



HAL
open science

Nouveau modèle d'étude de l'hépatoblastome in vivo et identification de microARNs régulateurs de la β -caténine

Emilie Indersie

► To cite this version:

Emilie Indersie. Nouveau modèle d'étude de l'hépatoblastome in vivo et identification de microARNs régulateurs de la β -caténine. Biologie cellulaire. Université de Bordeaux, 2016. Français. NNT : 2016BORD0212 . tel-01516607

HAL Id: tel-01516607

<https://theses.hal.science/tel-01516607>

Submitted on 2 May 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.

THÈSE

pour l'obtention du grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE BORDEAUX

Ecole Doctorale des Sciences de la Vie et de la Santé
Spécialité Biologie Cellulaire et Physiopathologie

Nouveau modèle d'étude de l'hépatoblastome *in vivo* et identification de microARNs régulateurs de la β -caténine

Présentée et soutenue publiquement

Le 18 novembre 2016

Par Emilie INDERSIE

Née le 30 mai 1990 à Vernon (27)

Membres du jury

Pr. François DOIGNON	Professeur - Université de Bordeaux	Président
Pr. Estelle ESPINOS-PARROU	Professeur - Université de Toulouse	Rapporteur
Dr. Christine PERRET	Directeur de recherche - Université Paris-Descartes	Rapporteur
Dr. Marie-Annick BUENDIA	Directeur de recherche - Université Paris-Sud	Invité
Dr. Bruno CARDINAUD	Maitre de conférence - Bordeaux Institut National Polytechnique	Invité
Dr. Christophe GROSSET	Directeur de recherche - Université de Bordeaux	Directeur de thèse

“Chaque difficulté rencontrée doit être l'occasion d'un nouveau progrès”

Pierre de Coubertin

A papi Roland,
A papi Jean.

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je tiens à remercier tous les membres de mon jury de thèse.

Je remercie le Professeur **François Doignon** pour les enseignements que vous m'avez apportés durant mon Master et pour avoir accepté de présider ma soutenance de thèse.

Je remercie le Professeur **Estelle Espinos-Parrou** et le Docteur **Christine Perret** d'avoir accepté d'évaluer mon travail. Estelle, je vous remercie également de m'avoir aiguillée et encouragée lors de mon comité de mi-thèse et des congrès auxquels nous avons eu l'occasion de nous rencontrer.

Je remercie le Professeur **Marie-Annick Buendia** de participer à mon jury de thèse, pour notre collaboration étroite et pour votre disponibilité lorsque j'avais besoin d'informations à propos des échantillons d'HBL que vous nous avez fournis.

Enfin, merci au Docteur **Bruno Cardinaud** de participer à mon jury de thèse et pour avoir été mon tuteur au cours de ces trois années, merci pour votre écoute et vos remarques avisées.

Je remercie bien sûr mon directeur de thèse le Docteur **Christophe Grosset**. Tous ces travaux n'auraient pas été possibles sans toi. Merci pour la confiance que tu m'as accordée dès le début et la reconnaissance que tu as pour mon travail. Ces trois années n'ont pas été un long fleuve tranquille mais nous avons réussi, avec nos caractères respectifs, à réaliser de nombreux projets intéressants. Cette thèse m'a permis de beaucoup évoluer, tant au niveau professionnel qu'au niveau personnel.

Je remercie également l'association **Eva pour la vie** et l'**Institut National du Cancer** qui ont financé respectivement deux ans et un an de mes travaux de thèse.

Je remercie aussi les associations Aidons Marina, E.S.CA.PE., Kaëna et les lapinours et à la Fondation Flavien pour leurs soutiens financiers qui ont contribué aux travaux de mon équipe de recherche.

Je tiens également à remercier mes collaborateurs aux côtés desquels j'ai énormément appris. Merci aux Docteurs **Carmelo Di Primo** et à **William Palau** de m'avoir fait découvrir la SPR. Merci également aux Docteurs **Chloé Jaubert**, **Cyril Masante** et **Michel Ventura**. Merci à **Tony Ernault**. Merci à **Nathalie Dugot-Senant** et **Alban Giese** pour m'avoir donné de nombreux conseils et l'accès libre aux services d'histologies. Merci au Docteur **Martin Hagedorn** de m'avoir fait découvrir le modèle CAM. Merci au Docteur **Sébastien Lepreux**, ça a été une très bonne expérience de te former sur les nouvelles techniques de western blot, et merci pour ta disponibilité et ton aide dans l'analyse et la mise au point des marquages histochimiques. Egalement un très grand merci au Docteur **Monique Fabre** pour votre disponibilité et votre aide précieuse pour l'analyse des marquages histochimiques des tumeurs

formées sur la CAM. Merci de m'avoir donné le vocabulaire « de pathologistes » auquel je ne suis pas encore habituée, et orienté sur la description des nodules tumoraux. Merci aussi au Docteur **Lucile Tran**, chef de projet santé à Aquitaine Science Transfert[®] pour les démarches effectuées et les explications relatives au dépôt du brevet. Je remercie aussi les **cliniciens**, **chirurgiens** et **pathologistes** pour les échantillons d'HBL qu'ils nous ont fourni.

Je remercie aussi mes anciens maîtres de stages, les Docteurs **Cathy Staedel** et **Jean-Paul Lasserre**. J'ai été ravie d'avoir effectué mes stages de Master avec vous. Cathy, vous m'avez fait découvrir le monde des microARNs et m'avez donné l'envie de continuer à travailler sur cette thématique. Jean-Paul, grâce à toi j'ai découvert les levures et la biochimie. J'ai vraiment passé 6 mois sympathiques et gourmands, également grâce à **Manu** et **Stéphane**. Merci à vous trois de m'avoir aidé pour le concours de l'Ecole Doctorale.

S'il y a une personne que je dois énormément remercier dans cette thèse, c'est bien **Sarah**. Merci pour ton accueil dans le labo (et dans le bureau). Merci de m'avoir formée à toutes les techniques de base que j'ai utilisées durant ma thèse. Mon arrivée et mon passage au laboratoire n'auraient pas été pareil sans toi. Merci pour tout: ton aide, ton écoute, ta disponibilité, et tes remarques pertinentes dans la correction de cette thèse. Merci également pour toutes ces discussions à refaire le monde et pour toutes les musiques que tu m'as faite découvrir. Tu es une personne formidable et j'espère que tu vas pouvoir t'épanouir dans ta vie personnelle et professionnelle, quelques soient tes choix. Et bon courage pour la reprise des études !!

Merci à mes colocataires de bureau, de passage ou de longue durée. Docteur **Flora Cartier**, quel plaisir d'avoir travaillé avec toi durant deux années. Heureusement que vous pouvions nous partager les mises au point et les protocoles de l'une et de l'autre, je pense que ça nous a fait gagner un temps précieux d'être deux. Nous avons partagé beaucoup de fous rires. Docteur **Lisa Paysan**, toujours le sourire même si je ne t'ai pas connue dans la période la plus facile de ta thèse. Pour moi, tu seras toujours Mme Souris (Souris mi !!), j'ai apprécié partager les soirées au labo et en dehors avec toi. **Angélique Desplat**, merci de m'avoir montré la voie pour toutes les manip œufs. Nos journées « ouverture des œufs » furent d'agréables séances de détente, de rigolades et de sympathiques discussions. **Gaëlle Labrunie**, merci d'avoir quand même accepté de nous parler après l'accueil qu'on t'a réservé. Merci pour ces échanges constructifs, tous les conseils que tu m'as donnés au cours de l'écriture et ta correction. Et merci pour toutes les discussions et les fous rires qu'on a pu partager, j'espère te voir bientôt à la télévision dans la prochaine saison de ton émission préférée !!

Je remercie **tous mes collègues** de l'ancienne unité **GREF** ou U1053 et de la nouvelle équipe **MiRCaDe** de l'U1035, sans citer de nom de peur d'en oublier.

A titre plus personnel, j'adresse également d'autres remerciements sans ordre d'importance et en espérant n'avoir oublié personne.

Tout particulièrement, les Docteurs **Véronique Neaud** et **Caroline Gest** (ou « la Normande »), le trinôme de culture de 7h30, nos longues discussions matinales en salle de culture sur la recherche et sur la vie en générale me manquent déjà. Je pense que votre présence m'a motivée à sortir de mon lit aussi tôt tous les jours. Merci aux Docteurs **Léo Piquet** et **Fabien Binamé** pour toutes vos blagues qui ont égayées nos journées. La plupart de temps elles n'étaient pas vraiment drôles mais elles ont eu le mérite de toujours nous faire rire. Léo, bon courage... plus que quelques petites semaines ;). Merci au futur Docteur **Elodie Henriot** (ou « Dora ») pour ta gentillesse et ton franc parler, j'ai *sérieusement* apprécié partager des moments hors labo avec toi au cours d'un Escape Game ou d'une petite bière. Futur Docteur **Joaquim Javary** (ou « Minou »), tu sais bien que je n'ai rien à dire sur toi mais je vais faire un effort :). Merci pour ta bonne humeur, les apéros, le moment de détente à la fête du vin avec **Camille** (« Oh »)... J'ai particulièrement apprécié ton anniversaire l'an dernier. Futur Docteur **Caroline Capdevielle** « Kinder », grâce à toi j'ai découvert qu'on pouvait devenir aussi rouge que la porte de la cafet' en un rien de temps, je découvre également une région avec sa culture, ses expressions (la sapinette!), sa prononciation (l'aiguise-crayon). Docteur **Véronique Veillat** merci pour ta gentillesse, ta disponibilité et tes conseils, travailler avec toi a été un réel plaisir. Docteur **Katarzyna Hooks**, thank you to make me discover your way you see science and bioinformatics world, and help me to improve my english. Docteur **Francis Sagliocco**, merci pour ta gentillesse et ta disponibilité, ainsi pour m'avoir appris les clonages et m'en avoir fait un certain nombre. **Hélène Fazli** (« le boy »), ta gentillesse et ton calme m'ont impressionné, j'ai beaucoup apprécié partager les expériences et les petites histoires avec toi. Futur Docteur **Laëtitia Dard**, merci pour ton passage au labo, nous avons bien rigolé pendant ces quelques mois et grâce à toi j'ai découvert une nouvelle passion.

Je remercie du fond du cœur mes collègues et amis runners : Docteur **Nicolas Dejeans**, **Thibaud Ildefonse**, **Néstor Pallarés Lupon** et **Gaëlle Labrunie** (encore elle !). Toutes nos séances m'ont fait un bien fou. Je suis fière qu'on ait débuté presque tous ensemble et qu'on en soit arrivé là. Nous avons bouclé deux semi-marathons comme des champions et après le marathon de la thèse, le nouvel objectif est bien sûr celui de 42,195km ! Et je rajouterais particulièrement un énorme merci au correcteur de mon introduction, Nico. Merci pour le temps que tu as pris à lire cette introduction, pour tes remarques pertinentes, tes nombreuses

questions et tous tes commentaires qui m'ont énormément aidé à avancer sur l'écriture et sur la réflexion de cette thèse.

Je remercie plus également mes amis scientifiques et thésards. Ça a été un plaisir de partager les années précédentes et ces années avec vous. C'est important de toujours s'encourager et se serrer les coudes, même à distance. Nos nombreuses soirées et/ou week-end nous ont tous permis de nous ressourcer. Pour futurs Docteurs, je suis la première d'une longue série et je vous souhaite le meilleur : **Laurianne** (ma coloc préférée ^^), **Pierre, Elise, Olivier, Vanessa, Benjamin, Sabrina, Sébastien, Noémie, Claire V., Floriane, Natalia.**

Merci également à mes autres amis, non moins importants, qui m'ont permis de maintenir une vie sociale durant ces trois dernières années et plus: **Claire, Aline, Magalie, Xavier, Laura, Ahcène, Emilie, Thomas, Sophie, Rémi, Charlotte, Quentin, Pierre, Emilie, Julien, Pauline, JB, Emilie, Florent, Sébastien, Ophélie, Anne-So, Xavier.**

Je remercie ma belle-famille, en particulier **Aline, François, Alain, Myriam, Aurore, Gwen, Aurélien, Magalie, Noémie, Thomas, Romain** et **Jérôme**. Merci de m'avoir laissé entrer dans cette fabuleuse famille. Merci pour les week-ends, soirées, repas, apéros, pétanques... et merci pour votre soutien sans failles.

Je remercie également toute ma famille pour m'avoir toujours encouragé dans la vie. Merci à mes oncles, tantes, cousins, cousines. Merci à mes grand-mères **Ginette** et **Elisabeth**. Merci à mon frère, **Damien**, et **Laureline**, nous sommes loin des yeux mais près du cœur. Enfin un immense merci à mes parents, **Isabelle** et **Dominique**, de m'avoir toujours soutenue dans mes choix, d'avoir toujours fait en sorte que je sois dans les meilleures conditions pour avancer dans la vie. Cette thèse, c'est grâce à vous que j'ai pu la réaliser.

Enfin, et pas des moindres, merci à **Adrien**, celui qui a suivi mon rythme au quotidien et qui m'a supporté ces quatre dernières années. Merci pour ton calme légendaire qui m'a beaucoup apaisée. Merci de t'être particulièrement occupé de moi durant ces semaines d'écriture (et de m'avoir évité de prendre 30kg en me cuisinant des bons petits plats). Et merci pour tout ce que tu fais pour mon bonheur.

ABSTRACT

New *in vivo* model of hepatoblastoma and identification of microRNAs regulating β -catenin.

Hepatoblastoma (HBL) is the most common pediatric liver cancer. At molecular level it is characterized by activating mutations in β -catenin gene (*CTNNB1*) that cause protein accumulation and abnormal Wnt signaling pathway activation leading to malignant transformation of hepatic cells. Therefore, β -catenin is a key therapeutic target in HBL.

This manuscript describes two major parts of my thesis project that aimed to understand the role of β -catenin-regulating microRNAs in HBL carcinogenesis.

The first part presents the development of a new *in vivo* HBL model. This work consisted of making HBL-derived cells xenograft on chick embryo chorioallantoic membrane (CAM) and studying tumor development using histological and molecular approaches. My results show that HBL cells implanted on CAM modify their phenotype and activate survival and proliferation mechanisms to form organized and vascularized tumor nodules. Cell treatment with cisplatin leads to tumor progression arrest.

The second part presents results concerning the regulation of β -catenin and oncogenic processes by microRNAs in HBL cells. A functional screening allowed me to identify several microRNAs with an inhibitory effect on β -catenin. Four microRNAs down-regulated in patient tumors inhibit cell proliferation and Wnt pathway activity *in vitro*. The most efficient microRNA directly interacts with β -catenin mRNA through a unique site localized in 3' untranslated region and blocks HBL tumor growth on CAM.

During my thesis I developed a new animal model to study HBL that allows modelling rapid tumor growth and testing the impact of therapeutic molecules. My work also led to the identification of new microRNAs down-regulated in HBL tumors that inhibit β -catenin expression and act as tumor suppressor genes. Those microRNAs represent new potential therapeutic molecules for HBL treatment and could be also used as diagnostic and prognostic biomarkers.

Key words: Hepatoblastoma, Cancer, Liver, Pediatric, MicroRNAs, β -catenin, Wnt pathway, Chorioallantoic membrane, Chick.

RESUME

Nouveau modèle d'étude de l'hépatoblastome *in vivo* et identification de microARNs régulateurs de la β -caténine

L'hépatoblastome (HBL) est le cancer du foie le plus fréquent chez l'enfant. Au niveau moléculaire, il est caractérisé par des mutations activatrices dans le gène de la β -caténine (*CTNNB1*) entraînant une accumulation de sa protéine et une activation anormale de la voie de signalisation Wnt, responsables de la transformation maligne des cellules hépatiques. Ainsi, la β -caténine est une cible thérapeutique majeure dans l'HBL.

Ce manuscrit décrit les deux parties principales de mon projet de thèse, dont l'objectif était d'étudier le rôle de microARNs régulateurs de la β -caténine sur la carcinogenèse de l'HBL.

La première partie présente le développement d'un nouveau modèle d'étude *in vivo* de l'HBL. Ce travail a consisté à réaliser des xénogreffes de cellules dérivées d'HBL sur la membrane chorioallantoïdienne (CAM) de l'embryon de poulet, et à étudier le développement des tumeurs par des approches histologiques et moléculaires. Mes résultats montrent que les cellules d'HBL modifient leur phénotype et activent des mécanismes de survie et de prolifération pour former des nodules tumoraux structurés et vascularisés au sein de la CAM. Le traitement des cellules par le cisplatine conduit à un arrêt net de la progression tumorale.

La seconde partie présente les résultats concernant la régulation de la β -caténine et des processus oncogéniques par les microARNs dans les cellules d'HBL. Un crible fonctionnel m'a permis d'identifier plusieurs microARNs ayant un effet inhibiteur sur la β -caténine. Quatre microARNs, sous-exprimés dans les tumeurs de patients, bloquent la prolifération cellulaire et l'activité de la voie Wnt *in vitro*. Le miARN le plus efficace interagit avec l'ARNm de la β -caténine *via* un site unique localisé dans sa région 3' non traduite et bloque la croissance des tumeurs d'HBL sur la CAM.

Durant ma thèse j'ai développé un nouveau modèle animal d'étude de l'HBL qui permet de modéliser la croissance tumorale et de tester l'impact de molécules thérapeutiques. Ce travail a également permis d'identifier de nouveaux microARNs sous-exprimés dans les tumeurs d'HBL, qui inhibent l'expression de la β -caténine et agissent comme des gènes suppresseurs de tumeur. Ces microARNs constituent de potentielles nouvelles molécules thérapeutiques dans le traitement de l'HBL et pourraient aussi être utilisés comme des biomarqueurs diagnostiques et pronostiques.

Mots clefs: Hépatoblastome, Cancer, Foie, Pédiatrique, MicroARNs, β -caténine, Voie Wnt, Modèle, Membrane chorioallantoïdienne, Poulet.

Cette thèse a été réalisée au laboratoire

INSERM U1035

Biothérapie des maladies génétiques, inflammatoires et cancer (BMGIC)

Equipe microARNs, Cancer et Développement (ex-U1053)

Bâtiment 1B, 3^{ème} étage - Carreire Zone Nord

146 rue Léo Saignat – 33076 Bordeaux Cedex

Cette thèse a été financée par

l'Association Eva pour la vie et l'Institut National du Cancer (INCa)



TABLE DES MATIERES

LISTE DES FIGURES	- 1 -
LISTE DES ABREVIATIONS	- 5 -
INTRODUCTION.....	- 9 -
I. L'HEPATOBLASTOME	- 11 -
1. Généralités.....	- 11 -
1.1. Les facteurs de risque	- 12 -
1.2. Dépistage et diagnostic.....	- 13 -
2. Les classifications et les stratégies thérapeutiques associées.....	- 14 -
2.1. Les différentes classifications de l'HBL	- 14 -
2.1.1 <i>La classification histologique</i>	- 14 -
2.1.2 <i>La classification PRETEXT</i>	- 15 -
2.1.3 <i>La classification moléculaire</i>	- 17 -
2.2. Les stratégies thérapeutiques.....	- 17 -
2.2.1 <i>Vers une uniformisation des protocoles cliniques</i>	- 17 -
2.2.2 <i>La chimiothérapie</i>	- 18 -
2.2.3 <i>L'exérèse chirurgicale et la transplantation hépatique</i>	- 19 -
2.2.4 <i>Une augmentation globale des taux de survie</i>	- 19 -
3. Les altérations moléculaires de l'HBL.....	- 20 -
3.1. Les caractéristiques moléculaires de l'HBL	- 20 -
3.1.1 <i>Les altérations génétiques</i>	- 20 -
3.1.2 <i>Deux voies particulièrement altérées</i>	- 21 -
3.2. La classification moléculaire de l'HBL.....	- 22 -
4. Les modèles <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> de l'HBL	- 24 -
5. Conclusion	- 25 -
II. LA VOIE DE SIGNALISATION WNT/B-CATENINE	- 27 -
1. La β -caténine, structure et fonction.....	- 27 -
1.1. Fonction structurale.....	- 30 -
1.2. Fonction de signalisation.....	- 31 -
1.3. Fonction dans la régulation post-transcriptionnelle des ARNm	- 33 -
2. La régulation de la β -caténine par le complexe de dégradation.....	- 34 -
3. La dérégulation de la voie Wnt/ β -caténine dans le cancer.....	- 35 -
4. Conclusion	- 37 -
III. LES MICROARNS	- 39 -
1. Biogenèse des miARNs	- 40 -
1.1. Origine et synthèse	- 40 -
1.2. Maturation	- 43 -
1.3. Le complexe RISC	- 44 -
2. Interaction miARN-ARNm.....	- 46 -
2.1. Reconnaissance du miARN avec sa cible	- 46 -
2.2. Les différents types d'appariements.....	- 48 -

2.3.	Les outils bioinformatiques de prédiction	- 49 -
3.	Les mécanismes d'action des miARNs.....	- 52 -
3.1.	Inhibition de l'expression génique	- 52 -
3.1.1	<i>Inhibition de la traduction.....</i>	- 54 -
3.1.2	<i>Dégradation des ARNm.....</i>	- 54 -
3.1.3	<i>Traduction et/ou dégradation ?.....</i>	- 56 -
3.2.	Activation de l'expression génique	- 57 -
3.2.1	<i>Exemple d'activation directe de l'expression des ARNm.....</i>	- 57 -
3.2.2	<i>Exemples d'activation indirecte de l'expression des ARNm.....</i>	- 57 -
3.3.	Activation ou répression de l'expression génique ?.....	- 58 -
4.	Conclusion	- 58 -
IV.	MICROARNs ET CANCER	- 59 -
1.	Les mécanismes de dérégulation de l'expression des miARNs dans les cancers .	- 60 -
1.1.	Les anomalies chromosomiques.....	- 61 -
1.2.	La régulation épigénétique	- 63 -
1.3.	La régulation par les facteurs de transcription	- 65 -
1.4.	L'altération de la biogenèse et de la stabilité des miARNs.....	- 66 -
1.4.1	<i>La dérégulation du clivage des pri-miARNs</i>	- 67 -
1.4.2	<i>La modulation de la maturation des pré-miARNs en miARNs matures.....</i>	- 68 -
1.4.3	<i>La régulation de la stabilité des miARNs.....</i>	- 68 -
2.	Le rôle fonctionnel des miARNs dans les cancers.....	- 69 -
2.1.	Exemples de miARNs supresseurs de tumeurs	- 69 -
2.2.	Exemples de miARNs oncogènes	- 70 -
2.3.	La double casquette des miARNs	- 71 -
3.	MiARNs et thérapie génique.....	- 73 -
3.1.	Thérapie par inhibition de miARNs	- 74 -
3.2.	Thérapie par remplacement de miARNs.....	- 77 -
3.3.	Les solutions de biodistribution des miARNs thérapeutiques.....	- 78 -
4.	Les miARNs, l'HBL et la β -caténine	- 80 -
4.1.	L'altération de l'expression des miARNs dans l'HBL	- 80 -
4.2.	La régulation de la β -caténine par les miARNs	- 82 -
5.	Conclusion	- 84 -
	OBJECTIFS	- 87 -
	RESULTATS	- 91 -
	PARTIE 1 : ELABORATION D'UN NOUVEAU MODELE D'ETUDE DE L'HBL <i>IN</i>	
	<i>VIVO</i>	- 93 -
	INTRODUCTION	- 95 -
	MATERIELS ET METHODES	- 99 -
	RESULTATS.....	- 105 -
1.	Mise au point des conditions d'implantation des cellules Huh6.....	- 105 -
2.	Caractérisation de l'implantation des cellules Huh6 sur la CAM de poulet.....	- 111 -
2.1.	Caractérisation histologique de l'implantation des cellules Huh6 sur la CAM	
	de poulet.....	- 112 -
2.1.1	<i>Evolution de la CAM au cours de l'embryogenèse.....</i>	- 112 -

2.1.2	<i>Caractérisation histologique du développement des nodules tumoraux...</i>	- 113 -
2.2.	Caractérisation moléculaire des nodules formés par les cellules Huh6 sur la CAM de poulet.....	- 120 -
2.2.1	<i>Statistiques de la cartographie des séquences et expression des gènes....</i>	- 122 -
2.2.2	<i>Evolution de la CAM au cours de l'embryogenèse.....</i>	- 123 -
2.2.3	<i>Influence du développement du nodule tumoral de cellules Huh6 sur le développement de la CAM.....</i>	- 126 -
2.2.4	<i>Caractérisation moléculaire du développement des nodules tumoraux ...</i>	- 133 -
2.2.4.a	<i>Comparaison entre cellules Huh6 implantées sur la CAM et les cellules Huh6 in vitro.....</i>	- 133 -
2.2.4.b	<i>Comparaison entre les cellules Huh6 implantées sur la CAM au cours du développement des nodules tumoraux.....</i>	- 137 -
3.	Effet de la chimiothérapie au cisplatine sur les tumeurs formées par les cellules Huh6 sur la CAM.....	- 144 -
4.	Résultats préliminaires de l'implantation d'un modèle PDX dérivé d'HBL sur la CAM de poulet.....	- 150 -
	CONCLUSION ET DISCUSSION.....	- 153 -
	PARTIE 2 : IDENTIFICATION DE MIARNS REGULATEURS DE LA B-CATENINE ET DES PROCESSUS ONCOGENIQUES DANS L'HBL.....	- 163 -
	INTRODUCTION.....	- 165 -
	MANUSCRIT.....	- 169 -
	CONCLUSION ET DISCUSSION.....	- 221 -
	CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....	- 245 -
	ANNEXE 1.....	- 253 -
	ANNEXE 2.....	- 283 -
	ANNEXE 3.....	- 339 -
	RÉFÉRENCES.....	- 417 -

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : La classification histologique de l'HBL (López-Terrada et al., 2014).....	- 14 -
Figure 2 : La classification des risques Evans par le COG (von Schweinitz, 2012).....	- 15 -
Figure 3 : La classification des risques PRETEXT (López-Terrada et al., 2014).....	- 16 -
Figure 4 : La classification moléculaire de l'HBL et les caractéristiques associées (Cairo et al., 2008).....	- 23 -
Figure 5 : Schéma représentatif des différentes régulations et localisations de la β -caténine (Valenta et al., 2012).....	- 28 -
Figure 6 : Représentation schématique de la structure de la β -caténine, de ses sites de phosphorylation et des sites de liaison de ses partenaires principaux.	- 29 -
Figure 7 : Les trois variants de l'ARNm de la β -caténine (Thiele et al., 2006).....	- 30 -
Figure 8 : La régulation de l'activation de la voie Wnt/ β -caténine (MacDonald et al., 2009). ...	- 34 -
Figure 9 : Organisation génomique des miARNs (Olena and Patton, 2010)	- 41 -
Figure 10 : La biogenèse des miARNs (Rottiers and Näär, 2012).....	- 42 -
Figure 11 : Les différents types d'appariements entre le miARN et son ARNm cible (Witkos et al., 2011).....	- 49 -
Figure 12 : Les caractéristiques des différents algorithmes de prédiction (Witkos et al., 2011) .	- 50 -
Figure 13 : Répression de l'expression des ARNm selon le type d'appariement avec le miARN (Ameres and Zamore, 2013).....	- 53 -
Figure 14 : Mécanismes d'inhibition de la traduction et de dégradation de l'ARNm (d'après (Iwakawa and Tomari, 2015)	- 56 -
Figure 15 : Les principales caractéristiques du cancer (Hanahan and Weinberg, 2011)	- 59 -
Figure 16 : Les divers mécanismes de dérégulation de l'expression et de l'activité des miARNs dans les cancers (Di Leva et al., 2013).....	- 61 -
Figure 17 : La régulation épigénétique de l'expression des miARNs (d'après Sato et al., 2011) -	- 63 -
Figure 18 : Régulation de l'expression des miARNs par p53 (Lujambio and Lowe, 2012).....	- 65 -
Figure 19 : Régulation de l'expression des miARNs par MYC (Lujambio and Lowe, 2012).....	- 66 -
Figure 20 : Les modes d'action des inhibiteurs de miARNs oncogéniques (Li and Rana, 2014) -	- 74 -
Figure 21 : Les différents types d'antimiRs et leurs modifications chimiques (Stenvang et al., 2012).....	- 76 -
Figure 22 : Les organes de développement de l'embryon de poulet	- 95 -
Figure 23 : Structure de la CAM au 17 ^{ème} jour de développement	- 96 -
Figure 24 : Masse tumorale formée en sept jours par l'implantation de 2.10^6 cellules Huh7 sur la CAM (image d'Angélique Desplat)	- 105 -
Figure 25 : Frise chronologique des étapes de la mise au point de l'implantation des cellules Huh6 sur la CAM	- 106 -

Figure 26 : Suivi macroscopique des masses tumorales formées par les cellules Huh6 implantées sur la CAM	- 107 -
Figure 27 : Suivi macroscopique en fluorescence des masses tumorales formées par les cellules Huh6-GFP implantées sur la CAM	- 108 -
Figure 28 : Images macroscopiques réalisées après prélèvement des masses tumorales formées par les cellules Huh6 implantées sur la CAM	- 109 -
Figure 29 : Organisation cellulaire des masses tumorales formées par les cellules Huh6 implantées en anneau ou en Matrigel® à T4 et à T7	- 110 -
Figure 30 : Frise chronologique des étapes de la caractérisation de l'implantation des Huh6 sur la CAM.....	- 111 -
Figure 31 : Organisation cellulaire de la CAM durant l'embryogenèse entre E11 et E17.....	- 112 -
Figure 32 : Organisation des nodules tumoraux formés par les cellules Huh6.....	- 115 -
Figure 33 : Expression du marqueur de prolifération Ki67 dans les cellules Huh6 en culture et au cours du développement du nodule tumoral.....	- 116 -
Figure 34 : Expression du marqueur de dédifférenciation biliaire CK19 dans les cellules Huh6 en culture et au cours du développement du nodule tumoral.....	- 117 -
Figure 35 : Expression du marqueur de dédifférenciation des cellules épithéliales EpCAM dans les cellules Huh6 en culture et au cours du développement du nodule tumoral.....	- 118 -
Figure 36 : Expression de la β -caténine dans les cellules Huh6 en culture et au cours du développement du nodule tumoral	- 119 -
Figure 37 : Frises chronologiques reflétant la stratégie utilisée pour l'analyse moléculaire des nodules formés par l'implantation des cellules Huh6 par séquençage ARN	- 121 -
Figure 38 : Statistiques de la cartographie des séquences et gènes significativement dérégulés-	123
-	-
Figure 39 : Stratégie d'analyse: comparaison des gènes exprimés dans les CAM non implantées entre E11 et E17	- 124 -
Figure 40 : Analyse comparative des 40 gènes du poulet les plus différenciellement exprimés entre E11 et E17 dans les CAM non implantées.....	- 125 -
Figure 41 : Stratégie d'analyse: comparaison des gènes exprimés dans les CAM implantées avec les cellules Huh6 entre E11 et E17.....	- 126 -
Figure 42 : Analyse comparative des 40 gènes du poulet les plus différenciellement exprimés entre E11 et E17 dans les CAM implantées avec des cellules Huh6	- 127 -
Figure 43 : Stratégie d'analyse: comparaison entre les gènes exprimés dans les CAM non implantées et les CAM implantées avec les cellules Huh6 entre E11 et E17	- 128 -
Figure 44 : Variations entre les échantillons de CAM au cours de l'embryogenèse et par l'influence des cellules Huh6.....	- 129 -
Figure 45 : Influence de l'implantation des cellules Huh6 sur le transcriptome des cellules de la CAM de poulet.....	- 131 -
Figure 46 : Analyse globale de l'influence de l'implantation des cellules Huh6 sur le transcriptome des cellules de la CAM de poulet.....	- 132 -

