., BECOUARN, Y., ET AL. (2011) FOLFIRINOX versus gemcitabine for metastatic pancreatic cancer. *The New England journal of medicine* **364**, 1817–1825.
- COTE, G.A., GORE, A.J., MCELYEA, S.D., HEATHERS, L.E., XU, H., SHERMAN, S. & KORC, M. (2014) A Pilot Study to Develop a Diagnostic Test for Pancreatic Ductal Adenocarcinoma Based on Differential Expression of Select miRNA in Plasma and Bile. *The American Journal of Gastroenterology* **109**, 1942–1952.
- COWAN, R.W. & MAITRA, A. (2014) Genetic progression of pancreatic cancer. *Cancer journal (Sudbury, Mass.)* **20**, 80–84.
- CUNNINGHAM, D., CHAU, I., STOCKEN, D.D., VALLE, J.W., SMITH, D., STEWARD, W., ET AL. (2009) Phase III randomized comparison of gemcitabine versus gemcitabine plus capecitabine in patients with advanced pancreatic cancer. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* **27**, 5513–5518.

D

- DAVALOS, V., MOUTINHO, C., VILLANUEVA, A., BOQUE, R., SILVA, P., CARNEIRO, F. & ESTELLER, M. (2012) Dynamic epigenetic regulation of the microRNA-200 family mediates epithelial and mesenchymal transitions in human tumorigenesis. *Oncogene* **31**, 2062–2074.
- DEER, E.L., GONZALEZ-HERNANDEZ, J., COURSEN, J.D., SHEA, J.E., NGATIA, J., SCAIFE, C.L., FIRPO, M.A. & MULVIHILL, S.J. (2010) Phenotype and Genotype of Pancreatic Cancer Cell Lines. *Pancreas* **39**, 425–435.
- DEKKER, J., ROSSEN, J.W.A., BÜLLER, H.A. & EINERHAND, A.W.C. (2002) The MUC family: an obituary. *Trends in biochemical sciences* **27**, 126–131.
- DELPU, Y., LULKA, H., SICARD, F., SAINT-LAURENT, N., LOPEZ, F., HANOUN, N., BUSCAIL, L., CORDELIER, P. & TORRISANI, J. (2013) The Rescue of miR-148a Expression in Pancreatic Cancer: An Inappropriate Therapeutic Tool. *PloS one* **8**, e55513.
- DELPU, Y., HANOUN, N., LULKA, H., SICARD, F., SELVES, J., BUSCAIL, L., TORRISANI, J. & CORDELIER, P. (2011) Genetic and epigenetic alterations in pancreatic carcinogenesis. *Current Genomics* **12**, 15–24.
- DELPU, Y., LULKA, H., SICARD, F., SAINT-LAURENT, N., LOPEZ, F., HANOUN, N., BUSCAIL, L., CORDELIER, P. & TORRISANI, J. (2013) The Rescue of miR-148a Expression in Pancreatic Cancer: An Inappropriate Therapeutic Tool. *PloS one* **8**, e55513.
- DERYNCK, R., AKHURST, R.J. & BALMAIN, A. (2001) TGF-beta signaling in tumor suppression and cancer progression. *Nature Genetics* **29**, 117–129.
- DHAYAT, S.A., MARDIN, W.A., KÖHLER, G., BAHDE, R., VOWINKEL, T., WOLTERS, H., SENNINGER, N., HAIER, J. & MEES, S.T. (2014) The microRNA-200 family--a potential diagnostic marker in hepatocellular carcinoma? *Journal of Surgical Oncology* **110**, 430–438.
- DING, X., PARK, S.I., MCCAULEY, L.K. & WANG, C.-Y. (2013) Signaling between transforming growth factor (TGF-) and transcription factor SNAI2 represses expression of microRNA miR-203 to promote epithelial-mesenchymal transition and tumor metastasis. *The Journal of Biological Chemistry* **288**, 10241–10253.
- DOKMAK, S. & SAUVANET, A. (2011) Pancréatectomies gauches. *EMC - Techniques chirurgicales - Appareil digestif* **6**, 1–15.
- DONG, J., ZHAO, Y.-P., ZHOU, L., ZHANG, T.-P. & CHEN, G. (2011) Bcl-2 upregulation induced by miR-21 via a direct interaction is associated with apoptosis and chemoresistance in MIA PaCa-2 pancreatic cancer cells. *Archives of Medical Research* **42**, 8–14.
- DUELL, E.J., LUCENTEFORTE, E., OLSON, S.H., BRACCI, P.M., LI, D., RISCH, H.A., ET AL. (2012) Pancreatitis and pancreatic cancer risk: a pooled analysis in the International Pancreatic Cancer Case-Control Consortium (PanC4). *Annals of oncology: official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* **23**, 2964–2970.

- DU, Q., ZHANG, X., CARDINAL, J., CAO, Z., GUO, Z., SHAO, L. & GELLER, D.A. (2009) Wnt/beta-catenin signaling regulates cytokine-induced human inducible nitric oxide synthase expression by inhibiting nuclear factor-kappaB activation in cancer cells. *Cancer Research* **69**, 3764–3771.
- DUXBURY, M.S., MATROS, E., CLANCY, T., BAILEY, G., DOFF, M., ZINNER, M.J., ASHLEY, S.W., MAITRA, A., REDSTON, M. & WHANG, E.E. (2005) CEACAM6 is a novel biomarker in pancreatic adenocarcinoma and PanIN lesions. *Annals of Surgery* **241**, 491–496.
- DWEEP, H., STICHT, C., PANDEY, P. & GRETZ, N. (2011) miRWalk--database: prediction of possible miRNA binding sites by 'walking' the genes of three genomes. *Journal of Biomedical Informatics* **44**, 839–847.

E

- EADES, G., YANG, M., YAO, Y., ZHANG, Y. & ZHOU, Q. (2011) miR-200a regulates Nrf2 activation by targeting Keap1 mRNA in breast cancer cells. *The Journal of Biological Chemistry* **286**, 40725–40733.
- EADES, G., YAO, Y., YANG, M., ZHANG, Y., CHUMSRI, S. & ZHOU, Q. (2011) miR-200a regulates SIRT1 expression and epithelial to mesenchymal transition (EMT)-like transformation in mammary epithelial cells. *The Journal of Biological Chemistry* **286**, 25992–26002.
- ENRIGHT, A.J., JOHN, B., GAUL, U., TUSCHL, T., SANDER, C. & MARKS, D.S. (2003) MicroRNA targets in *Drosophila*. *Genome Biology* **5**, R1.
- ESAU, C., DAVIS, S., MURRAY, S.F., YU, X.X., PANDEY, S.K., PEAR, M., WATTS, L., BOOTEN, S.L., GRAHAM, M., MCKAY, R., SUBRAMANIAM, A., PROPP, S., LOLLO, B.A., FREIER, S., BENNETT, C.F., BHANOT, S. & MONIA, B.P. (2006) miR-122 regulation of lipid metabolism revealed by in vivo antisense targeting. *Cell Metabolism* **3**, 87–98.
- ESQUELA-KERSCHER, A. & SLACK, F.J. (2006) Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nature Reviews. Cancer* **6**, 259–269.
- EULALIO, A., HUNTZINGER, E. & IZAURRALDE, E. (2008) GW182 interaction with Argonaute is essential for miRNA-mediated translational repression and mRNA decay. *Nature Structural & Molecular Biology* **15**, 346–353.
- EVSYUKOVA, I., BRADRICK, S.S., GREGORY, S.G. & GARCIA-BLANCO, M.A. (2013) Cleavage and polyadenylation specificity factor 1 (CPSF1) regulates alternative splicing of interleukin 7 receptor (IL7R) exon 6. *RNA (New York, N.Y.)* **19**, 103–115.
- EYHOLZER, M., SCHMID, S., WILKENS, L., MUELLER, B.U. & PABST, T. (2010) The tumour-suppressive miR-29a/b1 cluster is regulated by CEBPA and blocked in human AML. *British Journal of Cancer* **103**, 275–284.

F

- FABBRI, M., GARZON, R., CIMMINO, A., LIU, Z., ZANESI, N., CALLEGARI, E., LIU, S., ALDER, H., COSTINEAN, S., FERNANDEZ-CYMERING, C., VOLINIA, S., GULER, G., MORRISON, C.D., CHAN, K.K., MARCUCCI, G., CALIN, G.A., HUEBNER, K. & CROCE, C.M. (2007) MicroRNA-29 family reverts aberrant methylation in lung cancer by targeting DNA methyltransferases 3A and 3B. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **104**, 15805–15810.
- FELDMANN, G., BEATY, R., HRUBAN, R.H. & MAITRA, A. (2007) Molecular genetics of pancreatic intraepithelial neoplasia. *Journal of Hepato-Biliary-Pancreatic Surgery* **14**, 224–232.
- FENG, X., WANG, Z., FILLMORE, R. & XI, Y. (2014) MiR-200, a new star miRNA in human cancer. *Cancer Letters* **344**, 166–173.
- FESSLER, S.P., WOTKOWICZ, M.T., MAHANTA, S.K. & BAMDAD, C. (2009) MUC1* is a determinant of trastuzumab (Herceptin) resistance in breast cancer cells. *Breast Cancer Research and Treatment* **118**, 113–124.
- FOGELMAN, D., JAFARI, M., VARADHACHARY, G.R., XIONG, H., BULLOCK, S., OZER, H., LIN, E., MORRIS, J., CUNNINGHAM, P., BENNETT, B., ABBRUZZESE, J.L. & WOLFF, R.A. (2011) Bevacizumab plus gemcitabine and oxaliplatin as first-line therapy for metastatic or locally advanced pancreatic cancer: a phase II trial. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* **68**, 1431–1438.
- FRAMPTON, A.E., CASTELLANO, L., COLOMBO, T., GIOVANNETTI, E., KRELL, J., JACOB, J., ET AL. (2013) MicroRNAs Co-operatively Inhibit a Network of Tumor Suppressor Genes to Promote Pancreatic Tumor Growth and Progression. *Gastroenterology*.
- FRAMPTON, A.E., GIOVANNETTI, E., JAMIESON, N.B., KRELL, J., GALL, T.M., STEBBING, J., JIAO, L.R. & CASTELLANO, L. (2014) A microRNA meta-signature for pancreatic ductal adenocarcinoma. *Expert Review of Molecular Diagnostics* **14**, 267–271.
- FRIEDMAN, R.C., FARH, K.K.-H., BURGE, C.B. & BARTEL, D.P. (2009) Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Research* **19**, 92–105.
- FUNAMIZU, N., KAMATA, Y., MISAWA, T., UWAGAWA, T., LACY, C.R., YANAGA, K. & MANOME, Y. (2012) Hydroxyurea decreases gemcitabine resistance in pancreatic carcinoma cells with highly expressed ribonucleotide reductase. *Pancreas* **41**, 107–113.
- FURUKAWA, T., DUGUID, W.P., ROSENBERG, L., VIALLET, J., GALLOWAY, D.A. & TSAO, M.S. (1996) Long-term culture and immortalization of epithelial cells from normal adult human pancreatic ducts transfected by the E6E7 gene of human papilloma virus 16. *The American Journal of Pathology* **148**, 1763.

G

- GARAJOVÁ, I., LE LARGE, T.Y., FRAMPTON, A.E., ROLFO, C., VOORTMAN, J. & GIOVANNETTI, E. (2014) Molecular Mechanisms Underlying the Role of MicroRNAs in the Chemoresistance of Pancreatic Cancer. *BioMed Research International* **2014**, 678401.
- GAROFALO, M. & CROCE, C.M. (2013) MicroRNAs as therapeutic targets in chemoresistance. *Drug Resistance Updates: Reviews and Commentaries in Antimicrobial and Anticancer Chemotherapy* **16**, 47–59.
- GAROFALO, M., LEVA, G.D. & CROCE, C.M. (2014) microRNAs as Anti-Cancer Therapy. *Current Pharmaceutical Design* **20**, 5328–5335.
- GAROFALO, M., ROMANO, G., DI LEVA, G., NUOVO, G., JEON, Y.-J., NGANKEU, A., SUN, J., LOVAT, F., ALDER, H., CONDORELLI, G., ENGELMAN, J.A., ONO, M., RHO, J.K., CASCIONE, L., VOLINIA, S., NEPHEW, K.P. & CROCE, C.M. (2011) EGFR and MET receptor tyrosine kinase-altered microRNA expression induces tumorigenesis and gefitinib resistance in lung cancers. *Nature Medicine*.
- GARZON, R., GAROFALO, M., MARTELLI, M.P., BRIESEWITZ, R., WANG, L., FERNANDEZ-CYMERING, C., ET AL. (2008) Distinctive microRNA signature of acute myeloid leukemia bearing cytoplasmic mutated nucleophosmin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 3945–3950.
- GARZON, R., MARCUCCI, G. & CROCE, C.M. (2010) Targeting microRNAs in cancer: rationale, strategies and challenges. *Nat Rev Drug Discov* **9**, 775–789.
- GARZON, R., VOLINIA, S., LIU, C.-G., FERNANDEZ-CYMERING, C., PALUMBO, T., PICHIORRI, F., FABBRI, M., COOMBES, K., ALDER, H., NAKAMURA, T., FLOMENBERG, N., MARCUCCI, G., CALIN, G.A., KORNBLAU, S.M., KANTARJIAN, H., BLOOMFIELD, C.D., ANDREEFF, M. & CROCE, C.M. (2008) MicroRNA signatures associated with cytogenetics and prognosis in acute myeloid leukemia. *Blood* **111**, 3183–3189.
- GAYRAL, M., JO, S., HANOUN, N., VIGNOLLE-VIDONI, A., LULKA, H., DELPU, Y., MEULLE, A., DUFRESNE, M., HUMEAU, M., CHALRET DU RIEU, M., BOURNET, B., SÈLVES, J., GUIMBAUD, R., CARRÈRE, N., BUSCAIL, L., TORRISANI, J. & CORDELIER, P. (2014) MicroRNAs as emerging biomarkers and therapeutic targets for pancreatic cancer. *World journal of gastroenterology: WJG* **20**, 11199–11209.
- GEBESHUBER, C.A., ZATLOUKAL, K. & MARTINEZ, J. (2009) miR-29a suppresses tristetraproline, which is a regulator of epithelial polarity and metastasis. *EMBO Reports* **10**, 400–405.
- GENDLER, S.J. & SPICER, A.P. (1995) Epithelial mucin genes. *Annual review of physiology* **57**, 607–634.

- GNEMMI, V., BOUILLEZ, A., GAUDELLOT, K., HÉMON, B., RINGOT, B., POTTIER, N., GLOWACKI, F., VILLERS, A., VINDRIEUX, D., CAUFFIEZ, C., SEUNINGEN, I.V., BERNARD, D., LEROY, X., AUBERT, S. & PERRAIS, M. (2014) MUC1 drives epithelial–mesenchymal transition in renal carcinoma through Wnt/ -catenin pathway and interaction with SNAIL promoter. *Cancer Letters* **346**, 225–236.
- GONG, J., LI, J., WANG, Y., LIU, C., JIA, H., JIANG, C., WANG, Y., LUO, M., ZHAO, H., DONG, L., SONG, W., WANG, F., WANG, W., ZHANG, J. & YU, J. (2013) Characterization of microRNA-29 family expression and investigation of their mechanistic roles in gastric cancer. *Carcinogenesis*, bgt337.
- GRAVES, C.R.L., ROBERTSON, J.F.R., MURRAY, A., PRICE, M.R. & CHAPMAN, C.J. (2005) Malignancy-induced autoimmunity to MUC1: initial antibody characterization. *The Journal of Peptide Research: Official Journal of the American Peptide Society* **66**, 357–363.
- GREENHALF, W., GHANEH, P., NEOPTOLEMOS, J.P., PALMER, D.H., COX, T.F., LAMB, R.F., ET AL. (2014) Pancreatic cancer hENT1 expression and survival from gemcitabine in patients from the ESPAC-3 trial. *Journal of the National Cancer Institute* **106**, djt347.
- GREENLEE, R.T., HILL-HARMON, M.B., MURRAY, T. & THUN, M. (2001) Cancer statistics, 2001. *CA: a cancer journal for clinicians* **51**, 15–36.
- GREGORY, P.A., BERT, A.G., PATERSON, E.L., BARRY, S.C., TSYKIN, A., FARSHID, G., VADAS, M.A., KHEW-GOODALL, Y. & GOODALL, G.J. (2008) The miR-200 family and miR-205 regulate epithelial to mesenchymal transition by targeting ZEB1 and SIP1. *Nature Cell Biology* **10**, 593–601.
- GREGORY, P.A., BRACKEN, C.P., BERT, A.G. & GOODALL, G.J. (2008) MicroRNAs as regulators of epithelial-mesenchymal transition. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)* **7**, 3112–3118.
- GREITHER, T., GROCHOLA, L.F., UDELNOW, A., LAUTENSCHLÄGER, C., WÜRL, P. & TAUBERT, H. (2010) Elevated expression of microRNAs 155, 203, 210 and 222 in pancreatic tumors is associated with poorer survival. *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer* **126**, 73–80.
- GRONNIER, C., BRUYÈRE, E., LAHDAOUI, F., JONCKHEERE, N., PERRAIS, M., LETEURTRE, E., PIESSEN, G., MARIETTE, C. & VAN SEUNINGEN, I. (2014) The MUC1 mucin regulates the tumorigenic properties of human esophageal adenocarcinomatous cells. *Biochimica Et Biophysica Acta*.
- GUERRA, C., SCHUHMACHER, A.J., CAÑAMERO, M., GRIPPO, P.J., VERDAGUER, L., PÉREZ-GALLEGO, L., DUBUS, P., SANDGREN, E.P. & BARBACID, M. (2007) Chronic pancreatitis is essential for induction of pancreatic ductal adenocarcinoma by K-Ras oncogenes in adult mice. *Cancer Cell* **11**, 291–302.
- GUO, Z., SHAO, L., ZHENG, L., DU, Q., LI, P., JOHN, B. & GELLER, D.A. (2012) miRNA-939 regulates human inducible nitric oxide synthase posttranscriptional gene expression in human hepatocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**, 5826–5831.

H

- HAFNER, M., LIANOGLU, S., TUSCHL, T. & BETEL, D. (2012) Genome-wide identification of miRNA targets by PAR-CLIP. *Methods (San Diego, Calif.)* **58**, 94–105.
- HAMILL, D.R., HOWELL, B., CASSIMERIS, L. & SUPRENANT, K.A. (1998) Purification of a WD Repeat Protein, EMAP, That Promotes Microtubule Dynamics through an Inhibition of Rescue. *Journal of Biological Chemistry* **273**, 9285–9291.
- HA, M. & KIM, V.N. (2014) Regulation of microRNA biogenesis. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*.
- HANISCH, F.G. & MÜLLER, S. (2000) MUC1: the polymorphic appearance of a human mucin. *Glycobiology* **10**, 439–449.
- HAN, J., LEE, Y., YEOM, K.-H., KIM, Y.-K., JIN, H. & KIM, V.N. (2004) The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes & Development* **18**, 3016–3027.
- HAN, Y.-C., PARK, C.Y., BHAGAT, G., ZHANG, J., WANG, Y., FAN, J.-B., LIU, M., ZOU, Y., WEISSMAN, I.L. & GU, H. (2010) microRNA-29a induces aberrant self-renewal capacity in hematopoietic progenitors, biased myeloid development, and acute myeloid leukemia. *The Journal of Experimental Medicine* **207**, 475–489.
- HANOUN, N., DELPU, Y., SURIAWINATA, A.A., BOURNET, B., BUREAU, C., SELVES, J., TSONGALIS, G.J., DUFRESNE, M., BUSCAIL, L., CORDELIER, P. & TORRISANI, J. (2010) The silencing of microRNA 148a production by DNA hypermethylation is an early event in pancreatic carcinogenesis. *Clinical Chemistry* **56**, 1107–1118.
- VAN HECK, N.T., MEEKER, A.K., KERN, S.E., YEO, C.J., LILLEMÖE, K.D., CAMERON, J.L., OFFERHAUS, G.J.A., HICKS, J.L., WILENTZ, R.E., GOGGINS, M.G., DE MARZO, A.M., HRUBAN, R.H. & MAITRA, A. (2002) Telomere shortening is nearly universal in pancreatic intraepithelial neoplasia. *The American Journal of Pathology* **161**, 1541–1547.
- HEINZELMANN, J., HENNING, B., SANJMYATAV, J., POSORSKI, N., STEINER, T., WUNDERLICH, H., GAJDA, M.R. & JUNKER, K. (2011) Specific miRNA signatures are associated with metastasis and poor prognosis in clear cell renal cell carcinoma. *World Journal of Urology* **29**, 367–373.
- HEZEL, A.F., KIMMELMAN, A.C., STANGER, B.Z., BARDEESY, N. & DEPINHO, R.A. (2006) Genetics and biology of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Genes & Development* **20**, 1218–1249.
- HINGORANI, S.R., PETRICOIN III, E.F., MAITRA, A., RAJAPAKSE, V., KING, C., JACOBETZ, M.A., ET AL. (2003) Preinvasive and invasive ductal pancreatic cancer and its early detection in the mouse. *Cancer Cell* **4**, 437–450.

- HODZIC, J., GIOVANNETTI, E., DIOSDADO, B., CALVO, B.D., ADEMA, A.D. & PETERS, G.J. (2011) Regulation of deoxycytidine kinase expression and sensitivity to gemcitabine by micro-RNA 330 and promoter methylation in cancer cells. *Nucleosides, nucleotides & nucleic acids* **30**, 1214–1222.
- VON HOFF, D.D., ERVIN, T., ARENA, F.P., CHIOREAN, E.G., INFANTE, J., MOORE, M., ET AL. (2013) Increased Survival in Pancreatic Cancer with nab-Paclitaxel plus Gemcitabine. *New England Journal of Medicine* **369**, 1691–1703.
- HOLLINGSWORTH, M.A. & SWANSON, B.J. (2004) Mucins in cancer: protection and control of the cell surface. *Nat Rev Cancer* **4**, 45–60.
- HO, S.B., NIEHANS, G.A., LYFTOGT, C., YAN, P.S., CHERWITZ, D.L., GUM, E.T., DAHIYA, R. & KIM, Y.S. (1993) Heterogeneity of mucin gene expression in normal and neoplastic tissues. *Cancer Research* **53**, 641–651.
- HOUNSELL, E.F. & FEIZI, T. (1982) Gastrointestinal mucins. Structures and antigenicities of their carbohydrate chains in health and disease. *Medical Biology* **60**, 227–236.
- HOUNSELL, E.F., LAWSON, A.M. & FEIZI, T. (1982) Structural and antigenic diversity in mucin carbohydrate chains. *Advances in Experimental Medicine and Biology* **144**, 39–41.
- HRUBAN, R.H., GOGGINS, M., PARSONS, J. & KERN, S.E. (2000) Progression model for pancreatic cancer. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* **6**, 2969–2972.
- HRUBAN, R.H., MAITRA, A., KERN, S.E. & GOGGINS, M. (2007) Precursors to pancreatic cancer. *Gastroenterology Clinics of North America* **36**, 831–849, vi.
- HUANG, L., REN, J., CHEN, D., LI, Y., KHARBANDA, S. & KUFE, D. (2003) MUC1 cytoplasmic domain coactivates Wnt target gene transcription and confers transformation. *Cancer Biology & Therapy* **2**, 702–706.
- HUANG, Y., LIAO, D., PAN, L., YE, R., LI, X., WANG, S., YE, C. & CHEN, L. (2013) Expressions of miRNAs in papillary thyroid carcinoma and their associations with the BRAFV600E mutation. *European Journal of Endocrinology / European Federation of Endocrine Societies* **168**, 675–681.
- HUANG, Y.-W., KUO, C.-T., CHEN, J.-H., GOODFELLOW, P.J., HUANG, T.H.-M., RADER, J.S. & UYAR, D.S. (2014) Hypermethylation of miR-203 in endometrial carcinomas. *Gynecologic Oncology* **133**, 340–345.
- HUNTZINGER, E. & IZARRALDE, E. (2011) Gene silencing by microRNAs: contributions of translational repression and mRNA decay. *Nature Reviews. Genetics* **12**, 99–110.
- HUSSAIN, S.P., HOFSETH, L.J. & HARRIS, C.C. (2003) Radical causes of cancer. *Nature Reviews Cancer* **3**, 276–285.
- HUTVÁGNER, G., MCLACHLAN, J., PASQUINELLI, A.E., BÁLINT, E., TUSCHL, T. & ZAMORE, P.D. (2001) A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. *Science (New York, N.Y.)* **293**, 834–838.

HUXLEY, R., ANSARY-MOGHADDAM, A., BERRINGTON DE GONZÁLEZ, A., BARZI, F. & WOODWARD, M. (2005) Type-II diabetes and pancreatic cancer: a meta-analysis of 36 studies. *British Journal of Cancer* **92**, 2076–2083.

HWANG, J.-H., VOORTMAN, J., GIOVANNETTI, E., STEINBERG, S.M., LEON, L.G., KIM, Y.-T., FUNEL, N., PARK, J.K., KIM, M.A., KANG, G.H., KIM, S.-W., DEL CHIARO, M., PETERS, G.J. & GIACCONE, G. (2010) Identification of microRNA-21 as a biomarker for chemoresistance and clinical outcome following adjuvant therapy in resectable pancreatic cancer. *PloS One* **5**, e10630.

I

IBRAHIM, N.K., YARIZ, K.O., BONDARENKO, I., MANIKHAS, A., SEMIGLAZOV, V., ALYASOVA, A., KOMISARENKO, V., SHPARYK, Y., MURRAY, J.L., JONES, D., SENDEROVICH, S., CHAU, A., ERLANDSSON, F., ACTON, G. & PEGRAM, M. (2011) Randomized phase II trial of letrozole plus anti-MUC1 antibody AS1402 in hormone receptor-positive locally advanced or metastatic breast cancer. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* **17**, 6822–6830.

IKENAGA, N., OHUCHIDA, K., MIZUMOTO, K., YU, J., KAYASHIMA, T., SAKAI, H., FUJITA, H., NAKATA, K. & TANAKA, M. (2010) MicroRNA-203 expression as a new prognostic marker of pancreatic adenocarcinoma. *Annals of surgical oncology* **17**, 3120–3128.