Figure 47 : Stratégie d'analyse: comparaison des gènes exprimés entre les cellules Huh6 en culture et les cellules Huh6 implantées sur la CAM	- 133 -
Figure 48 : Analyse comparative des 40 gènes humains les plus différentiellement exprimés entre les cellules Huh6 en culture et les cellules Huh6 implantées sur la CAM	- 135 -
Figure 49 : Analyse globale des gènes humains les plus différentiellement exprimés entre les cellules Huh6 en culture et les cellules Huh6 implantées sur la CAM	- 136 -
Figure 50 : Stratégie d'analyse: comparaison des gènes exprimés par les cellules Huh6 implantées sur la CAM entre T1 et T7	- 137 -
Figure 51 : Analyse comparative des 40 gènes humains les plus différentiellement exprimés au cours de la formation du nodule tumoral par les Huh6 entre E11 (T1) et E17 (T7)	- 139 -
Figure 52 : Analyse globale des gènes humains les plus différentiellement exprimés entre les cellules Huh6 en culture et les cellules Huh6 implantées sur la CAM	- 140 -
Figure 53 : Immunomarquage de la Méprine 1 α dans le foie normal et dans l'HBL	- 141 -
Figure 54 : Immunomarquage de la Méprine 1 α dans les cellules Huh6 en culture et dans les tumeurs formées par les cellules Huh6 implantées sur la CAM	- 142 -
Figure 55 : Frise chronologique reflétant les étapes pour l'analyse des effets de la chimiothérapie au cisplatine sur les nodules tumoraux formés par les cellules Huh6 sur la CAM	- 144 -
Figure 56 : Suivi macroscopique du développement des nodules tumoraux formés par les cellules Huh6 non traitées et traitées au cisplatine	- 145 -
Figure 57 : Organisation des nodules tumoraux formés par les cellules Huh6 non traitées et traitées au cisplatine	- 146 -
Figure 58 : Evolution du poids des tumeurs formées par les cellules Huh6 non traitées et traitées au cisplatine	- 147 -
Figure 59 : Expression du marqueur de prolifération Ki67 dans les tumeurs formées par les cellules Huh6 non traitées et traitées au cisplatine	- 148 -
Figure 60 : Expression du marqueur apoptotique Caspase-3 activée dans les tumeurs formées par les cellules Huh6 non traitées et traitées au cisplatine	- 149 -
Figure 61 : Suivi macroscopique des masses tumorales formées par les cellules HB-214-J implantées sur la CAM	- 151 -
Figure 62 : Représentation tridimensionnelle de l'architecture du parenchyme hépatique (d'après Laperche, 2003)	- 158 -
Figure 63 : Expression relative de l'ARNm de la β -caténine dans l'HBL	- 165 -
Figure 64 : Stratégie de crible utilisant la méthode (DF)-FunREG	- 167 -
Figure 65 : Nombre de séquences de miARNs annotés dans miRBase et de publications étudiant les miARNs entre 2001 et 2013 (source http://www.mirbase.org/)	- 222 -
Figure 66 : Effet des miARNs sur l'expression de l'ARNm de la β -caténine dans les cellules HepG2	- 227 -
Figure 67 : Localisation des sites potentiels d'interaction des quatre miARNs d'intérêt sur les trois variants de l'ARNm de la β -caténine	- 233 -
Figure 68 : Effet du miR-34a-5p sur les processus oncogéniques	- 242 -

LISTE DES ABREVIATIONS

A

AAV: virus adéno-associé
ACP: Analyse des composantes principales
ADN: Acide désoxyribonucléique
AFP: alpha-fœtoprotéine
AGO: Argonaute
APC: Adenomatous polyposis coli
ARE: AU-rich element
ARM: Armadillo
ARN: Acide ribonucléique
ARNm: ARN messenger
ARN Pol: ARN polymérase
ARNr: ARN ribosomique
ARNsn: petit ARN nucléaire
ARNsno: petit ARN nucléolaire
ARNt: ARN de transfert

B

BCL-2: B-cell CLL/lymphoma 2

C

Ca²⁺: Calcium
CAF-1: CCR4-associated factor
CAM: Membrane chorioallantoïdienne
CCR4: C-C motif chemokine receptor 4
CDDP: cis-diamminedichloridoplatinum (II)
CDK: Cyclin-dépendant kinase
CDKN1C: Cyclin-dépendant kinase inhibitor 1C
CHC: Carcinome hépatocellulaire
CHIC: Children's Hepatic tumor International Collaboration
CK1: Casein kinase 1
CK19: Cytokératine 19
COG: Children's Oncology Group
CTNNB1: β-catenin

D

DCP: Decapping enzyme
DGCR8: DiGeorge syndrome critical region gene 8
dsRBD: domaine de liaison à l'ARN double brin
Dvl: Dishevelled

E

EC: Extracellular Cadherin
EC50: concentration efficace médiane d'une molécule
EDV: EnGeneIC Delivery Vehicule
eIF: Eukaryotic translation initiation factor
ENCODE: Encyclopedia Of DNA Elements
EpCAM: Epithelial Cell Adhesion Molecule

F

FDA: Food and Drug Administration
FGF: Fibroblast Growth Factor

FCR: Fold change ratio

FunREG: Functional, integrated and quantitative method to measure post-transcriptional regulations

FXR: Fragile X mental retardation, autosomal homolog 1

G

GFP: Green Fluorescent Protein

GPC3: Glypican-3

GPOH: Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie

GSK3: Glycogen synthase kinase-3

GTP: Guanosine triphosphate

GW182: Glycine(G)-tryptophan(W) repeats 182

H

HAT: Histone acétyltransférase

HBL: Hépatoblastome

HDAC: Histone désacétylase

HES: Hématoxyline/Eosine/Safran

HH: Hedgehog

HMG: High Mobility Group

HuR: Human antigen R

I

IGF2: Insulin-like growth factor 2

IPA[®]: Ingenuity[®] Pathway Analysis

IRE1 α : Inositol-Requiring Enzyme 1 alpha

IRM: Imagerie par Résonance Magnétique

J

JPLT: Japanese Study Group for Pediatric Liver Tumor

K

kDa: kilodalton

KRAS: V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog

L

LIN28: Lin-28 homolog

LLC-B: Leucémie Lymphoïde Chronique à cellules B

LNA: Locked-nucleic acid

LncARN: ARN long non codant

LPR5/6: Low density lipoprotein receptor-related protein 5/6

M

M7G: 7-methylguanosine

MiARN: MicroARN

MID: Middle

MiRISC: miRNA-induced silencing complex

MYC: V-myc myelocytomatosis varial oncogene homolog

N

NASH: Non-Alcoholic Steatohepatitis

NES: Signal d'export nucléaire

NLS: Signal de localisation nucléaire

NOT1: CCR4-NOT transcription complex subunit 1

NQO1: NADPH déshydrogénase quinone 1

NT: Non traduite

O

P

P53: cellular tumor antigen p53
PABP: Poly(A)-binding protein
PAF: Polypose adénomateuse familiale
PAN: poly(A) nuclease
PAZ: PIWI, Argonaute, Zwillie
Pb: paires de bases
P-bodies: Processing bodies
PCP: Planar Cell Polarity
PDX: Patient-Derived Xenograft
PET: Tomographie par émission de positrons
PI3K: phosphoinositide 3-kinase
PiARN: ARN interagissant avec les protéines PIWI
PIWI: P-element Induced Wimpy testis
Poly(A): Polyadénylé
PRETEXT: PRETreatment EXTent of disease
PTEN: Phosphatase and tensin homolog

Q

R

RISC: RNA-induced silencing complex
RNase III: ribonuclease III
RT-qPCR: Reverse Transcription - quantitative real-time Polymerase Chain Reaction

S

SBW: syndrome de Beckwith-Wiedemann
ShARN: petit ARN en épingle à cheveux
SiARN: petit ARN interférent
SIOPEL: Société Internationale d'Oncologie Pédiatrique - Epithelial Liver Tumor Study Group
SNP: Single Nucleotide Polymorphism
STS: Sodium Thiosulphate
SVF: Sérum de veau fœtal

T

TCF/LEF: T-cell factor/lymphoid enhancer factor
TLE: Transducin-like enhancer
TNF α : Tumor necrosis factor alpha
TRBP: TAR RNA binding protein
TUT: Terminal Uridylyl Transferase Tudor- Staphylococcal nuclease

U

V

VHC: Virus de l'Hépatite C

W

WNT: wingless-type MMTV integration site family member
WRE: Wnt Response Element

X

XPO5: Exportine-5
XNR1: 5'→3' exoribonuclease 1

Y

Z

INTRODUCTION

I. L'HEPATOBLASTOME

1. Généralités

L'hépatoblastome (HBL) est une tumeur maligne primitive du foie qui affecte essentiellement les enfants et les adolescents. Elle se développe entre six mois et trois ans après la naissance dans 90 à 95% des cas, avec un âge médian de 18 mois (Litten and Tomlinson, 2008). Moins de 5% ont lieu chez l'enfant après 4 ans et les cas adultes sont exceptionnels (Harada et al., 1995). Dans le spectre des tumeurs pédiatriques, l'HBL est un cancer rare puisqu'il représente 1% de ces tumeurs. C'est le troisième cancer abdominal pédiatrique après le neuroblastome abdominal et le néphroblastome (Perilongo and Shafford, 1999) et la tumeur du foie primaire pédiatrique la plus fréquente.

Son incidence annuelle est de 1,5 cas par an pour un million d'enfants âgés de moins de 15 ans (Czuderna et al., 2014). Elle est supérieure chez les garçons (1,57) par rapport aux filles (1,09). Les groupes d'études épidémiologiques (National Cancer Institute Surveillance Epidemiology and End Results - Américain, Japonais, Européen) ont reporté une augmentation de l'incidence de l'HBL au cours des 30 dernières années. L'amélioration des connaissances et de la prise en charge des patients atteints d'HBL a permis une augmentation globale de la survie de 30% dans les années 1970 à 80% aujourd'hui (Czuderna et al., 2014). Cependant, des écarts importants subsistent en fonction du stade de la maladie avec une survie globale allant jusqu'à 100% pour les stades les plus précoces et qui descend à 30% pour les stades les plus avancés (von Schweinitz, 2012 ; Meyers et al., 2011).

Le nombre de cas étant relativement faible, des groupes d'études se sont formés afin de rassembler les connaissances et d'améliorer les traitements par des essais multicentriques. Ainsi, on retrouve le Children's Oncology Group (COG) aux Etats-Unis, la Société Internationale d'Oncologie Pédiatrique - Epithelial Liver Tumor Study Group - Européenne (SIOPEL), le Japanese Study Group for Pediatric Liver Tumor (JPLT) au Japon et la Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie (GPOH) en Allemagne. Récemment, ces groupes se sont associés au sein de la Children's Hepatic tumor International Collaboration (CHIC ; Czuderna et al., 2016) pour combiner et uniformiser les essais cliniques.

1.1. Les facteurs de risque

La plupart des cas d'HBL sont sporadiques mais 5% sont associés à des anomalies génétiques constitutionnelles, des malformations et/ou des syndromes de cancers familiaux. L'incidence de l'HBL est plus élevée en cas de syndrome de Beckwith-Wiedemann (SBW) et de Polypose Adénomateuse Familiale (PAF) (Cohen, MM Jr, 2005 ; Garber et al., 1988 ; Thomas et al., 2003), deux syndromes de prédisposition aux cancers embryonnaires.

Le SBW est caractérisé par une croissance excessive et des malformations congénitales. Il est lié à une anomalie génétique ou épigénétique sur le chromosome 11 conduisant à la dérégulation de l'expression de gènes impliqués dans le cycle cellulaire (augmentation de l'expression d'*IGF2*, diminution de l'expression de *H19* et *CDKN1C*).

La PAF est associée à des mutations dans le gène *APC* (*adenomatous polyposis coli*), causant l'activation constitutive de la voie Wnt/ β -caténine impliquée dans l'apparition de multiples cancers, notamment l'HBL (voir section II.3). Le risque de développer un HBL est 700 fois plus élevé chez les patients atteints de PAF que dans la population globale (Aretz et al., 2006).

Occasionnellement on retrouve des cas d'HBL associés à la trisomie 18 (syndrome d'Edward), les syndromes de Prader-Willi (Hashizume et al., 1991) et de Simpson-Golabi-Behmel (Kosaki et al., 2014) ou encore à l'anémie de Fanconi (Kopic et al., 2011).

La naissance prématurée et un petit poids à la naissance (<1,500 kg) sont également des facteurs de risques de développement de l'HBL (Ansell et al., 2005). Ils peuvent être les conséquences d'une pré-éclampsie voire d'une éclampsie qui pourraient être la cause sous-jacente du développement de l'HBL.

Des facteurs de risques environnementaux ont également été identifiés tels que le tabagisme parental préconceptionnel et gestationnel, surtout lorsque les deux parents sont fumeurs réguliers (Spector and Birch, 2012). L'association de l'HBL avec un syndrome d'alcoolisme fœtal a été reporté de manière anecdotique (Spector and Birch, 2012).

1.2. Dépistage et diagnostic

Les symptômes cliniques caractéristiques de l'HBL sont l'apparition d'une masse abdominale parfois accompagnée de douleurs, fièvre, fatigue, perte d'appétit et/ou anorexie (Schnater et al., 2003). Des symptômes sévères tels qu'une jaunisse obstructive ou une rupture tumorale sont relativement rares (Meyers et al., 2011).

Lors de la suspicion d'un HBL, plusieurs analyses sont nécessaires pour réaliser le diagnostic.

Tout d'abord, des analyses sanguines permettent d'étudier le fonctionnement hépatique par la mesure des niveaux d'alpha-fœtoprotéine (AFP), de la lactate déshydrogénase, de la gonadotrophine chorionique beta-humaine, de la ferritine, des antigènes carcino-embryonnaires, de l'énolase neurone-spécifique, les catécholamines et du titre viral hépatotrophique (Meyers et al., 2011 ; von Schweinitz, 2006). Le niveau d'AFP est le marqueur le plus important. Il augmente chez 90% des patients avec un HBL. Cependant, il peut être difficile à interpréter car il est naturellement élevé chez les nourrissons jusqu'à six mois et peut être élevé chez certains patients avec une tumeur du foie bénigne comme l'hamartome mésoenchymateux et l'adénome (Meyers et al., 2011 ; Boman, F et al., 2004). De plus, plusieurs études ont montré que certains HBL agressifs et associés à un mauvais pronostic présentent un niveau bas d'AFP (<100ng/mL) (Meyers et al., 2009).

L'imagerie médicale permet de confirmer le diagnostic et de localiser la tumeur. L'échographie abdominale est la technique de choix pour le diagnostic initial. Elle permet de localiser la tumeur primaire au niveau du foie et de montrer sa relation avec les vaisseaux hépatiques. Le scanner et/ou l'imagerie par résonance magnétique (IRM) permettent dans un second temps de mieux définir la localisation de la tumeur par rapport à la segmentation hépatique et de rechercher une atteinte des vaisseaux. Le scanner permet également d'évaluer la présence de métastases pulmonaires. L'IRM est recommandée car elle procure une image plus détaillée de la morphologie de la tumeur, de sa relation avec les structures et les vaisseaux les entourant. Il est également possible d'observer le statut des ganglions lymphatiques.

Pour une confirmation histologique du diagnostic chez les patients n'ayant pas subi de résection tumorale, une biopsie peut être réalisée.

2. Les classifications et les stratégies thérapeutiques associées

2.1. Les différentes classifications de l'HBL

2.1.1 La classification histologique

L'HBL est une tumeur embryonnaire qui se développerait à partir d'un précurseur des hépatocytes (hépatoblaste). C'est une tumeur hétérogène dont les sous-groupes récapitulent les étapes de développement et de maturation du foie (López-Terrada et al., 2014). Elle montre une combinaison de motifs histologiques qui la distinguent du carcinome hépatocellulaire (CHC) (Zimmermann, 2005). Deux formes histologiques principales sont décrites et utilisées dans les classifications depuis de nombreuses années (Meyers et al., 2011) : le type purement épithélial, qui est le plus commun, et le type mixte épithélial/mésenchymateux (Figure 1). Parmi les HBL purement épithéliaux, on distingue des sous-catégories histologiques: fœtale, embryonnaire, à petites cellules indifférenciées, macrotrabéculaire et cholangioblastique. Les HBL mixtes peuvent être dérivés de cellules stromales ou d'éléments hétérogènes (sous-type tératoïdes) (Czauderna et al., 2014 ; López-Terrada et al., 2014).

Table 2 Hepatoblastoma classification

<i>Epithelial</i>	
Fetal	'well-differentiated': uniform (10–20 μ in diameter), round nuclei, cords with minimal mitotic activity (<2 per $\times 10/400$ microscopic fields), EMH ^a 'crowded' or mitotically active (>2 per $\times 10/400$ microscopic fields); conspicuous nucleoli, less glycogen
Embryonal	'pleomorphic, or poorly differentiated' moderate anisonucleosis, high N/C, nucleoli
Macrotrabecular	'anaplastic' marked nuclear enlargement and pleomorphism, hyperchromasia, abnormal mitoses
Small-cell	10–15 μ in diameter, high N/C, angulated nuclei, primitive tubules, EMH
undifferentiated	epithelial HB (fetal or embryonal) growing in trabeculae of >5 cells thick (between sinusoids)
Cholangioblastic	5–10 μ in diameter, no architectural pattern, minimal pale amphophilic cytoplasm, round to oval nuclei with fine chromatin and inconspicuous nucleoli, +/- mitoses; +/- INI ^b bile ducts, usually at periphery of epithelial islands, can predominate
<i>Mixed</i>	
Stromal derivatives	spindle cells ('blastema'), osteoid, skeletal muscle, cartilage
Teratoid	mixed, plus primitive endoderm; neural derivatives, melanin, squamous and glandular elements

^aEMH, extramedullary hematopoiesis.

^bPure small-cell undifferentiated needs to be differentiated from malignant rhabdoid tumors (discohesive, eccentric irregular nuclei, prominent nucleoli, abundant cytoplasmic filaments including cytokeratin and vimentin, negative nuclear INI).

Figure 1 : La classification histologique de l'HBL (López-Terrada et al., 2014)

Ces classifications sont remaniées régulièrement depuis plusieurs années, évoluant avec la diversité des échantillons et des études. Elles sont essentiellement basées sur les analyses histologiques réalisées par des pathologistes à partir de biopsies prélevées au diagnostic ou à partir d'échantillons issus de résections chirurgicales. De ce fait, certains

échantillons ont déjà subi une chimiothérapie, augmentant la difficulté de la classification histologique des tumeurs d'HBL. Le regroupement des centres a récemment permis de mettre en évidence l'existence de nouvelles sous-catégories comme les HBL épithéliaux pléiotropiques ou les néoplasmes hépatocellulaires malin (Czauderna et al., 2014).

Ces caractéristiques ont été associées à différents pronostics : les HBL purement fœtaux ont un pronostic de survie plus favorable, tandis que les HBL à petites cellules indifférenciées et macrotrabéculaires sont de pronostic plutôt défavorable (Czauderna et al., 2016), mais d'autres données sont nécessaires pour affiner les pronostics.

2.1.2 *La classification PRETEXT*

La détermination du stade de la tumeur est essentielle pour évaluer les risques et planifier une stratégie thérapeutique. Historiquement, le groupe d'étude américain COG utilisait les stades Evans I-IV (Figure 2) basés sur les résultats d'une première tentative de chirurgie au diagnostic (Meyers et al., 2011). En fonction de la classification Evans ainsi que des caractéristiques histologiques de la tumeur, le groupe COG a défini quatre catégories de risques pronostiques: très faible, faible, intermédiaire et élevé.

Table 2 COG (Evans) staging system for hepatoblastomas ¹
Stage I: complete gross resection at diagnosis with clear margins
Stage II: complete gross resection at diagnosis with microscopic residual disease at the margins of resection
Stage III: biopsy only at diagnosis, or gross total resection with nodal involvement or tumor spill or incomplete resection with gross intrahepatic disease
Stage IV: metastatic disease at diagnosis
COG, Children's Oncology Group.

Figure 2 : La classification des risques Evans par le COG (von Schweinitz, 2012)

Actuellement, tous les groupes d'études ont adopté un consensus et utilisent le système de classification PRETEXT (PRETreatment EXTent of disease) (Roebuck, 2011 ; López-Terrada et al., 2014). Ce système a été proposé en 1990 par le groupe européen SIOPEL. La classification PRETEXT est réalisée avant l'intervention, à partir des résultats des examens d'imagerie médicale. Le foie est divisé en quatre secteurs, la classification est

définie par le nombre de sections hépatiques touchées par la tumeur au moment du diagnostic (Figure 3):

- Le stade I : la tumeur ne touche qu'un seul secteur hépatique
- Le stade II : la tumeur touche deux secteurs hépatiques adjacents
- Le stade III : la tumeur touche trois secteurs hépatiques adjacents
- Le stade IV : la tumeur touche les quatre secteurs hépatiques

Des éléments permettent d'affiner la classification (Roebuck et al., 2006 ; Czauderna et al., 2016):

- C = atteinte du lobe caudal
- E = extension extra-hépatique de la tumeur
- F = tumeur multifocale
- R = rupture de la tumeur ou hémorragie intrapéritonéale
- M = présence de métastases distantes
- N = présence de métastases dans les ganglions lymphatiques
- P = atteinte de la veine porte ou de ses 2 branches
- V = atteinte de la veine cave inférieure ou des veines hépatiques

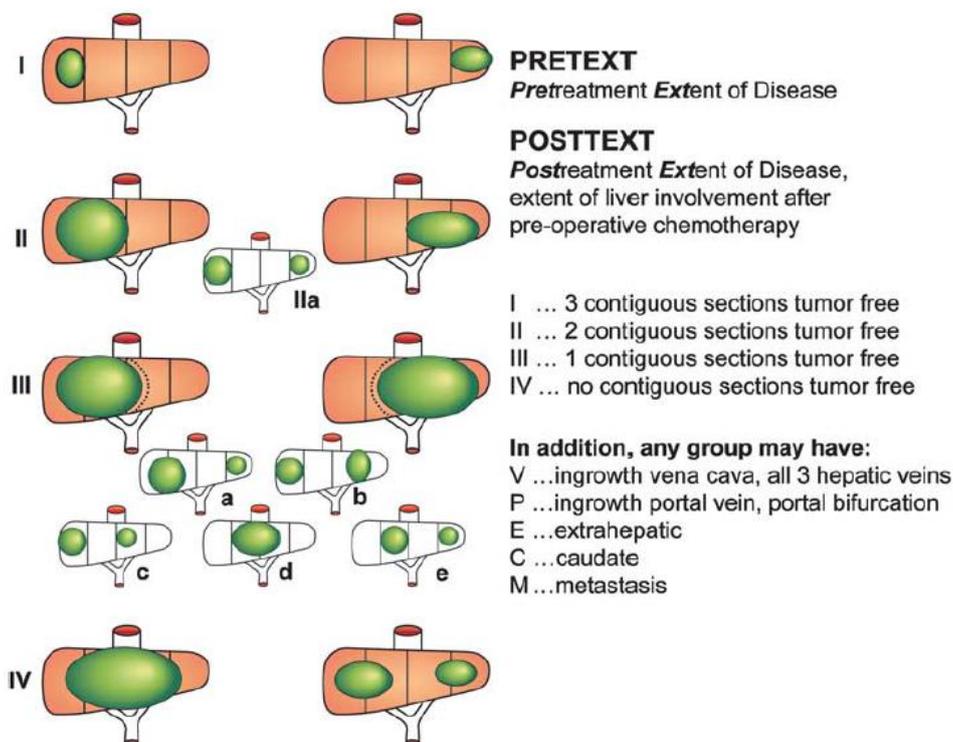


Figure 3 : La classification des risques PRETEXT (López-Terrada et al., 2014)

La classification PRETEXT est actuellement utilisée afin de déterminer la stratégie thérapeutique à adopter. Elle permet de prévoir l'opérabilité de la tumeur ainsi que le pronostic de survie à long terme. Elle peut également être utilisée après une chimiothérapie néo-adjuvante comme une reclassification POSTTEXT.

Deux catégories de risques ont été définies : le risque standard pour les patients avec un HBL confiné et impliquant trois secteurs hépatiques au maximum (PRETEXT I, II et III) et le haut risque (PRETEXT IV) pour les HBL étendus aux quatre secteurs et/ou avec des métastases, une dispersion intra-abdominale extra-hépatique, une invasion vasculaire ou un niveau d'AFP bas (<100 ng/mL) (Perilongo et al., 2004).

2.1.3 *La classification moléculaire*

Il existe une troisième classification des HBL basée sur les altérations génétiques identifiées (Cairo et al., 2008). Des analyses moléculaires ont permis de mettre en évidence deux sous-types d'HBL: les tumeurs de classe C1 dont le pronostic est plus favorable et les tumeurs de classe C2 qui sont plus agressives et de mauvais pronostic. Cette classification est décrite plus en détails dans la section I.3.2.

2.2. Les stratégies thérapeutiques

2.2.1 *Vers une uniformisation des protocoles cliniques*

Comme pour les classifications, les stratégies thérapeutiques ont d'abord différencié selon les groupes d'étude. Auparavant, le COG, aux Etats-Unis, recommandait une chirurgie initiale pour tous les patients atteints d'HBL, permettant ainsi une classification des tumeurs selon les stades Evans (voir section I.2.1.2, Figure 2). Pour les tumeurs non-opérables, une biopsie était d'abord réalisée, suivie d'une chimiothérapie pré-opératoire, d'une chirurgie et d'une chimiothérapie post-opératoire (Czuderna et al., 2014 ; von Schweinitz, 2012). Au contraire, le GPOH, en Allemagne, a observé que la chirurgie sans pré-traitement entraîne la croissance de tumeurs résiduelles et l'apparition de métastases (von Schweinitz, 2006). Le SIOPEL, en Europe, a réalisé différents essais cliniques depuis les années 1990, le SIOPEL-6 est actuellement en cours. Ainsi, le SIOPEL et le GPOH recommandent plutôt une chimiothérapie néo-adjuvante pour tous les stades. Dans 90% des cas, la tumeur répond à la

chimiothérapie, diminue en taille et en solidité, et les micrométastases peuvent être éliminées. Le groupe Japonais JPLT suit les recommandations du SIOPEL en adoptant également des éléments du COG.

Grâce à la création du consortium CHIC, une uniformisation des protocoles se met en place, évoluant en permanence aux grés des résultats des différentes études. A ce jour, le CHIC recommande l'utilisation de la classification PRETEXT. Seuls les patients PRETEXT I et II montrant une tumeur bien définie sans implication majeure du système sanguin sont opérés sans chimiothérapie préopératoire. Les autres patients de risque standard (PRETEXT I, II et III) bénéficient de chimiothérapies pré- et post-opératoires. Pour les patients de haut risque (PRETEXT IV), une chimiothérapie pré-opératoire combinant des doses intenses de plusieurs composés est recommandée, elle est suivie d'une résection de la tumeur ou d'une transplantation hépatique, puis d'une chimiothérapie post-opératoire (Meyers et al., 2012 ; Aronson et al., 2014).

2.2.2 *La chimiothérapie*

L'introduction de la chimiothérapie au cisplatine, ou cis-diamminedichloridoplatinum(II) (CDDP) dans les années 1980 a fortement amélioré le devenir des patients. En Europe, la survie à 5 ans des patients ayant développé un HBL est passée en moyenne de 28% en 1978-1982 à 66% en 1993-1997 (Stiller et al., 2006). Des tendances similaires ont été observées aux Etats-Unis et au Japon (Pham et al., 2007 ; Sasaki et al., 2002).

Le cisplatine est l'agent le plus efficace sur la tumeur d'HBL, il est au cœur de tous les protocoles (von Schweinitz, 2012 ; Meyers et al., 2012 ; Czauderna et al., 2014). Il peut être associé au carboplatine, à la doxorubicine, à l'étoposide ou encore à l'ifosfamide selon les protocoles (Czauderna et al., 2014). C'est une molécule composée de platine qui perturbe la réplication et la transcription de l'ADN, et interfère avec ses mécanismes de réparation, causant des dommages et conduisant à l'activation de l'apoptose (Bouvet, 2003).

Un des inconvénients majeurs du cisplatine est son ototoxicité. En effet, il induit une perte d'audition plus ou moins sévère dans près de 50% des cas d'HBL (Perilongo et al., 2012 ; Zsiros et al., 2013). Actuellement, l'association du cisplatine avec le sodium thiosulphate (STS) est testé dans l'essai clinique SIOPEL-6 dans le but de diminuer les doses de cisplatine administrées et d'éviter une perte d'audition.

2.2.3 *L'exérèse chirurgicale et la transplantation hépatique*

Pour les HBL de risque élevé, la résection chirurgicale complète est nécessaire. Elle est précédée et suivie de chimiothérapies. Les techniques chirurgicales ont été largement décrites et ont peu évolué (von Schweinitz, 2006). Dans les cas les plus graves (risque élevé, implication du système veineux), la résection tumorale n'est pas envisageable et les taux de rechute sont élevés (Meyers et al., 2011 ; Gupta et al., 2011). Il est donc nécessaire de procéder à une transplantation du foie. La transplantation hépatique a augmenté le taux de guérison des patients à haut risque et a permis une survie à long terme de 80% comparé à 30% après résection incomplète (Otte et al., 2004 ; Tiao et al., 2005 ; Kasahara et al., 2005).

2.2.4 *Une augmentation globale des taux de survie*

Durant les quatre dernières décennies, la survie globale de l'HBL est passé de 30% à 80% (Czauderna et al., 2014), surtout grâce aux avancées chimiothérapeutiques et à la capacité de réaliser des résections complètes et des transplantations hépatiques, même pour les tumeurs les plus avancées. Les HBL de risque faible ou standard tels que les stades PRETEXT I et II ont une survie globale de 85 à 100% (von Schweinitz, 2012 ; Meyers et al., 2011 ; Malogolowkin et al., 2011 ; Hishiki et al., 2010). Les HBL plus étendus mais localisés de stade PRETEXT III ont une survie globale de 70 à 80% (von Schweinitz, 2012 ; Meyers et al., 2011). Les HBL de haut risque de stade PRETEXT IV, spécifiquement ceux montrant des lésions multifocales, des tumeurs extra-hépatiques, des invasions vasculaires, ou encore des métastases ont une survie globale de 50 à 65% (von Schweinitz, 2012 ; Meyers et al., 2011 ; Hishiki et al., 2010 ; Czauderna et al., 2016). Parmi les HBL de PRETEXT IV, il existe un groupe à très haut risque dont le pronostic de survie à cinq ans est proche de 30%. Ces tumeurs sont caractérisées par un taux d'AFP très faible (<100 mg/mL), une histologie de petites cellules indifférenciées, des métastases distantes et une invasion macroscopique de la veine hépatique majeure et/ou de la veine cave (von Schweinitz, 2012 ; Meyers et al., 2009).