J

JAKYMIW, A., PAULEY, K.M., LI, S., IKEDA, K., LIAN, S., EYSTATHIOY, T., SATOH, M., FRITZLER, M.J. & CHAN, E.K.L. (2007) The role of GW/P-bodies in RNA processing and silencing. *Journal of Cell Science* **120**, 1317–1323.

JIANG, H., ZHANG, G., WU, J.-H. & JIANG, C.-P. (2014) Diverse roles of miR-29 in cancer (review). *Oncology Reports* **31**, 1509–1516.

JIN, C., RAJABI, H. & KUFEL, D. (2010) miR-1226 targets expression of the mucin 1 oncoprotein and induces cell death. *International Journal of Oncology* **37**, 61–69.

Ji, Q., HAO, X., ZHANG, M., TANG, W., YANG, M., LI, L., XIANG, D., DESANO, J.T., BOMMER, G.T., FAN, D., FEARON, E.R., LAWRENCE, T.S. & XU, L. (2009) MicroRNA miR-34 inhibits human pancreatic cancer tumor-initiating cells. *PloS One* **4**, e6816.

JOHN, B., ENRIGHT, A.J., ARAVIN, A., TUSCHL, T., SANDER, C. & MARKS, D.S. (2004) Human MicroRNA targets. *PLoS biology* **2**, e363.

JONCKHEERE, N. & VAN SEUNINGEN, I. (2008) The membrane-bound mucins: how large O-glycoproteins play key roles in epithelial cancers and hold promise as biological tools for gene-based and immunotherapies. *Critical Reviews in Oncogenesis* **14**, 177–196.

JONCKHEERE, N. & VAN SEUNINGEN, I. (2010) The membrane-bound mucins: From cell signalling to transcriptional regulation and expression in epithelial cancers. *Biochimie* **92**, 1–11.

- JONCKHEERE, N., SKRYPEK, N., FRÉNOIS, F. & VAN SEUNINGEN, I. (2012) Membrane-bound mucin modular domains: From structure to function. *Biochimie*.
- JONCKHEERE, N., SKRYPEK, N., MERLIN, J., DESSEIN, A.F., DUMONT, P., LETEURTRE, E., HARRIS, A., DESSEYN, J.-L., SUSINI, C., FRÉNOIS, F. & VAN SEUNINGEN, I. (2012) The mucin MUC4 and its membrane partner ErbB2 regulate biological properties of human CAPAN-2 pancreatic cancer cells via different signalling pathways. *PloS one* **7**, e32232.
- JONCKHEERE, N., SKRYPEK, N. & VAN SEUNINGEN, I. (2010) Mucins and Pancreatic Cancer. *Cancers* **2**, 1794–1812.
- JONCKHEERE, N., SKRYPEK, N. & VAN SEUNINGEN, I. (2014) Mucins and tumor resistance to chemotherapeutic drugs. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* **1846**, 142–151.
- JONES, P.A. & BAYLIN, S.B. (2002) The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nature Reviews. Genetics* **3**, 415–428.
- JOPLING, C.L. (2008) Regulation of hepatitis C virus by microRNA-122. *Biochemical Society Transactions* **36**, 1220–1223.

K

- KALLURI, R. & WEINBERG, R.A. (2009) The basics of epithelial-mesenchymal transition. *The Journal of Clinical Investigation* **119**, 1420–1428.
- KALRA, A.V. & CAMPBELL, R.B. (2007) Mucin impedes cytotoxic effect of 5-FU against growth of human pancreatic cancer cells: overcoming cellular barriers for therapeutic gain. *British Journal of Cancer* **97**, 910–918.
- KALRA, A.V. & CAMPBELL, R.B. (2009) Mucin overexpression limits the effectiveness of 5-FU by reducing intracellular drug uptake and antineoplastic drug effects in pancreatic tumours. *European Journal of Cancer* **45**, 164–173.
- KANWAL, R. & GUPTA, S. (2011) Epigenetic Modifications in Cancer. *Clinical Genetics*.
- KARUBE, Y., TANAKA, H., OSADA, H., TOMIDA, S., TATEMATSU, Y., YANAGISAWA, K., YATABE, Y., TAKAMIZAWA, J., MIYOSHI, S., MITSUDOMI, T. & TAKAHASHI, T. (2005) Reduced expression of Dicer associated with poor prognosis in lung cancer patients. *Cancer Science* **96**, 111–115.
- KHANVILKAR, K., DONOVAN, M.D. & FLANAGAN, D.R. (2001) Drug transfer through mucus. *Advanced Drug Delivery Reviews* **48**, 173–193.
- KHARBANDA, A., RAJABI, H., JIN, C., RAINA, D. & KUFÉ, D. (2013) MUC1-C oncoprotein induces tamoxifen resistance in human breast cancer cells. *Molecular cancer research: MCR*.

- KHODAREV, N., AHMAD, R., RAJABI, H., PITRODA, S., KUFÉ, T., MCCLARY, C., JOSHI, M.D., MACDERMED, D., WEICHELBAUM, R. & KUFÉ, D. (2010) Cooperativity of the MUC1 oncoprotein and STAT1 pathway in poor prognosis human breast cancer. *Oncogene* **29**, 920–929.
- KHOSHNAW, S.M., RAKHA, E.A., ABDEL-FATAH, T.M., NOLAN, C.C., HODI, Z., MACMILLAN, D.R., ELLIS, I.O. & GREEN, A.R. (2012) Loss of Dicer expression is associated with breast cancer progression and recurrence. *Breast Cancer Research and Treatment* **135**, 403–413.
- KIM, D.H., SAETROM, P., SNØVE, O. & ROSSI, J.J. (2008) MicroRNA-directed transcriptional gene silencing in mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **105**, 16230–16235.
- KIMURA, T. & FINN, O.J. (2013) MUC1 immunotherapy is here to stay. *Expert opinion on biological therapy* **13**, 35–49.
- KIM, V.N. (2004) MicroRNA precursors in motion: exportin-5 mediates their nuclear export. *Trends in Cell Biology* **14**, 156–159.
- KINLOUGH, C.L., MCMAHAN, R.J., POLAND, P.A., BRUNS, J.B., HARKLEROAD, K.L., STREMPLE, R.J., KASHLAN, O.B., WEIXEL, K.M., WEISZ, O.A. & HUGHEY, R.P. (2006) Recycling of MUC1 is dependent on its palmitoylation. *The Journal of Biological Chemistry* **281**, 12112–12122.
- KINLOUGH, C.L., POLAND, P.A., BRUNS, J.B., HARKLEROAD, K.L. & HUGHEY, R.P. (2004) MUC1 membrane trafficking is modulated by multiple interactions. *The Journal of biological chemistry* **279**, 53071–53077.
- KLUIVER, J., GIBBUS, J.H., HETTINGA, C., ADEMA, A., RICHTER, M.K.S., HALSEMA, N., SLEZAK-PROCHAZKA, I., DING, Y., KROESEN, B.-J. & VAN DEN BERG, A. (2012) Rapid generation of microRNA sponges for microRNA inhibition. *PloS One* **7**, e29275.
- KONDO, S., YOSHIZAKI, T., WAKISAKA, N., HORIKAWA, T., MURONO, S., JANG, K.L., JOAB, I., FURUKAWA, M. & PAGANO, J.S. (2007) MUC1 induced by Epstein-Barr virus latent membrane protein 1 causes dissociation of the cell-matrix interaction and cellular invasiveness via STAT signaling. *Journal of Virology* **81**, 1554–1562.
- KORPAL, M., LEE, E.S., 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. *The Journal of Biological Chemistry* **283**, 14910–14914.
- KOVARIK, A., PEAT, N., WILSON, D., GENDLER, S.J. & TAYLOR-PAPADIMITRIOU, J. (1993) Analysis of the tissue-specific promoter of the MUC1 gene. *Journal of Biological Chemistry* **268**, 9917–9926.
- KRANTZ, S.B., SHIELDS, M.A., DANGI-GARIMELLA, S., MUNSHI, H.G. & BENTREM, D.J. (2012) Contribution of epithelial-to-mesenchymal transition and cancer stem cells to pancreatic cancer progression. *The Journal of Surgical Research* **173**, 105–112.

- KROEMER, G., ZITVOGEL, L. & GALLUZZI, L. (2013) Victories and deceptions in tumor immunology: Stimuvax®. *OncoImmunology* **2**, e23687.
- KUFE, D.W. (2009) Functional targeting of the MUC1 oncogene in human cancers. *Cancer Biology & Therapy* **8**, 1197–1203.
- KUFE, D.W. (2013) MUC1-C oncoprotein as a target in breast cancer: activation of signaling pathways and therapeutic approaches. *Oncogene* **32**, 1073–1081.
- KUO, T.-Y., HSI, E., YANG, I.-P., TSAI, P.-C., WANG, J.-Y. & JUO, S.-H.H. (2012) Computational Analysis of mRNA Expression Profiles Identifies MicroRNA-29a/c as Predictor of Colorectal Cancer Early Recurrence. *PloS One* **7**, e31587.
- KWIECINSKI, M., NOETEL, A., ELFIMOVA, N., TREBICKA, J., SCHIEVENBUSCH, S., STRACK, I., MOLNAR, L., VON BRANDENSTEIN, M., TÖX, U., NISCHT, R., COUTELLE, O., DIENES, H.P. & ODENTHAL, M. (2011) Hepatocyte growth factor (HGF) inhibits collagen I and IV synthesis in hepatic stellate cells by miRNA-29 induction. *PloS One* **6**, e24568.
- KYRIAZIS, A.A., KYRIAZIS, A.P., STERNBERG, C.N., SLOANE, N.H. & LOVELESS, J.D. (1986) Morphological, biological, biochemical, and karyotypic characteristics of human pancreatic ductal adenocarcinoma Capan-2 in tissue culture and the nude mouse. *Cancer Research* **46**, 5810–5815.
- KYRIAZIS, A.P., KYRIAZIS, A.A., SCARPELLI, D.G., FOGH, J., RAO, M.S. & LEPERA, R. (1982) Human pancreatic adenocarcinoma line Capan-1 in tissue culture and the nude mouse: morphologic, biologic, and biochemical characteristics. *The American Journal of Pathology* **106**, 250–260.
- ## L
- LAGOS-QUINTANA, M., RAUHUT, R., LENDECKEL, W. & TUSCHL, T. (2001) Identification of Novel Genes Coding for Small Expressed RNAs. *Science* **294**, 853–858.
- LAHDAOUI, F., DELPU, Y., VINCENT, A., RENAUD, F., MESSEGER, M., DUCHÊNE, B., LETEURTRE, E., MARIETTE, C., TORRISANI, J., JONCKHEERE, N. & VAN SEUNINGEN, I. (2014) miR-219-1-3p is a negative regulator of the mucin MUC4 expression and is a tumor suppressor in pancreatic cancer. *Oncogene* **0**, 1–9.
- LAKSHMINARAYANAN, V., THOMPSON, P., WOLFERT, M.A., BUSKAS, T., BRADLEY, J.M., PATHANGEY, L.B., MADSEN, C.S., COHEN, P.A., GENDLER, S.J. & BOONS, G.-J. (2012) Immune recognition of tumor-associated mucin MUC1 is achieved by a fully synthetic aberrantly glycosylated MUC1 tripartite vaccine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **109**, 261–266.
- LAL, A., THOMAS, M.P., ALTSCHULER, G., NAVARRO, F., O'DAY, E., LI, X.L., CONCEPCION, C., HAN, Y.-C., THIERY, J., RAJANI, D.K., DEUTSCH, A., HOFMANN, O., VENTURA, A., HIDE, W. & LIEBERMAN, J. (2011) Capture of microRNA-bound mRNAs identifies the tumor suppressor miR-34a as a regulator of growth factor signaling. *PLoS genetics* **7**, e1002363.

- LANCASTER, C.A., PEAT, N., DUHIG, T., WILSON, D., TAYLOR-PAPADIMITRIOU, J. & GENDLER, S.J. (1990) Structure and expression of the human polymorphic epithelial mucin gene: an expressed VNTR unit. *Biochemical and biophysical research communications* **173**, 1019–1029.
- LAN, M.S., BATRA, S.K., QI, W.N., METZGAR, R.S. & HOLLINGSWORTH, M.A. (1990) Cloning and sequencing of a human pancreatic tumor mucin cDNA. *The Journal of biological chemistry* **265**, 15294–15299.
- LAU, N.C., LIM, L.P., WEINSTEIN, E.G. & BARTEL, D.P. (2001) An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science (New York, N.Y.)* **294**, 858–862.
- LEE, E.J., GUSEV, Y., JIANG, J., NUOVO, G.J., LERNER, M.R., FRANKEL, W.L., MORGAN, D.L., POSTIER, R.G., BRACKETT, D.J. & SCHMITTGEN, T.D. (2007) Expression profiling identifies microRNA signature in pancreatic cancer. *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer* **120**, 1046–1054.
- LEE, R.C., FEINBAUM, R.L. & AMBROS, V. (1993) The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* **75**, 843–854.
- LEE, Y., AHN, C., HAN, J., CHOI, H., KIM, J., YIM, J., LEE, J., PROVOST, P., RÅDMARK, O., KIM, S. & KIM, V.N. (2003) The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* **425**, 415–419.
- LENG, Y., CAO, C., REN, J., HUANG, L., CHEN, D., ITO, M. & KUFÉ, D. (2007) Nuclear import of the MUC1-C oncoprotein is mediated by nucleoporin Nup62. *The Journal of biological chemistry* **282**, 19321–19330.
- LENNOX, K.A., OWCZARZY, R., THOMAS, D.M., WALDER, J.A. & BEHLKE, M.A. (2013) Improved Performance of Anti-miRNA Oligonucleotides Using a Novel Non-Nucleotide Modifier. *Molecular Therapy — Nucleic Acids* **2**, e117.
- LETEURTRE, E., GOUYER, V., ROUSSEAU, K., MOREAU, O., BARBAT, A., SWALLOW, D., HUET, G. & LESUFFLEUR, T. (2004) Differential mucin expression in colon carcinoma HT-29 clones with variable resistance to 5-fluorouracil and methotrexate. *Biology of the Cell / Under the Auspices of the European Cell Biology Organization* **96**, 145–151.
- DI LEVA, G. & CROCE, C.M. (2013) miRNA profiling of cancer. *Current Opinion in Genetics & Development* **23**, 3–11.
- DI LEVA, G., GAROFALO, M. & CROCE, C.M. (2014) MicroRNAs in Cancer. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* **9**, 287–314.
- LEVITIN, F., STERN, O., WEISS, M., GIL-HENN, C., ZIV, R., PROKOCIMER, Z., SMORODINSKY, N.I., RUBINSTEIN, D.B. & WRESCHNER, D.H. (2005) The MUC1 SEA module is a self-cleaving domain. *The Journal of biological chemistry* **280**, 33374–33386.
- LI, A., OMURA, N., HONG, S.-M., 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 Research* **70**, 5226–5237.

- LICATALOSI, D.D., MELE, A., FAK, J.J., ULE, J., KAYIKCI, M., CHI, S.W., CLARK, T.A., SCHWEITZER, A.C., BLUME, J.E., WANG, X., DARNELL, J.C. & DARNELL, R.B. (2008) HITS-CLIP yields genome-wide insights into brain alternative RNA processing. *Nature* **456**, 464–469.
- LIEBER, M., MAZZETTA, J., NELSON-REES, W., KAPLAN, M. & TODARO, G. (1975) Establishment of a continuous tumor-cell line (panc-1) from a human carcinoma of the exocrine pancreas. *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer* **15**, 741–747.
- LI, H., SOLOMON, E., DUHACHEK MUGGY, S., SUN, D. & ZOLKIEWSKA, A. (2011) Metalloprotease-disintegrin ADAM12 expression is regulated by Notch signaling via microRNA-29. *The Journal of Biological Chemistry* **286**, 21500–21510.
- LIU, F. & KORC, M. (2012) Cdk4/6 inhibition induces epithelial-mesenchymal transition and enhances invasiveness in pancreatic cancer cells. *Molecular cancer therapeutics* **11**, 2138–2148.
- LIU, N., FURUKAWA, T., KOBARI, M. & TSAO, M.S. (1998) Comparative phenotypic studies of duct epithelial cell lines derived from normal human pancreas and pancreatic carcinoma. *The American journal of pathology* **153**, 263–269.
- LIU, S.-G., QIN, X.-G., ZHAO, B.-S., QI, B., YAO, W.-J., WANG, T.-Y., LI, H.-C. & WU, X.-N. (2013) Differential expression of miRNAs in esophageal cancer tissue. *Oncology Letters* **5**, 1639–1642.
- LIU, S.-X., XIA, Z.-S. & ZHONG, Y.-Q. (2014) Gene therapy in pancreatic cancer. *World journal of gastroenterology: WJG* **20**, 13343–13368.
- LIU, X., YI, C., WEN, Y., RADHAKRISHNAN, P., TREMAYNE, J.R., DAO, T., JOHNSON, K.R. & HOLLINGSWORTH, M.A. (2014) Interactions between MUC1 and p120 catenin regulate dynamic features of cell adhesion, motility, and metastasis. *Cancer Research* **74**, 1609–1620.
- LI, X.L., HARA, T., CHOI, Y., SUBRAMANIAN, M., FRANCIS, P., BILKE, S., WALKER, R.L., PINEDA, M., ZHU, Y., YANG, Y., LUO, J., WAKEFIELD, L.M., BRABLETZ, T., PARK, B.H., SHARMA, S., CHOWDHURY, D., MELTZER, P.S. & LAL, A. (2014) A p21-ZEB1 complex inhibits epithelial-mesenchymal transition through the microRNA 183-96-182 cluster. *Molecular and Cellular Biology* **34**, 533–550.
- LI, Y., REN, J., YU, W., LI, Q., KUWAHARA, H., YIN, L., CARRAWAY, K.L. & KUFU, D. (2001) The epidermal growth factor receptor regulates interaction of the human DF3/MUC1 carcinoma antigen with c-Src and beta-catenin. *The Journal of Biological Chemistry* **276**, 35239–35242.
- LI, Y., VANDENBOOM, T.G., 2ND, KONG, D., WANG, Z., ALI, S., PHILIP, P.A. & SARKAR, F.H. (2009) Up-regulation of miR-200 and let-7 by natural agents leads to the reversal of epithelial-to-mesenchymal transition in gemcitabine-resistant pancreatic cancer cells. *Cancer Research* **69**, 6704–6712.

- LI, Y., ZHU, X., XU, W., WANG, D. & YAN, J. (2013) miR-330 regulates the proliferation of colorectal cancer cells by targeting Cdc42. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **431**, 560–565.
- LOUVET, C., LABIANCA, R., HAMMEL, P., LLEDO, G., ZAMPINO, M.G., ANDRÉ, T., ZANIBONI, A., DUCREUX, M., AITINI, E., TAÏEB, J., FAROUX, R., LEPERE, C., DE GRAMONT, A., GERCOR & GISCAD (2005) Gemcitabine in combination with oxaliplatin compared with gemcitabine alone in locally advanced or metastatic pancreatic cancer: results of a GERCOR and GISCAD phase III trial. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* **23**, 3509–3516.
- LOWERY, A.J., MILLER, N., DWYER, R.M. & KERIN, M.J. (2010) Dysregulated miR-183 inhibits migration in breast cancer cells. *BMC Cancer* **10**, 502.
- LUCENTEFORTE, E., LA VECCHIA, C., SILVERMAN, D., PETERSEN, G.M., BRACCI, P.M., JI, B.T., ET AL. (2012) Alcohol consumption and pancreatic cancer: a pooled analysis in the International Pancreatic Cancer Case-Control Consortium (PanC4). *Annals of oncology: official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* **23**, 374–382.
- LU, J., GETZ, G., MISKA, E.A., ALVAREZ-SAAVEDRA, E., LAMB, J., PECK, D., SWEET-CORDERO, A., EBERT, B.L., MAK, R.H., FERRANDO, A.A., DOWNING, J.R., JACKS, T., HORVITZ, H.R. & GOLUB, T.R. (2005) MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* **435**, 834–838.
- LUNA, C., LI, G., QIU, J., EPSTEIN, D.L. & GONZALEZ, P. (2011) Cross-talk between miR-29 and transforming growth factor-betas in trabecular meshwork cells. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* **52**, 3567–3572.

M

- MACAO, B., JOHANSSON, D.G.A., HANSSON, G.C. & HÄRD, T. (2006) Autoproteolysis coupled to protein folding in the SEA domain of the membrane-bound MUC1 mucin. *Nature structural & molecular biology* **13**, 71–76.
- MADHAVAN, D., ZUCKNICK, M., WALLWIENER, M., CUK, K., MODUGNO, C., SCHARPFF, M., SCHOTT, S., HEIL, J., TURCHINOVICH, A., YANG, R., BENNER, A., RIETHDORF, S., TRUMPP, A., SOHN, C., PANTEL, K., SCHNEEWEISS, A. & BURWINKEL, B. (2012) Circulating miRNAs as surrogate markers for circulating tumor cells and prognostic markers in metastatic breast cancer. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* **18**, 5972–5982.
- MAGNANI, J.L., STEPLEWSKI, Z., KOPROWSKI, H. & GINSBURG, V. (1983) Identification of the gastrointestinal and pancreatic cancer-associated antigen detected by monoclonal antibody 19-9 in the sera of patients as a mucin. *Cancer Research* **43**, 5489–5492.
- MAITRA, A., FUKUSHIMA, N., TAKAORI, K. & HRUBAN, R.H. (2005) Precursors to invasive pancreatic cancer. *Advances in Anatomic Pathology* **12**, 81–91.

- MAITRA, A. & HRUBAN, R.H. (2008) Pancreatic Cancer. *Annual review of pathology* **3**, 157–188.
- MARIETTE, C., PERRAIS, M., LETEURTRE, E., JONCKHEERE, N., HÉMON, B., PIGNY, P., BATRA, S., AUBERT, J.-P., TRIBOULET, J.-P. & VAN SEUNINGEN, I. (2004) Transcriptional regulation of human mucin MUC4 by bile acids in oesophageal cancer cells is promoter-dependent and involves activation of the phosphatidylinositol 3-kinase signalling pathway. *The Biochemical journal* **377**, 701–708.
- MARTINEZ-SANCHEZ, A. & MURPHY, C.L. (2013) MicroRNA Target Identification-Experimental Approaches. *Biology* **2**, 189–205.
- MATHONNET, G., FABIAN, M.R., SVITKIN, Y.V., PARSYAN, A., HUCK, L., MURATA, T., BIFFO, S., MERRICK, W.C., DARZYNKIEWICZ, E., PILLAI, R.S., FILIPOWICZ, W., DUCHAINE, T.F. & SONENBERG, N. (2007) MicroRNA inhibition of translation initiation in vitro by targeting the cap-binding complex eIF4F. *Science (New York, N.Y.)* **317**, 1764–1767.
- MAYR, C. & BARTEL, D.P. (2009) Widespread shortening of 3'UTRs by alternative cleavage and polyadenylation activates oncogenes in cancer cells. *Cell* **138**, 673–684.
- MCCRACKEN, S., FONG, N., YANKULOV, K., BALLANTYNE, S., PAN, G., GREENBLATT, J., PATTERSON, S.D., WICKENS, M. & BENTLEY, D.L. (1997) The C-terminal domain of RNA polymerase II couples mRNA processing to transcription. *Nature* **385**, 357–361.
- MEDRANO, S., MONTEAGUDO, M.C., SEQUEIRA-LOPEZ, M.L.S., PENTZ, E.S. & GOMEZ, R.A. (2011) Two microRNAs -miR-330 and miR-125b-5p- mark the juxtaglomerular cell and balance its smooth muscle phenotype. *American Journal of Physiology - Renal Physiology*.
- MENG, F., HENSON, R., WEHBE-JANEK, H., GHOSHAL, K., JACOB, S.T. & PATEL, T. (2007) MicroRNA-21 regulates expression of the PTEN tumor suppressor gene in human hepatocellular cancer. *Gastroenterology* **133**, 647–658.
- MERLIN, J., STECHLY, L., DE BEAUCÉ, S., MONTÉ, D., LETEURTRE, E., VAN SEUNINGEN, I., HUET, G. & PIGNY, P. (2011) Galectin-3 regulates MUC1 and EGFR cellular distribution and EGFR downstream pathways in pancreatic cancer cells. *Oncogene* **30**, 2514–2525.
- MIAO, L., XIONG, X., LIN, Y., CHENG, Y., LU, J., ZHANG, J. & CHENG, N. (2014) miR-203 inhibits tumor cell migration and invasion via caveolin-1 in pancreatic cancer cells. *Oncology letters* **7**, 658–662.
- MOES, M., LE BÉCHEC, A., CRESPO, I., LAURINI, C., HALAVATYI, A., VETTER, G., DEL SOL, A. & FRIEDERICH, E. (2012) A novel network integrating a miRNA-203/SNAI1 feedback loop which regulates epithelial to mesenchymal transition. *PloS One* **7**, e35440.
- MOHR, A.M., BAILEY, J.M., LEWALLEN, M.E., LIU, X., RADHAKRISHNAN, P., YU, F., TAPPRICH, W. & HOLLINGSWORTH, M.A. (2013) MUC1 regulates expression of