3. Les altérations moléculaires de l'HBL

3.1. Les caractéristiques moléculaires de l'HBL

3.1.1 *Les altérations génétiques*

Les changements cytogénétiques caractéristiques observés dans l'HBL sont des acquisitions ou des pertes de chromosomes entiers ou partiels. Ceux majoritairement touchés par un gain sont les chromosomes 1q, 2, 8, 17q et 20 (Buendia, 2014 ; Tomlinson and Kappler, 2012). Les chromosomes les plus souvent perdus sont les 11p, 4q et le chromosome 18 (Buendia, 2014 ; Tomlinson and Kappler, 2012). L'implication du chromosome 18 dans le développement de l'HBL est complexe car sa perte est fréquemment observée chez les patients, mais à l'inverse, la trisomie 18 est un facteur de risque associé à l'HBL. Cela suggère que le chromosome 18 contient des gènes impliqués dans des processus essentiels au développement (*BCL-2*, *MAPK4*, *SMAD2/4*), leur dérégulation conduisant à l'apparition de maladies.

Des études de séquençage d'exomes entiers ont mis en évidence un faible taux de mutations somatiques dans l'HBL par comparaison avec les cancers hépatiques adultes (Vogelstein et al., 2013). Le taux de mutations somatiques moyen identifié varie entre 2.9 et 4.67 mutations par tumeur (de une à huit mutations) comprenant une majorité de délétions (Eichenmüller et al., 2014 ; Jia et al., 2014). Les mutations identifiées dans ces deux études sont différentes, confirmant que les mutations récurrentes sont rares dans l'HBL et que ces tumeurs ont un génome relativement stable (Buendia, 2014). Par comparaison, le nombre moyen de mutations dans les CHC adultes est de 5 à 76 mutations par tumeur (Guichard et al., 2012 ; Fujimoto et al., 2012). Parmi les gènes fréquemment mutés on retrouve, par exemple, *NFE2L2* (ou *NRF2*), un facteur de transcription qui régule l'expression des gènes impliqués dans l'équilibre rédox (Eichenmüller et al., 2014 ; Buendia, 2014). Ces mutations conduisent à une forte activation du gène cible *NAPDH déshydrogénase quinone 1 (NQO1)* corrélée à une classification moléculaire de type C2, correspondant à des tumeurs invasives, métastatiques et de mauvais pronostic.

L'expression de gènes soumis à l'empreinte parentale est également altérée dans certaines tumeurs d'HBL conduisant, par exemple, à l'augmentation de l'expression d'*IGF2* et la diminution de *H19*, caractéristiques du SBW (Gray et al., 2000). D'autres gènes sont

également soumis à l'empreinte parentale dans l'HBL : *DLK1*, *PEG3*, *PEG10*, *BEX1*, *MEG3* ou encore *NDN* (Cairo et al., 2008 ; López-Terrada et al., 2009a ; Luo et al., 2006). L'altération de la méthylation de l'ADN dans les régions soumises à l'empreinte parentale est un mécanisme clef de la transformation maligne des cellules progénitrices dans une variété de tissus, y compris le foie.

3.1.2 *Deux voies particulièrement altérées*

Deux voies de signalisation sont particulièrement dérégulées dans l'HBL. Il s'agit de la voie Hedgehog (HH) et de la voie Wnt/ β -caténine (Buendia, 2014 ; Tomlinson and Kappler, 2012), deux voies essentielles pour la régulation du développement et de la différenciation cellulaire.

Des niveaux élevés de ligands HH ont été détectés dans les HBL, ainsi qu'une augmentation de l'expression des effecteurs de cette voie tels que *GLII*, *PTCH* ou encore le facteur anti-apoptotique *BCL-2*. L'augmentation de l'expression de ces gènes conduit à une activation de la prolifération cellulaire et à la carcinogenèse (Eichenmüller et al., 2009 ; Oue et al., 2010).

Les altérations génétiques les plus fréquentes ont lieu dans les gènes impliqués dans la voie de signalisation Wnt/ β -caténine (Koch et al., 1999 ; Wei et al., 2000 ; López-Terrada et al., 2009a). Environ 2/3 des HBL sont mutés dans le gène de la β -caténine, *CTNNB1* (Cairo et al., 2008 ; Tomlinson and Kappler, 2012 ; Jia et al., 2014 ; Buendia, 2014). La plupart des mutations sont localisées dans l'exon 3 qui contient les sites de phosphorylation de la β -caténine par le complexe de dégradation (voir section II.1 ; Figure 6 ; Armengol et al., 2011). D'autres mutations ont également été identifiées dans des gènes effecteurs de la voie Wnt/ β -caténine. Notamment, les patients atteints de PAF ayant développé un HBL portent des mutations dans le gène *APC*. Des mutations dans les gènes *AXIN1* et *AXIN2* ont également été identifiées. Toutes ces mutations empêchent la dégradation de la β -caténine qui active la transcription de gènes cibles impliqués dans la prolifération et la différenciation cellulaire, menant à la carcinogenèse hépatique (voir section III.3).

Les voies de signalisation HH et Wnt/ β -caténine semblent être de bonnes cibles pour l'élaboration de nouveaux agents thérapeutiques. Parmi les gènes potentiellement impliqués dans la carcinogenèse hépatique, le *GPC3* constitue un bon candidat car il est impliqué dans

ces deux voies de signalisations (Capurro et al., 2008). Des mutations inactivatrices du gène *GPC3* ont été identifiées dans le syndrome de Simpson-Golabi-Behmel qui confère un risque élevé de développer un HBL (Pilia et al., 1996 ; Jakubovic and Jothy, 2007 ; Li et al., 2001). De plus, une augmentation de l'expression de *GPC3* a été décrite dans l'HBL (Toretsky et al., 2001 ; Zynger et al., 2008). Des molécules qui ciblent la voie Wnt/ β -caténine ont été identifiées telles que les molécules PKF115-584 et CGP049090 (Lepourcelet et al., 2004), ICG-001 (Emami et al., 2004), l'acide carnosique (de la Roche et al., 2012) ou encore le MSAB (methyl 3-[[4-methylphenyl)sulfonyl]amino]benzoate ; Hwang et al., 2016). Ces molécules inhibent la formation du complexe de transcription ou l'activité transcriptionnelle de la voie Wnt/ β -caténine mais leur manque de spécificité et la méconnaissance de leurs mécanismes d'actions exactes sont un frein à des tests cliniques.

3.2. La classification moléculaire de l'HBL

Afin de déterminer une signature moléculaire caractéristique de différentes classes d'HBL, des analyses par *microarray* ont été effectuées (Cairo et al., 2008). Des mutations de *CTNNB1* ont été retrouvées dans 76% des cas, comme décrit dans d'autres études (Tomlinson and Kappler, 2012 ; Jia et al., 2014 ; Buendia, 2014). Des mutations dans les gènes *APC* et *AXIN1* ont également été identifiées. Au total, 82% des tumeurs analysées portent des mutations dans des gènes liés à la voie Wnt/ β -caténine. L'enrichissement des gènes dérégulés en relation avec cette voie de signalisation dans l'HBL montre son importance dans la tumorigenèse hépatique.

En analysant les 16 gènes les plus différentiellement régulés, les auteurs ont mis en évidence deux clusters, nommés C1 et C2 (Figure 4). Les taux de mutations de *CTNNB1* sont élevés dans les deux groupes et l'expression de la β -caténine est forte dans le cytoplasme et le noyau des cellules de ces tumeurs. Cependant, les tumeurs de type C1 montrent une localisation de la β -caténine majoritairement membranaire et cytoplasmique alors que les tumeurs C2 montrent plutôt une forte accumulation de la β -caténine dans le noyau.

Les tumeurs C1 sont de type histologique fœtal pour la plupart alors que les tumeurs C2 sont plus immatures, majoritairement embryonnaires, macrotrabéculaire, ou de type fœtal associé à une forte prolifération. De manière générale, les HBL de type C2 sont principalement associés à une étape tumorale plus avancée avec présence d'invasion

vasculaire et de métastases extra-hépatiques. Dans ce groupe, les tumeurs sont plus agressives et le pronostic est mauvais avec une estimation de la survie à deux ans de 44% contrairement à 92% pour les patients ayant une tumeur C1. De plus, les tumeurs de classe C2 sont souvent associées à un gain de chromosome 2 et 8, spécifiquement 2p et 8q, et à une sur-expression de l'oncogène MYC et de ses cibles.

Cette classification a permis l'identification de nouveaux marqueurs pronostiques. Elle amène des précisions moléculaires par rapport au classement histologique et au PRETEXT.

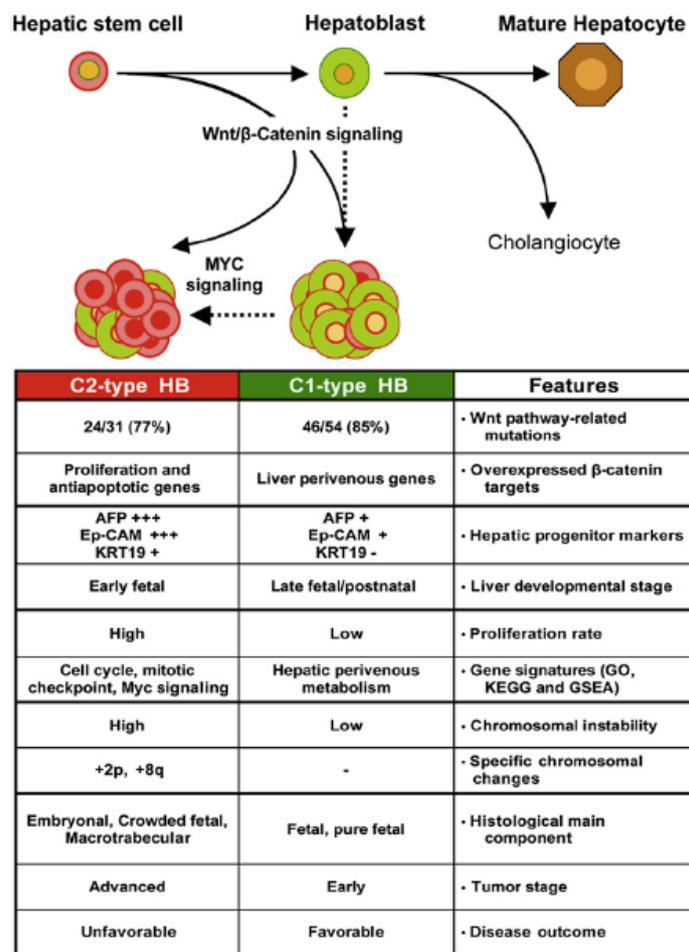


Figure 4 : La classification moléculaire de l'HBL et les caractéristiques associées (Cairo et al., 2008)

4. Les modèles *in vitro* et *in vivo* de l'HBL

Afin de mieux caractériser l'HBL et dans le but de tester l'efficacité et la toxicité de nouveaux traitements, le développement de modèles cellulaires et animaux d'HBL est nécessaire.

La première lignée cellulaire immortelle humaine a été créée dans les années 1950 par George Gey. Il est parvenu à faire proliférer *in vitro* des cellules dérivées d'un cancer très agressif du col de l'utérus qu'il a appelé HeLa, du nom de la patiente Henrietta Lacks. L'utilisation de lignées cellulaires est, à ce jour, extrêmement répandue et permet d'étudier de nombreux mécanismes cellulaires associés aux cancers. Elle permet des études de mutagenèse, d'expression de gènes, d'analyses fonctionnelles, de tests de drogues, entre autres, avec une réserve illimitée de cellules. Il existe plusieurs lignées cellulaires dérivées d'HBL : Huh6 (Doi, 1976), HepG2 (Aden et al., 1979), HepT1 (Pietsch et al., 1996), HepT3 (Weber et al., 2000), Hep293TT (Chen et al., 2009b), HB1 (Manchester et al., 1995), HepU1 et HepU2 (Scheil et al., 2003). Cependant ces lignées cellulaires ne permettent pas de représenter l'hétérogénéité tumorale de cette maladie, et elles sont toutes issues de tumeurs agressives, car ce sont elles qui prolifèrent le mieux *in vitro*. De plus, la culture *in vitro* de ces lignées depuis plusieurs années entraîne une sélection des clones les plus résistants et une dérive des cellules, causant un changement probable de leur génotype et de leur phénotype.

Afin de caractériser la tumorigenèse, l'investigation de modèles animaux est nécessaire. Une approche largement utilisée dans l'étude de l'HBL est la xéno greffe de lignées cellulaires humaines (Schnater et al., 2006 ; Cairo et al., 2008) ou de cellules primaires (Hata et al., 1982 ; Desdouets et al., 1995 ; Fuchs et al., 1996) de manière sous-cutanée chez des souris immunodéficientes. Des xéno greffes intrahépatiques de lignées cellulaires dérivées d'HBL ont également déjà été effectuées (Schnater et al., 2006 ; Ellerkamp et al., 2011). Contrairement à l'utilisation de lignées cellulaires, la greffe de cellules primaires a l'avantage de présenter un certain degré d'hétérogénéité, représentant les différentes cellules de la tumeur initiale. Ces modèles permettent l'étude de la carcinogenèse hépatique dans l'HBL ainsi que l'analyse de l'effet de potentiels traitements sur la croissance tumorale *in vivo*.

Comme alternative à l'étude de l'HBL, des modèles dérivés de patients (PDX, Patient-Derived Xenograft) ont été développées depuis les années 1980. Brièvement, cette approche

consiste à greffer un morceau de la tumeur primaire ou de métastases solides chez la souris immunodéficiente. Lorsque la tumeur s'est développée, un morceau est prélevé et greffé sur une autre souris immunodéficiente. Cette étape peut être répétée plusieurs fois, et constitue la phase d'expansion. Il est alors possible de réaliser des expériences sur la tumeur formée ou d'extraire les cellules tumorales et de les étudier *in vitro* (Hidalgo et al., 2014 ; Bissig-Choisat et al., 2016). Un des avantages majeurs des PDX est la conservation de l'organisation et de l'hétérogénéité tumorale. Les cellules issues de PDX conservent les caractéristiques génétiques et phénotypiques de la tumeur HBL d'origine (Hidalgo et al., 2014 ; Bissig-Choisat et al., 2016). Cette approche permet de faire des études ciblées pour l'identification de nouveaux traitements, et des tests pour une médecine personnalisée (Choi et al., 2014). Cependant, ces modèles PDX sont plutôt difficiles à obtenir. Comme pour les lignées cellulaires, ce sont les tumeurs les plus agressives et les plus prolifératives qui se développent le mieux chez la souris. De plus, le stroma murin peut prendre l'avantage sur les cellules tumorales humaines, conduisant à la sélection de cellules murines (Hidalgo et al., 2014).

Malgré la prédominance du modèle murin dans les études en cancérologie, son utilisation a certains inconvénients. La nécessité de l'hébergement des souris implique le besoin d'une animalerie à proximité, d'un personnel dédié, et la connaissance des techniques de xéno greffes. Ceci engendre des coûts financiers pouvant limiter les études à réaliser et les tests à effectuer. De plus, le développement des xéno greffes nécessite du temps.

5. Conclusion

L'HBL est un cancer du foie pédiatrique hétérogène. Les collaborations internationales ont contribué au développement de nombreuses études permettant de mieux caractériser et de mieux comprendre les causes du développement de ce cancer. L'élaboration de différentes stratégies thérapeutiques a permis une nette amélioration de la survie des patients, notamment grâce à la chimiothérapie au cisplatine. Cependant, des progrès thérapeutiques sont encore attendus, surtout chez les patients ayant une tumeur multifocale, métastatique et/ou chimiorésistance dont le pronostic de survie est mauvais.

Les analyses moléculaires montrent une implication majeure de la voie Wnt/ β -caténine dans le développement de l'HBL. Ces phénomènes entraînent la prolifération incontrôlée des cellules et leur migration dans les autres tissus.

II. LA VOIE DE SIGNALISATION WNT/ β -CATENINE

La voie de signalisation Wnt est une voie très conservée dans le règne animal, depuis les métazoaires primitifs (Srivastava et al., 2008) jusqu'à l'homme. Elle contrôle l'expression des gènes impliqués dans de nombreux processus essentiels au développement d'un organisme. Durant l'embryogenèse, la voie Wnt contribue à l'établissement de l'axe du corps, l'organisation du développement des tissus et des organes, le devenir, la prolifération, l'adhésion et la polarité cellulaires. Dans les organismes adultes, cette voie joue un rôle indispensable dans l'homéostasie tissulaire, le renouvellement cellulaire et la régénération (Korinek et al., 1998 ; Micsenyi et al., 2004 ; Moon et al., 2004 ; Benhamouche et al., 2006). La voie de signalisation médiée par Wnt se divise en deux branches distinctes : la voie canonique dépendante de la β -caténine (Wnt/ β -caténine) qui régule le devenir cellulaire ainsi que la prolifération ; et la voie non canonique indépendante de la β -caténine, elle-même subdivisée en deux voies, la voie de Wnt/PCP (Planar Cell Polarity) et la voie Wnt/ Ca^{2+} (dépendante du calcium) qui régulent les mouvements et la polarité cellulaires durant le développement.

Comme nous l'avons vu dans la section I.3.1.2, une caractéristique majeure de l'HBL est la dérégulation de l'expression de la β -caténine. C'est pourquoi dans ce manuscrit nous allons nous intéresser essentiellement à la voie Wnt dépendante de la β -caténine.

1. La β -caténine, structure et fonction

La β -caténine est une protéine très conservée au cours de l'évolution, que l'on retrouve sous le nom d'Armadillo chez *Drosophila melanogaster*. C'est une protéine multifonctionnelle qui exerce un rôle crucial dans une multitude de processus développementaux et homéostatiques par son implication dans la voie de signalisation Wnt/ β -caténine ainsi que sa présence au niveau des jonctions cellulaires (Figure 5). La balance entre son rôle de signalisation et son rôle structural est fortement régulée. Une dérégulation de son expression et/ou de l'une de ses fonctions est souvent impliquée dans le développement de maladies telles que les maladies osseuses (Spencer et al., 2006), les cardiomyopathies (Perriard et al., 2003), ainsi que dans toutes les étapes de développement des cancers (MacDonald et al., 2009).

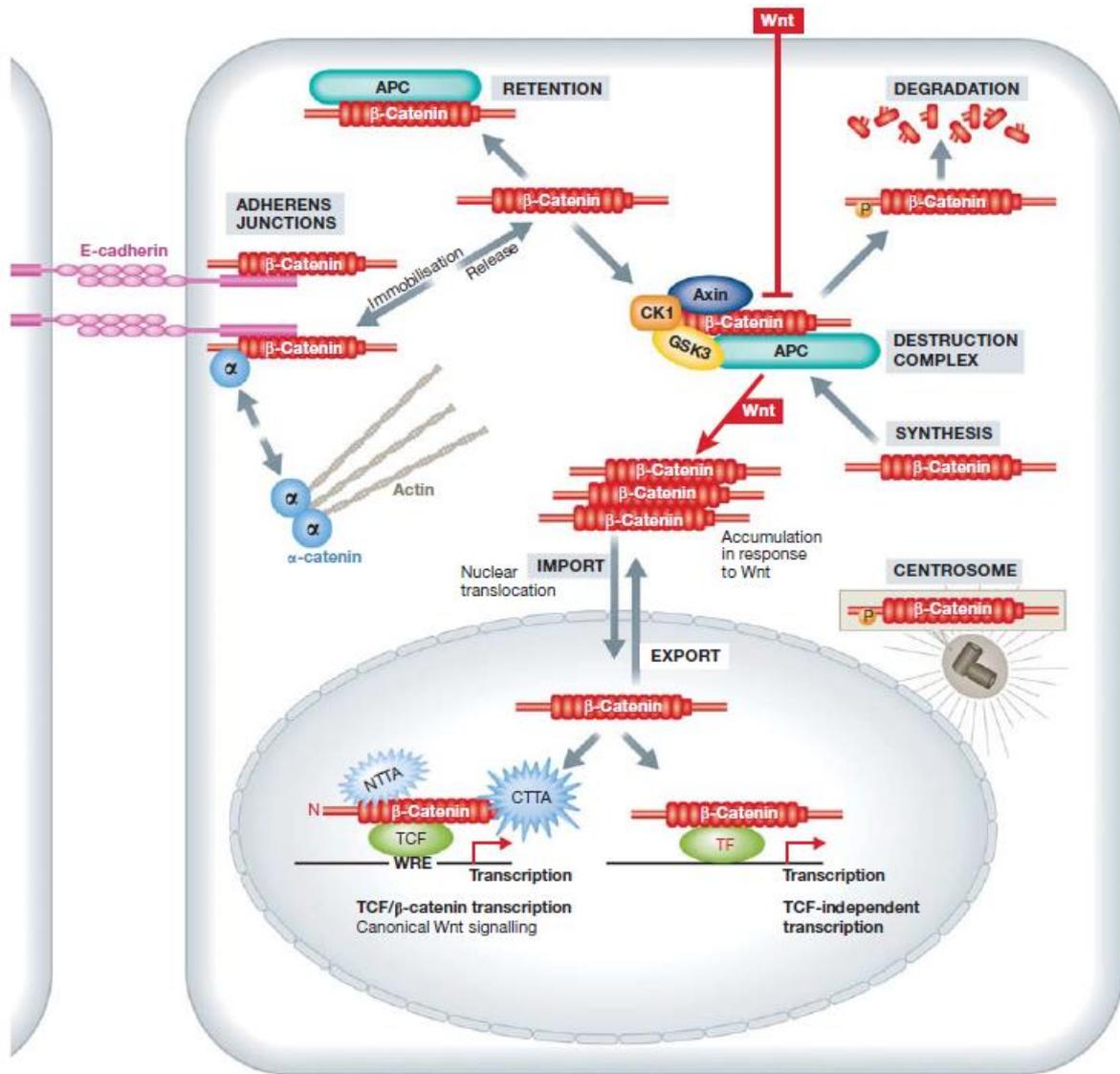


Figure 5 : Schéma représentatif des différentes régulations et localisations de la β -caténine (Valenta et al., 2012)

La β -caténine est une protéine de 781 acides aminés chez l'homme, composée d'une région centrale de 12 répétitions Armadillo (ARM) entourée d'un domaine N-terminal régulateur et d'un domaine C-terminal transactivateur (Figure 6). Les répétitions ARM s'organisent en une superhélice formant un long sillon chargé positivement. Ainsi, les domaines N-terminal et C-terminal sont plutôt flexibles tandis que la région centrale est plus rigide et sert d'échafaudage.

C'est au niveau de cette région centrale que la β -caténine interagit avec ses multiples partenaires à la membrane, dans le cytoplasme et dans le noyau (Huber et al., 1997). Des études biochimiques et structurales ont montré que de nombreux partenaires de la β -caténine partagent des sites de liaison qui se chevauchent, ainsi ils ne peuvent pas s'y fixer de manière simultanée (Figure 6). C'est la compétition entre ses partenaires et sa localisation dans la cellule qui permet de réguler l'implication de la β -caténine dans ses différentes fonctions. Les changements de conformation de la β -caténine impactent également la liaison de ses partenaires. Sous forme monomérique et repliée sur elle-même, elle jouerait son rôle transcriptionnel alors que sous forme dimérique elle est associée à l' α -caténine dans les jonctions adhérentes (Gottardi and Gumbiner, 2004). Les partenaires majeurs de la β -caténine sont : la E-cadhérine dans les jonctions adhérentes à la membrane, APC au complexe de dégradation dans le cytoplasme et TCF/LEF (T-cell factor/lymphoid enhancer factor) dans son activité transcriptionnelle au noyau.

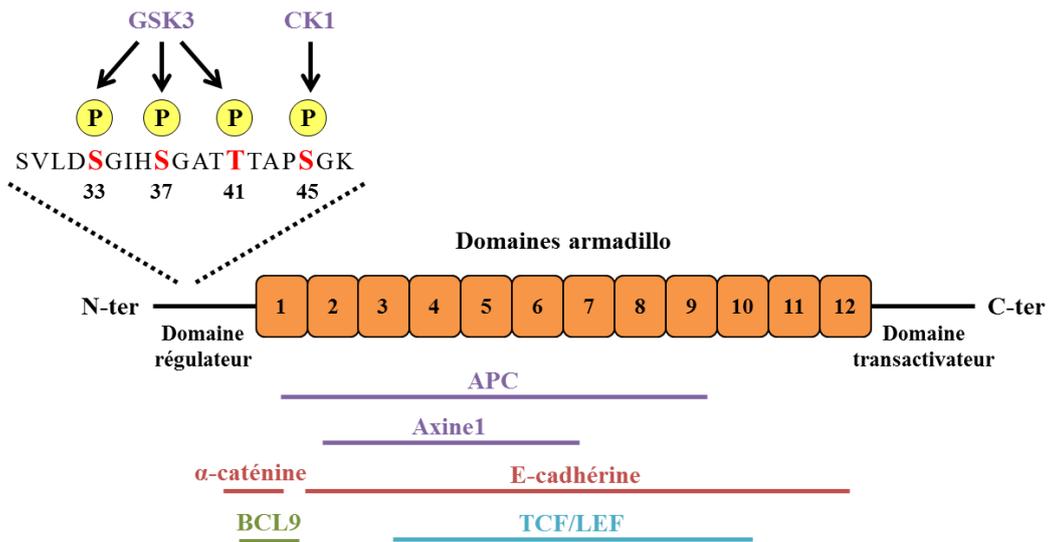


Figure 6 : Représentation schématique de la structure de la β -caténine, de ses sites de phosphorylation et des sites de liaison de ses partenaires principaux.

Les sites de phosphorylation par la glycogène synthase kinase 3 (GSK3) et la caséine kinase 1 α (CK1) sont indiqués en rouge. Les sites d'interaction avec les différents partenaires de la β -caténine sont schématisés par un trait.

Ainsi, selon ses partenaires et sa localisation dans la cellule, la β -caténine peut exercer une multitude de fonctions dont les principales sont sa fonction structurale à la membrane, sa fonction de signalisation dans le noyau et sa fonction de régulateur post-transcriptionnel des ARNs messagers (ARNm) dans le cytoplasme (Figure 5).

L'ARNm de la β -caténine est caractérisé par un épissage alternatif au niveau de sa région 3' non traduite (NT) conduisant à la production de trois isoformes de demi-vies différentes (Figure 7 ; Thiele et al., 2006). La présence d'éléments riches en Adénine et Uridine (AU-rich element, ARE) dans les trois isoformes au niveau de la région 3'NT participe à la régulation post-transcriptionnelle de l'ARNm et à sa stabilité.

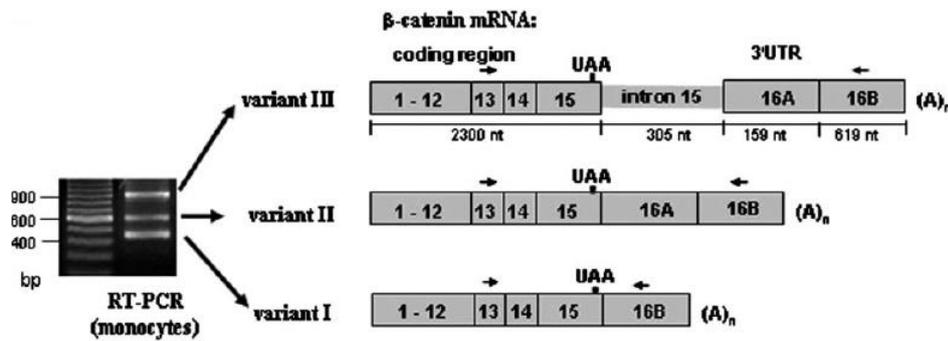


Figure 7 : Les trois variants de l'ARNm de la β -caténine (Thiele et al., 2006)

1.1. Fonction structurale

En l'absence de stimulus Wnt, la majorité de la β -caténine est localisée à la membrane et interagit avec les cadhérines pour maintenir les jonctions adhérentes entre les cellules et assurer l'intégrité des tissus (Figure 5).

Les cadhérines sont des glycoprotéines transmembranaires dont l'activité est dépendante du Ca^{2+} . Chez les vertébrés, elles possèdent une région extracellulaire composée de cinq domaines EC (extracellular cadherin) et interagissent avec les cadhérines des cellules adjacentes. Elles contiennent également un domaine transmembranaire ainsi qu'un domaine cytoplasmique qui interagit avec les caténines dans le cytoplasme. Elles sont exprimées dans tous les tissus et sont nommées en fonction du tissu dans lequel elles sont le plus exprimées : N-cadhérine dans les tissus nerveux et la E-cadhérine dans les tissus épithéliaux ; cette dernière étant la plus étudiée dans l'interaction avec la β -caténine. Le domaine cytoplasmique de la E-cadhérine interagit avec les répétitions ARM de la β -caténine (Figure 6) lorsque les deux protéines sont encore localisées dans le réticulum endoplasmique, puis elles cheminent ensemble vers la membrane. Leur interaction permet de les protéger l'une et l'autre de la dégradation : la β -caténine cache les sites d'ubiquitination de la E-cadhérine et la E-cadhérine empêche l'interaction d'APC et de l'Axine avec la β -caténine (Figure 6 ; voir section II.2 ; Hinck et al., 1994 ; Huber and Weis, 2001).

Au niveau de la membrane, la région N-terminale de la β -caténine interagit avec l' α -caténine (Figure 6 ; Pokutta and Weis, 2000). L' α -caténine est une protéine qui se lie également au cytosquelette d'actine lorsqu'elle n'est pas présente au niveau des jonctions cellulaires et régule l'assemblage de l'actine. Ainsi, l'interaction de l' α -caténine avec la β -caténine entre en compétition avec la régulation du cytosquelette. Une protéine clef dans la régulation de l'interaction entre la β -caténine et l' α -caténine est Bcl-9. En effet, Bcl-9 interagit avec la β -caténine (Figure 6) et la phosphoryle au niveau du site de liaison de l' α -caténine, réduisant ainsi leur interaction en faveur de la polymérisation de l'actine par l' α -caténine et de la fonction de signalisation de la β -caténine (Brembeck et al., 2004).

Ainsi, la formation du complexe E-cadhérine- β -caténine- α -caténine permet le maintien des jonctions adhérentes nécessaires à l'initiation et à la stabilisation de l'adhésion cellule-cellule. C'est un processus extrêmement dynamique finement régulé avec l'organisation du cytosquelette d'actine, la signalisation cellulaire et la régulation de la transcription.

1.2. Fonction de signalisation

Si la voie Wnt est activée, la β -caténine échappe à la dégradation et s'accumule dans le cytoplasme, puis elle est transloquée dans le noyau (voir section II.2). Les mécanismes d'entrée de la β -caténine dans le noyau ne sont pas très bien compris. La séquence de la β -caténine ne contient pas de signal de localisation nucléaire (NLS) ou de signal d'export nucléaire (NES), elle ne peut donc pas entrer dans le noyau de manière passive par les pores nucléaires. Cependant, elle peut interagir directement avec des composants des complexes des pores nucléaires permettant son import et son export (Shitashige et al., 2008 ; Sharma et al., 2012). Elle peut également être transportée par des facteurs de transcription qui possèdent un signal de localisation nucléaire comme FoxM1 (Zhang et al., 2011). De plus, des intermédiaires de la voie Wnt possèdent des séquences NLS et NES tels que Bcl-9 qui permet l'import nucléaire de la β -caténine *via* son interaction avec la protéine nucléaire Pygopus (Kramps et al., 2002), ou l'Axine et APC qui permettent son export (Cong and Varmus, 2004 ; Neufeld et al., 2000).