- multiple microRNAs involved in pancreatic tumor progression, including the miR-200c/141 cluster. *PLoS one* **8**, e73306.
- MONGES, G.M., MATHOULIN-PORTIER, M.P., ACRES, R.B., HOUVENAEGHEL, G.F., GIOVANNINI, M.F., SEITZ, J.F., BARDOU, V.J., PAYAN, M.J. & OLIVE, D. (1999) Differential MUC 1 expression in normal and neoplastic human pancreatic tissue. An immunohistochemical study of 60 samples. *American Journal of Clinical Pathology* **112**, 635–640.
- MONIAUX, N., ESCANDE, F., PORCHET, N., AUBERT, J.P. & BATRA, S.K. (2001) Structural organization and classification of the human mucin genes. *Frontiers in Bioscience: A Journal and Virtual Library* **6**, D1192–D1206.
- MONTEYS, A.M., SPENGLER, R.M., WAN, J., TECEDOR, L., LENNOX, K.A., XING, Y. & DAVIDSON, B.L. (2010) Structure and activity of putative intronic miRNA promoters. *RNA* **16**, 495–505.
- MOORCRAFT, S.Y., KHAN, K., PECKITT, C., WATKINS, D., RAO, S., CUNNINGHAM, D. & CHAU, I. (2014) FOLFIRINOX for Locally Advanced or Metastatic Pancreatic Ductal Adenocarcinoma: The Royal Marsden Experience. *Clinical Colorectal Cancer* **13**, 232–238.
- MOORE, M.J., GOLDSTEIN, D., HAMM, J., FIGER, A., HECHT, J.R., GALLINGER, S., AU, H.J., MURAWA, P., WALDE, D., WOLFF, R.A., CAMPOS, D., LIM, R., DING, K., CLARK, G., VOSKOGLOU-NOMIKOS, T., PTASYSKI, M., PARULEKAR, W. & NATIONAL CANCER INSTITUTE OF CANADA CLINICAL TRIALS GROUP (2007) Erlotinib plus gemcitabine compared with gemcitabine alone in patients with advanced pancreatic cancer: a phase III trial of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* **25**, 1960–1966.
- MORRIS, J.P., WANG, S.C. & HEBROK, M. (2010) KRAS, Hedgehog, Wnt and the twisted developmental biology of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Nat Rev Cancer* **10**, 683–695.
- MOTT, J.L., KURITA, S., CAZANAVE, S.C., BRONK, S.F., WERNEBURG, N.W. & FERNANDEZ-ZAPICO, M.E. (2010) Transcriptional suppression of mir-29b-1/mir-29a promoter by c-Myc, hedgehog, and NF-kappaB. *Journal of Cellular Biochemistry* **110**, 1155–1164.
- MUKHERJEE, P., PATHANGEY, L.B., BRADLEY, J.B., TINDER, T.L., BASU, G.D., AKPORIAYE, E.T. & GENDLER, S.J. (2007) MUC1-specific immune therapy generates a strong anti-tumor response in a MUC1-tolerant colon cancer model. *Vaccine* **25**, 1607–1618.
- MUKHERJEE, S., HURT, C.N., BRIDGEWATER, J., FALK, S., CUMMINS, S., WASAN, H., CROSBY, T., JEPHCOTT, C., ROY, R., RADHAKRISHNA, G., McDONALD, A., RAY, R., JOSEPH, G., STAFFURTH, J., ABRAMS, R.A., GRIFFITHS, G. & MAUGHAN, T. (2013) Gemcitabine-based or capecitabine-based chemoradiotherapy for locally advanced pancreatic cancer (SCALOP): a multicentre, randomised, phase 2 trial. *The Lancet. Oncology* **14**, 317–326.
- MULRANE, L., MCGEE, S.F., GALLAGHER, W.M. & O'CONNOR, D.P. (2013) miRNA dysregulation in breast cancer. *Cancer Research* **73**, 6554–6562.

MUNIYAPPA, M.K., DOWLING, P., HENRY, M., MELEADY, P., DOOLAN, P., GAMMELL, P., CLYNES, M. & BARRON, N. (2009) MiRNA-29a regulates the expression of numerous

MUNIYAPPA, M.K., DOWLING, P., HENRY, M., MELEADY, P., DOOLAN, P., GAMMELL, P., CLYNES, M. & BARRON, N. (2009) MiRNA-29a regulates the expression of numerous proteins and reduces the invasiveness and proliferation of human carcinoma cell lines. *European Journal of Cancer* **45**, 3104–3118.

N

NAGANO, H., TOMIMARU, Y., EGUCHI, H., HAMA, N., WADA, H., KAWAMOTO, K., KOBAYASHI, S., MORI, M. & DOKI, Y. (2013) MicroRNA-29a induces resistance to gemcitabine through the Wnt/ β -catenin signaling pathway in pancreatic cancer cells. *International journal of oncology* **43**, 1066–1072.

NAMLØS, H.M., MEZA-ZEPEDA, L.A., BARØY, T., ØSTENSEN, I.H.G., KRESSE, S.H., KUIJER, M.L., SERRA, M., BÜRGER, H., CLETON-JANSEN, A.-M. & MYKLEBOST, O. (2012) Modulation of the osteosarcoma expression phenotype by microRNAs. *PloS One* **7**, e48086.

NATH, S., DANESHVAR, K., ROY, L.D., GROVER, P., KIDIYOOR, A., MOSLEY, L., SAHRAEI, M. & MUKHERJEE, P. (2013) MUC1 induces drug resistance in pancreatic cancer cells via upregulation of multidrug resistance genes. *Oncogenesis* **2**, e51.

NATH, S. & MUKHERJEE, P. (2014) MUC1: a multifaceted oncoprotein with a key role in cancer progression. *Trends in Molecular Medicine* **20**, 332–342.

NEESSE, A., MICHL, P., FRESE, K.K., FEIG, C., COOK, N., JACOBETZ, M.A., LOLKEMA, M.P., BUCHHOLZ, M., OLIVE, K.P., GRESS, T.M. & TUVESON, D.A. (2011) Stromal biology and therapy in pancreatic cancer. *Gut* **60**, 861–868.

NG, S., DONG, Y. & YU, J. (2014) MicroRNA dysregulation as a prognostic biomarker in colorectal cancer. *Cancer Management and Research*, 405.

NYMARK, P., GULED, M., BORZE, I., FAISAL, A., LAHTI, L., SALMENKIVI, K., KETTUNEN, E., ANTTILA, S. & KNUUTILA, S. (2011) Integrative analysis of microRNA, mRNA and aCGH data reveals asbestos- and histology-related changes in lung cancer. *Genes, Chromosomes & Cancer* **50**, 585–597.

O

OBERHOLZER, K., MENIG, M., KREFT, A., SCHNEIDER, A., JUNGINGER, T., HEINTZ, A., KREITNER, K.-F., HÖTKER, A.M., HANSEN, T., DÜBER, C. & SCHMIDBERGER, H. (2012) Rectal cancer: mucinous carcinoma on magnetic resonance imaging indicates poor response to neoadjuvant chemoradiation. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics* **82**, 842–848.

ORMANNS, S., HEINEMANN, V., RAPONI, M., ISAACSON, J., LAUBENDER, R.P., HAAS, M., KRUGER, S., KLEESPIES, A., MANN, E., BARTOSIEWICZ, M., KIRCHNER, T. & BOECK, S. (2014) Human equilibrative nucleoside transporter 1 is not predictive for gemcitabine efficacy in advanced pancreatic cancer: translational results from the AIO-PK0104 phase III study with the clone SP120 rabbit antibody. *European Journal of Cancer (Oxford, England: 1990)* **50**, 1891–1899.

OROM, U.A. & LUND, A.H. (2007) Isolation of microRNA targets using biotinylated synthetic microRNAs. *Methods (San Diego, Calif.)* **43**, 162–165.

ØROM, U.A., NIELSEN, F.C. & LUND, A.H. (2008) MicroRNA-10a binds the 5'UTR of ribosomal protein mRNAs and enhances their translation. *Molecular Cell* **30**, 460–471.



PACURARI, M., ADDISON, J.B., BONDALAPATI, N., WAN, Y.-W., LUO, D., QIAN, Y., CASTRANOVA, V., IVANOV, A.V. & GUO, N.L. (2013) The microRNA-200 family targets multiple non-small cell lung cancer prognostic markers in H1299 cells and BEAS-2B cells. *International Journal of Oncology* **43**, 548–560.

PALMAI-PALLAG, T., KHODABUKUS, N., KINARSKY, L., LEIR, S.-H., SHERMAN, S., HOLLINGSWORTH, M.A. & HARRIS, A. (2005) The role of the SEA (sea urchin sperm protein, enterokinase and agrin) module in cleavage of membrane-tethered mucins. *The FEBS journal* **272**, 2901–2911.

PANICCIA, A., EDIL, B.H., SCHULICK, R.D., BYERS, J.T., MEGUID, C., GAJDOS, C. & MCCARTER, M.D. (2014) Neoadjuvant FOLFIRINOX Application in Borderline Resectable Pancreatic Adenocarcinoma: A Retrospective Cohort Study. *Medicine* **93**, e198.

PARK, J.-K., LEE, E.J., ESAU, C. & SCHMITTGEN, T.D. (2009) Antisense Inhibition of microRNA-21 or -221 Arrests Cell Cycle, Induces Apoptosis, and Sensitizes the Effects of Gemcitabine in Pancreatic Adenocarcinoma. *Pancreas* **38**, e190–e199.

PARK, S.-M., GAUR, A.B., LENGYEL, E. & PETER, M.E. (2008) The miR-200 family determines the epithelial phenotype of cancer cells by targeting the E-cadherin repressors ZEB1 and ZEB2. *Genes & Development* **22**, 894–907.

PARK, S.-Y., LEE, J.H., HA, M., NAM, J.-W. & KIM, V.N. (2009) miR-29 miRNAs activate p53 by targeting p85 alpha and CDC42. *Nature Structural & Molecular Biology* **16**, 23–29.

PARRY, S., SILVERMAN, H.S., MCDERMOTT, K., WILLIS, A., HOLLINGSWORTH, M.A. & HARRIS, A. (2001) Identification of MUC1 Proteolytic Cleavage Sites in Vivo. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **283**, 715–720.

- PEGRAM, M.D., BORGES, V.F., IBRAHIM, N., FULORIA, J., SHAPIRO, C., PEREZ, S., WANG, K., SCHAEDLI STARK, F. & COURTENAY LUCK, N. (2009) Phase I dose escalation pharmacokinetic assessment of intravenous humanized anti-MUC1 antibody AS1402 in patients with advanced breast cancer. *Breast cancer research: BCR* **11**, R73.
- PEMBERTON, L.F., RUGHETTI, A., TAYLOR-PAPADIMITRIOU, J. & GENDLER, S.J. (1996) The epithelial mucin MUC1 contains at least two discrete signals specifying membrane localization in cells. *The Journal of biological chemistry* **271**, 2332–2340.
- PEREZ-VILAR, J. & HILL, R.L. (1999) The structure and assembly of secreted mucins. *The Journal of Biological Chemistry* **274**, 31751–31754.
- PEREZ-VILAR, J. & MABOLO, R. (2007) Gel-forming mucins. Notions from in vitro studies. *Histology and Histopathology* **22**, 455–464.
- PEREZ-VILAR, J., SHEEHAN, J.K. & RANDELL, S.H. (2003) Making More MUCS. *American Journal of Respiratory Cell and Molecular Biology* **28**, 267–270.
- PHILIP, P.A., BENEDETTI, J., CORLESS, C.L., WONG, R., O'REILLY, E.M., FLYNN, P.J., ROWLAND, K.M., ATKINS, J.N., MIRTSCHING, B.C., RIVKIN, S.E., KHORANA, A.A., GOLDMAN, B., FENOGLIO-PREISER, C.M., ABBRUZZESE, J.L. & BLANKE, C.D. (2010) Phase III study comparing gemcitabine plus cetuximab versus gemcitabine in patients with advanced pancreatic adenocarcinoma: Southwest Oncology Group-directed intergroup trial S0205. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology* **28**, 3605–3610.
- PIESSEN, G., JONCKHEERE, N., VINCENT, A., HÉMON, B., DUCOUROUBLE, M.-P., COPIN, M.-C., MARIETTE, C. & VAN SEUNINGEN, I. (2007) Regulation of the human mucin MUC4 by taurodeoxycholic and taurochenodeoxycholic bile acids in oesophageal cancer cells is mediated by hepatocyte nuclear factor 1alpha. *The Biochemical journal* **402**, 81–91.
- PILLAI, R.S., BHATTACHARYYA, S.N., ARTUS, C.G., ZOLLER, T., COUGOT, N., BASYUK, E., BERTRAND, E. & FILIPOWICZ, W. (2005) Inhibition of Translational Initiation by Let-7 MicroRNA in Human Cells. *Science* **309**, 1573–1576.
- PORCHET, N. & AUBERT, J.-P. (2004) [MUC genes: mucin or not mucin? That is the question]. *Médecine Sciences: M/S* **20**, 569–574.
- PREIS, M., GARDNER, T.B., GORDON, S.R., PIPAS, J.M., MACKENZIE, T.A., KLEIN, E.E., LONGNECKER, D.S., GUTMANN, E.J., SEMPERE, L.F. & KORC, M. (2011) MicroRNA-10b Expression Correlates with Response to Neoadjuvant Therapy and Survival in Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Clinical Cancer Research* **17**, 5812–5821.

Q

- QIU, M., LIU, L., CHEN, L., TAN, G., LIANG, Z., WANG, K., LIU, J. & CHEN, H. (2014) microRNA-183 plays as oncogenes by increasing cell proliferation, migration and invasion via targeting protein phosphatase 2A in renal cancer cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **452**, 163–169.
- QU, Y., LI, W.-C., HELLEM, M.R., ROSTAD, K., POPA, M., MCCORMACK, E., OYAN, A.M., KALLAND, K.-H. & KE, X.-S. (2013) MiR-182 and miR-203 induce mesenchymal to epithelial transition and self-sufficiency of growth signals via repressing SNAI2 in prostate cells. *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer* **133**, 544–555.

R

- RACHAGANI, S., MACHA, M.A., HEIMANN, N., SESHACHARYULU, P., HARIDAS, D., CHUGH, S. & BATRA, S.K. (2015) Clinical implications of miRNAs in the pathogenesis, diagnosis and therapy of pancreatic cancer. *Advanced Drug Delivery Reviews* **81C**, 16–33.
- RADHAKRISHNAN, P., MOHR, A.M., GRANDGENETT, P.M., STEELE, M.M., BATRA, S.K. & HOLLINGSWORTH, M.A. (2013) MicroRNA-200c Modulates the Expression of MUC4 and MUC16 by Directly Targeting Their Coding Sequences in Human Pancreatic Cancer. *PloS one* **8**, e73356.
- RAINA, D., AHMAD, R., JOSHI, M.D., YIN, L., WU, Z., KAWANO, T., VASIR, B., AVIGAN, D., KHARBANDA, S. & KUFE, D. (2009) Direct Targeting of the Mucin 1 Oncoprotein Blocks Survival and Tumorigenicity of Human Breast Carcinoma Cells. *Cancer Research* **69**, 5133–5141.
- RAINA, D., AHMAD, R., KUMAR, S., REN, J., YOSHIDA, K., KHARBANDA, S. & KUFE, D. (2006) MUC1 oncoprotein blocks nuclear targeting of c-Abl in the apoptotic response to DNA damage. *The EMBO journal* **25**, 3774–3783.
- RAINA, D., AHMAD, R., RAJABI, H., PANCHAMOORTHY, G., KHARBANDA, S. & KUFE, D. (2012) Targeting cysteine-mediated dimerization of the MUC1-C oncoprotein in human cancer cells. *International journal of oncology* **40**, 1643–1649.
- RAINA, D., KHARBANDA, S. & KUFE, D. (2004) The MUC1 oncoprotein activates the anti-apoptotic phosphoinositide 3-kinase/Akt and Bcl-xL pathways in rat 3Y1 fibroblasts. *The Journal of Biological Chemistry* **279**, 20607–20612.
- RAINA, D., KOSUGI, M., AHMAD, R., PANCHAMOORTHY, G., RAJABI, H., ALAM, M., SHIMAMURA, T., SHAPIRO, G.I., SUPKO, J., KHARBANDA, S. & KUFE, D. (2011) Dependence on the MUC1-C Oncoprotein in Non-Small Cell Lung Cancer Cells. *Molecular Cancer Therapeutics* **10**, 806–816.

- RAJABI, H., AHMAD, R., JIN, C., KOSUGI, M., ALAM, M., JOSHI, M.D. & KUFE, D. (2012) MUC1-C oncoprotein induces TCF7L2 transcription factor activation and promotes cyclin D1 expression in human breast cancer cells. *The Journal of biological chemistry* **287**, 10703–10713.
- RAJABI, H., ALAM, M., TAKAHASHI, H., KHARBANDA, A., GUHA, M., AHMAD, R. & KUFE, D. (2013) MUC1-C oncoprotein activates the ZEB1/miR-200c regulatory loop and epithelial-mesenchymal transition. *Oncogene*.
- RAJABI, H., JIN, C., AHMAD, R., MCCLARY, C., JOSHI, M.D. & KUFE, D. (2010) MUCIN 1 ONCOPROTEIN EXPRESSION IS SUPPRESSED BY THE miR-125b ONCOMIR. *Genes & Cancer* **1**, 62–68.
- RAMASAMY, S., DURAISAMY, S., BARBASHOV, S., KAWANO, T., KHARBANDA, S. & KUFE, D. (2007) The MUC1 and galectin-3 oncoproteins function in a microRNA-dependent regulatory loop. *Molecular cell* **27**, 992–1004.
- RAMBOW, F., BECHADERGUE, A., SAINTIGNY, G., MORIZOT, F., MAHÉ, C. & LARUE, L. (2014) miR-330-5p Targets Tyrosinase and Induces Depigmentation. *The Journal of investigative dermatology*.
- RAMDAS, V., MCBRIDE, M., DENBY, L. & BAKER, A.H. (2013) Canonical Transforming Growth Factor- Signaling Regulates Disintegrin Metalloprotease Expression in Experimental Renal Fibrosis via miR-29. *The American Journal of Pathology*.
- RANI, S., GATELY, K., CROWN, J., O'BYRNE, K. & O'DRISCOLL, L. (2013) Global analysis of serum microRNAs as potential biomarkers for lung adenocarcinoma. *Cancer Biology & Therapy* **14**, 1104–1112.
- RASHEED, Z.A., MATSUI, W. & MAITRA, A. (2012) Pathology of pancreatic stroma in PDAC. In *Pancreatic Cancer and Tumor Microenvironment* (eds P.J. GRIPPO & H.G. MUNSHI),. Transworld Research Network, Trivandrum (India).
- REINHART, B.J., SLACK, F.J., BASSON, M., PASQUINELLI, A.E., BETTINGER, J.C., ROUGVIE, A.E., HORVITZ, H.R. & RUVKUN, G. (2000) The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **403**, 901–906.
- REN, J., AGATA, N., CHEN, D., LI, Y., YU, W., HUANG, L., RAINA, D., CHEN, W., KHARBANDA, S. & KUFE, D. (2004) Human MUC1 carcinoma-associated protein confers resistance to genotoxic anticancer agents. *Cancer Cell* **5**, 163–175.
- REN, J., BHARTI, A., RAINA, D., CHEN, W., AHMAD, R. & KUFE, D. (2006) MUC1 oncoprotein is targeted to mitochondria by heregulin-induced activation of c-Src and the molecular chaperone HSP90. *Oncogene* **25**, 20–31.
- REN, J., RAINA, D., CHEN, W., LI, G., HUANG, L. & KUFE, D. (2006) MUC1 oncoprotein functions in activation of fibroblast growth factor receptor signaling. *Molecular cancer research: MCR* **4**, 873–883.

- REN, L.-H., CHEN, W.-X., LI, S., HE, X.-Y., ZHANG, Z.-M., LI, M., CAO, R.-S., HAO, B., ZHANG, H.-J., QIU, H.-Q. & SHI, R.-H. (2014) MicroRNA-183 promotes proliferation and invasion in oesophageal squamous cell carcinoma by targeting programmed cell death 4. *British Journal of Cancer*.
- DU RIEU, M.C., TORRISANI, J., SELVES, J., AL SAATI, T., SOUQUE, A., DUFRESNE, M., TSONGALIS, G.J., SURIAWINATA, A.A., CARRÈRE, N., BUSCAIL, L. & CORDELIER, P. (2010) MicroRNA-21 is induced early in pancreatic ductal adenocarcinoma precursor lesions. *Clinical Chemistry* **56**, 603–612.
- RIUS, M. & LYKO, F. (2012) Epigenetic cancer therapy: rationales, targets and drugs. *Oncogene* **31**, 4257–4265.
- ROULOIS, D., GRÉGOIRE, M. & FONTENEAU, J.-F. (2013) MUC1-Specific Cytotoxic T Lymphocytes in Cancer Therapy: Induction and Challenge. *BioMed Research International* **2013**, 1–10.
- ROUSSEL, P., LAMBLIN, G., LHERMITTE, M., HOUDRET, N., LAFITTE, J.J., PERINI, J.M., KLEIN, A. & SCHARFMAN, A. (1988) The complexity of mucins. *Biochimie* **70**, 1471–1482.
- ROY, L.D., SAHRAEI, M., SUBRAMANI, D.B., BESMER, D., NATH, S., TINDER, T.L., BAJAJ, E., SHANMUGAM, K., LEE, Y.Y., HWANG, S.I.L., GENDLER, S.J. & MUKHERJEE, P. (2011) MUC1 enhances invasiveness of pancreatic cancer cells by inducing epithelial to mesenchymal transition. *Oncogene* **30**, 1449–1459.
- ROZENBLATT-ROSEN, O., NAGAIKE, T., FRANCIS, J.M., KANEKO, S., GLATT, K.A., HUGHES, C.M., LAFRAMBOISE, T., MANLEY, J.L. & MEYERSON, M. (2009) The tumor suppressor Cdc73 functionally associates with CPSF and CstF 3' mRNA processing factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**, 755–760.
- §
- DA SACCO, L. & MASOTTI, A. (2012) Recent Insights and Novel Bioinformatics Tools to Understand the Role of MicroRNAs Binding to 5' Untranslated Region. *International journal of molecular sciences* **14**, 480–495.
- SACHDEVA, M. & MO, Y.-Y. (2010) MicroRNA-145 suppresses cell invasion and metastasis by directly targeting mucin 1. *Cancer Research* **70**, 378–387.
- SALNIKOV, A.V., LIU, L., PLATEN, M., GLADKICH, J., SALNIKOVA, O., RYSCHICH, E., MATTERN, J., MOLDENHAUER, G., WERNER, J., SCHEMMER, P., BÜCHLER, M.W. & HERR, I. (2012) Hypoxia Induces EMT in Low and Highly Aggressive Pancreatic Tumor Cells but Only Cells with Cancer Stem Cell Characteristics Acquire Pronounced Migratory Potential. *PLoS ONE* **7**, e46391.
- SANDBERG, R., NEILSON, J.R., SARMA, A., SHARP, P.A. & BURGE, C.B. (2008) Proliferating cells express mRNAs with shortened 3' untranslated regions and fewer microRNA target sites. *Science (New York, N.Y.)* **320**, 1643–1647.

- SARVER, A.L., LI, L. & SUBRAMANIAN, S. (2010) MicroRNA miR-183 functions as an oncogene by targeting the transcription factor EGR1 and promoting tumor cell migration. *Cancer Research* **70**, 9570–9580.
- SATOH, K., HAMADA, S. & SHIMOSEGAWA, T. (2014) Involvement of epithelial to mesenchymal transition in the development of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Journal of Gastroenterology*.
- SCHROEDER, J.A., THOMPSON, M.C., GARDNER, M.M. & GENDLER, S.J. (2001) Transgenic MUC1 Interacts with Epidermal Growth Factor Receptor and Correlates with Mitogen-activated Protein Kinase Activation in the Mouse Mammary Gland. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 13057–13064.
- SCHULTZ, N.A., WERNER, J., WILLENBROCK, H., ROSLIND, A., GIESE, N., HORN, T., WØJDEMAN, M. & JOHANSEN, J.S. (2012) MicroRNA expression profiles associated with pancreatic adenocarcinoma and ampullary adenocarcinoma. *Modern Pathology*.
- SCHWARZ, D.S., HUTVÁGNER, G., DU, T., XU, Z., ARONIN, N. & ZAMORE, P.D. (2003) Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell* **115**, 199–208.
- SELBACH, M., SCHWANHÄUSSER, B., THIERFELDER, N., FANG, Z., KHANIN, R. & RAJEWSKY, N. (2008) Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs. *Nature* **455**, 58–63.
- SICARD, F., GAYRAL, M., LULKA, H., BUSCAIL, L. & CORDELIER, P. (2013) Targeting miR-21 for the Therapy of Pancreatic Cancer. *Molecular therapy: the journal of the American Society of Gene Therapy* **21**, 986–994.
- SIEGEL, R., NAISHADHAM, D. & JEMAL, A. (2013) Cancer statistics, 2013. *CA: A Cancer Journal for Clinicians* **63**, 11–30.
- SINGH, P.K., BEHRENS, M.E., EGGERS, J.P., CERNY, R.L., BAILEY, J.M., SHANMUGAM, K., GENDLER, S.J., BENNETT, E.P. & HOLLINGSWORTH, M.A. (2008) Phosphorylation of MUC1 by Met modulates interaction with p53 and MMP1 expression. *The Journal of Biological Chemistry* **283**, 26985–26995.
- SINGH, P.K. & HOLLINGSWORTH, M.A. (2006) Cell surface-associated mucins in signal transduction. *Trends in Cell Biology* **16**, 467–476.
- SINGH, P.K., WEN, Y., SWANSON, B.J., SHANMUGAM, K., KAZLAUSKAS, A., CERNY, R.L., GENDLER, S.J. & HOLLINGSWORTH, M.A. (2007) Platelet-Derived Growth Factor Receptor –Mediated Phosphorylation of MUC1 Enhances Invasiveness in Pancreatic Adenocarcinoma Cells. *Cancer Research* **67**, 5201–5210.
- SIU, M.K., ABOU-KHEIR, W., YIN, J.J., CHANG, Y.-S., BARRETT, B., SUAU, F., CASEY, O., CHEN, W.-Y., FANG, L., HYNES, P., HSIEH, Y.-Y., LIU, Y.-N., HUANG, J. & KELLY, K. (2014) Loss of EGFR signaling regulated miR-203 promotes prostate cancer bone metastasis and tyrosine kinase inhibitors resistance. *Oncotarget* **5**, 3770–3784.