La β -caténine ne possède pas de domaine de liaison à l'ADN. Une fois dans le noyau elle doit donc s'associer à d'autres facteurs de transcription pour se lier aux promoteurs de ses gènes cibles (Xing et al., 2008). Ces facteurs permettent également le maintien de la β -caténine dans le noyau. Les facteurs de transcription de la famille TCF/LEF sont les

principaux partenaires de la β -caténine pour son activité transcriptionnelle. Les vertébrés possèdent quatre paralogues TCF1, TCF3, TCF4 et LEF1. Chacun possède un domaine HMG (high mobility group) qui permet sa liaison aux gènes cibles grâce à un motif WRE [Wnt response element, CCTTTGAT(G/C)] dans le petit sillon de l'ADN (van de Wetering et al., 1997 ; van Beest et al., 2000). Certains TCF, tels que TCF3, semblent être des répresseurs, alors que d'autres semblent agir comme des activateurs, comme LEF1. TCF1 et TCF4 semblent pouvoir agir de différentes manières selon le contexte (Wray et al., 2011 ; Yi et al., 2011 ; Archbold et al., 2012). En l'absence de β -caténine, la transcription est réprimée par la formation d'un complexe entre les TCF et les répresseurs Groucho/TLE (transducin-like enhancer) qui recrutent des histones désacétylases (HDAC). La chromatine est ainsi condensée au niveau local, réduisant l'accessibilité de ces régions à la machinerie transcriptionnelle. La liaison de la β -caténine aux facteurs TCF par les domaines ARM conduit au déplacement du complexe de répression Groucho/TLE pour laisser place aux complexes activateurs de la transcription. La β -caténine recrute également l'histone acétyltransférase (HAT) CBP/p300 et Brg-1 qui facilitent le remodelage de la chromatine par SWI/SNF induisant une ouverture de la chromatine favorable à la transcription des gènes cibles.

La β -caténine est donc une plateforme de recrutement pour une multitude de co-activateurs permettant d'initier et de propager le signal Wnt/ β -caténine ainsi que d'activer la transcription des gènes cibles de cette voie (Najdi et al., 2011 ; Archbold et al., 2012).

De nombreux gènes cibles de la voie Wnt/ β -caténine ont été identifiés et sont fréquemment découverts dans tous les organismes animaux. Il apparaît que les cibles varient en fonction des signaux et du contexte cellulaire. Cette régulation implique divers co-facteurs qui engendrent des réponses différentes. Les gènes dont l'expression est activée par la voie Wnt/ β -caténine sont pour la plupart impliqués dans la prolifération cellulaire, le cycle cellulaire ou encore la migration, tels que la Cycline D1 (Tetsu and McCormick, 1999 ; Shtutman et al., 1999), c-MYC (He et al., 1998), FGF9 (Hendrix et al., 2006) ou encore la Survivine (Zhang et al., 2001). Certains gènes cibles de la voie Wnt/ β -caténine assurent aussi une boucle de rétrocontrôle, par exemple Frizzled (Muller et al., 1999), TCF1 (Roose et al., 1999) ou l'Axine 2 (Lustig et al., 2002). L'activation de la voie Wnt, et par conséquent l'activité transcriptionnelle de la β -caténine, sont nécessaires à l'embryogenèse et au développement des organismes.

1.3. Fonction dans la régulation post-transcriptionnelle des ARNm

En plus de ses activités structurale à la membrane et fonctionnelle au noyau, la β -caténine exerce également une fonction moins étudiée en tant que stabilisateur de l'expression des ARNm dans le cytoplasme.

En 2006, Lee et Jeong ont montré que la β -caténine est capable d'interagir directement avec l'ARNm de COX-2, une de ses cibles transcriptionnelle (Araki et al., 2003), contribuant à l'augmentation de sa stabilité au niveau cytoplasmique. Quelques années plus tard, ils ont confirmé l'interaction entre le domaine Armadillo de la β -caténine et la région 3'NT de COX-2 (Kim et al., 2012). Ainsi, via le domaine Armadillo, cette interaction entre en compétition avec la liaison les autres partenaires de la β -caténine : la E-cadhérine, APC ou encore l'Axine (Figure 6). De plus, cette équipe a montré que l'interaction entre la β -caténine et l'ARNm COX-2 est renforcée par la protéine de liaison à l'ARN HuR. La protéine HuR se lie au domaine C-terminal de la β -caténine et à la région 3'NT de COX-2 via un site différent de celui de la β -caténine. La formation de ce complexe ribonucléoprotéique tertiaire très stable dans le cytoplasme pourrait contribuer à la stabilité de l'ARNm du proto-oncogène COX-2 et sa sur-expression dans les cancers colorectaux (Gupta and DuBois, 2001).

Plus récemment, une autre équipe a montré l'implication de la β -caténine dans la stabilisation des ARNm de CA9 et SNAI2 dans le cytoplasme des cellules de tumeurs mammaires en conditions d'hypoxie (D'Uva et al., 2013). La stabilisation de ces ARNm a pour conséquence la dédifférenciation des cellules cancéreuses mammaires, ainsi que la promotion de la survie et de la prolifération des cellules souches. De plus, dans ces conditions d'hypoxie, la β -caténine stabilise également l'ARNm de facteurs pro-inflammatoires tels que le facteur de croissance interleukine 6 (IL-6 ; D'Uva et al., 2013), ainsi que TNF- α et IL-8 (Storci et al., 2013). L'implication de la β -caténine dans la stabilisation de ces diverses cibles fait également intervenir la protéine de liaison à l'ARN HuR.

Ces trois études montrent que la β -caténine joue également un rôle important dans la régulation post-transcriptionnelle des ARNm, et que la protéine de liaison aux ARNm HuR est un partenaire essentiel de la β -caténine dans cette fonction. Alliée au rôle fonctionnel de la β -caténine dans la voie de signalisation Wnt, cette activité régulatrice permet de stabiliser l'expression de certains ARNm et ainsi favoriser la prolifération et la différenciation cellulaires.

2. La régulation de la β -caténine par le complexe de dégradation

Passé l'embryogenèse, l'activation de la voie Wnt/ β -caténine et l'accumulation de la β -caténine dans le cytoplasme et dans le noyau nécessitent une forte régulation pour éviter la différenciation des cellules ainsi que leur prolifération et leur migration excessives conduisant à la tumorigenèse.

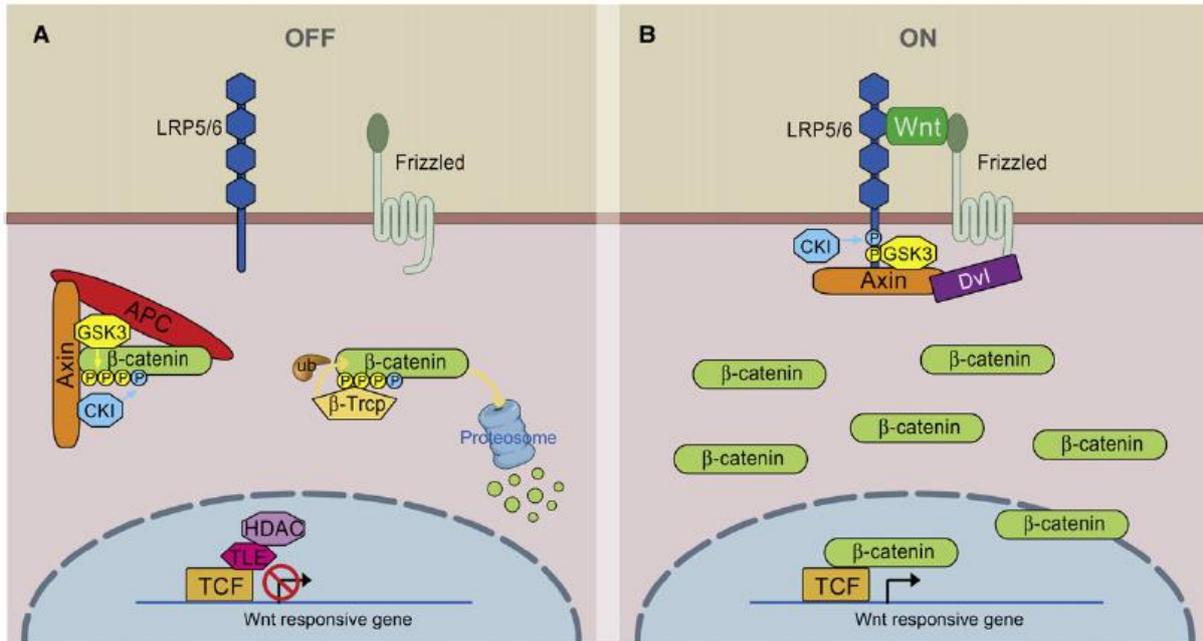


Figure 8 : La régulation de l'activation de la voie Wnt/ β -caténine (MacDonald et al., 2009)

A) Voie Wnt/ β -caténine inactive : la β -caténine est dégradée par le complexe de dégradation et la transcription des gènes cibles est réprimée. B) Voie Wnt/ β -caténine active : la β -caténine n'est plus dégradée et s'accumule dans le cytoplasme et le noyau où elle active la transcription des gènes cibles.

En l'absence de ligand Wnt, la β -caténine est recrutée par le complexe de dégradation qui maintient un niveau faible du taux de la protéine dans le cytoplasme et dans le noyau (Figure 8A). Ce complexe est notamment composé des protéines APC et Axine. APC contient plusieurs sites de liaison pour la β -caténine. Elle sert donc au recrutement de plusieurs protéines β -caténine de manière simultanée. L'Axine est une plateforme moléculaire qui se lie à la β -caténine, à APC et à d'autres partenaires du complexe de dégradation comme GSK3, elle permet de renforcer l'interaction entre la β -caténine et le complexe. Une fois la β -caténine stabilisée par APC et Axine, CK1 et GSK3 phosphorylent la β -caténine au niveau des résidus sérine 45 pour CK1, et sérines 33, 37 et thréonine 41 pour GSK3 (Figure 6). Les sites de

phosphorylation de la β -caténine sont tous localisés au niveau de l'exon 3, cette région est donc très importante pour sa régulation. Le motif de phosphorylation est reconnu par la protéine β -TrCP du complexe E3 ubiquitine ligase entraînant l'ubiquitination de la β -caténine et sa dégradation par le protéasome. Dans ce contexte, les gènes cibles de la voie Wnt/ β -caténine sont réprimés *via* les facteurs de transcription TCF/LEF.

Lorsque le niveau de Wnt est élevé (Figure 8B), les ligands ne sont pas tous pris en charge par les inhibiteurs, tels que les protéines sécrétées liées au récepteur Frizzled et les protéines de la famille Dickkopf. Wnt se lie alors à son récepteur Frizzled et son co-récepteur LPR5/6 (Low density lipoprotein receptor-related protein 5/6). Cette interaction active la phosphoprotéine Dishevelled (Dvl) qui a un double rôle : elle recrute l'Axine au niveau des récepteurs LPR5/6 pour sa dégradation et elle inhibe l'activité de GSK3. Ainsi, la phosphorylation et la dégradation de la β -caténine sont diminuées. Cela provoque son accumulation dans le cytoplasme et sa translocation dans le noyau où elle interagit avec les membres de la famille TCF/LEF pour activer la transcription des gènes cibles.

3. La dérégulation de la voie Wnt/ β -caténine dans le cancer

Des mutations dans les gènes impliqués dans la voie Wnt conduisent à diverses maladies en fonction du gène touché. Par exemple, des mutations dans LRP5 sont associées à des maladies osseuses (Gong et al., 2001 ; Boyden et al., 2002). Des variations d'une seule paire de base (SNP: Single Nucleotide Polymorphisme) dans les séquences de WNT5B et WNT10B sont associées à des maladies métaboliques (Kanazawa et al., 2004 ; Christodoulides et al., 2006). Des mutations dans APC sont associées à la PAF (Kinzler et al., 1991 ; Nishisho et al., 1991).

Les dérégulations dans la voie de signalisation Wnt/ β -caténine ont également été largement associées au développement de cancers. La plupart provoquent une activation de la voie Wnt conduisant à l'accumulation de la β -caténine et à la transcription des gènes cibles. Le premier cancer associé à ces dérégulations est le cancer du côlon lié à l'inactivation d'APC (Korinek et al., 1997 ; Morin et al., 1997). Des mutations provoquant l'activation de la voie Wnt/ β -caténine ont également été identifiées dans les CHC (de la Coste et al., 1998 ; Laurent-Puig and Zucman-Rossi, 2006 ; Breuhahn et al., 2006), les médulloblastomes (Zurawel et al., 1998) et les cancers de l'ovaire (Palacios and Gamallo, 1998) ainsi que dans une multitude

d'autres cancers. La diversité des pathologies rencontrées est liée aux différents types cellulaires impactés par un défaut de signalisation Wnt, montrant que c'est une voie clef dans le développement de l'organisme entier.

Comme décrit dans la section I.3.1.2, la plupart des échantillons d'HBL contiennent des mutations dans les composants de la voie Wnt/ β -caténine, au niveau d'APC ou de l'Axine. En effet, plus de 65% des échantillons d'HBL contiennent des mutations dans la β -caténine. La plupart de ces mutations sont localisées dans l'exon 3 qui contient les quatre sites de phosphorylation nécessaires à la dégradation de la β -caténine (Figure 6). Ces mutations provoquent la stabilisation de la β -caténine dans le cytoplasme conduisant à la prolifération excessive des cellules progénitrices du foie et au développement du cancer. Ceci est appuyé par le fait que la plupart des échantillons tumoraux présentent une expression élevée des cibles de la voie Wnt, telles que la cycline D1, l'Axine, la survivine et MYC.

Ainsi, le blocage du signal β -caténine a largement été envisagé dans le traitement des cancers. Cependant, la β -caténine ne possède pas d'activité enzymatique pouvant être ciblée. Une approche visant à réguler l'activité de la β -caténine en modulant son interaction avec ses partenaires est en cours de développement, mais cette approche est complexe car la β -caténine interagit avec une multitude de partenaires. Des petites molécules qui perturbent l'interaction β -caténine/TCF (Lepourcelet et al., 2004 ; Emami et al., 2004) ou l'activité transcriptionnelle de la voie Wnt/ β -caténine ont été identifiées (de la Roche et al., 2012 ; Hwang et al., 2016) (voir section I.3.1.2). Des anticorps qui ciblent Wnt ont aussi été développés (He et al., 2004 ; You et al., 2004). Une nouvelle classe de petites molécules qui stabilisent l'Axine pour empêcher l'accumulation de la β -caténine a également été décrite (Chen et al., 2009a) mais ces mécanismes ne sont pas très bien compris, et ne permettent pas l'inhibition directe de la β -caténine. Une seule stratégie thérapeutique utilisant des petits ARNs en épingle à cheveux (shARNs) qui ciblent la β -caténine est actuellement en essai clinique de phase II (Li and Rana, 2014) et a été approuvé par la *Food and Drug Administration* (FDA) en 2015. Cependant, la voie Wnt/ β -caténine est ubiquitaire et le ciblage de la β -caténine par le shARN n'est pas spécifique au tissu malade, pouvant causer des dommages dans les tissus sains.

4. Conclusion

La voie Wnt/ β -caténine est une voie de signalisation essentielle au développement de l'organisme entier. Elle fait intervenir de nombreux co-facteurs et a un impact sur la stabilité de ses partenaires et la transcription d'une multitude de cibles. Nous savons que l'activation de la voie Wnt et la stabilisation de la β -caténine est une des causes principales du développement de l'HBL. Ces phénomènes entraînent la prolifération incontrôlée des cellules et leur migration dans les autres tissus.

Au cours de ma thèse, je me suis focalisée sur le développement d'une nouvelle stratégie thérapeutique dont le but est d'inhiber l'expression de la β -caténine dans l'HBL afin de bloquer la croissance tumorale. Pour cela, je me suis intéressée au rôle régulateur des microARNs (miARNs).

III. LES MICROARNs

L'organisme est constitué de nombreux transcrits non codants. Ils diffèrent par leur longueur, leur mode de biogenèse et les protéines effectrices. Il existe les microARNs (miARNs), les ARNs interagissant avec piwi (piARNs), les ARNs longs non codants (lncARNs), les petits ARNs nucléolaires (ARNsno), les petits ARNs nucléaires (ARNsn), les ARNs de transfert (ARNt) et les ARNs ribosomiques (ARNr), entre autres. Ils peuvent être classés en deux catégories principales : les modulateurs de l'expression des gènes (miARNs, piARNs, lncARNs) et ceux impliqués dans les processus de traduction (ARNt, ARNr).

Parmi eux, les miARNs sont de petits ARNs non codants d'une vingtaine de nucléotides qui jouent un rôle essentiel dans la régulation de l'expression génique. Ils ont été identifiés pour la première fois en 1993 chez *Caenorhabditis elegans* (Lee et al., 1993 ; Wightman et al., 1993) avec la découverte de lin-4, nécessaire à la régulation du développement du ver. En 2000, un second miARN, let-7, qui régule une autre étape du développement du ver a été découvert (Reinhart et al., 2000). Des séquences homologues de let-7 ont ensuite été identifiées chez les tous invertébrés et de nombreux vertébrés, et ont montré sa conservation jusqu'à l'homme (Reinhart et al., 2000 ; Pasquinelli et al., 2000).

Par la suite, de nombreuses études ont mené à l'identification de miARNs chez divers organismes animaux et végétaux (Lau et al., 2001 ; Lagos-Quintana et al., 2001 ; Aravin et al., 2003 ; Llave et al., 2002 ; Reinhart et al., 2002). Les avancées technologiques et le séquençage à haut débit, notamment avec le projet *Encyclopedia Of DNA Elements* (ENCODE) (Derrien et al., 2012) ont conduit à la découverte de milliers de ces petits ARNs non codants. A ce jour, 441 miARNs matures ont été identifiés chez *C. elegans*, 466 chez *D. melanogaster*, 427 chez *Arabidopsis thaliana* ou encore 2603 chez *Homo sapiens* (<http://www.mirbase.org/> ; miRBase Version 21).

Chez l'homme, environ 60% des gènes ont conservé leurs sites d'appariements aux miARNs. Chaque miARN a en moyenne 300 cibles (Friedman et al., 2009) et chaque ARNm possède des séquences cibles pour de multiples miARNs. La conservation des miARNs et de leurs cibles ARNm au cours du temps met en évidence le maintien d'une forte pression de sélection et donc l'importance fonctionnelle de la régulation des gènes dépendante des miARNs. Cette « matière noire » du génome a remis en cause le dogme central de la biologie

moléculaire dont le principe est que l'information génétique conservée sous forme d'ADN est transcrite en ARN qui est traduit en protéine. La régulation de l'expression des gènes par les petits ARNs non codants joue un rôle important dans la complexité physiologique de l'organisme.

Dans la suite de ce manuscrit, je m'intéresserai plus particulièrement aux miARNs du règne animal, à leur fonction et leur implication dans les cancers, notamment l'HBL.

1. Biogenèse des miARNs

1.1. Origine et synthèse

Plus de la moitié des miARNs de mammifères sont situés dans les régions introniques de gènes codant pour des protéines (environ 40%) ou des lncARNs (environ 10%) (Figure 9 ; Rodriguez et al., 2004 ; Kim and Kim, 2007 ; Shomron et al., 2009). Ils sont également retrouvés dans des portions exoniques et intergéniques (environ 10% ; Figure 9 ; Rodriguez et al., 2004 ; Kim and Kim, 2007 ; Shomron et al., 2009).

Les miARNs intragéniques (introniques et exoniques) partagent le même promoteur que leur gène hôte, leur transcription par l'ARN polymérase II (ARN Pol II) est donc dépendante de celle du gène dans lequel ils se trouvent. Cependant, la maturation des miARNs exoniques est souvent délétère pour l'expression du gène hôte car elle conduit à la production d'un transcrit épissé. Les mécanismes de biogenèse des miARNs exoniques ne sont pas encore très bien décrits. Les miARNs intergéniques sont transcrits indépendamment du gène hôte à partir de leur propre unité de transcription. Dans des cas particuliers, les gènes codant pour les miARNs ont plusieurs sites d'initiation de la transcription (Ozsolak et al., 2008) et certains miARNs introniques ont un promoteur distinct de celui de leur gène hôte (Monteys et al., 2010).

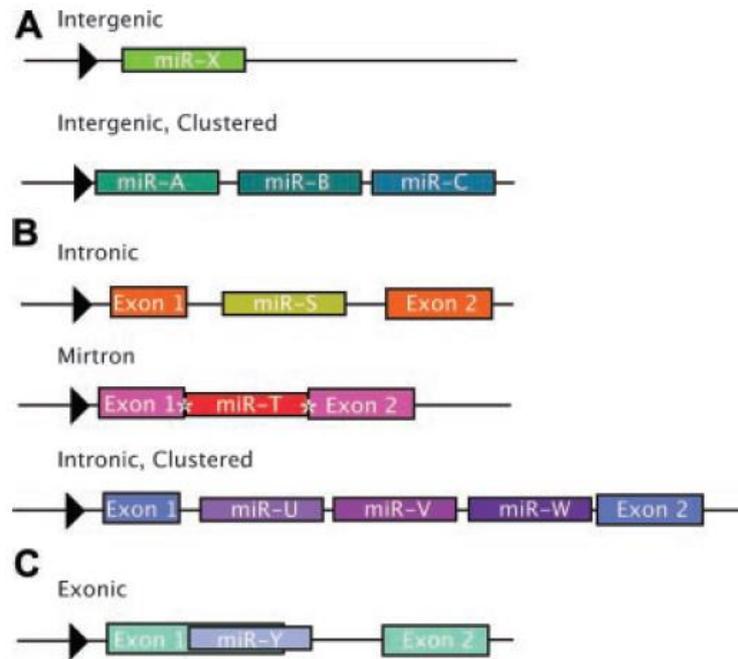


Figure 9 : Organisation génomique des miARNs (Olena and Patton, 2010)

Les *loci* de miARNs sont principalement organisés sous la forme d'unités de transcription polycistroniques (Figure 9 ; Lee, 2002 ; Ambros, 2011 ; Li and Rana, 2014). Ainsi les miARNs situés au sein d'un même cluster sont transcrits simultanément sous forme d'un long transcrit primaire (pri-miARN) et plusieurs pré-miARNs sont produits à partir de ce transcrit. Environ la moitié des clusters contiennent des miARNs appartenant à la même famille, c'est-à-dire qu'ils possèdent la même séquence de reconnaissance à l'ARNm. L'organisation en cluster permet à la cellule d'exprimer des miARNs ayant des fonctions communes à partir d'un seul transcrit de départ. Chaque miARN du cluster peut être régulé individuellement au niveau post-transcriptionnel.

La plupart des miARNs sont transcrits par l'ARN Pol II et génèrent des miARNs primaires appelés pri-miARNs de plus de 1 kilobase (Figure 10). Les pri-miARNs ont une structure tige-boucle double brin qui contient le(s) futur(s) miARN(s) mature(s). Ils sont composés d'une coiffe 5' 7-méthylguanosine (m^7G), d'une queue polyadénylée [poly(A)] en 3' et parfois d'introns (Cai et al., 2004 ; Lee et al., 2004). Ils ressemblent donc beaucoup aux transcrits codant pour des protéines. La transcription des pri-miARNs est contrôlée par les facteurs de transcription associés à l'ARN Pol II. Pour les miARNs intragéniques, elle est également dépendante de la régulation du gène hôte.

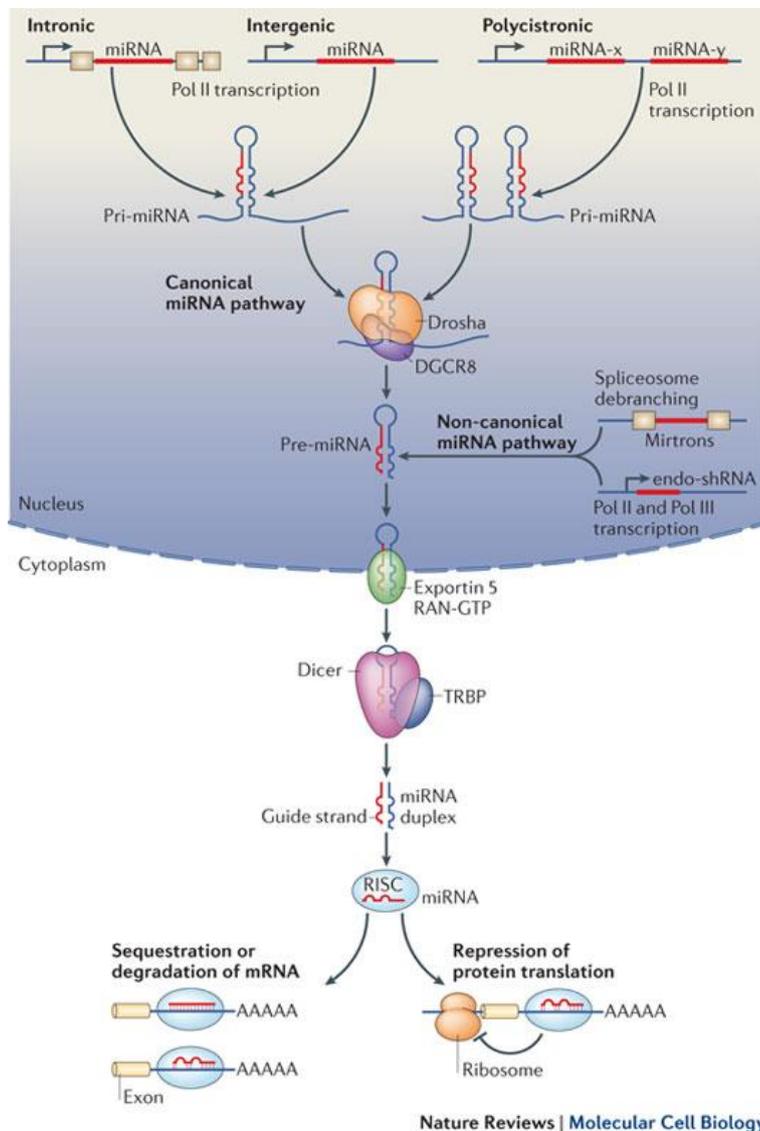


Figure 10 : La biogenèse des miARNs (Rottiers and Näär, 2012)

Certains petits ARNs semblables à des miARNs sont dérivés d'ARNs non codants plus longs comme les ARNt ou les ARNsno. Ces ARNs sont transcrits par l'ARN Pol III (Ha and Kim, 2014).

1.2. Maturation

Les pri-miARNs sont pris en charge par le complexe protéique microprocesseur composé de l'endoribonucléase Drosha, de son co-facteur « Di George syndrome critical region 8 » (DGCR8, Pasha chez *C. elegans* et *D. melanogaster*) et de protéines auxiliaires (Figure 10 ; Denli et al., 2004 ; Lee et al., 2003). Drosha est une protéine nucléaire qui contient un domaine de liaison à l'ARN double brin (dsRBD) ainsi que deux domaines ribonucléase III (RNase III). DGCR8, également localisée dans le noyau, contient deux domaines dsRBD permettant la reconnaissance du transcrit primaire et un domaine C-terminal interagissant avec Drosha. DGCR8 permet la stabilisation de l'interaction entre Drosha et le pri-miARN. Les domaines RNase III de Drosha clivent le pri-miARN à la base de la tige boucle produisant un pré-miARN d'environ 70 nucléotides qui possède un groupe 3' hydroxyle avec une extrémité de 2 nucléotides sortant (Denli et al., 2004 ; Gregory et al., 2004 ; Han et al., 2004 ; Han et al., 2006). Des protéines auxiliaires, comme les sous-unités des hélicases à boîte DEAD p68 et p72 (Fukuda et al., 2007) et les protéines SMAD (Davis et al., 2008), contribuent à la maturation du pri-miARN et aident à l'interaction entre le pri-miARN et Drosha. Une déficience en Drosha cause une mortalité précoce lors de l'embryogenèse (Chong et al., 2010) reflétant le rôle essentiel des miARNs dans le développement. De même, des embryons de souris invalidés pour *Dgcr8* arrêtent leur développement de manière très précoce et les cellules souches embryonnaires montrent des défauts de prolifération et de différenciation (Wang et al., 2007).

Certains miARNs ne suivent pas cette voie canonique de production des miARNs et empruntent d'autres voies non canoniques. C'est le cas des miARNs appelés mirtrons. Ils sont localisés dans des introns et leur extrémité est située au niveau du site donneur ou accepteur d'épissage. L'intervention du spliceosome libère directement un pré-miARN ne nécessitant pas le clivage par Drosha (Figure 10 ; Flynt et al., 2010 ; Okamura et al., 2007 ; Ruby et al., 2007).

Le pré-miARN formé est ensuite exporté dans le cytoplasme par le facteur d'export nucléaire Exportin-5 (XPO5) complexé à la protéine Ran de liaison au GTP (Guanosine triphosphate) qui forment un complexe de transport nucléaire (Figure 10 ; Lund et al., 2004 ; Yi et al., 2003). XPO5 reconnaît l'extrémité 3' sortante du pré-miARN. Suite à la translocation du pré-miARN par le pore nucléaire, le GTP est hydrolysé, le complexe est désassemblé et le pré-miARN est libéré dans le cytoplasme. Le knockdown de *XPO5* conduit à la réduction du niveau de miARNs sans accumulation de pré-miARNs nucléaires suggérant que ce facteur ne sert pas seulement à l'export des pré-miARNs mais aussi à leur protection contre les attaques nucléolytiques dans le noyau (Yi et al., 2003).

Dans le cytoplasme, le pré-miARN est ensuite maturé par Dicer. C'est une endonucléase RNase III dont le domaine C-terminal forme un dimère intramoléculaire, créant un centre catalytique similaire à celui de Drosha. Le domaine N-terminal interagit avec la boucle du pré-miARN, facilitant sa reconnaissance. Le clivage de la boucle par Dicer génère un duplex de miARN de 19 à 25 nucléotides composé d'un brin guide (en rouge, Figure 10) et d'un brin passager (miARN*, en bleu, Figure 10). Dicer est associée à TRBP (TAR RNA binding protein), une protéine de liaison à l'ARN qui possède deux domaines dsRBD. TRBP n'est pas nécessaire à la maturation par Dicer mais augmente la stabilité de l'interaction et la fidélité du clivage de manière dépendante de la structure. Elle permet également la liaison entre Dicer et les protéines Argonautes (AGO) et participe à la formation du miRNA-induced silencing complex (miRISC).

1.3. Le complexe RISC

Une fois le duplex de miARNs produit, il est chargé dans le complexe RISC. La formation d'un complexe miRISC mature nécessite le relargage d'un des deux brins du duplex miARN. Le brin passager est libéré tandis que le brin guide est pris en charge dans le miRISC (Figure 10). En général, c'est le brin ayant l'extrémité 5' la moins thermostable qui génère le brin guide (Khvorova et al., 2003). Il est plus prévalent et biologiquement plus actif que l'autre. Cependant, il est possible que les deux brins du miARN mature génèrent un brin guide. Ils sont distingués par l'annotation miR-x-3p (brin en 3') et miR-x-5p (brin en 5'). Ces deux brins peuvent être fonctionnels et induire la répression de leurs gènes cibles *in vivo* (Okamura et al., 2008 ; Ro et al., 2007).

Au sein du RISC, le miARN guide est pris en charge par une protéine AGO en association avec les membres de la famille de protéines GW182 (AIN-1 et AIN-2 chez *C. elegans*, TNRC6A-C chez l'Homme). Il sert de guide pour la reconnaissance spécifique de l'ARNm cible afin de réguler sa traduction et/ou sa dégradation.

Les protéines AGO sont les composants clefs du complexe miRISC. Chez l'Homme, elles sont divisées en 4 sous-classes (AGO1-4) exprimées de manière ubiquitaire. Elles sont constituées d'un domaine PAZ (PIWI, Argonaute, Zwillie), d'un domaine MID (middle) et d'un domaine PIWI (P-element Induced Wimpy testis) qui permettent de positionner le miARN de façon à rendre accessible sa région d'interaction avec sa cible ARNm (Schirle et al., 2014). Le domaine PAZ forme une poche de liaison spécifique à l'extrémité 3' du miARN, le domaine MID interagit avec l'extrémité 5', tandis que le domaine PIWI possède l'activité catalytique (Ma et al., 2004 ; Song et al., 2004 ; Parker et al., 2005). Seule la protéine AGO2 possède un domaine catalytique actif et a la capacité de cliver l'ARNm cible (Ipsaro and Joshua-Tor, 2015). Cependant, AGO1, -3 et -4 peuvent quand même se lier au miARN guide pour inhiber la traduction ou induire la dégradation des ARNm (Dueck et al., 2012 ; Wang et al., 2012a). Le domaine PIWI permet également l'interaction directe avec les protéines GW182. Ces protéines sont caractérisées par la présence de répétitions de glycines et de tryptophanes (répétitions GW). Elles sont impliquées dans le miRISC et forment une plateforme moléculaire pour le recrutement de facteurs importants pour la régulation de la traduction (voir section III.3.1 ; Till et al., 2007). Elles sont aussi responsables du recrutement des protéines AGO aux *Processing bodies* (P-bodies) (Eulalio et al., 2007a). Les P-bodies sont des structures localisées dans le cytoplasme des cellules eucaryotes. Elles contiennent de nombreux facteurs qui contrôlent le devenir des ARNm (répression de la traduction, contrôle qualité de l'ARNm, dégradation) (Eulalio et al., 2007b).

L'intégration du miARN dans le miRISC et la reconnaissance de sa cible conduit à la répression de la traduction de l'ARNm, voire à sa dégradation.

2. Interaction miARN-ARNm

Les miARNs sont des régulateurs spécifiques de l'expression génique, ce sont eux qui donnent la spécificité d'action au miRISC en reconnaissant et en s'appariant aux ARNm cibles *via* une séquence partiellement complémentaire. Le RISC exerce ensuite le contrôle de l'expression génique en inhibant la traduction et/ou en dégradant l'ARNm ciblé par le miARN.

2.1. Reconnaissance du miARN avec sa cible

La région la plus importante pour l'interaction entre un miARN et son ARNm cible est située à l'extrémité 5' du miARN guide simple brin, entre les nucléotides 2 et 7 (voire jusqu'au nucléotide 8) (Doench and Sharp, 2004 ; Lewis et al., 2003). Cette région est appelée la séquence graine, elle est très conservée au cours de l'évolution. Les miARNs qui portent une séquence graine identique appartiennent à la même famille de miARNs et ont généralement la même activité sur la cible. Des rôles distincts ont également été suggérés (Ventura et al., 2008). Par exemple, le génome humain possède 12 miARNs membres de la famille let-7 (let-7a-1, let-7a-2, let-7a-3, let-7b, let-7c, let-7d, let-7e, let-7f-1, let-7f-2, let-7g, let-7i, miR-98). Leurs séquences graines sont identiques, ils partagent des cibles et des fonctions communes. Cependant, des différences d'expression en fonction du stade de développement ou lors d'une pathologie suggèrent des fonctions spécifiques (Su et al., 2012). Du fait qu'ils possèdent des séquences graines similaires, il est difficile d'étudier le rôle de chaque miARN de la famille.

La région graine du miARN interagit avec l'ARNm cible *via* des liaisons de type Watson-Crick. Elle reconnaît majoritairement des séquences localisées dans la région 3'NT de l'ARNm (Bartel, 2009). Cependant, de plus en plus d'études montrent que les miARNs sont également capables d'interagir avec la région 5'NT, la région codante de l'ARNm ou encore le promoteur des gènes (Helwak et al., 2013 ; Tay et al., 2008 ; Place et al., 2008 ; Lytle et al., 2007 ; Maurel et al., 2013a).

Le degré de complémentarité entre le miARN et la cible ARNm est déterminant dans le mécanisme de régulation des ARNm. Un appariement parfait entre le miARN et l'ARNm induit l'activation d'AGO2 et le clivage endonucléolytique de la cible. Ce mécanisme est majoritaire chez les plantes mais plutôt rare chez les mammifères (Iwakawa and Tomari, 2015). Un appariement imparfait conduit à la répression de la traduction de l'ARNm et peut conduire à la séquestration de la cible dans des compartiments spécifiques comme les P-bodies ou les granules de stress (Chu and Rana, 2006 ; Fabian et al., 2010 ; Krol et al., 2010), ou à sa dégradation par l'action d'endonucléases (Bagga et al., 2005 ; Wu and Belasco, 2005 ; Behm-Ansmant et al., 2006). Le taux d'inhibition par le RISC peut être affecté par la structure secondaire ou tertiaire de l'ARNm cible (Brown et al., 2005 ; Overhoff et al., 2005 ; Schubert et al., 2005).

La région graine des miARNs étant courte (six à sept nucléotides), les séquences cibles d'un miARN se retrouvent sur une multitude d'ARNm. De plus, plus de la moitié des ARNm cellulaires contiennent au moins un site conservé de liaison aux miARNs (Friedman et al., 2009). Ainsi, les miARNs sont des régulateurs clefs de l'homéostasie cellulaire.

Plusieurs autres facteurs peuvent influencer la régulation de la cible par les miARNs. La présence d'autres sites de miARNs implique une compétition ou une collaboration de différents miARNs. Les protéines de liaison aux ARNs peuvent également influencer l'interaction entre le miARN et sa cible. Par exemple, la protéine de liaison aux ARNs HuR reconnaît les régions riches en AU, qui sont souvent enrichies à proximité des sites de liaison des miARNs. L'interaction de HuR avec un ARNm peut à la fois stimuler ou inhiber la répression par les miARNs. Ainsi, dans certains contextes, HuR est nécessaire pour la régulation de c-Myc et de RhoB par let-7 et miR-19 respectivement (Kim et al., 2009 ; Glorian et al., 2011). En revanche, dans les cellules de l'hépatocarcinome humain, l'interaction de HuR avec certains ARNm empêche la liaison du miRISC à l'ARNm. Par exemple, miR-331 entre en compétition avec HuR pour la régulation de ERBB-2 (Epis et al., 2011) et miR-16 pour celle de COX-2 (Young et al., 2012).

2.2. Les différents types d'appariements

La majorité des miARNs s'apparient avec leur ARNm cible *via* des sites d'interaction canoniques. Ces sites sont caractérisés par une interaction parfaitement complémentaire entre les nucléotides 2 et 7 du miARN (séquence graine) et la cible (Doench and Sharp, 2004 ; Lewis et al., 2003). Il en existe trois catégories principales (Figure 11) :

- Le site 7mer-1A : appariement parfait des nucléotides 2 à 7 et présence d'une adénine en face du nucléotide 1 du miARN
- Le site 7mer-m8 : appariement parfait des nucléotides 2 à 7, pas de présence d'adénine en face du nucléotide 1 du miARN mais présence d'un appariement Watson-Crick supplémentaire côté 3' au nucléotide 8.
- Le site 8mer : appariement parfait des nucléotides 2 à 7, présence d'une adénine en face du nucléotide 1 du miARN et présence d'un appariement Watson-Crick supplémentaire côté 3' au nucléotide 8.

La présence d'une adénine en position 1 du miARN améliore l'efficacité d'inhibition de la cible (Nielsen et al., 2007). Les sites 8mer sont les plus efficaces mais également les moins conservés.

Des sites 6mer présentant seulement un appariement parfait des nucléotides 2 à 7 ont également été identifiés. Leur efficacité et leur spécificité sont plus faibles.

Il existe également des sites « atypiques » :

- Un site d'appariement 3' supplémentaire de quelques bases en 3' du miARN, en général au niveau des nucléotides 13-16, qui renforce l'efficacité de l'interaction miARN:ARN (Brennecke et al., 2005)
- Un site d'appariement 3' compensatoire de quelques bases en 3' du miARN, en général au niveau des nucléotides 13-16, qui compense un mésappariement dans la région graine (Grimson et al., 2007).

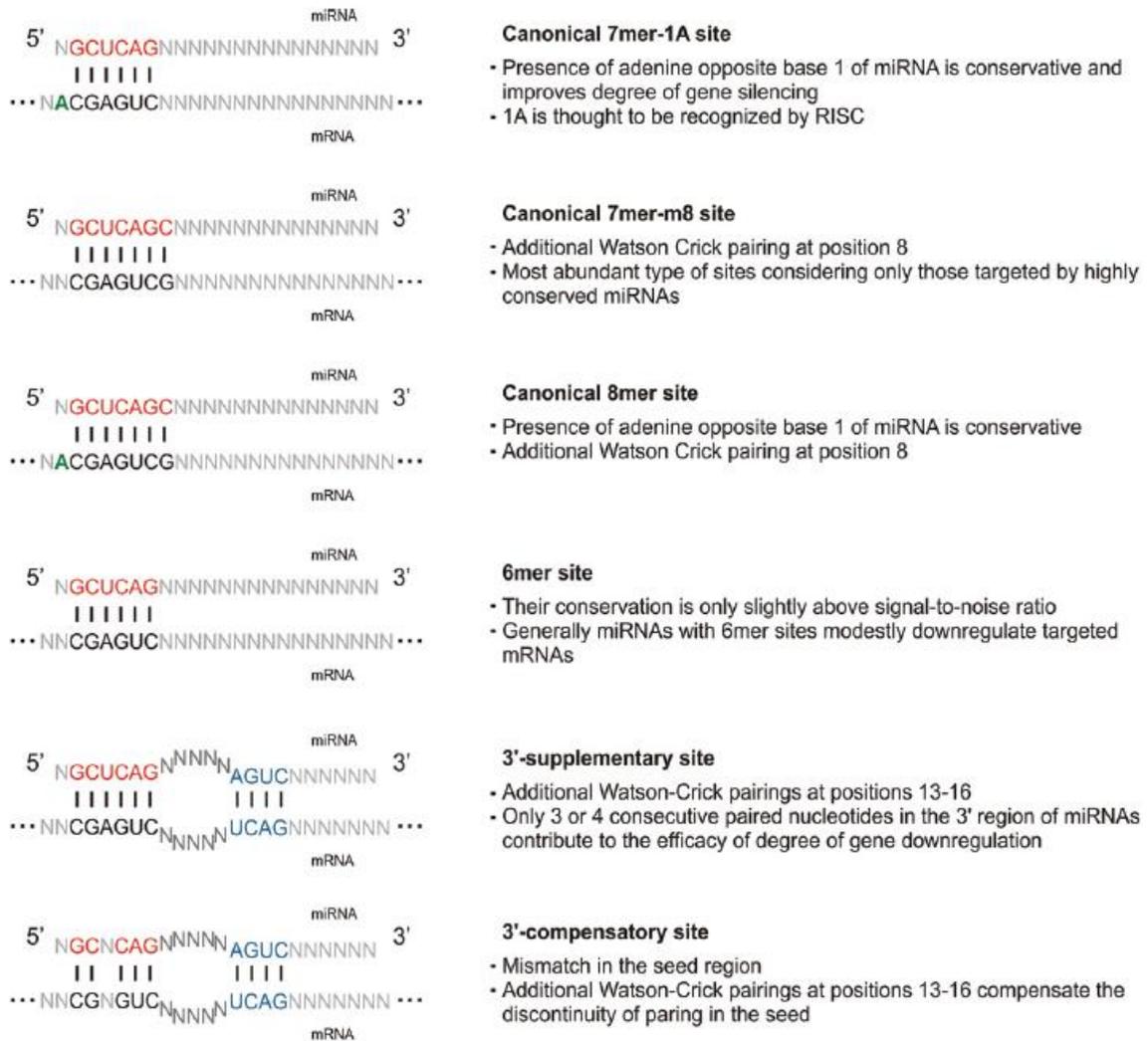


Figure 11 : Les différents types d'appariements entre le miARN et son ARNm cible (Witkos et al., 2011)

2.3. Les outils bioinformatiques de prédiction

L'émergence des études portant sur les miARNs ces deux dernières décennies a contribué au développement de bases de données regroupant les séquences des miARNs identifiées et leurs annotations. Des programmes bioinformatiques de prédiction utilisent ces bases de données pour identifier des interactions potentielles entre les miARNs et les ARNm (Griffiths-Jones et al., 2008). Cependant, la présence d'appariements imparfaits et de sites atypiques d'appariement entre le miARN et sa cible rendent ces prédictions complexes.

La plupart des algorithmes de prédiction des cibles se basent sur les sites d'interaction canoniques, possédant un appariement rigoureux au niveau de la région graine. Ils ont donc un fort degré de chevauchement. Cependant, ils divergent dans la prise en compte d'artéfacts d'alignements ou l'utilisation de bases de données de régions NT différentes. Les autres différences sont intrinsèques aux algorithmes de prédiction qui prennent en compte d'autres critères (Figure 12 ; Grimson et al., 2007 ; Witkos et al., 2011 ; Akhtar et al., 2016), tels que :

- La localisation du site dans la 3'NT à au moins 15 nucléotides en aval du codon stop
- Une forte densité de nucléotides AU localement
- La présence de sites pour la co-expression de multiples miARNs conduisant à une activité synergique pouvant augmenter l'efficacité de la répression
- La présence de sites multiples de ciblage par les miARNs
- La conservation de la séquence par analyse de comparaison de séquences orthologues
- La prédiction de la structure secondaire du duplex miARN-ARNm
- La stabilité thermodynamique du duplex miARN:ARNm *via* le calcul de l'énergie libre de liaison.

Target prediction algorithm	Features		Experimental evaluation results				Assessment		Reference
	Parameters contributing to the final score	Cross-species conservation	Sethupathy et al. 2006	Baek et al. 2008	Alexiou et al. 2009		Advantages	Disadvantages	
			sensitivity ¹	log ₂ -fold change ²	precision ³	sensitivity ⁴			
miRanda	complementarity and free energy binding	conservation filter is used	49%	0.14	29%	20%	- beneficial for prediction sites with imperfect binding within seed region	- low precision, too many false positives	[56]
TargetScan	seed match, 3' complementarity local AU content and position contribution ⁵	given scoring for each result	21%	0.32 ⁶	51%	12%	- many parameters included in target scoring - final score correlates with protein downregulation	- sites with poor seed pairing are omitted	[38]
Target-Scans	seed match type	only conservative sites are considered	48%	-	49%	8%	- simple tool for search of conserved sites with stringent seed pairing	- underestimate miRNAs with multiple target sites	[38]
PicTar	binding energy, complementarity and conservation	required pairing at conserved positions	48%	0.26	49%	10%	- miRNAs with multiple alignments are favored	- does not predict non-conservative sites	[42, 57]
DIANA-microT	free energy binding and complementarity	dataset of conserved UTRs among human and mouse is used	10%	-	48%	12%	- SNR ratio and probability given for each target site - possibility of using own miRNA sequence as an input	- some miRNAs with multiple target sites may be omitted	[36]
PITA	target site accessibility energy	user-defined cut-off level	-	0.04 ⁶	26%	6%	- the secondary structure of 3'UTR is considered for miRNA interaction	- low efficiency compared to other algorithms	[46]
Rna22	pattern recognition and folding energy	not included	-	0.09	24%	6%	- allows to identify sites targeted by yet-undiscovered miRNAs	- low efficiency compared to other algorithms	[58]

¹percentage of experimentally supported miRNA-target gene interactions predicted (used TarBase records for which a direct miRNA effect was examined).

²average protein depression of genes predicted by the algorithm to be miR-223 targets.

³proportion of correctly predicted target miRNAs to total predicted miRNA-mRNA interactions (data obtained from proteomic analyses carried out by Selbach et al.).

⁴proportion of correctly predicted target miRNAs to total correct miRNA-mRNA interactions (data obtained from proteomic analyses carried out by Selbach et al.).

⁵position contribution parameter promotes sites close to the 3'UTR ends.

⁶the final scoring correlates with the level of protein downregulation.

Figure 12 : Les caractéristiques des différents algorithmes de prédiction (Witkos et al., 2011)

Les références indiquées dans le tableau correspondent à celles de la publication (voir Witkos et al., 2011)

Au début de leur développement, les outils de prédiction des cibles des miARNs se sont majoritairement basés sur la prédiction de sites d'interaction dans la région 3'NT des ARNm. De plus en plus d'études identifient de nouveaux modes d'action des miARNs *via* la région 5'NT et la séquence codante (Helwak et al., 2013 ; Tay et al., 2008 ; Place et al., 2008 ; Lytle et al., 2007 ; Maurel et al., 2013a). Ainsi, certains algorithmes recherchent des complémentarités avec les miARNs seulement dans la région 3'NT des ARNm (miRanda, TargetScan) tandis que d'autres scannent la région d'intérêt entière (PITA, RNA22).

Un enrichissement en nucléotides AU serait plus favorable à une reconnaissance non Watson-Crick en position 1 du miARN et permettrait également une meilleure accessibilité à la cible.

Il a été montré que la plupart des gènes codant pour des protéines ont conservé spécifiquement les régions complémentaires aux séquences graines des miARNs qui les régulent (Friedman et al., 2009). Ainsi, la prédiction sur la base de la conservation de séquence semble intéressante. Cependant, cette approche peut également induire des faux-négatifs car elle ne prend pas en compte les sites non-conservés fonctionnels. Plusieurs algorithmes sont basés sur cette conservation de séquence : miRanda (Enright et al., 2004), PicTar (Krek et al., 2005), TargetScanS (Lewis et al., 2005), DIANA-microT (Maragkakis et al., 2011) et EIMMo (Gaidatzis et al., 2007).

D'autres algorithmes comme PITA (Kertesz et al., 2007) ou RNA22 (Miranda et al., 2006) ne prennent pas en compte la conservation et sont basés sur l'énergie libre de liaison et la structure secondaire. Certains outils incluent également des données validées expérimentalement, permettant de consolider les prédictions réalisées.

Ces exemples soulignent l'importance du choix de l'outil de prédiction dans les études portant sur les miARNs et leurs cibles. Afin d'aider les utilisateurs à mieux sélectionner leurs outils de prédiction, des groupes de chercheurs ont évalué la performance de ces programmes. Les critères à prendre en compte sont la spécificité et la sensibilité de chacun, ils sont directement corrélés aux pourcentages de faux-positifs et de faux-négatifs. L'utilisation combinée des trois programmes TargetScanS, PicTar et DIANA-microT permet un niveau de précision supérieur à 60% (Selbach et al., 2008). En parallèle, Alexiou et al. (2009) ont montré que la combinaison de cinq programmes (DIANA-microT, TargetScan, TargetScanS, PicTar, et EIMMo) donne un niveau de précision d'environ 50%. L'utilisation de ces trois à cinq outils est une base intéressante pour prédire des cibles de miARNs chez les vertébrés, les

mouches et les vers. En 2015, Dweep and Gretz ont également développé le programme miRWalk2.0 qui intègre les résultats de 13 bases de données différentes pour la prédiction des interactions miARN-ARNm chez l'homme, la souris et le rat. A ce jour, il existe de nombreuses plateformes permettant de combiner les différents algorithmes de prédiction (Akhtar et al., 2016). Cependant, la combinaison de différents algorithmes conduit à l'augmentation de la sensibilité au prix de la spécificité.

La prédiction des cibles ARNm potentielles des miARNs d'intérêts nécessite ensuite la validation des interactions prédites. Ces analyses peuvent être réalisées de manière globale, par exemple par chromatographie d'affinité *via* l'utilisation d'un miARN d'intérêt biotinylé et la mesure de l'expression des ARNm retenus sur la colonne avec le miARN. Elles peuvent également être réalisées de manière plus précise, par exemple grâce à l'utilisation de gènes rapporteurs exprimant une cible potentielle du miARN d'intérêt.

3. Les mécanismes d'action des miARNs

Le contrôle de l'expression génique médié par les miARNs a été largement étudié mais reste très controversé. Leur effet nécessite l'intervention du complexe RISC et de facteurs associés. Dans la majorité des cas, ils induisent l'inhibition de l'expression de l'ARNm cible par son clivage, la répression de sa traduction et/ou sa dégradation. Dans de rares cas, ils peuvent induire l'augmentation de leur expression.

3.1. Inhibition de l'expression génique

Dans le cas où le miRISC a un effet inhibiteur sur l'expression de l'ARNm cible, deux cas de figure se présentent en fonction de l'appariement du miARN.

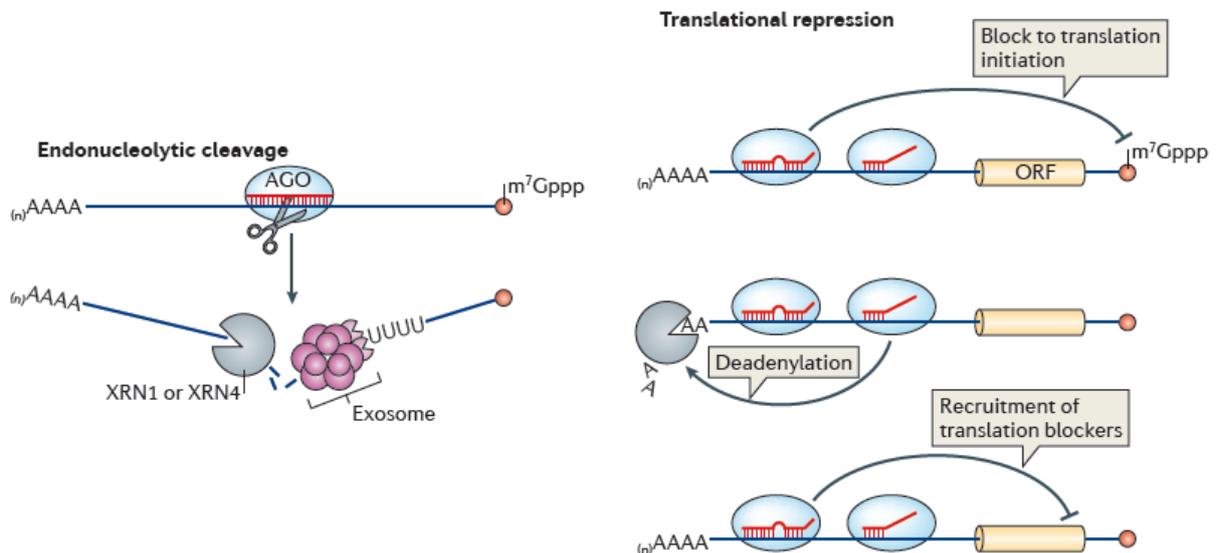


Figure 13 : Répression de l'expression des ARNm selon le type d'appariement avec le miARN (Ameres and Zamore, 2013)

Lorsque le miARN s'apparie à sa cible avec une complémentarité parfaite au niveau de sa région graine (Figure 13, panel de gauche), l'ARNm est directement clivé par AGO2 puis dégradé (section III.3.1.2). Ce mécanisme est fréquent chez les plantes car la plupart des miARNs s'associent parfaitement à leur cible, mais il est rare chez les mammifères.

Une complémentarité imparfaite entre la séquence graine du miARN et la cible (Figure 13, panel de droite) entraîne la mobilisation des autres protéines AGO : AGO1, -3 ou -4. Leur domaine catalytique n'étant pas actif, elles ne peuvent pas cliver l'ARNm cible. La répression de l'expression génique est donc portée par des protéines effectrices, recrutées par GW812, qui inhibent la traduction (section III.3.1.1) et/ou dégradent l'ARNm (section III.3.1.2).

3.1.1 *Inhibition de la traduction*

La traduction et la stabilité des ARNs sont contrôlées par une protéine clef, la Poly(A)-Binding Protein (PABP). Elle se fixe à la queue poly(A) et interagit avec les facteurs d'initiation de la traduction eIF4G, eIF4E et eIF4A localisés au niveau de la structure m⁷GpppN de la coiffe en 5'NT de l'ARNm (Figure 14A). Cela favorise la circularisation de l'ARNm et le recrutement des ribosomes nécessaires à l'initiation de la traduction.

Lorsqu'un ARNm est pris en charge dans le miRISC, la protéine GW182 interagit avec la PABP qui se dissocie de l'ARNm et des facteurs d'initiation empêchant ainsi le démarrage de la traduction (Moretti et al., 2012). Les mécanismes impliqués dans cette dissociation ne sont pas exactement connus mais diverses hypothèses ont été formulées. L'interaction de GW182 avec la PABP pourrait entrer en compétition avec eIF4G et empêcher la circularisation de l'ARNm (Fabian et al., 2010 ; Zekri et al., 2009). Elle pourrait également affecter l'affinité de la PABP pour la queue poly(A) (Fabian et al., 2010 ; Zekri et al., 2009 ; Huntzinger et al., 2010). Une troisième hypothèse est que l'interaction GW182-PABP pourrait accélérer la déadénylation induite par les miARNs (Fabian et al., 2010 ; Jinek et al., 2010). La dissociation de la PABP empêche le recrutement des ribosomes, inhibant ainsi la traduction en protéine.

3.1.2 *Dégradation des ARNm*

Dans le cas d'une complémentarité parfaite entre la séquence graine du miARN et l'ARNm cible (Figure 13, panel de gauche), la protéine AGO2 est recrutée au miRISC. Son domaine PIWI, qui possède l'activité catalytique, clive l'ARNm au niveau de la région faisant face aux nucléotides 10-11 du miARN (Ameres and Zamore, 2013). L'ARNm est alors dégradé à la fois par l'exoribonucléase 5'→3' XRN1 (XRN4 chez les plantes) et par les exosomes dans le sens 3'→5'. L'ARN clivé peut être uridylé, marquant les fragments pour la dégradation.

La dégradation des ARNm indépendante du clivage par AGO2 en cas de complémentarité imparfaite (Figure 13, panel de droite) fait intervenir deux processus: la

déadénylation de la queue poly(A) et l'enlèvement de la coiffe. Ces deux processus peuvent être complémentaires mais peuvent également intervenir de manière indépendante.

- La déadénylation

La déadénylation des ARNm fait intervenir les complexes de déadénylation CCR4-NOT et PAN2-PAN3 (Figure 14B ; Behm-Ansmant et al., 2006 ; Piao et al., 2010). GW182 interagit directement avec la sous-unité NOT1 du complexe CCR4-NOT1 permettant le recrutement des déadénylases CAF-1 et CCR4 (Figure 14B). La sous-unité PAN3, du complexe PAN2-PAN3, peut également interagir directement avec GW182 ou avec la PABP, puis recrute la sous-unité catalytique PAN2. Ce complexe est impliqué mais pas nécessaire au processus de déadénylation (Braun et al., 2012 ; Fabian et al., 2011). Le recrutement de ces complexes provoque la déadénylation des ARNm. Lorsque la queue poly(A) atteint une taille critique, l'ARNm est dégradé dans le sens 3'→5' par les exosomes. GW182 pourrait également servir de co-activateur (Fabian et al., 2011) en stimulant l'activité du complexe CCR4-NOT1 (Huntzinger et al., 2013). Le recrutement de CCR4-NOT1 induit également la dissociation de la PABP avec l'ARNm (Zekri et al., 2013), amplifiant la dé-circularisation et le blocage de l'initiation de la traduction. La déadénylation est un processus réversible.

- L'enlèvement de la coiffe

Des facteurs d'enlèvement de la coiffe sont recrutés par le complexe RISC sur l'ARNm. La sous-unité catalytique du complexe de décoiffage (DCP2), aidée par des co-activateurs, hydrolyse la coiffe (Figure 14C). L'ARNm n'étant plus protégé en 5', il est rapidement dégradé par l'exoribonuclease 5'→3' XRN1 (Figure 14D ; Eulalio et al., 2007 ; Behm-Ansmant et al., 2006). Contrairement à la déadénylation, l'enlèvement de la coiffe est un processus irréversible et conduit toujours à la dégradation de l'ARNm. En général, chez les mammifères, le décoiffage est induit suite à la déadénylation des ARNm dirigée par les miARNs mais il peut également se produire de manière indépendante.

3.1.3 Traduction et/ou dégradation ?

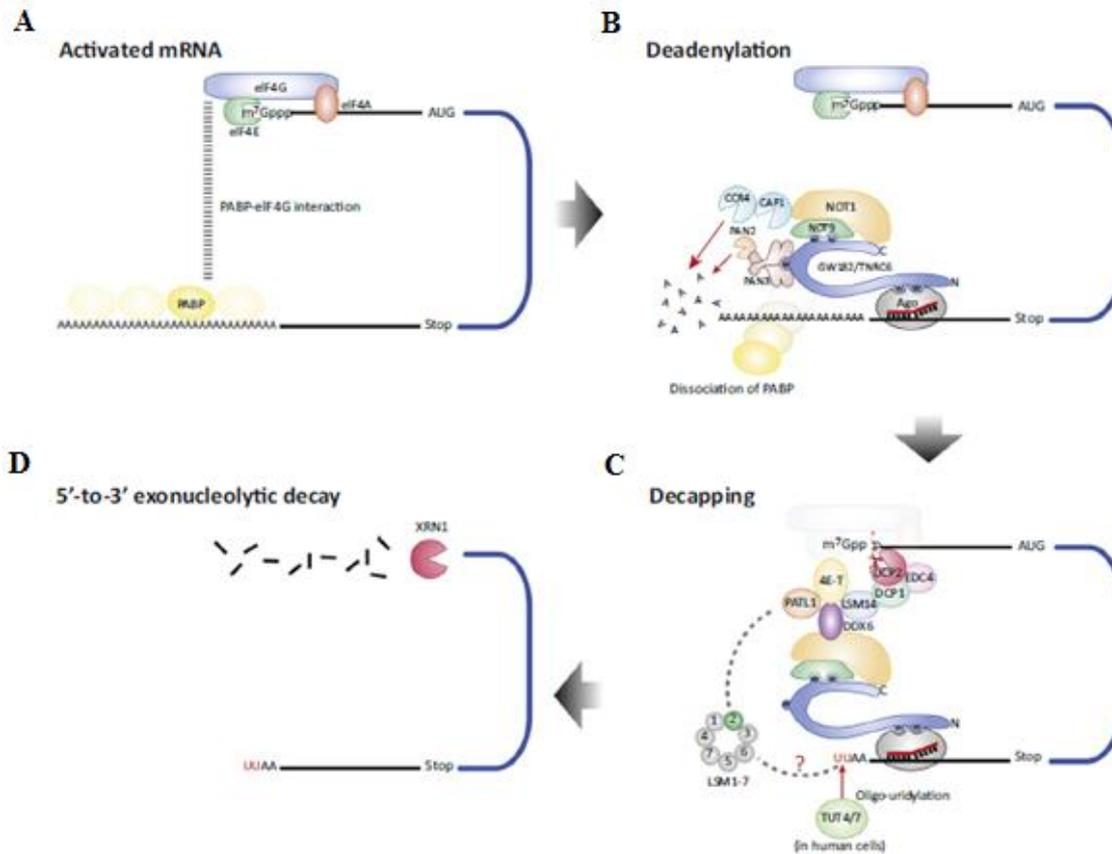


Figure 14 : Mécanismes d'inhibition de la traduction et de dégradation de l'ARNm (d'après (Iwakawa and Tomari, 2015))

Les mécanismes d'inhibition de la traduction et de dégradation de l'ARNm varient selon l'appariement entre le miARN et sa cible, la concentration de composants du RISC et le type cellulaire. De récentes analyses sur le génome entier ont montré que la répression de l'expression des gènes cibles des miARNs est majoritairement due à la dégradation (66 à 90% des cas), alors que l'inhibition de la traduction non liée à la dégradation intervient pour 6 à 26% (Subtelny et al., 2014 ; Eichhorn et al., 2014). Cela pourrait être une conséquence des différences de cinétiques entre les deux mécanismes. En effet, la déadénylation est un processus plutôt lent qui a lieu de manière co-traductionnelle jusqu'à ce que l'ARNm soit totalement dégradé. En revanche, l'inhibition de la traduction est un processus plus rapide. De plus, l'inhibition de la traduction peut être découplée de la dégradation de l'ARNm puisqu'elle peut se produire sur des ARNm n'ayant pas de queue poly(A) ou qui sont résistants à la dégradation. La déadénylation et la dégradation des ARNm peuvent également avoir lieu en absence de traduction.