- SKRYPEK, N., DUCHÊNE, B., HEBBAR, M., LETEURTRE, E., VAN SEUNINGEN, I. & JONCKHEERE, N. (2013) The MUC4 mucin mediates gemcitabine resistance of human pancreatic cancer cells via the Concentrative Nucleoside Transporter family. *Oncogene* **32**, 1714–1723.
- SOUBANI, O., ALI, A.S., LOGNA, F., ALI, S., PHILIP, P. & SARKAR, F.H. (2012) Re-expression of miR-200 by novel approaches regulates the expression of PTEN and MT1-MMP in pancreatic cancer. *Carcinogenesis*.
- DE SOUSA CAVALCANTE, L. & MONTEIRO, G. (2014) Gemcitabine: Metabolism and molecular mechanisms of action, sensitivity and chemoresistance in pancreatic cancer. *European Journal of Pharmacology* **741C**, 8–16.
- SPICER, A.P., ROWSE, G.J., LIDNER, T.K. & GENDLER, S.J. (1995) Delayed Mammary Tumor Progression in Muc-1 Null Mice. *Journal of Biological Chemistry* **270**, 30093–30101
- SRIVASTAVA, S.K., BHARDWAJ, A., SINGH, S., ARORA, S., WANG, B., GRIZZLE, W.E. & SINGH, A.P. (2011) MicroRNA-150 directly targets MUC4 and suppresses growth and malignant behavior of pancreatic cancer cells. *Carcinogenesis* **32**, 1832–1839.
- SU, J., ZHANG, A., SHI, Z., MA, F., PU, P., WANG, T., ZHANG, J., KANG, C. & ZHANG, Q. (2012) MicroRNA-200a suppresses the Wnt/ β -catenin signaling pathway by interacting with β -catenin. *International Journal of Oncology* **40**, 1162–1170.
- SUPRENANT, K.A., DEAN, K., MCKEE, J. & HAKE, S. (1993) EMAP, an echinoderm microtubule-associated protein found in microtubule-ribosome complexes. *Journal of Cell Science* **104**, 445–450.
- SWALLOW, D.M., GENDLER, S., GRIFFITHS, B., CORNEY, G., TAYLOR-PAPADIMITRIOU, J. & BRAMWELL, M.E. (1987) The human tumour-associated epithelial mucins are coded by an expressed hypervariable gene locus PUM. *Nature* **328**, 82–84.
- SWALLOW, D.M., GENDLER, S., GRIFFITHS, B., KEARNEY, A., POVEY, S., SHEER, D., PALMER, R.W. & TAYLOR-PAPADIMITRIOU, J. (1987) The hypervariable gene locus PUM, which codes for the tumour associated epithelial mucins, is located on chromosome 1, within the region 1q21-24. *Annals of human genetics* **51**, 289–294.
- SZAFRANSKA, A.E., DAVISON, T.S., JOHN, J., CANNON, T., SIPOS, B., MAGHNOUJ, A., LABOURIER, E. & HAHN, S.A. (2007) MicroRNA expression alterations are linked to tumorigenesis and non-neoplastic processes in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Oncogene* **26**, 4442–4452.

†

- TAKANO, M., FUJII, K., KITA, T., KIKUCHI, Y. & UCHIDA, K. (2004) Amplicon profiling reveals cytoplasmic overexpression of MUC1 protein as an indicator of resistance to platinum-based chemotherapy in patients with ovarian cancer. *Oncology Reports* **12**, 1177–1182.

- TANAKA, M., JAVLE, M., DONG, X., ENG, C., ABBRUZZESE, J.L. & LI, D. (2010) Gemcitabine metabolic and transporter gene polymorphisms are associated with drug toxicity and efficacy in patients with locally advanced pancreatic cancer. *Cancer* **116**, 5325–5335.
- TANG, W., ZHU, Y., GAO, J., FU, J., LIU, C., LIU, Y., SONG, C., ZHU, S., LENG, Y., WANG, G., CHEN, W., DU, P., HUANG, S., ZHOU, X., KANG, J. & CUI, L. (2014) MicroRNA-29a promotes colorectal cancer metastasis by regulating matrix metalloproteinase 2 and E-cadherin via KLF4. *British journal of cancer* **110**, 450–458.
- TANG, X., ZHENG, D., HU, P., ZENG, Z., LI, M., TUCKER, L., MONAHAN, R., RESNICK, M.B., LIU, M. & RAMRATNAM, B. (2014) Glycogen synthase kinase 3 beta inhibits microRNA-183-96-182 cluster via the β -Catenin/TCF/LEF-1 pathway in gastric cancer cells. *Nucleic acids research* **42**, 2988–2998.
- TAN, M.H., NOWAK, N.J., LOOR, R., OCHI, H., SANDBERG, A.A., LOPEZ, C., PICKREN, J.W., BERJIAN, R., DOUGLASS, H.O. & CHU, T.M. (1986) Characterization of a new primary human pancreatic tumor line. *Cancer Investigation* **4**, 15–23.
- TAN, M., WU, J. & CAI, Y. (2013) Suppression of Wnt signaling by the miR-29 family is mediated by demethylation of WIF-1 in non-small-cell lung cancer. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **438**, 673–679.
- TAUBE, J.H., MALOUF, G.G., LU, E., SPHYRIS, N., VIJAY, V., RAMACHANDRAN, P.P., UENO, K.R., GAUR, S., NICOLOSO, M.S., ROSSI, S., HERSCHKOWITZ, J.I., ROSEN, J.M., ISSA, J.-P.J., CALIN, G.A., CHANG, J.T. & MANI, S.A. (2013) Epigenetic silencing of microRNA-203 is required for EMT and cancer stem cell properties. *Scientific reports* **3**, 2687.
- TERADA, T., OHTA, T., SASAKI, M., NAKANUMA, Y. & KIM, Y.S. (1996) Expression of MUC apomucins in normal pancreas and pancreatic tumours. *The Journal of Pathology* **180**, 160–165.
- THERMANN, R. & HENTZE, M.W. (2007) Drosophila miR2 induces pseudo-polysomes and inhibits translation initiation. *Nature* **447**, 875–878.
- TINDER, T.L., SUBRAMANI, D.B., BASU, G.D., BRADLEY, J.M., SCETTINI, J., MILLION, A., SKAAR, T. & MUKHERJEE, P. (2008) MUC1 enhances tumor progression and contributes toward immunosuppression in a mouse model of spontaneous pancreatic adenocarcinoma. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* **181**, 3116–3125.
- TORRISANI, J., BOURNET, B., DU RIEU, M.C., BOUISSON, M., SOUQUE, A., ESCOURROU, J., BUSCAIL, L. & CORDELIER, P. (2009) let-7 MicroRNA Transfer in Pancreatic Cancer-Derived Cells Inhibits In Vitro Cell Proliferation but Fails to Alter Tumor Progression. *Human Gene Therapy* **20**, 831–844.
- TREON, S.P., MOLLIK, J.A., URASHIMA, M., TEOH, G., CHAUHAN, D., OGATA, A., RAJE, N., HILGERS, J.H., NADLER, L., BELCH, A.R., PILARSKI, L.M. & ANDERSON, K.C. (1999) Muc-1 core protein is expressed on multiple myeloma cells and is induced by dexamethasone. *Blood* **93**, 1287–1298.
- TRUTY, M.J. & URRUTIA, R. (2007) Basics of TGF- β and Pancreatic Cancer. *Pancreatology* **7**, 423–435.

U

- UCHIDA, Y., RAINA, D., KHARBANDA, S. & KUFE, D. (2013) Inhibition of the MUC1-C oncoprotein is synergistic with cytotoxic agents in the treatment of breast cancer cells. *Cancer biology & therapy* **14**, 127–134.
- UGALDE, A.P., RAMSAY, A.J., DE LA ROSA, J., VARELA, I., MARIÑO, G., CADIÑANOS, J., LU, J., FREIJE, J.M. & LÓPEZ-OTÍN, C. (2011) Aging and chronic DNA damage response activate a regulatory pathway involving miR-29 and p53. *The EMBO Journal* **30**, 2219–2232.

V

- VERSLYPE, C., VAN CUTSEM, E., DICATO, M., CASCINU, S., CUNNINGHAM, D., DIAZ-RUBIO, E., ET AL. (2007) The management of pancreatic cancer. Current expert opinion and recommendations derived from the 8th World Congress on Gastrointestinal Cancer, Barcelona, 2006. *Annals of oncology: official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* **18 Suppl 7**, vii1–vii10.
- VINALL, L.E., HILL, A.S., PIGNY, P., PRATT, W.S., TORIBARA, N., GUM, J.R., KIM, Y.S., PORCHET, N., AUBERT, J.P. & SWALLOW, D.M. (1998) Variable number tandem repeat polymorphism of the mucin genes located in the complex on 11p15.5. *Human Genetics* **102**, 357–366.
- VINCENT, A., HERMAN, J., SCHULICK, R., HRUBAN, R.H. & GOGGINS, M. (2011) Pancreatic cancer. *The Lancet* **378**, 607–620.
- VOLINIA, S., CALIN, G.A., LIU, C.-G., AMBS, S., CIMMINO, A., PETROCCA, F., VISIONE, R., IORIO, M., ROLDO, C., FERRACIN, M., PRUEITT, R.L., YANAIHARA, N., LANZA, G., SCARPA, A., VECCHIONE, A., NEGRINI, M., HARRIS, C.C. & CROCE, C.M. (2006) A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **103**, 2257–2261.
- VRBA, L., GARBE, J.C., STAMPFER, M.R. & FUTSCHER, B.W. (2011) Epigenetic regulation of normal human mammary cell type-specific miRNAs. *Genome Research* **21**, 2026–2037.

W

- WALTERS, R.W., BRADRICK, S.S. & GROMEIER, M. (2010) Poly(A)-binding protein modulates mRNA susceptibility to cap-dependent miRNA-mediated repression **16**, 239–250.
- WANG, C., WANG, X., LIANG, H., WANG, T., YAN, X., CAO, M., WANG, N., ZHANG, S., ZEN, K., ZHANG, C. & CHEN, X. (2013) miR-203 inhibits cell proliferation and migration of lung cancer cells by targeting PKC . *PloS One* **8**, e73985.

- WANG, G., MAO, W. & ZHENG, S. (2008) MicroRNA-183 regulates Ezrin expression in lung cancer cells. *FEBS Letters* **582**, 3663–3668.
- WANG, G., ZHANG, H., HE, H., TONG, W., WANG, B., LIAO, G., CHEN, Z. & DU, C. (2010) Up-regulation of microRNA in bladder tumor tissue is not common. *International Urology and Nephrology* **42**, 95–102.
- WANG, J., HUANG, S., ZHAO, M., YANG, M., ZHONG, J., GU, Y., PENG, H., CHE, Y. & HUANG, C. (2014) Identification of a circulating microRNA signature for colorectal cancer detection. *PloS One* **9**, e87451.
- WANG, N., LIANG, H., ZHOU, Y., WANG, C., ZHANG, S., PAN, Y., WANG, Y., YAN, X., ZHANG, J., ZHANG, C.-Y., ZEN, K., LI, D. & CHEN, X. (2014) miR-203 suppresses the proliferation and migration and promotes the apoptosis of lung cancer cells by targeting SRC. *PloS One* **9**, e105570.
- WANG, S., ZHAO, X., WANG, J., WEN, Y., ZHANG, L., WANG, D., CHEN, H., CHEN, Q. & XIANG, W. (2013) Upregulation of microRNA-203 is associated with advanced tumor progression and poor prognosis in epithelial ovarian cancer. *Medical Oncology (Northwood, London, England)* **30**, 681.
- WANG, Y., ZHANG, X., LI, H., YU, J. & REN, X. (2013) The role of miRNA-29 family in cancer. *European journal of cell biology* **92**, 123–128.
- WANG, Z., LI, Y., AHMAD, A., BANERJEE, S., AZMI, A.S., KONG, D. & SARKAR, F.H. (2011) Pancreatic cancer: understanding and overcoming chemoresistance. *Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology* **8**, 27–33.
- WEISSMANN-BRENNER, A., KUSHNIR, M., LITHWICK YANAI, G., AHARONOV, R., GIBORI, H., PURIM, O., KUNDEL, Y., MORGENSTERN, S., HALPERIN, M., NIV, Y. & BRENNER, B. (2012) Tumor microRNA-29a expression and the risk of recurrence in stage II colon cancer. *International Journal of Oncology* **40**, 2097–2103.
- WEI, W., HE, H.-B., ZHANG, W.-Y., ZHANG, H.-X., BAI, J.-B., LIU, H.-Z., CAO, J.-H., CHANG, K.-C., LI, X.-Y. & ZHAO, S.-H. (2013) miR-29 targets Akt3 to reduce proliferation and facilitate differentiation of myoblasts in skeletal muscle development. *Cell death & disease* **4**, e668.
- WEI, X., XU, H. & KUFE, D. (2005) Human MUC1 oncoprotein regulates p53-responsive gene transcription in the genotoxic stress response. *Cancer Cell* **7**, 167–178.
- WEI, X., XU, H. & KUFE, D. (2007) Human mucin 1 oncoprotein represses transcription of the p53 tumor suppressor gene. *Cancer Research* **67**, 1853–1858.
- WELCH, S.A. & MOORE, M.J. (2007) Erlotinib: success of a molecularly targeted agent for the treatment of advanced pancreatic cancer. *Future Oncology (London, England)* **3**, 247–254.
- WELLNER, U., SCHUBERT, J., BURK, U.C., SCHMALHOFER, O., ZHU, F., SONNTAG, A., ET AL. (2009) The EMT-activator ZEB1 promotes tumorigenicity by repressing stemness-inhibiting microRNAs. *Nature cell biology* **11**, 1487–1495.