3.2. Activation de l'expression génique

Dans la majorité des cas, les miARNs sont responsables de l'inhibition de l'expression des ARNm, mais il existe des exceptions pour lesquels les miARNs induisent une augmentation de l'expression des cibles. Cette régulation peut être la conséquence de l'effet direct du miARN et de ses co-facteurs (activation) ou d'un effet indirect *via* la répression d'un autre ARN (levée de répression). Cela dépend du contexte cellulaire, de la séquence de l'ARN et de l'association avec des co-facteurs tels que les AU-rich element (ARE). Les mécanismes ne sont pas encore très bien décrits, mais de nombreux exemples démontrent cette activité.

3.2.1 Exemple d'activation directe de l'expression des ARNm

Dans les cellules quiescentes, miR-369-3 recrute la protéine AGO2 ainsi qu'une isoforme de la protéine de liaison à l'ARN FXR1, FXR1-iso-a, sans recruter GW182. Cela a pour conséquence d'activer l'expression de sa cible TNF α (Vasudevan et al., 2007). TNF α est un ARE qui contrôle l'efficacité de traduction des ARNm. Ainsi, l'activation de sa traduction a pour but d'activer la prolifération dans une condition où les cellules sont bloquées en phase G0/G1. Cependant, ce phénomène semble plutôt anecdotique.

3.2.2 Exemples d'activation indirecte de l'expression des ARNm

Les pseudogènes et d'autres petits ARNs non-codants peuvent entrer en compétition avec les miARNs au niveau de leur site d'interaction avec leur cible, conduisant à une levée de la répression des cibles par les miARNs. Par exemple, PTEN (Phosphatase and tensin homolog), connu pour son rôle suppresseur de tumeur, et son pseudogène PTENP1 sont tous deux les cibles de miR-19b et miR-20a. Dans ce contexte, PTENP1 agit comme un appât pour ces miARNs afin de lever la répression de PTEN et permettre l'augmentation de ses niveaux d'ARNm et de protéine (Poliseno et al., 2010). Il en est de même pour le suppresseur de tumeur KRAS (V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog) et son pseudogène KRAS1P (Poliseno et al., 2010).

Les miARNs peuvent également contribuer à l'augmentation indirecte de l'expression d'un ARNm *via* la répression d'une cible directe intermédiaire. C'est le cas pour miR-1291 qui augmente indirectement l'expression du GPC3 dans les cellules hépatiques (Maurel et al., 2013a). MiR-1291 a pour cible directe l'ARNm de l'exonucléase IRE1 α (Inositol-Requiring Enzyme 1 α) dont il induit la dégradation. Cette exonucléase régule la stabilité du GPC3 en

clivant son ARNm dans sa région 5'NT. La répression d'IRE1 α et sa dégradation par miR-1291 conduisent à une levée de la répression du GPC3.

3.3. Activation ou répression de l'expression génique ?

Un miARN peut avoir des effets variés selon la cible et le contexte cellulaire.

Par exemple, miR-145 active l'expression de la myocardine alors qu'il réprime l'expression d'autres facteurs de transcription tel que Klf4 pour contrôler le devenir des muscles lisses (Cordes et al., 2009). Il a également été montré que miR-122, un miARN très abondant dans le foie, active la traduction de l'ARN du virus de l'hépatite C (VHC) *via* deux sites d'interaction localisés en région 5'NT (Jopling et al., 2005) alors qu'il réprime sa traduction lorsqu'il interagit avec cet ARNm en région 3'NT (Jopling et al., 2008). La balance entre les différents sites d'interaction et les co-facteurs mis en jeu, ainsi que l'état de prolifération de la cellule influencent l'action du miARN.

Ainsi, l'activation post-transcriptionnelle de l'expression des ARNm par les miARNs est un phénomène biologiquement relevant. Elle implique la formation de complexes différents de ceux décrits pour la répression, de co-facteurs additionnels ou intermédiaires, tels que les ARE, et a lieu en réponse à un contexte cellulaire particulier.

4. Conclusion

Les miARNs sont des petits ARNs dont le rôle biologique est de réguler l'expression des gènes au niveau post-transcriptionnel. Leur rôle est essentiel dans le maintien de l'homéostasie cellulaire. Chaque miARN est capable d'agir sur de multiples cibles et chaque ARNm est la cible de plusieurs miARNs. En général, un miARN possède plusieurs cibles appartenant au même processus ou à la même voie de signalisation, lui permettant d'effectuer une régulation à plusieurs niveaux pour une meilleure efficacité. Ainsi, au cours de l'évolution, les cellules ont mis en place et ont conservé un réseau de régulations très complexe au cœur duquel sont les miARNs. Ce réseau doit être très finement régulé pour maintenir l'équilibre de la cellule. Une dérégulation de leur expression peut mener au développement de maladies comme le cancer.

IV. MICROARNs ET CANCER

La tumorigenèse est un processus complexe par lequel une cellule somatique normale acquiert des modifications de son programme génétique et de ses voies de signalisation, lui conférant des propriétés de prolifération anormale, de migration et/ou de résistance à la mort conduisant à la formation d'une tumeur. Les caractéristiques menant au cancer ont été très bien décrites par Hanahan and Weinberg (2011) (Figure 15).

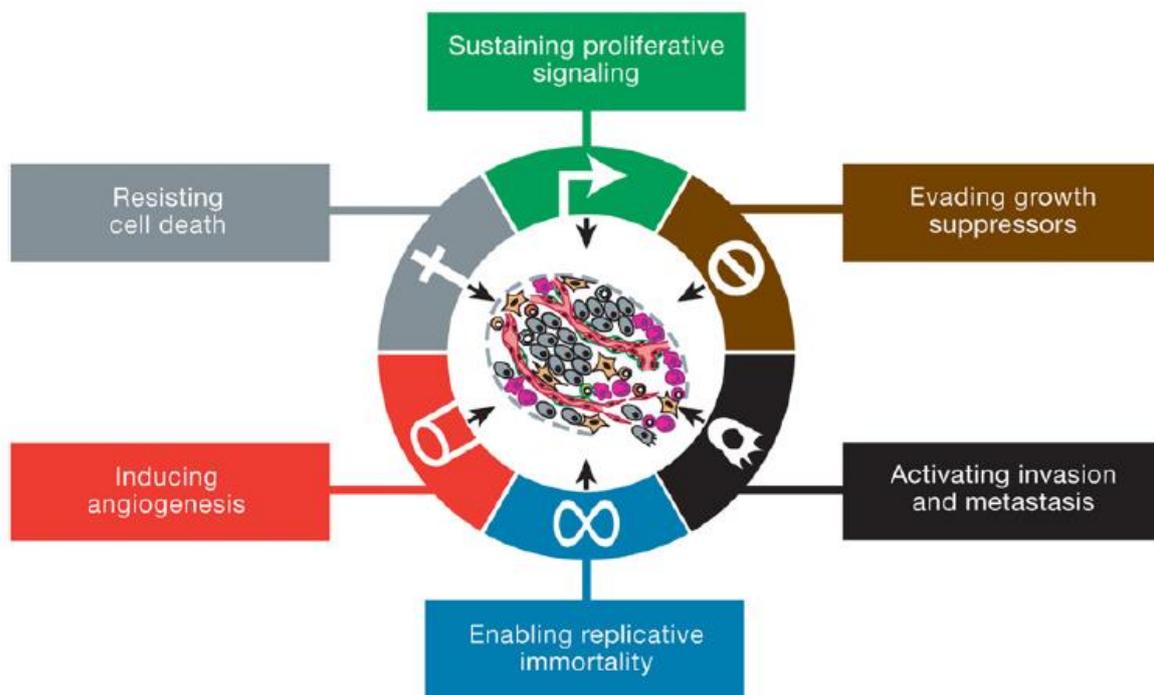


Figure 15 : Les principales caractéristiques du cancer (Hanahan and Weinberg, 2011)

Les miARNs contrôlent l'expression des gènes impliqués dans tous les processus cellulaires tels que la prolifération, la différenciation, la survie, le métabolisme, la stabilité du génome, l'inflammation, l'invasion ou encore l'angiogenèse. Ainsi, il apparaît évident que des modifications de l'expression des miARNs soient impliquées dans la transformation d'une cellule normale en cellule cancéreuse et le développement du cancer.

Depuis la première publication qui a identifié une délétion des *loci* de miR-15 et miR-16 dans la majorité des échantillons de patients atteints de leucémie lymphoïde chronique à cellules B (LLC-B) (Calin et al., 2002), de nombreux articles ont montré l'altération de l'expression des miARNs dans les cellules tumorales comparé au tissu normal (Lu et al., 2005 ; Thomson et al., 2006 ; Calin and Croce, 2006).

L'étude du miRNome (spectre des miARNs exprimés par un génome spécifique et dans des conditions physiologiques données) a montré qu'il reflète l'état malin de la cellule cancéreuse. Les miARNs sont ainsi des marqueurs diagnostiques et pronostiques prometteurs corrélés à la progression de la maladie et à la survie des patients. Ayant un effet régulateur important sur de multiples voies de signalisation et étant fortement dérégulés dans les cancers, les miARNs constituent également des cibles intéressantes pour le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques (Garzon et al., 2010 ; Broderick and Zamore, 2011 ; Li and Rana, 2014).

1. Les mécanismes de dérégulation de l'expression des miARNs dans les cancers

Dans la plupart des cancers, l'expression des miARNs est globalement diminuée suggérant une dédifférenciation des cellules tumorales (Lu et al., 2005). Cette diminution des niveaux d'expression peut également être induite par une dérégulation de la machinerie de maturation des miARNs (Kumar et al., 2009 ; Lambertz et al., 2010). Des faibles niveaux d'expression de Dicer et Drosha ont notamment été corrélés à un stade tumoral avancé et à un faible pronostic (Karube et al., 2005 ; Lin et al., 2010). Les causes de leur dérégulation dans les tumeurs ne sont pas entièrement connues.

En plus de ces modifications globales, chaque tumeur contient de nombreuses anomalies pouvant conduire à une modification de l'expression de miARNs spécifiques. Ces anomalies peuvent être situées dans la séquence des miARNs ou dans celles des effecteurs de la voie de maturation des miARNs. Elles peuvent affecter la séquence, l'expression, la maturation, la stabilité des miARNs (Figure 16). La dérégulation d'un miARN peut donc avoir lieu à plusieurs niveaux de manière indépendante ou synergique.

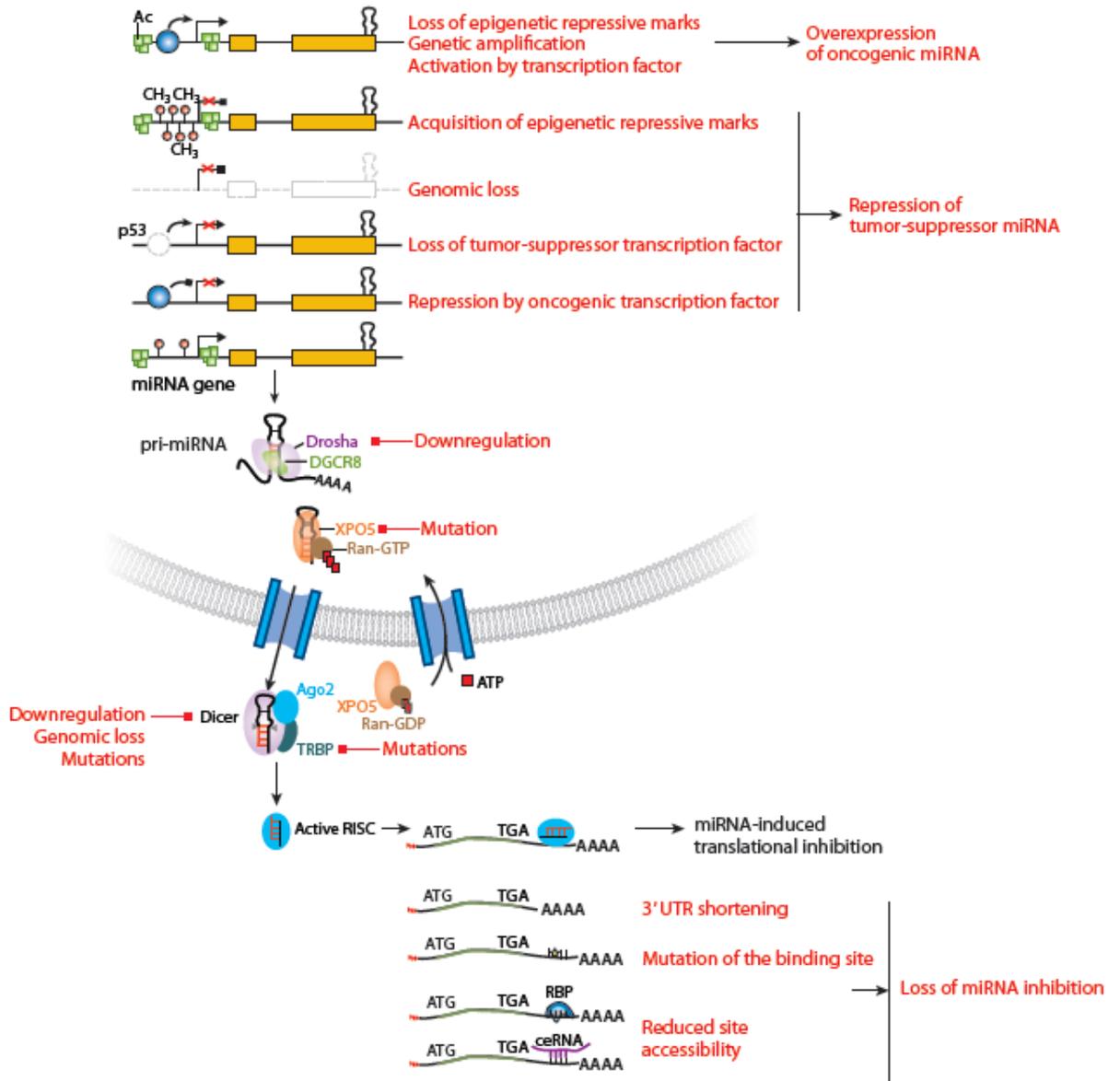


Figure 16 : Les divers mécanismes de dérégulation de l'expression et de l'activité des miARNs dans les cancers (Di Leva et al., 2013)

1.1. Les anomalies chromosomiques

Plus de la moitié des miARNs sont localisés dans les introns ou exons de gènes codant pour des lncARNs ou pour des protéines (voir section III.1.1; Figure 9 ; Rodriguez et al., 2004 ; Kim and Kim, 2007 ; Shomron et al., 2009). De ce fait, des altérations chromosomiques dans ces régions perturbent l'expression des miARNs. En 2004, Calin et al. ont également montré que plus de la moitié des miARNs humains connus sont localisés dans des régions du génomes fréquemment altérées dans les cellules cancéreuses. Une majorité de

ces miARNs sont situés dans des régions de perte d'hétérozygotie où la plupart des gènes suppresseurs de tumeurs sont localisés. Ces régions sont fréquemment perdues dans les cancers. En revanche, une plus faible quantité de miARNs sont localisés au niveau de régions du génome amplifiées qui contiennent pour la plupart des oncogènes. De plus, il y a également une forte proportion de miARNs situés au sein de sites fragiles et de régions de fréquentes cassures chromosomiques, qui sont des sites communs d'échanges de chromatides sœurs, de délétions, d'amplifications et de translocations, ainsi que d'intégrations virales.

Toutes ces variations entraînent une altération de la transcription des pri-miARNs et de l'expression des miARNs, conduisant à une expression aberrante de leurs cibles qui participent à l'initiation et la progression cancéreuse (Zhang et al., 2006).

C'est le cas pour le cluster miR-15/16-1 situé au niveau du chromosome 13q14.3. Les *loci* de ces miARNs sont fréquemment délétés ou mutés dans les LLC-B (Calin et al., 2002 ; Raveche et al., 2007). Dans ces tumeurs, leur expression est inversement corrélée à l'expression d'une de leur cible, la protéine anti-apoptotique BCL-2 (Cimmino et al., 2005). La perte de ces *loci* conduit à la levée de la répression de BCL-2. Par conséquent, BCL-2 permet à la cellule d'échapper à l'apoptose, un mécanisme clef dans la tumorigenèse (Figure 15 ; Hanahan and Weinberg, 2011). De manière intéressante, une duplication du cluster de miR-15 et miR-16 a été identifiée au niveau d'un autre chromosome, dans la région 3q25.33. Cette redondance pourrait être un mécanisme de sauvegarde contre la perte d'expression de ces deux miARNs. Un autre exemple est celui du cluster miR-17~92, localisé dans l'intron du gène *C13orf25* au niveau du *locus* 13q31. Cette région subit souvent une amplification dans les lymphomes et tumeurs solides (Ota et al., 2004 ; He et al., 2005 ; Hayashita et al., 2005). Ce cluster agit en coopération avec MYC pour accélérer le développement de la tumeur en diminuant l'apoptose (He et al., 2005).

Les séquences des pri-miARNs sont des sites particulièrement riches en polymorphisme nucléotidique (SNP) (Saunders et al., 2007). Les SNP correspondent à des mutations d'une seule paire de base nucléotidique qui peuvent avoir lieu partout dans le génome. Ils affectent la biogenèse des miARNs. Par exemple la mutation C>T dans le motif CNNC du pri-miARN miR-15/16-1 conduit à une réduction de la maturation par Drosha et donc à la diminution de l'expression de ces miARNs (Ryan et al., 2010). La présence d'un SNP dans la séquence graine peut également avoir lieu, empêchant la reconnaissance de l'ARNm cible par le miARN et donc inhibant sa répression.

1.2. La régulation épigénétique

L'altération épigénétique est une caractéristique commune dans les cancers, elle conduit également à la dérégulation de l'expression des miARNs (Esteller, 2008). Elle est caractérisée par l'hypo- ou hyperméthylation de l'ADN ainsi que par l'acétylation des histones par les HATs ou leur désacétylation par les HDACs. Ces changements contrôlent localement la structure de la chromatine et donc l'accessibilité des facteurs de transcription, affectant l'expression des gènes codant pour des miARNs (Figure 17).

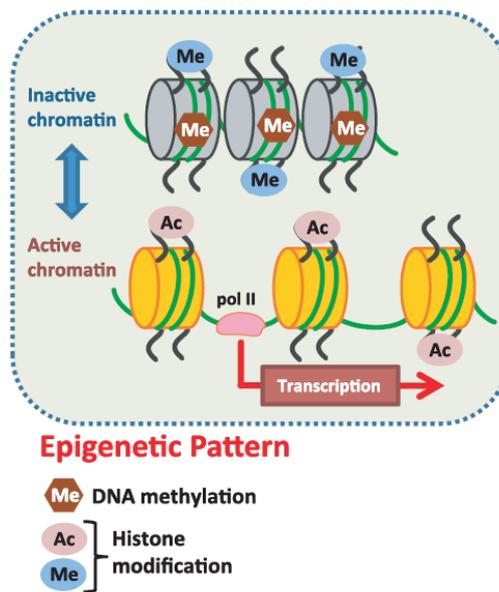


Figure 17 : La régulation épigénétique de l'expression des miARNs (d'après Sato et al., 2011)

- Répression de la transcription des miARNs par hyperméthylation: l'exemple de mi-34b/c

La famille de miR-34 est composée de trois miARNs, miR-34a/b/c. Les miR-34b et miR-34c sont transcrits au sein d'un même pri-miARN. Leur promoteur contient des îlots CpG dont la méthylation est altérée dans de multiples cancers (Corney et al., 2007). L'hyperméthylation du promoteur conduit à la répression de la transcription des miARNs (Kozaki et al., 2008 ; Guil and Esteller, 2009). Ces miARNs ciblant de multiples oncogènes tels que MYC et BCL-2 (Cole et al., 2008), la diminution de leur expression participe à la progression tumorale. Le traitement des cellules cancéreuses à la decitabine, un inhibiteur des méthyltransférases, et particulièrement DNMT1, réactive l'expression la famille miR-34 conduisant à l'inhibition de la croissance tumorale et des métastases (Lujambio et al., 2008).

- Activation de la transcription des miARNs par hypométhylation: l'exemple de let-7a-3

Au contraire, les promoteurs de certains miARNs deviennent hypométhylés. C'est le cas du promoteur de let-7a-3, souvent hypométhylé dans les cancers du poumon (Brueckner et al., 2007). L'expression de ce miARN est alors augmentée, conduisant à la diminution de l'expression de gènes décrits comme des régulateurs de la prolifération des cellules cancéreuses dans le poumon : *PPARG*, *TGFB2*, and *SFRP1*. En parallèle, l'expression de gènes impliqués dans l'adhésion cellulaire est augmentée (*CDK6*, *PCNA*, *PRDX1* et *CXCL5*).

- Répression de la transcription des miARNs par désacétylation des histones: l'exemple de miR-183

La désacétylation des histones par les HDACs est globalement augmentée dans les cancers, favorisant la répression de la transcription des miARNs. Une étude a montré que l'utilisation de molécules inhibitrices des HDAC dans les cancers du sein induit une forte modification de l'expression des miARNs, restaurant une activité antitumorale (Scott et al., 2006). De manière plus ciblée, HDAC2 coopère avec N-MYC pour inhiber l'expression de miR-183 (Lodrini et al., 2013). MiR-183 a pour cible l'oncogène BMI-1, qui inhibe l'apoptose et augmente la croissance des cellules de neuroblastome (Cui et al., 2007). L'inhibition de miR-183 par HDAC2 et MYC conduit à la levée de la répression de BMI-1 favorisant la tumorigenèse.

- Activation de la transcription des miARNs par acétylation des histones : l'exemple de miR-224

Dans les cellules de CHC, la HAT EP300 réprime les HDAC1 et HDAC3 et active l'acétylation des histones au niveau du promoteur de miR-224, conduisant à l'augmentation de l'expression de ce miARN (Wang et al., 2012c). MiR-224 active des voies de signalisation comme la voie TGF β (Yao et al., 2010), conduisant à la prolifération cancéreuse.

1.3. La régulation par les facteurs de transcription

De nombreux facteurs régulant la transcription par l'ARN pol II sont impliqués dans le contrôle de l'expression des miARNs. Parmi ces facteurs, deux sont bien caractérisés : p53 et MYC.

P53 est un gène suppresseur de tumeur très important. Il est muté dans de nombreux cancers (Hollstein et al., 1991). Les voies de signalisation impliquant p53 interviennent dans les réparations des dommages de l'ADN, le stress cellulaire et la stimulation mitogénique. L'altération de ces voies aboutit à un empêchement de la réparation des dommages à l'ADN, une prolifération cellulaire incontrôlée, l'inhibition de l'apoptose ou encore l'angiogenèse, des processus dont l'activation mène à la carcinogenèse. p53 régule l'expression de nombreux miARNs (Figure 18, Lujambio and Lowe, 2012). Notamment, il induit la transcription de la famille de miR-34 (He et al., 2007) qui joue le même rôle en régulant l'arrêt du cycle cellulaire, la sénescence et l'apoptose dans les cancers. Dans les cancers mutés pour *P53*, comme les cancers de l'ovaire, l'expression des miR34a/b/c reflète le niveau d'expression de p53 (Corney et al., 2007). Ainsi la régulation de l'expression de miR-34 est un des mécanismes important qui participe à l'activité antitumorale de p53.

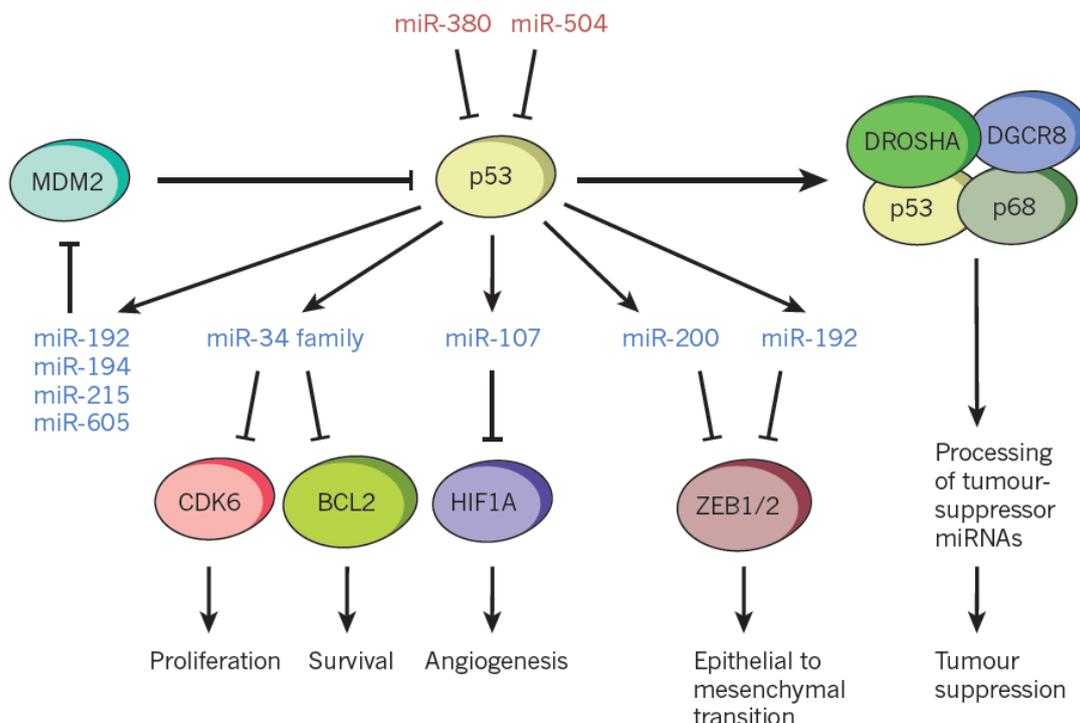


Figure 18 : Régulation de l'expression des miARNs par p53 (Lujambio and Lowe, 2012)

MYC est un oncogène. Il inhibe l'expression de miARNs inhibiteurs de la tumorigenèse et active l'expression de miARNs oncogènes comme le cluster miR-17~92 (Figure 19, O'Donnell et al., 2005). Les miARNs du cluster miR-17~92 contrôlent l'expression du facteur de transcription E2F1. L'action synergique de MYC et de ces miARNs promeut la prolifération cancéreuse. MYC est également capable de réguler l'expression de let-7 par l'intermédiaire de l'ARN non codant LIN28. LIN28 empêche la maturation de let-7 par Drosha et Dicer (Newman et al., 2008) et altère la stabilité de let-7 en recrutant l'uridyl transférase TUT4 qui conduit à l'uridylation et à la dégradation de ce petit ARN (Heo et al., 2009).

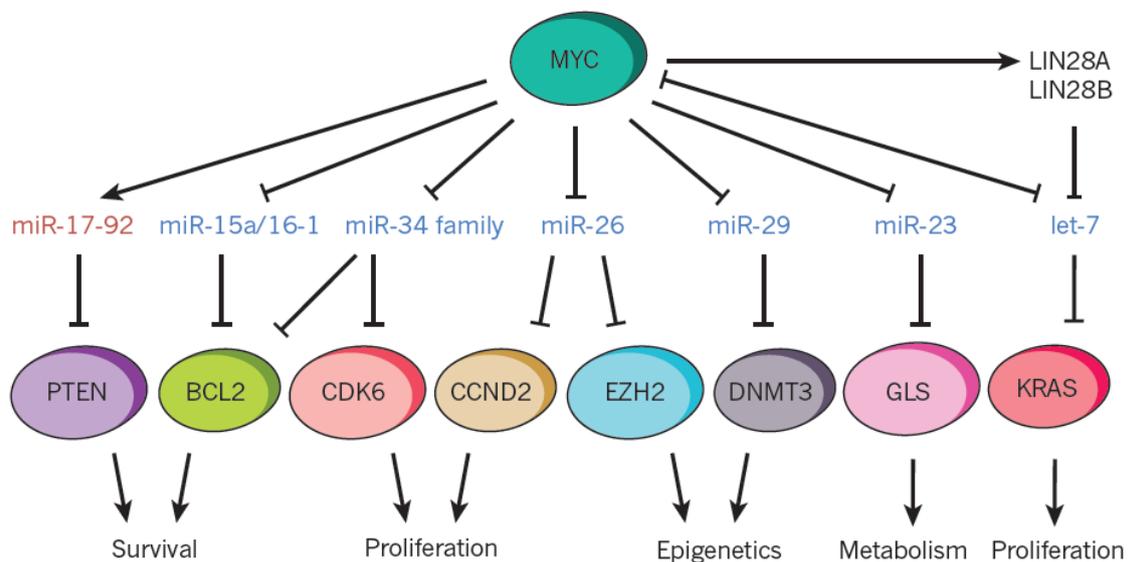


Figure 19 : Régulation de l'expression des miARNs par MYC (Lujambio and Lowe, 2012)

1.4. L'altération de la biogenèse et de la stabilité des miARNs

Certains miARNs matures appartenant à un même pri-miARN sont parfois différemment exprimés, montrant un niveau de régulation post-transcriptionnel. Comme décrit dans la section III.1, la maturation des miARNs est un processus complexe faisant intervenir de nombreux facteurs. Ainsi, les composants de cette voie peuvent être mutés dans les cellules tumorales et/ou avoir une expression altérée (Lin and Gregory, 2015), conduisant à la dérégulation de l'expression des miARNs.

1.4.1 *La dérégulation du clivage des pri-miARNs*

La maturation des miARNs par le complexe microprocesseur est une étape clef de la régulation du niveau de miARNs car il contrôle le devenir du pri-miARN en pré-miARN. Selon le type de cancer, Drosha est fréquemment sur- ou sous-régulé, conduisant à une altération globale de l'expression des miARNs. L'augmentation de l'expression de Drosha promeut la prolifération cellulaire, la migration et l'invasion (Muralidhar et al., 2011 ; Lin and Gregory, 2015), tandis que sa diminution est plutôt corrélée à l'apparition de métastases, l'invasion et à un mauvais pronostic (Lin et al., 2010 ; Shu et al., 2012 ; Jafarnejad et al., 2013 ; Guo et al., 2011 ; Lin and Gregory, 2015). A ce jour, les mécanismes pour lesquelles Drosha est plus ou moins exprimée dans certains cancers ne sont pas très bien connus. Ces différences pourraient être expliquées par des altérations génétiques et épigénétiques qui contrôlent la transcription de Drosha dans un contexte cellulaire donné.