- WEN, Y., CAFFREY, T.C., WHEELOCK, M.J., JOHNSON, K.R. & HOLLINGSWORTH, M.A. (2003) Nuclear association of the cytoplasmic tail of MUC1 and beta-catenin. *The Journal of Biological Chemistry* **278**, 38029–38039.
- VAN DE WIEL-VAN KEMENADE, E., LIGTENBERG, M.J., DE BOER, A.J., BUIJS, F., VOS, H.L., MELIEF, C.J., HILKENS, J. & FIGDOR, C.G. (1993) Episialin (MUC1) inhibits cytotoxic lymphocyte-target cell interaction. *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* **151**, 767–776.
- WILLIS, J.A., OLSON, S.H., ORLOW, I., MUKHERJEE, S., MCWILLIAMS, R.R., KURTZ, R.C. & KLEIN, R.J. (2012) A Replication Study and Genome-Wide Scan of Single-Nucleotide Polymorphisms Associated with Pancreatic Cancer Risk and Overall Survival. *Clinical Cancer Research* **18**, 3942–3951.
- WINBANKS, C.E., WANG, B., BEYER, C., KOH, P., WHITE, L., KANTHARIDIS, P. & GREGOREVIC, P. (2011) TGF-beta regulates miR-206 and miR-29 to control myogenic differentiation through regulation of HDAC4. *The Journal of Biological Chemistry* **286**, 13805–13814.
- WINTER, J.M., TANG, L.H., KLIMSTRA, D.S., BRENNAN, M.F., BRODY, J.R., ROCHA, F.G., JIA, X., QIN, L.-X., D'ANGELICA, M.I., DEMATTEO, R.P., FONG, Y., JARNAGIN, W.R., O'REILLY, E.M. & ALLEN, P.J. (2012) A novel survival-based tissue microarray of pancreatic cancer validates MUC1 and mesothelin as biomarkers. *PloS one* **7**, e40157.
- WOLFGANG, C.L., HERMAN, J.M., LAHERU, D.A., KLEIN, A.P., ERDEK, M.A., FISHMAN, E.K. & HRUBAN, R.H. (2013) Recent progress in pancreatic cancer. *CA: a cancer journal for clinicians* **63**, 318–348.
- WRESCHNER, D.H., HAREUVENI, M., TSARFATY, I., SMORODINSKY, N., HOREV, J., ZARETSKY, J., KOTKES, P., WEISS, M., LATHE, R. & DION, A. (1990) Human epithelial tumor antigen cDNA sequences. Differential splicing may generate multiple protein forms. *European journal of biochemistry / FEBS* **189**, 463–473.
- WU, H., XIAO, Z., WANG, K., LIU, W. & HAO, Q. (2013) MiR-145 is downregulated in human ovarian cancer and modulates cell growth and invasion by targeting p70S6K1 and MUC1. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **441**, 693–700.
- WU, Q., WANG, C., LU, Z., GUO, L. & GE, Q. (2012) Analysis of serum genome-wide microRNAs for breast cancer detection. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry* **413**, 1058–1065.
- WU, Z., HUANG, X., HUANG, X., ZOU, Q. & GUO, Y. (2013) The inhibitory role of Mir-29 in growth of breast cancer cells. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research* **32**, 98.

X

- XIA, H., CHEUNG, W.K.C., SZE, J., LU, G., JIANG, S., YAO, H., BIAN, X.-W., POON, W.S., KUNG, H. & LIN, M.C. (2010) miR-200a Regulates Epithelial-Mesenchymal to Stem-like Transition via ZEB2 and β -Catenin Signaling. *Journal of Biological Chemistry* **285**, 36995–37004.

- XIA, Q., ISHIGAKI, Y., ZHAO, X., SHIMASAKI, T., NAKAJIMA, H., NAKAGAWA, H., TAKEGAMI, T., CHEN, Z. & MOTOO, Y. (2011) Human SMG-1 is involved in gemcitabine-induced primary microRNA-155/BIC up-regulation in human pancreatic cancer PANC-1 cells. *Pancreas* **40**, 55–60.
- XIONG, Y., FANG, J.-H., YUN, J.-P., YANG, J., ZHANG, Y., JIA, W.-H. & ZHUANG, S.-M. (2010) Effects of microRNA-29 on apoptosis, tumorigenicity, and prognosis of hepatocellular carcinoma. *Hepatology (Baltimore, Md.)* **51**, 836–845.
- XU, L., LI, Y., YAN, D., HE, J. & LIU, D. (2014) MicroRNA-183 inhibits gastric cancer proliferation and invasion via directly targeting Bmi-1. *Oncology Letters* **8**, 2345–2351.

Y

- YAMADA, N., KITAMOTO, S., YOKOYAMA, S., HAMADA, T., GOTO, M., TSUTSUMIDA, H., HIGASHI, M. & YONEZAWA, S. (2011) Epigenetic regulation of mucin genes in human cancers. *Clinical Epigenetics* **2**, 85–96.
- YAMADA, N., NISHIDA, Y., TSUTSUMIDA, H., HAMADA, T., GOTO, M., HIGASHI, M., NOMOTO, M. & YONEZAWA, S. (2008) MUC1 expression is regulated by DNA methylation and histone H3 lysine 9 modification in cancer cells. *Cancer Research* **68**, 2708–2716.
- YAMAMOTO, M., BHARTI, A., LI, Y. & KUFEL, D. (1997) Interaction of the DF3/MUC1 breast carcinoma-associated antigen and beta-catenin in cell adhesion. *The Journal of Biological Chemistry* **272**, 12492–12494.
- YANAIHARA, N., CAPLEN, N., BOWMAN, E., SEIKE, M., KUMAMOTO, K., YI, M., STEPHENS, R.M., OKAMOTO, A., YOKOTA, J., TANAKA, T., CALIN, G.A., LIU, C.-G., CROCE, C.M. & HARRIS, C.C. (2006) Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Cell* **9**, 189–198.
- YAO, J., ZHOU, E., WANG, Y., XU, F., ZHANG, D. & ZHONG, D. (2014) microRNA-200a inhibits cell proliferation by targeting mitochondrial transcription factor A in breast cancer. *DNA and cell biology* **33**, 291–300.
- YIN, J., ZHENG, G., JIA, X., ZHANG, Z., ZHANG, W., SONG, Y., XIONG, Y. & HE, Z. (2013) A Bmi1-miRNAs cross-talk modulates chemotherapy response to 5-fluorouracil in breast cancer cells. *PloS One* **8**, e73268.
- YONEZAWA, S., GOTO, M., YAMADA, N., HIGASHI, M. & NOMOTO, M. (2008) Expression profiles of MUC1, MUC2, and MUC4 mucins in human neoplasms and their relationship with biological behavior. *Proteomics* **8**, 3329–3341.
- YOO, J.K., KIM, C.-H., JUNG, H.Y., LEE, D.R. & KIM, J.K. (2014) Discovery and characterization of miRNA during cellular senescence in bone marrow-derived human mesenchymal stem cells. *Experimental Gerontology* **58C**, 139–145.

- YOSHINO, H., ENOKIDA, H., ITESAKO, T., TATARANO, S., KINOSHITA, T., FUSE, M., KOJIMA, S., NAKAGAWA, M. & SEKI, N. (2013) Epithelial-mesenchymal transition-related microRNA-200s regulate molecular targets and pathways in renal cell carcinoma. *Journal of human genetics*.
- YU, H. & JOVE, R. (2004) The STATs of cancer--new molecular targets come of age. *Nature Reviews. Cancer* **4**, 97–105.
- YU, J., LI, A., HONG, S.-M., HRUBAN, R.H. & GOGGINS, M. (2012) MicroRNA alterations of pancreatic intraepithelial neoplasias. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* **18**, 981–992.
- YU, J., OHUCHIDA, K., MIZUMOTO, K., FUJITA, H., NAKATA, K. & TANAKA, M. (2010) MicroRNA miR-17-5p is overexpressed in pancreatic cancer, associated with a poor prognosis, and involved in cancer cell proliferation and invasion. *Cancer Biology & Therapy* **10**, 748–757.
- YUNIS, A.A., ARIMURA, G.K. & RUSSIN, D.J. (1977) Human pancreatic carcinoma (MIA PaCa-2) in continuous culture: sensitivity to asparaginase. *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer* **19**, 128–135.
- YU, P.-N., YAN, M.-D., LAI, H.-C., HUANG, R.-L., CHOU, Y.-C., LIN, W.-C., YEH, L.-T. & LIN, Y.-W. (2014) Downregulation of miR-29 contributes to cisplatin resistance of ovarian cancer cells. *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer* **134**, 542–551.

Z

- ZAVORAL, M., MINARIKOVA, P., ZAVADA, F., SALEK, C. & MINARIK, M. (2011) Molecular biology of pancreatic cancer. *World journal of gastroenterology: WJG* **17**, 2897–2908.
- ZHANG, D., GAO, J., ZHU, L., HU, Z., HOU, R., LIU, S., TAN, M., LIU, J. & LIN, B. (2013) Chemoresistance Is Associated with MUC1 and Lewis y Antigen Expression in Ovarian Epithelial Cancers. *International Journal of Molecular Sciences* **14**, 11024–11033.
- ZHANG, H.-H., ZHANG, Z.-Y., CHE, C.-L., MEI, Y.-F. & SHI, Y.-Z. (2013) Array analysis for potential biomarker of gemcitabine identification in non-small cell lung cancer cell lines. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology* **6**, 1734–1746.
- ZHANG, K., DAI, L., ZHANG, B., XU, X., SHI, J., FU, L., CHEN, X., LI, J. & BAI, Y. (2014) miR-203 is a Direct Transcriptional Target of E2F1 and Causes G1 Arrest in Esophageal Cancer Cells. *Journal of Cellular Physiology*.
- ZHANG, Q.-H., SUN, H.-M., ZHENG, R.-Z., LI, Y.-C., ZHANG, Q., CHENG, P., TANG, Z.-H. & HUANG, F. (2013) Meta-analysis of microRNA-183 family expression in human cancer studies comparing cancer tissues with noncancerous tissues. *Gene* **527**, 26–32.

- ZHANG, X., ZHAO, X., FISKUS, W., LIN, J., LWIN, T., RAO, R., ZHANG, Y., CHAN, J.C., FU, K., MARQUEZ, V.E., CHEN-KIANG, S., MOSCINSKI, L.C., SETO, E., DALTON, W.S., WRIGHT, K.L., SOTOMAYOR, E., BHALLA, K. & TAO, J. (2012) Coordinated silencing of MYC-mediated miR-29 by HDAC3 and EZH2 as a therapeutic target of histone modification in aggressive B-Cell lymphomas. *Cancer cell* **22**, 506–523.
- ZHAO, J.-J., LIN, J., LWIN, T., YANG, H., GUO, J., KONG, W., DESSUREAULT, S., MOSCINSKI, L.C., REZANIA, D., DALTON, W.S., SOTOMAYOR, E., TAO, J. & CHENG, J.Q. (2010) microRNA expression profile and identification of miR-29 as a prognostic marker and pathogenetic factor by targeting CDK6 in mantle cell lymphoma. *Blood* **115**, 2630–2639.
- ZHONG, S., LI, W., CHEN, Z., XU, J. & ZHAO, J. (2013) miR-222 and miR-29a contribute to the drug-resistance of breast cancer cells. *Gene*.
- ZHOU, L., WANG, L., LU, L., JIANG, P., SUN, H. & WANG, H. (2012) Inhibition of miR-29 by TGF-beta-Smad3 signaling through dual mechanisms promotes transdifferentiation of mouse myoblasts into myofibroblasts. *PloS One* **7**, e33766.
- ZHOU, L., ZHANG, W.-G., WANG, D.-S., TAO, K.-S., SONG, W.-J. & DOU, K.-F. (2014) MicroRNA-183 is involved in cell proliferation, survival and poor prognosis in pancreatic ductal adenocarcinoma by regulating Bmi-1. *Oncology Reports* **32**, 1734–1740.
- ZHOU, Y., WAN, G., SPIZZO, R., IVAN, C., MATHUR, R., HU, X., YE, X., LU, J., FAN, F., XIA, L., CALIN, G.A., ELLIS, L.M. & LU, X. (2014) miR-203 induces oxaliplatin resistance in colorectal cancer cells by negatively regulating ATM kinase. *Molecular Oncology* **8**, 83–92.
- ZRIHAN-LICHT, S., VOS, H.L., BARUCH, A., ELROY-STEIN, O., SAGIV, D., KEYDAR, I., HILKENS, J. & WRESCHNER, D.H. (1994) Characterization and molecular cloning of a novel MUC1 protein, devoid of tandem repeats, expressed in human breast cancer tissue. *European journal of biochemistry / FEBS* **224**, 787–795.
- ZRIHAN-LICHT, S., WEISS, M., KEYDAR, I. & WRESCHNER, D.H. (1995) DNA methylation status of the MUC1 gene coding for a breast-cancer-associated protein. *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer* **62**, 245–251.

Sites de prédictions de miARN

MirBase : <http://www.mirbase.org/>
 MirWalk : <http://www.umm.uni-heidelberg.de/apps/zmf/mirwalk/>
 MiRanda : <http://www.microrna.org/microrna/home.do>
 TargetScan : <http://www.targetscan.org/>

Banque d'images PowerPoint

<http://smart.servier.fr/servier-medical-art>