De plus, certains facteurs de transcription participent à la maturation des miARNs par Drosha. Ainsi, leur altération dans les cancers participe à la dérégulation de l'expression des miARNs. Par exemple, il a été montré que p53 est capable d'interagir avec la sous-unité p68 des hélicases à boîte DEAD pour faciliter la maturation des pri-miARNs en pré-miARNs par Drosha (Suzuki et al., 2009). L'inhibition de p53 dans les cancers pourrait donc conduire à une diminution de l'efficacité de maturation et à la diminution globale de l'expression des miARNs.

DGCR8 est l'autre composant majeur du complexe microprocesseur. Son expression a également été décrite comme dérégulée dans les cancers. Comme pour Drosha, l'expression de DGCR8 est parfois augmentée ou diminuée. Dans les cellules de carcinome pulmonaire chez la souris, la diminution de son expression induit la transformation cellulaire et la croissance tumorale (Kumar et al., 2007). En revanche, l'expression de DGCR8 est fréquemment augmentée dans les carcinomes colorectaux (Kim et al., 2013) et dans les cancers de l'ovaire (Guo et al., 2013). Dans ces derniers, l'inhibition de DGCR8 provoque une forte modification de l'expression globale des miARNs. Plus particulièrement, l'expression de miR-27b est fortement diminuée suite à l'inhibition de DGCR8. Ce miARN a pour cible des gènes suppresseurs de tumeur et participe à la tumorigenèse. Ainsi, l'inhibition de DGCR8 conduit à la diminution des processus liés à la progression tumorale tels que la prolifération, la migration et l'invasion cellulaires, montrant son rôle essentiel dans la régulation de la tumorigenèse.

1.4.2 *La modulation de la maturation des pré-miARNs en miARNs matures*

Comme Drosha, Dicer subit des régulations de son expression à différents niveaux selon le type de cancer. Des mutations dans le gène *DICER* ont fréquemment été identifiées dans divers types de tumeurs (Lin and Gregory, 2015 ; Wu et al., 2013 ; Schultze-Florey et al., 2013) conduisant à la diminution de son expression et à l'altération de la machinerie de maturation des miARNs menant à la tumorigenèse. Certaines mutations sont situées dans le domaine RNase III provoquant un défaut dans la fonction de clivage des miARNs (Heravi-Moussavi et al., 2012). De plus, des oncogènes et des suppresseurs de tumeurs peuvent réguler l'expression de Dicer. Par exemple, TAp63, un membre de la famille de suppresseurs de tumeur p53, se lie au promoteur de *DICER* pour promouvoir son expression (Su et al., 2010). Au contraire, l'ARN non-codant LIN28 peut réprimer l'expression de *DICER*, conduisant à la diminution de l'expression de let-7 (Dangi-Garimella et al., 2009). La déplétion conditionnelle de *DICER* dans les cellules cancéreuses et dans les modèles murins de cancer du poumon et de sarcomes stimule la croissance cellulaire et la tumorigenèse, montrant la fonction importante de Dicer dans la carcinogenèse (Kumar et al., 2007 ; Kumar et al., 2009).

1.4.3 *La régulation de la stabilité des miARNs*

Dans les cancers, la stabilité des miARNs matures peut être également altérée par de nombreux facteurs. La présence de méthylations sur le dernier ribose du miARN mature le protège de la dégradation par les exonucléases 5'→3'. Les méthyltransférases et les exonucléases peuvent être dérégulées dans les cancers (Lin and Gregory, 2015). Au contraire, l'uridylation des miARNs conduit à leur dégradation prématurée, comme celle de let-7 par l'oncogène LIN28B (Heo et al., 2009) (voir section IV.1.3). LIN28B est notamment surexprimé dans de nombreux cas de CHC (Guo et al., 2006), dans des neuroblastomes de haut risque (Molenaar et al., 2012) et dans des tumeurs de Wilms (Urbach et al., 2014).

Un autre élément qui régule la stabilité des miARNs est leur intégration dans le complexe RISC. En effet, les protéines AGO protègent les deux extrémités des miARNs matures de la dégradation par les exonucléases. Les protéines impliquées dans le complexe RISC sont également touchées par des mutations et des délétions inactivatrices dans les cancers (Carmell et al., 2002 ; Li et al., 2010).

2. Le rôle fonctionnel des miARNs dans les cancers

Au cours du chapitre précédent nous avons pu voir qu'un ensemble de régulations conduit à une modification du miRNome dans de nombreux cancers. Les miARNs sont généralement classés dans deux catégories selon leur dérégulation dans le tissu tumoral par rapport au tissu sain: les miARNs dont l'expression est diminuée sont plutôt appelés miARNs suppresseurs de tumeurs. Souvent, ils répriment la traduction et/ou induisent la dégradation de leurs cibles qui sont, en général, des oncogènes. A l'inverse, les miARNs dont l'expression est augmentée sont souvent appelés miARNs oncogéniques. En général, ils ont pour cibles des gènes suppresseurs de tumeurs.

2.1. Exemples de miARNs suppresseurs de tumeurs

La première mise en évidence d'une implication des miARNs dans le développement tumoral est celle de miR-15 et miR-16. Ces miARNs sont situés au niveau du chromosome 13q14.3 (Calin et al., 2002 ; Calin and Croce, 2006). Comme indiqué dans la section IV.1.1, les *loci* de ces miARNs sont fréquemment délétés ou mutés dans les cancers. Par conséquent l'expression de miR-15 et miR-16 est diminuée voire absente, comme dans plus de la moitié des cas de LLC-B (Calin et al., 2002 ; Pekarsky and Croce, 2015), dans de nombreux cas de myélomes multiples (Roccaro et al., 2009) ainsi que dans 80% des cas de cancers de la prostate (Bonci et al., 2008). Il a été montré expérimentalement que la réintroduction de miR-15 et miR-16 perturbe la capacité proliférative des cellules tumorales du stroma *in vitro* et *in vivo* (Musumeci et al., 2011). Ces miARNs inhibent l'expression d'oncogènes tels que Fgf2 et son récepteur Fgf1, ainsi que de la Cycline D1, WNT3A et BCL-2 (Musumeci et al., 2011). Ces études montrent le rôle suppresseur de tumeur de miR-15 et miR-16.

Un autre exemple est la famille de miARNs let-7 constituée de 12 homologues chez l'homme. Ils sont localisés au niveau de sites fragiles associés aux cancers des poumons, du sein, des cervicales et de la vessie (Calin et al., 2004). La diminution de l'expression d'un ou plusieurs miARNs de la famille let-7 a été mise en évidence dans de nombreux cancers (Takamizawa et al., 2004 ; Sempere et al., 2007 ; Ozen et al., 2007 ; Dahiya et al., 2008 ; O'Hara et al., 2009). Le groupe de Takamizawa et al. (2004) a également montré que la diminution de l'expression de certains homologues de let-7 dans le cancer du poumon est corrélée à un mauvais pronostic. Les oncogènes RAS et HMGA2 contiennent plusieurs sites

complémentaires à la séquence graine de la famille let-7 dans leurs 3'NT (Kim, 2005 ; Johnson et al., 2005). Les miARNs suppresseurs de tumeur de la famille let-7 sont capables d'inhiber l'expression de RAS et de l'oncogène MYC (Johnson et al., 2005), contribuant à l'arrêt de la croissance cellulaire.

Il existe de nombreux autres miARNs dont l'expression est diminuée dans les cancers et dont le rôle suppresseur de tumeur a été démontré. Parmi eux, miR-34a a été décrits comme sous-exprimés dans de nombreux cancers (Lodygin et al., 2008) dont le CHC (Li et al., 2009 ; Lou et al., 2013). Il en est de même pour miR-200 (Mongroo and Rustgi, 2010). Ces deux miARNs ont notamment été décrits comme des suppresseurs de tumeurs qui inhibent l'expression de l'oncogène β -caténine (Liu et al., 2013 ; Kim et al., 2011).

2.2. Exemples de miARNs oncogènes

Le premier exemple de miARNs oncogéniques est le cluster miR-17~92. Ce cluster contient les séquences de six miARNs (miR-17, miR-18a, miR-19a, miR-20a, miR-19b-1 et miR-92a-1). Comme indiqué dans la section IV.1.1, il est localisé dans une région chromosomique fréquemment amplifiée dans les cancers. Une sur-expression de ce cluster a été décrite dans la majorité des cas de nombreux cancers tels que le cancer du poumon (Hayashita et al., 2005), le CHC (Connolly et al., 2008), le lymphome diffus à grandes cellules B (He et al., 2005), le cancer colorectal (Ng et al., 2009), l'adénocarcinome pancréatique (Szafranska et al., 2007) et le neuroblastome (Schulte et al., 2010). L'expression des miARNs de ce cluster est contrôlée par l'oncogène MYC (Figure 19). Des expériences ont montré que l'augmentation de l'expression des miARNs du cluster miR-17~92 en coopération avec la sur-expression de MYC contribue au développement de lymphomes dans un modèle souris (He et al., 2005). MiR-19a et miR-19b-1 ont pour cible le gène suppresseur de tumeur PTEN. Des études complémentaires ont montré que ces deux miARNs sont nécessaires et suffisants pour induire la tumorigenèse (Mu et al., 2009 ; Olive et al., 2009).

MiR-21 est un miARN dont la dérégulation de l'expression et le rôle oncogénique ont largement été démontrés. En 2006, Volinia et al. ont mis en évidence une augmentation de l'expression de miR-21 dans la plupart des échantillons de plusieurs types de tumeurs solides (sein, côlon, poumon, pancréas, prostate, estomac). Des résultats similaires ont été trouvés pour de nombreux cancers (Chan et al., 2005 ; Ciafrè et al., 2005 ; Meng et al., 2006 ;

Schetter et al., 2008). Une cible connue de miR-21 est le suppresseur de tumeur PTEN. Expérimentalement, l'augmentation de l'expression de miR-21 entraîne une diminution de l'expression de PTEN (Meng et al., 2007). PTEN est une phosphatase dont le rôle majeur est de réguler la voie de la phosphoinositide 3-kinase (PI3K), une voie qui stimule le métabolisme, la croissance et la survie des cellules (Engelman et al., 2006). La conséquence d'une régulation de PTEN par miR-21 est l'augmentation de la croissance et l'activation des mécanismes de survie de la cellule. L'inactivation de ce miARN dans les cellules dérivées de glioblastomes déclenche l'apoptose (Chan et al., 2005) confirmant le rôle anti-apoptotique et pro-tumoral de miR-21.

Comme pour les miARNs suppresseurs de tumeurs, il existe de nombreux autres miARNs connus pour être exprimés de manière aberrante dans les cancers et dont le rôle dans la progression tumorale a été démontré. Parmi les plus décrits, miR-155 et le cluster miR-222/221 sont sur-exprimés dans de nombreuses tumeurs solides (Volinia et al., 2006 ; Wang et al., 2008 ; Lee et al., 2007 ; Nikiforova et al., 2008 ; Yanaihara et al., 2006 ; Fornari et al., 2008 ; Di Leva et al., 2010 ; Pallante et al., 2006 ; Felicetti et al., 2008). Le rôle oncogénique de miR-155 n'est pas encore très bien décrit. Son induction contribue à la prolifération des granulocytes et des monocytes dans la moelle osseuse (O'Connell et al., 2008). En revanche, l'augmentation de l'expression du cluster miR-222/221 contribue à l'augmentation de la prolifération et de la migration des cellules. Les miARNs de ce cluster ciblent notamment quatre gènes suppresseurs de tumeurs: *PTEN*, *p27*, *p57* et *TIMP3* (Garofalo et al., 2012).

2.3. La double casquette des miARNs

Selon leur profil d'expression dans les tumeurs et leurs cibles, les miARNs sont souvent classés comme suppresseurs de tumeurs ou oncogènes. Cependant, leur rôle dans les cancers est parfois plus complexe. En effet, certains miARNs ont un rôle oncogénique dans un contexte donné alors qu'ils agissent comme des miARNs suppresseurs de tumeur dans un autre contexte cellulaire ou tumoral, et inversement.

Le premier exemple de double fonction des miARNs est le cluster miR-17~92. Ils ont été largement décrits comme miARNs oncogènes (voir section IV.2.2). L'expression de ses membres est régulièrement augmentée dans les cancers. Ils coopèrent avec MYC, contribuant

à la tumorigenèse et empêchant l'apoptose (Ventura and Jacks, 2009). Cependant, ils peuvent également cibler l'oncogène E2F1 et diminuer sa traduction. Cette inhibition permet d'éviter d'accumuler le facteur de transcription E2F1 qui contribue à la formation de métastases, à l'activation des mécanismes d'invasion et à l'inhibition de l'apoptose (O'Donnell et al., 2005). Ces données montrent un effet suppresseur de tumeur du cluster miR-17~92.

La famille de miR-34 est décrite pour son rôle suppresseur de tumeur dans de multiples cancers (voir section IV.2.1 ; Lodygin et al., 2008 ; Cole et al., 2008 ; Li et al., 2009 ; Lou et al., 2013 ; Wang et al., 2013). MiR-34a cible les oncogènes MYC et BCL-2 dans le neuroblastome, agissant comme un miARN suppresseur de tumeur (Cole et al., 2008). De plus, des expériences « gain de fonction » ont montré que miR-34b diminue la prolifération cellulaire en augmentant l'apoptose (Wang et al., 2013). Cependant, d'autres études ont identifié une augmentation de l'expression de miR-34a dans les CHC, notamment les CHC mutés pour l'oncogène β -caténine (Meng et al., 2007 ; Pineau et al., 2010). Récemment, Gougelet et al. (2016) ont également montré une activation de l'expression de miR-34 dans un modèle murin de CHC muté pour la β -caténine. L'utilisation d'inhibiteurs de miR-34 conduit à la restauration de l'expression du suppresseur de tumeur HNF-4 α et à la diminution de la croissance tumorale. Ces études montrent que miR-34 peut donc également agir comme un oncogène.

MiR-221 et miR-222 sont décrits comme oncogènes dans de nombreuses tumeurs de type solides ou épithéliales (Pallante et al., 2006 ; Fornari et al., 2008 ; Di Leva et al., 2010 ; Felicetti et al., 2008 ; Garofalo et al., 2012). Comme évoqué dans la section IV.2.2, les miARNs de ce cluster ciblent surtout des gènes suppresseurs de tumeurs (Garofalo et al., 2012). Cependant, Felli et al. (2005) ont montré que l'expression de ces miARNs est diminuée dans les leucémies érythroblastiques. Elle est inversement corrélée à l'expression de l'oncogène KIT, une protéine qui stimule la prolifération cellulaire, la survie et la migration. De plus, la sur-expression expérimentale de miR-221 et miR-222 conduit à une baisse de la prolifération cellulaire *in vitro* et une inhibition de la prise de greffe des cellules érythropoïétiques *in vivo*. Ainsi, miR-221 et miR-222 agissent comme des suppresseurs de tumeurs dans ce contexte.

Comme le montrent ces exemples, les miARNs ne doivent pas être strictement classés en tant que miARNs suppresseurs de tumeurs ou miARNs oncogènes. Chaque miARN peut

interagir avec une multitude de cibles et chaque interaction engendre une réponse spécifique dans la cellule. Le transcriptome d'une cellule donnée n'est pas le même que celui d'une autre cellule selon leurs conditions physiologiques (stress, pathologie) ou le tissu dans lequel elles sont localisées. Ainsi, selon le transcriptome de la cellule, un miARN ne va pas toujours agir sur les mêmes cibles et avoir le même impact. Il peut réguler des voies de signalisation et des mécanismes divers. De plus, les miARNs subissent également une modulation de leur expression *via* des régulations transcriptionnelles et post-transcriptionnelles.

De ce fait, l'action des miARNs est dépendante de leur profil d'expression, du profil d'expression de leurs ARNs cibles et des ARNs qui les régulent, du type cellulaire et des conditions physiologiques de la cellule. Selon les voies de signalisation dans lesquelles ils sont impliqués, les miARNs engendrent donc des effets phénotypiques et fonctionnels variés.

3. MiARNs et thérapie génique

La multitude de leurs cibles et leur implication dans de nombreuses maladies humaines ont fait des miARNs des cibles attractives pour le développement d'outils thérapeutiques. Actuellement, leur potentiel thérapeutique est étudié pour le traitement des cancers, mais aussi des infections virales, des troubles neurodégénératifs et des maladies vasculaires.

Dans le cas du cancer, deux stratégies ont été mises en place : (i) le ciblage de miARNs oncogéniques par l'utilisation d'inhibiteurs et (ii) la réintroduction de miARNs synthétiques (dits miARNs « mimics ») pour rétablir l'expression des miARNs suppresseur de tumeurs. Les inhibiteurs ARNs et les miARNs synthétiques nus sont incapables d'entrer seuls dans la cellule. Leur nature hydrophile et leur charge négative empêchent leur passage à travers la bicouche lipidique de la membrane plasmique. Un des challenges dans ce domaine est le développement de biodistributeurs de petits ARNs efficaces, bien tolérés par l'organisme et permettant de cibler les cellules d'intérêt. De plus, le traitement par les miARNs pourrait permettre de sensibiliser les cellules cancéreuses aux autres traitements comme les chimiothérapies dans le but de réduire leurs doses, de diminuer leur toxicité et d'augmenter leur efficacité.

3.1. Thérapie par inhibition de miARNs

L'avantage majeur de la thérapie par inhibition de miARNs est qu'en ciblant un seul miARN oncogénique, il est possible de réactiver l'expression de plusieurs gènes suppresseurs de tumeurs et d'inhiber différentes voies de signalisation qui mènent à la tumorigenèse. Plusieurs approches ont été envisagées pour inhiber les miARNs oncogéniques (Figure 20).

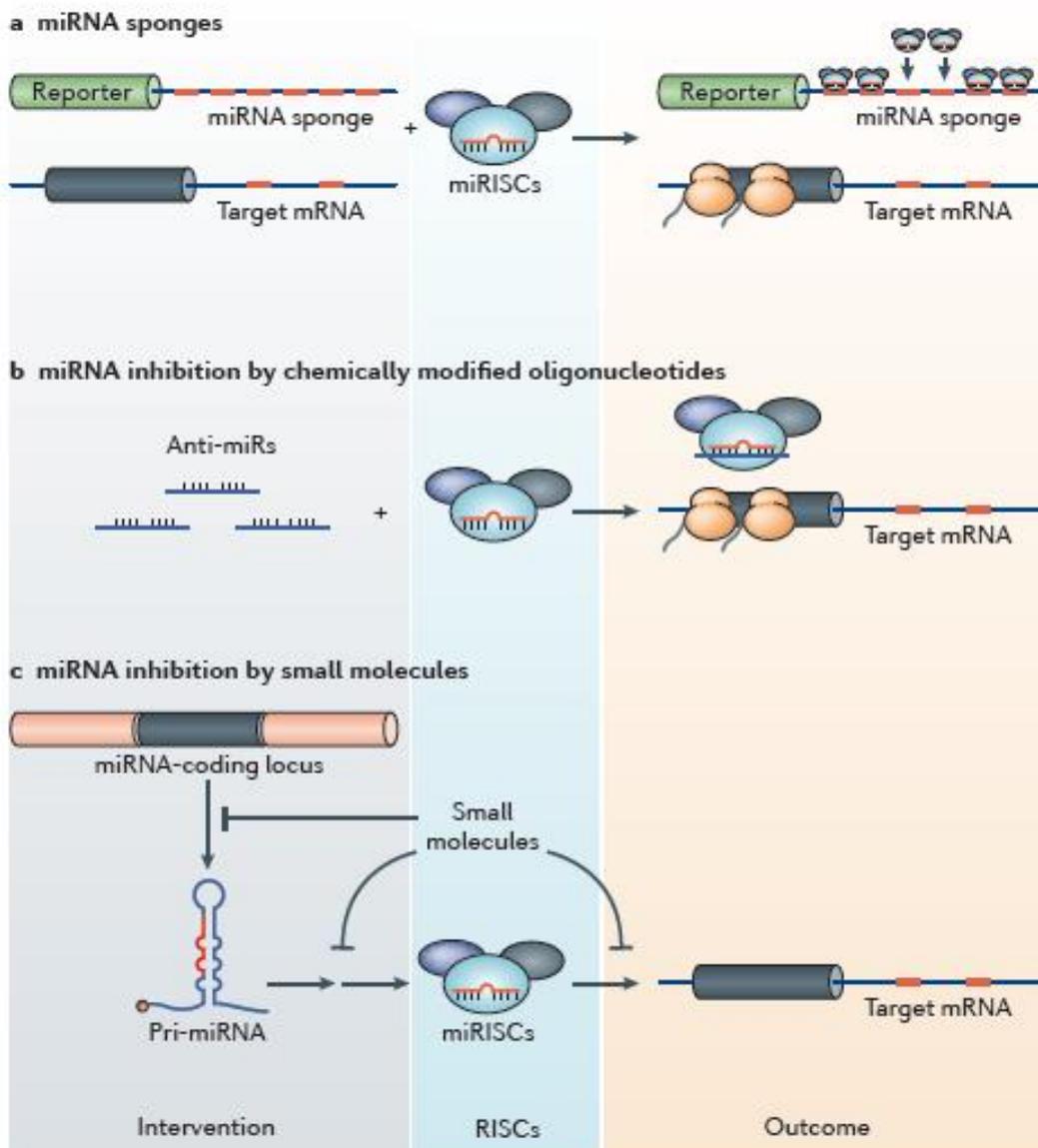


Figure 20 : Les modes d'action des inhibiteurs de miARNs oncogéniques (Li and Rana, 2014)

La première est l'utilisation de vecteurs qui servent d'éponges à miARNs (Figure 20a). Ils expriment un ARNm rapporteur contenant de multiples sites de liaison du miARN d'intérêt. Le miARN est alors séquestré sur l'éponge avec le RISC, libérant ses ARNm cibles endogènes qui peuvent s'exprimer à nouveau (Ebert et al., 2007). L'avantage est que ces éponges à miARNs peuvent bloquer l'action de tous les miARNs de la même famille, qui possèdent la même séquence graine.

Une autre approche est l'utilisation de petites molécules inhibitrices (Figure 20c). Ces molécules ont la capacité d'agir à toutes les étapes de biogenèse et de maturation des miARNs. Le choix de la molécule permettra d'inhiber la transcription du pri-miARN, la production du pré-miARN ou du miARN mature et/ou la liaison avec l'ARNm cible. Par exemple, un criblage a permis d'identifier l'azobenzène 2 comme inhibiteur spécifique de la transcription du pri-miR-21 (Gumireddy et al., 2008). Cependant, le potentiel thérapeutique de ces molécules est limité puisqu'elles sont souvent très toxiques, même à faible dose. Il est nécessaire de trouver la concentration optimale permettant la meilleure efficacité sur la cible pour une toxicité minimale (Young et al., 2010).

L'approche la plus étudiée consiste à inhiber directement la fonction d'un miARN endogène par l'utilisation d'oligonucléotides antisens (Figure 20b, Figure 21 ; Brown and Naldini, 2009). Cette approche est déjà utilisée dans des essais cliniques. Les inhibiteurs antisens sont composés d'une séquence d'ADN ou d'ARN complémentaire au miARN endogène d'intérêt. En s'hybridant, ils séquestrent le miARN et l'empêchent de reconnaître sa cible, voire ils conduisent à sa dégradation.

Ces molécules d'ARN ou d'ADN sont rapidement dégradées par les nucléases dans la cellule et ont une efficacité limitée. Pour empêcher cela, des modifications chimiques ont été ajoutées à leurs nucléotides lors de la synthèse, la plupart du temps sur les riboses (Figure 21A). Par exemple, le remplacement des liaisons phosphodiester par des liaisons phosphorothioate dans le squelette sucre-phosphate (un oxygène remplacé par un sulfate dans le groupe phosphate) réduit l'élimination de ces molécules par les nucléases (Stenvang et al., 2012). Les 2'-O-MOE sont des nucléotides qui contiennent un groupement 2'-O-methoxyethyl sur l'oxygène en position 2' du ribose (Hutvagner et al., 2004 ; Krützfeldt et al., 2005). Les LNA (Locked-nucleic acids) contiennent un pont méthylène entre l'oxygène en position 2' et le carbone 4' du ribose, bloquant la conformation du ribose (Vester and Wengel, 2004).

Différentes sortes d'oligonucléotides sont composés de ces nucléotides modifiés (Figure 21B). Parmi eux, on distingue les antagonomiRs qui sont généralement complémentaires à la séquence entière du miARN mature cible. Ils sont constitués de 2'-O-Me et portent un groupement cholestérol du côté 3'. Les antimiRs LNA/DNA sont composés de l'alternance de nucléotides LNA et ADN renforçant leur stabilité. Les tiny LNA sont des petits antimiRs composés seulement de nucléotides LNA qui sont complémentaires uniquement à la séquence graine du miARN d'intérêt. Ces modifications chimiques augmentent l'affinité pour la cible, la spécificité d'action, la résistance aux nucléases et la biodistribution de ces molécules. Les LNA sont notamment efficaces pour le blocage des miARNs cibles *in vivo*, chez les souris et les primates non-humains (Elmén et al., 2008a ; 2008b).

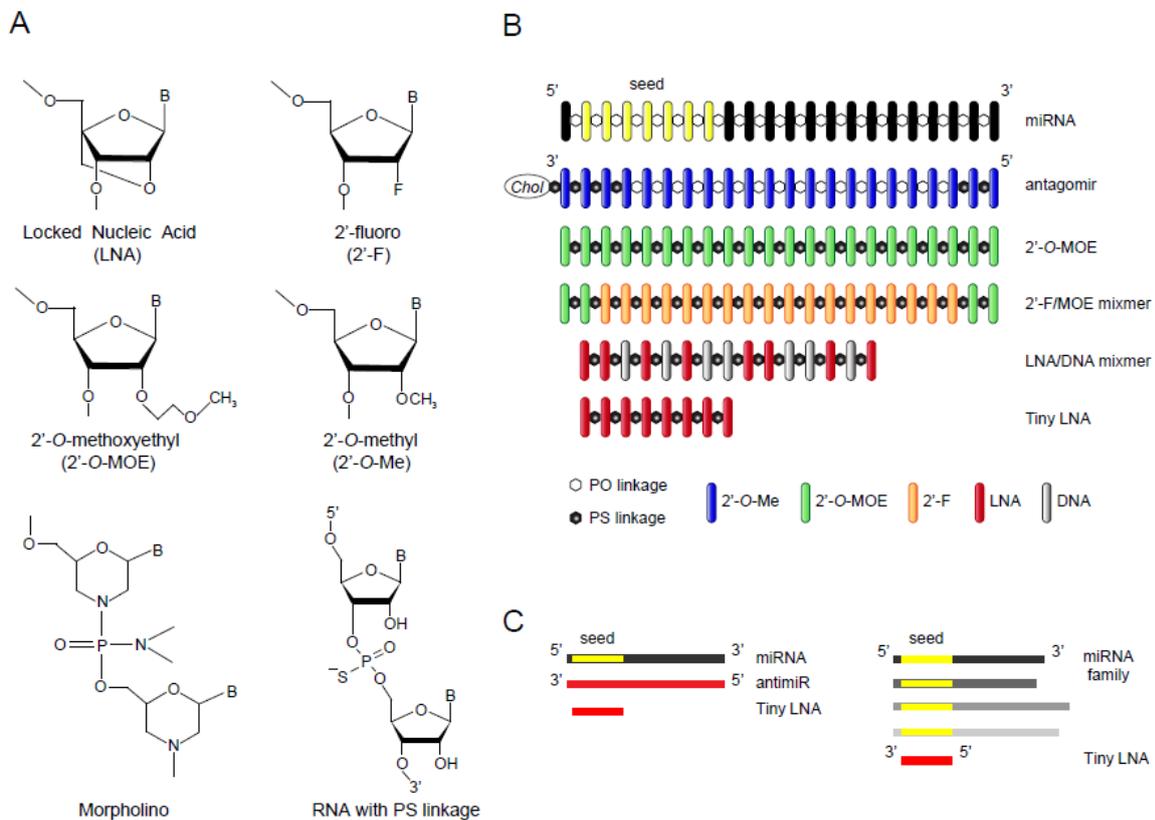


Figure 21 : Les différents types d'antimiRs et leurs modifications chimiques (Stenvang et al., 2012)

A ce jour, deux essais cliniques évaluant l'utilisation des inhibiteurs de miARNs sont en cours pour le traitement de l'infection par le VHC. Cette infection virale peut conduire à l'apparition d'une cirrhose dont une des complications est le développement d'un CHC. Il a été montré que le miR-122 est nécessaire à la répllication du VHC (Jopling et al., 2005). Afin

d'empêcher le développement d'un CHC chez les patients infectés par ce virus, le blocage spécifique de miR-122 est une stratégie de choix. Ainsi, le premier essai clinique teste un anti-miR-122, le mirvasen, développé par Santaris Pharma (référence [ClinicalTrials.gov: NCT01200420](https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT01200420)). La phase-IIa s'est terminée avec succès en 2012. Les résultats de cet essai clinique montrent une faible toxicité, une bonne tolérance et une inhibition de la réplication du VHC dans quatre cas sur neuf (Janssen et al., 2013). Une seconde compagnie, Regulus Therapeutics (San Diego, CA, USA) a développé un autre anti-miR-122, le RG-101. L'étude de phase-I s'est terminée fin 2015, et l'étude clinique de phase-II est en cours.

3.2. Thérapie par remplacement de miARNs

Le rôle des miARNs synthétiques est d'exercer la même fonction biologique que les miARNs endogènes. Leur réintroduction dans les cellules cancéreuses a pour but de restaurer la perte de fonction des miARNs suppresseurs de tumeurs. Ils sont synthétisés chimiquement sous forme double brin correspondant au miARN mature. Leur séquence en acides nucléiques est similaire à celle des miARNs endogènes. Ils contiennent également des modifications chimiques (2'O-Me avec un squelette phosphorothioate) permettant d'améliorer leur efficacité, leur stabilité et de réduire leur immunogénicité et leurs effets non-ciblés. La production d'une structure plus longue type pré-miARN a été envisagée, mais cette stratégie nécessite une étape supplémentaire de maturation par rapport aux miARNs synthétiques matures. Plusieurs études ont montré l'efficacité des miARNs synthétiques à inhiber la progression tumorale *in vitro* et *in vivo* (Xiong et al., 2010 ; Garzon et al., 2009).

Aujourd'hui, plusieurs thérapies de remplacement de miARNs sont actuellement en cours d'essais cliniques dans les cancers. MRX34 est la première thérapie basée sur la réintroduction d'un miARN, miR-34, à avoir été testée en clinique (référence [ClinicalTrials.gov: NCT01829971](https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT01829971)). Elle a été développée par Mirna Therapeutics (Austin, Texas, USA). MiR-34 est un miARN sous-exprimé dans de nombreux cancers dont certains CHC (voir section IV.2.1 et IV.2.3). Sa réintroduction a montré une régression complète du CHC chez la souris (Bader et al., 2012 ; Daige et al., 2011). Depuis 2013, MRX34 était en essai clinique de phase-I pour les tumeurs solides, dont les CHC (Bouchie, 2013). Cependant, très récemment, en septembre 2016, cet essai clinique a été arrêté dû à l'apparition d'évènements graves liés à l'immunité chez cinq patients

(<http://www.mirnatherapeutics.com/>). Le second essai clinique en cours est appelé Mesomir. Il a été développé pour le traitement du mésothéliome pleural malin et des cancers du poumon à petites cellules (référence [ClinicalTrials.gov: NCT02369198](https://clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT02369198)). Il a débuté en 2015 et il est actuellement en recrutement de participants pour la phase-I. Cet essai est basé sur la réintroduction d'un miR-16 synthétique appelé TargomiR, conduisant à l'inhibition de la progression de la tumeur et à la sensibilisation des cellules tumorales au traitement à la gemcitabine *in vivo* (Aqeilan et al., 2009 ; Reid et al., 2013).

La différence majeure entre l'utilisation de miARNs synthétiques et de siARNs est la multitude de transcrits impliqués dans des voies et des processus communs ciblés par les miARN, contrairement aux siARNs qui ont une action ciblée sur un seul transcrit. Bien sûr, l'utilisation des miARNs nécessite d'étudier les effets non-ciblés indésirables qui pourraient être toxiques pour la cellule. Comme évoqué précédemment, cette approche est basée sur la restauration de l'expression d'un miARN endogène qui a subi une dérégulation lors de la tumorigenèse. Le miARN synthétique a la même séquence que le miARN endogène, il doit donc réguler les mêmes transcrits et subir les mêmes régulations que le miARN mature. Un des inconvénients majeurs de cette approche est l'effet potentiel de ces traitements sur les cellules non-cancéreuses. A ce jour, aucune toxicité sur les cellules saines n'a pas été observée.

3.3. Les solutions de biodistribution des miARNs thérapeutiques

Un des challenges majeurs dans l'essor de l'utilisation thérapeutique des antimiRs et des miARNs synthétiques est le développement de transporteurs permettant une libération efficace de l'ARN au niveau de la cellule cible. De par leur nature hydrophile et leur charge négative les ARNs passent difficilement à travers les membranes biologiques. L'identification de vecteurs permettant leur pénétration dans les cellules est donc nécessaire dans le contexte des miARNs thérapeutiques.

L'administration locale de miARNs et d'antimiRs améliore la biodisponibilité au niveau des tissus cibles et minimise la distribution aux autres tissus, mais est limitée aux yeux, à la peau, et aux muqueuses. Dans la majorité des cas, l'administration de miARN et d'antimiRs est envisagée *via* la circulation sanguine. Cette voie d'administration pose deux

challenges importants : il faut empêcher l'activation d'une réponse immunitaire et permettre la libération du petit ARN au tissu ciblé.

Les virus sont des vecteurs très efficaces pour le transport et l'expression d'ARNs dans les cellules, et sont déjà utilisés en thérapie génique (Chen et al., 2015). Ces virus, tels que les lentivirus (Trang et al., 2010), les adénovirus et les virus adéno-associés (AAVs) (Kota et al., 2009 ; Miyazaki et al., 2012) sont génétiquement modifiés pour être non virulents. Il est possible de moduler leur tropisme pour guider le ciblage spécifique vers certains types cellulaires ou vers les cellules cancéreuses. Ils permettent une expression stable des ARNs dans la cellule. Cependant, il subsiste certains problèmes de sécurité pour une utilisation en clinique, notamment une forte immunogénicité ou un risque de mutagénèse insertionnelle. De plus, les virus ont une faible capacité d'encapsulation et des coûts de production élevés.

Bien que leurs efficacités de transfection soient plus faibles, les systèmes de biodistribution non-viraux sont devenus une alternative intéressante pour délivrer des ARNs synthétiques (Pramanik et al., 2011 ; Ibrahim et al., 2011). Ils sont plus sécurisés et ont des coûts de production plus faibles. Ces biodistributeurs synthétiques peuvent être de nature lipidique (liposomes) ou composés de polymères (nanoparticules). Ils peuvent être facilement modifiés pour améliorer leur efficacité de distribution ou pour cibler une cellule d'intérêt. Notamment, il est possible d'ajouter des ligands à leur surface. Ces ligands se lient aux récepteurs exprimés par la cellule cible permettant l'acheminement spécifique des vecteurs jusqu'à ces cellules. Leur contenu y est ensuite délivré après endocytose. Il est également possible de les modifier pour améliorer leur stabilité et augmenter leur temps de circulation dans les fluides de l'organisme. L'utilisation thérapeutique de ces biodistributeurs cependant encore des problèmes de toxicité et d'activation du système immunitaire.

L'essai thérapeutique de MXR34 mené par Mirna Therapeutics dans le CHC (voir section IV.3.2) utilisait une nanoparticule lipidique. Ce biodistributeur, développé et breveté par Marina Biotech Inc. (Bothell, Washington, USA), est appelé SMARTICLES®. Les SMARTICLES® peuvent être utilisés pour le transport d'oligonucléotides ADN, d'antisens, de ribozymes, d'aptamères, de protéines, de peptides ou encore de petits ARNs tels que les siARNs et les miARNs. Ils sont constitués de liposomes amphotères, c'est-à-dire un mélange de lipides anioniques et cationiques, dont certains sont sensibles au pH, conférant une forte stabilité de ces nanoparticules dans la circulation sanguine. Leur taille peut varier de 50 à 500 nm en fonction de leur composition et de la taille de leur contenu.

L'essai thérapeutique Mesomir, qui vise à restaurer l'expression d'un miR-16 synthétique dans le traitement du mésothéliome pleural malin et du cancer du poumon à petites cellules (voir section IV.3.2), utilise des nanoparticules appelées EDV (*EnGeneIC Delivery Vehicule*). Ces biodistributeurs sont développés par la compagnie EnGeneIC Ltd (Lane Cove West, Australia). Ils sont générés par des bactéries génétiquement modifiées. Lors de leur division cellulaire, ces bactéries produisent des particules anucléées, appelées *minicell* ou *nanocell*, qui sont utilisées biodistributeurs de molécules thérapeutiques. Ils permettent le transport de protéines ou d'acides nucléiques et ont une bonne efficacité d'encapsulation. Leur taille varie entre 50 et 400 nm selon leur contenu. Dans le mésothéliome pleural malin et des cancers du poumon à petites cellules, les cellules tumorales expriment fortement le récepteur EGFR. Ainsi, les nanoparticules EDV ont été recouvertes d'anticorps anti-EGFR afin de cibler les cellules d'intérêt.

Le foie a été un des premiers organes où la distribution des ARNs *in vivo* a été testée. En effet, un des rôles majeurs du foie étant la détoxification du sang, il est irrigué en grande partie par la veine porte et par l'artère hépatique. Dans le foie, le sang circule par des petits capillaires appelés sinusoides, bordés par les cellules endothéliales qui présentent de larges fenestrations de 100 à 150 nm permettant les échanges entre le sang et les hépatocytes. L'administration de vecteurs viraux ou de biodistributeurs synthétiques (liposomes et nanoparticules) d'environ 100 nm dans la circulation sanguine permet leur filtration en premier lieu par ces fenestrations, facilitant leur distribution aux hépatocytes (Wisse et al., 2008). Le foie est donc un organe idéal pour le développement de thérapies basées sur la distribution de miARNs *via* la circulation sanguine (Callegari et al., 2015).

4. Les miARNs, l'HBL et la β -caténine

4.1. L'altération de l'expression des miARNs dans l'HBL

Bien que les dérégulations du miRNome dans les tumeurs soient de plus en plus étudiées, il existe peu de publications qui les décrivent pour l'HBL.

En 2009, Magrelli et ses collaborateurs étudient pour la première fois ces altérations dans neuf échantillons tumoraux et leurs tissus adjacents par *microarray* et RT-qPCR

(Reverse Transcription - quantitative real-time Polymerase Chain Reaction). Ils ont identifié 13 miARNs différentiellement exprimés entre les tissus tumoraux et non-tumoraux, dont 8 sont sur-exprimés (miR-10a, miR-10b, miR-125a-5p, miR-15b, miR-181a, miR-199a-3p, miR-214 et let-7e) et cinq sont sous-exprimés (miR-122-3p, miR-148a, miR-30b, miR-455-3p et miR-885-5p) dans les tumeurs. Ces miARNs pourraient être utilisés comme marqueurs diagnostiques spécifiques de l'HBL. Ils ont également identifié cinq miARNs permettant de discriminer les tumeurs d'HBL par rapport aux tumeurs de CHC, dont quatre sont sur-exprimés (miR-214, miR-199a, miR-150 et miR-125a-5p) et un est sous-exprimé (miR-148a).

En 2008, une signature moléculaire de 16 gènes permettant la classification des HBL a été identifiée (voir section I.3.2; Cairo et al., 2008). En parallèle, en 2010, cette équipe a également identifié une signature miARN par *microarray* en analysant 49 échantillons tumoraux, sept non tumoraux ainsi que deux échantillons de foies fœtaux (Cairo et al., 2010). Ils ont montré l'altération significative de l'expression de 18 miARNs dans les échantillons tumoraux comparés au foies normaux, parmi lesquels figure miR-148a, déjà identifié auparavant (Magrelli et al., 2009). Les miARNs les plus fortement sur-exprimés sont impliqués dans la prolifération et le cycle cellulaire alors que les miARNs sous-exprimés ont des propriétés de miARNs suppresseurs de tumeurs (Cairo et al., 2010). Ces résultats suggèrent l'implication des dérégulations de ces miARNs dans la tumorigenèse de l'HBL. Entre les tumeurs de types C1 et C2 (voir section I.3.2), 20 miARNs ont été identifiés comme différentiellement régulés, avec une prévalence de miARNs qui sont des cibles de l'oncogène Myc dans le groupe C2 (Cairo et al., 2010). Notamment, le cluster miR-371-3 est sur-exprimé dans les tumeurs C2 et son inhibition dans des xénogreffes chez la souris provoque une diminution de la taille des tumeurs. A l'inverse, le miR-26a ainsi que le cluster miR-100/let-7a-2/miR-125b sont sous-exprimés. La sur-expression expérimentale du cluster miR-100/let-7a-2/miR-125b ne suffit pas à inhiber efficacement la prolifération cellulaire *in vitro* et la croissance tumorale *in vivo*. Cependant, l'association de la sur-expression du cluster miR-100/let-7a-2/miR-125b et de l'inhibition du cluster miR-371-3 a un effet additif qui permet un arrêt total de la croissance tumorale *in vitro* et *in vivo*.

Cette étude a également mis en évidence des sous-groupes de tumeurs avec une classification proche de C1 et C2, nommée C1m et C2m (Cairo et al., 2010). Les tumeurs classées C2m sont peu différenciées, invasives, métastatiques et ont un mauvais pronostic comparé aux C1m. Ainsi, cette étude a permis l'identification de potentiels biomarqueurs

diagnostiques et pronostiques de l'HBL ainsi que l'identification de miARNs intéressants pour le développement d'outils thérapeutiques dans les tumeurs de type C2.

Une troisième équipe de recherche a montré la corrélation entre l'expression de miR-492 et le gène de la kératine 19 (*KRT19*) (von Frowein et al., 2011). En effet, le *locus* de miR-492 est situé au niveau des exons 1 et 2 du gène *KRT19*. La sur-expression de la kératine 19 a été associée à l'apparition d'HBL immatures de mauvais pronostic avec des taux d'AFP élevés et une accumulation de la β -caténine dans le noyau dans l'HBL (Cairo et al., 2008). Ainsi, la sur-expression de miR-492 serait un biomarqueur des tumeurs d'HBL embryonnaires, agressives et métastatiques. De plus, il a été montré que miR-492 influence l'expression de ses cibles en faveur de la progression tumorale.

Enfin, une dernière étude plus récente a analysé l'expression de 15 miARNs sur 20 échantillons de tumeurs d'HBL de type épithéliales (12 purement fœtales et 8 de type mixte fœtale/embryonnaire) (Gyugos et al., 2014). Cette étude a permis d'identifier cinq miARNs différentiellement régulés entre les tumeurs épithéliales purement fœtales et épithéliales mixtes. De plus, elle a montré la sous-expression d'un miARN (miR-221) et la sur-expression de cinq miARNs (miR-17-5p, miR-122, miR-195, miR-210, miR-214) dans les échantillons d'HBL par rapport aux tissus adjacents. On retrouve miR-122 sur-exprimé, et miR-221 sous-exprimés, comme dans les expériences menées par Cairo et al. (2010). De même, miR-214 est sur-exprimé, comme décrit par Magrelli et al. (2009).

Les différences observées entre ces études proviennent probablement du faible nombre d'échantillons étudiés, de l'hétérogénéité des tumeurs, ainsi que des différentes techniques utilisées.

4.2. La régulation de la β -caténine par les miARNs

La sur-expression de la β -caténine et son accumulation dans le cytoplasme et dans le noyau sont des caractéristiques majeures dans la progression de l'HBL et de nombreux autres cancers (voir section II.3). L'identification d'inhibiteurs de la voie Wnt/ β -caténine est donc une stratégie thérapeutique intéressante pour bloquer la progression de ces tumeurs. Cette voie peut être inhibée à différents niveaux. Dans le cas de mutations dans le gène *CTNNB1*,

l'inhibition directe de la β -caténine reste la stratégie la plus intéressante car son accumulation est due à son échappement à la machinerie de régulation, en amont dans la voie de signalisation Wnt. Or, la β -caténine est une protéine intracellulaire qui ne possède pas d'activité enzymatique. Elle a donc longtemps été considérée comme une « mauvaise » cible pour les traitements médicamenteux. Ainsi, l'utilisation de la fonction de répression des miARNs sur les ARNm constitue une stratégie thérapeutique intéressante pour cibler directement l'ARNm de la β -caténine, empêcher sa traduction, et mener à sa dégradation.

La β -caténine est une protéine qui régule également les jonctions cellulaires. Une inhibition totale de cette protéine à la membrane par l'utilisation d'inhibiteurs pourrait avoir des conséquences négatives sur l'homéostasie des tissus normaux. Une des caractéristiques des miARNs est que, de manière générale, ils n'inhibent pas la traduction à 100%. Ainsi, l'utilisation d'un inhibiteur miARN de la β -caténine permettrait la synthèse d'un minimum de protéines pour assurer ses fonctions biologiques tout en bloquant les mécanismes menant à la prolifération cancéreuse.

Même si à ce jour aucun miARN ciblant directement la β -caténine n'a été identifié dans l'HBL, plusieurs miARNs ont déjà été décrits dans d'autres cancers.

La famille miR-200 a largement été décrite pour cibler et inhiber la β -caténine ou d'autres effecteurs de la voie Wnt (Wnt, TCF) dans les méningiomes (Saydam et al., 2009), le CHC (Liu et al., 2013), les adénomes gastriques (Su et al., 2011), ou encore les cancers du sein (Ahmad et al., 2012). La famille miR-34 est également un régulateur de la β -caténine dans les cancers du poumon et du sein (Kim et al., 2011). MiR-483-3p a été identifié comme un régulateur direct de la β -caténine et il participe à une boucle de régulation car il est directement régulé par la β -caténine (Veronese et al., 2011). MiR-214 inhibe l'expression de la β -caténine dans les CHC (Wang et al., 2012b), or l'expression de ce miARN est augmentée dans l'HBL (Magrelli et al., 2009 ; Gyugos et al., 2014).

5. Conclusion

Comme dans tous les cancers, l'expression des miARNs est altérée dans l'HBL. Malgré la faible quantité d'échantillons et de données disponibles dans la littérature, plusieurs équipes de recherche ont identifié des miARNs sur-exprimés et sous-exprimés dans ce cancer. Ces données sont très hétérogènes, du faite de l'existence de différents sous-types d'HBL et des différentes approches expérimentales utilisées. Les miARNs identifiés pourraient être utilisés comme outils de diagnostic et pronostic dans l'HBL mais il est nécessaire d'effectuer des analyses sur de plus grandes cohortes.

Les miARNs exercent leur activité régulatrice sur une multitude de cibles ARNm. Cette propriété leur permet d'agir à plusieurs niveaux d'une voie de signalisation et d'avoir une action efficace sur les processus qu'ils contrôlent. Cette caractéristique particulière des miARNs a permis d'envisager des nouvelles stratégies thérapeutiques. Ainsi, de nombreux inhibiteurs de miARNs oncogéniques et des miARNs suppresseurs de tumeur synthétiques ont été développés. Leur utilisation *in vitro* et *in vivo* a montré qu'un seul de ces petits ARNs synthétiques peut efficacement inhiber la prolifération des cellules cancéreuses et la croissance de tumeurs dans les modèles animaux.

La plupart des HBL sont caractérisés par une augmentation de l'expression de la β -caténine conduisant à la tumorigenèse. Ainsi, son inhibition par des miARNs synthétiques constitue une stratégie thérapeutique intéressante pour bloquer la progression tumorale de l'HBL.

OBJECTIFS

Objectifs

Les stratégies thérapeutiques mises en place par les différents groupes de recherche et par le consortium CHIC a permis une nette amélioration de la survie globale des patients atteints d'HBL. Cependant, les patients ayant développé des tumeurs de haut risque multifocales, métastatiques ou encore chimiorésistantes ont toujours un mauvais pronostic et un taux de survie faible. De plus, les traitements actuels, bien que très efficaces, sont également très toxiques. Il est ainsi essentiel d'étudier de nouvelles pistes thérapeutiques pour une meilleure prise en charge de ces cancers. La majorité des HBL sont caractérisés par des mutations dans le gène de la β -caténine ou dans des gènes contribuant à sa régulation. Ces mutations provoquent l'accumulation de la β -caténine qui active l'expression de nombreux gènes impliqués dans la prolifération et la transformation cellulaire, conduisant à la tumorigenèse. Ainsi, la β -caténine est une cible thérapeutique particulièrement pertinente dans ce cancer pédiatrique.

Auparavant, l'équipe dans laquelle j'ai réalisé ma thèse s'est intéressée à la compréhension des mécanismes post-transcriptionnels conduisant à une sur-expression du GPC3 dans le CHC. Elle a identifié deux miARNs d'intérêts : miR-1271, sous-exprimé dans le CHC, qui inhibe l'expression du GPC3 (Maurel et al., 2013b) et miR-1291, sur-exprimé dans certains groupes de CHC, qui augmente l'expression du GPC3 (Maurel et al., 2013a). Pour identifier des miARNs candidats, ils ont adapté une méthode de criblage précédemment mise au point au laboratoire, le Dual Fluorescence FunREG system (**F**unctional integrated and quantitative analysis to measure post-transcriptional **REG**ulation ; Laloo et al., 2009 ; Maurel et al., 2013b).

Dans ce contexte, l'objectif global de mon projet de thèse était d'identifier des miARNs qui inhibent la progression tumorale de l'HBL *in vitro* et *in vivo* en ciblant la β -caténine. Mon projet se divise en deux grandes parties :

- **Partie 1** : Une partie de ma thèse a consisté à la mise au point et à la caractérisation d'un nouveau modèle d'étude *in vivo* de l'HBL afin de tester l'effet de traitements sur la progression tumorale. Ce modèle est basé sur la xénogreffe de cellules dérivées d'HBL sur la membrane chorioallantoïdienne (CAM) d'embryon de poulet.
- **Partie 2** : Une seconde partie de ma thèse avait pour objectif d'identifier les miARNs ciblant la β -caténine dans l'HBL, potentiellement intéressants pour une utilisation en thérapie. Je me suis concentrée sur l'étude de miARNs qui (i) régulent la β -caténine *via* ses régions 5' et/ou 3'NT, (ii) sont sous-exprimés dans les tumeurs et (iii) bloquent la croissance tumorale *in vitro*, ainsi qu'*in vivo*, en utilisant le modèle décrit dans la Partie 1.

RESULTATS

PARTIE 1 :
ELABORATION D'UN NOUVEAU MODELE
D'ETUDE DE L'HBL *IN VIVO*

INTRODUCTION

A ce jour, les modèles d'études *in vivo* pour l'HBL consistent à implanter des lignées cellulaires dérivées d'HBL, des cellules primaires ou des PDX chez la souris (voir section I.4). Nous avons cherché un moyen alternatif, rapide et moins onéreux de modéliser le développement tumoral de l'HBL, dans le but de tester facilement l'impact de molécules thérapeutiques sur ces tumeurs. Nous nous sommes intéressés au modèle de la membrane chorioallantoïdienne (CAM) d'embryon de poulet (*gallus gallus domesticus*).

Ce modèle a été utilisé pour la première fois en 1911 par Rous et Murphy qui y ont implanté avec succès des tumeurs de sarcomes de poulet. Par la suite, la CAM de poulet a largement été utilisée pour l'étude du développement et de la perméabilité vasculaires, de la croissance tumorale humaine et des métastases, des transports de gaz et d'ions, l'analyse de l'allergénicité et l'ingénierie tissulaire (Nowak-Sliwinska et al., 2014). C'est surtout un excellent modèle *in vivo* pour l'étude de l'angiogenèse et le criblage de molécules thérapeutiques. En effet, un de ses avantages majeurs est son développement rapide, car l'œuf de poulet éclot au 21^{ème} jour de développement (E21 pour « Embryon de 21 jours »).

L'œuf est composé de plusieurs membranes extra-embryonnaires : l'amnios qui entoure l'embryon et le suspend dans le liquide amniotique, le sac vitellin qui contient toutes les substances nutritives nécessaires au développement de l'embryon, et la CAM (Figure 22).

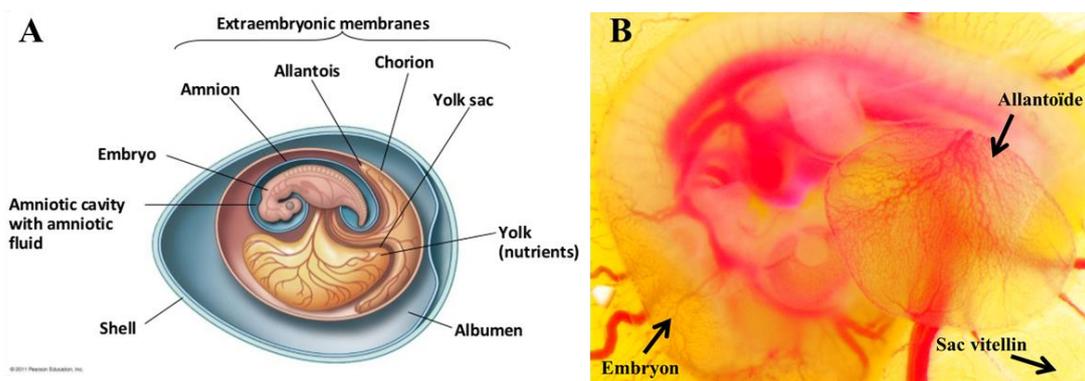


Figure 22 : Les organes de développement de l'embryon de poulet

A) Représentation schématique des structures composant l'œuf pendant le développement de l'embryon de poulet (source internet Rita Yevdayeva). B) Photo d'un embryon à E5. Nous pouvons observer l'embryon au centre, l'allantoïde qui forme la CAM en association avec le chorion (qui ne peut pas être visualisé sur cette image), le sac vitellin sur lequel repose l'embryon, ainsi que le développement d'artères et de vaisseaux sanguins.

La CAM correspond à l'organe respiratoire de l'embryon de poulet. Elle est composée de deux structures: l'allantoïde et le chorion. L'allantoïde est un organe vascularisé qui reçoit les déchets de l'embryon. Dès E3, il s'accroît et fusionne avec le chorion pour se rapprocher de la coquille poreuse (jusqu'à 200nm). Ce rapprochement permet les échanges gazeux, dont le transport d'oxygène, entre les vaisseaux sanguins et l'environnement externe (Figure 23A). A E10, cette double membrane vascularisée recouvre toute la face interne de la coquille. Elle continue sa différenciation jusqu'à E13. Le réseau lymphatique se développe également dans la CAM entre E5 et E9, mais le système immunitaire n'est actif qu'à partir de E15.

Histologiquement, la CAM est une membrane composée de deux couches d'épithélium entourant une fine couche de stroma (Figure 23B). L'épithélium supérieur est d'origine ectodermale, le stroma se développe à partir du mésoderme et l'épithélium inférieur à partir de l'endoderme.

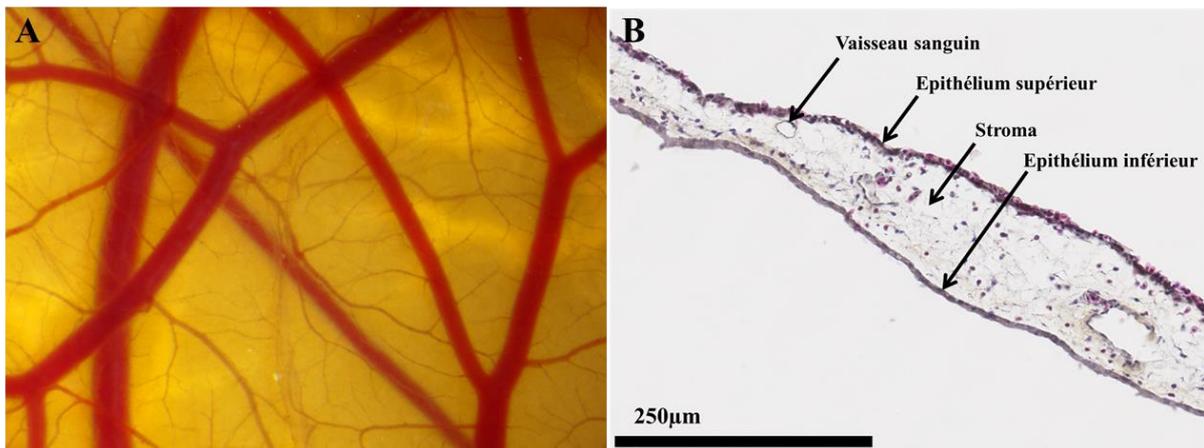


Figure 23 : Structure de la CAM au 17^{ème} jour de développement

A) A E17, la CAM est une structure richement vascularisée. B) Coloration HES d'une coupe de CAM à E17. L'épithélium supérieur est normalement constitué d'une couche de cellules. L'ouverture des œufs pour leur manipulation fait varier le taux d'humidité dans l'environnement proche de l'épithélium, entraînant une augmentation de la division cellulaire et parfois une kératinisation. Cela engendre la formation d'un épithélium de plusieurs couches de cellules.

La CAM est un modèle avantageux de par son accessibilité et sa croissance rapide. L'embryogenèse du poulet dure 21 jours, durant lesquels le réseau vasculaire se développe et transporte l'oxygène, les nutriments et le calcium à l'embryon. C'est un modèle relativement facile à manipuler et qui dispose maintenant de nombreuses techniques d'imagerie adaptées (microscopie optique, IRM, tomographie par émission de positrons, etc.). La CAM étant une

membrane transparente, cette propriété peut être utilisée pour visualiser des molécules ou des cellules fluorescentes. De plus, le système immunitaire du poulet se développe très lentement. Il n'est actif qu'à partir du 15^{ème} jour de développement permettant aisément la transplantation de tissus ou de cellules sans problème de rejet. Un dernier avantage, et non des moindres, est le faible coût de l'utilisation de ce modèle : un œuf fertilisé coûte 0,20€ au minimum. Cependant, ce modèle possède également quelques désavantages. En effet, les manipulations génétiques y sont très délicates. De plus, certaines molécules ne sont pas réactives avec l'espèce aviaire. A l'inverse, d'autres interagissent avec l'homme ainsi que le poulet, ne permettant pas de discriminer les deux espèces (des amorces ou des anticorps par exemple). Enfin, il est compliqué de différencier les vaisseaux sanguins déjà formés et la néovascularisation suite au traitement, rendant les conclusions parfois difficiles à interpréter.

A ce jour, le Comité d'expérimentation animale n'impose pas de réglementation pour la manipulation du poulet au stade embryonnaire. Il est évidemment nécessaire de suivre la « règle des 3R » élaborée en 1959 par W.M.S. Russell et R.L. Burch (Richmond, 2000), c'est-à-dire *Reduce* (réduire le nombre d'animaux en expérimentation), *Refine* (Raffiner la méthodologie utilisée, ce qui implique la notion de points limites) et *Replace* (Remplacer les modèles animaux).

Etant donné les avantages du modèle CAM, l'objectif de cette partie de mon projet de thèse a été de (i) mettre au point et caractériser l'implantation de la lignée cellulaire dérivée d'HBL Huh6 sur la CAM et de (ii) tester l'effet de traitements chimiothérapeutiques sur ce modèle. Ce projet a été supervisé par les Docteurs Christophe Grosset et Martin Hagedorn.

Dans un premier temps, j'ai déterminé les conditions et le nombre de cellules à implanter avec l'aide d'Angélique Desplat. Ensuite, j'ai réalisé de nouvelles implantations et prélevé des tumeurs à différents temps pour caractériser la progression tumorale des cellules Huh6 dans ce modèle par des analyses histologiques et moléculaires. J'ai sélectionné les marquages immunohistologiques à réaliser et analysé les données obtenues avec l'aide d'une pathologiste spécialiste de l'HBL, le Docteur Monique Fabre (Hôpital Necker à Paris). J'ai réalisé ces marquages grâce à l'aide de Nathalie Dugot, responsable du service d'Histologie de la FR TransBioMed de Bordeaux. Le séquençage ARN a été réalisé par la plateforme MGX-Montpellier GenomiX. L'analyse bioinformatique des données de séquençage a été effectuée par le Docteur Katarzyna B. Hooks, post-doctorante dans mon équipe. Par la suite, j'ai également testé l'effet du cisplatine sur le développement des tumeurs d'HBL formées sur

la CAM. Enfin, j'ai commencé la mise au point de l'implantation d'un modèle PDX de cellules dérivées d'HBL. Ces travaux, en cours de finalisation, devraient conduire prochainement à une publication actuellement en cours d'écriture dans laquelle je suis premier auteur.

MATERIELS ET METHODES

Lignées cellulaires

Les cellules Huh6 et Huh6-GFP dérivées d'HBL ont été cultivées dans du milieu D-MEM Glutamax contenant 1g/L de D-glucose (Gibco) supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal (SVF, Sigma), 100U/mL de pénicilline et 100µg/mL de streptomycine (Gibco). Les cellules dérivées de patients HB-214-J (PDX) ont été fournies par Xentech (Evry, France) via le Dr Stefano Cairo. Les cellules HB-214-J ont été cultivées dans du milieu Advanced D-MEM/F-12 (Gibco) supplémenté avec 8% de SVF (Sigma), 2mM de L-Glutamine (Gibco), 100U/mL de pénicilline et 100µg/mL de streptomycine (Gibco). Les lignées ont été maintenues en culture à 37°C dans une atmosphère humide à 5% de CO₂. L'identité des cellules de chaque lignée a été vérifiée une fois par an par génération du profile *Short Tandem Repeat* (STR) par LGC Standards.

Constructions de plasmides et transduction lentivirale

Le plasmide lentiviral pL-GFP a été décrit précédemment (Maurel et al., 2013b). La lignée Huh6-GFP a été développée par transduction lentivirale du plasmide pL-GFP (multiplicité d'infection [moi] = 3) (Maurel et al., 2013b ; Laloo et al., 2009 ; Jalvy-Delvaille et al., 2012).

Traitement au cisplatine

Le cisplatine (Sigma) lyophilisé a été re-suspendu dans une solution de NaCl 0,9% et maintenu stérile. Le traitement a été effectué le jour de l'implantation, lors de la re-suspension des cellules en Matrigel[®], à une concentration finale de 15,16 µM.

Implantation et suivi des cellules d'HBL sur la CAM

Préparation des embryons de poulet

Les œufs fécondés issus de poules conventionnelles (*gallus gallus domesticus* ; Couvoir de Cerveloup, France) ont été reçus au stade de segmentation, qui est la première phase du développement embryonnaire. Ils sont positionnés sur le côté et incubés à 37.4°C dans une atmosphère à 70% d'humidité. Le jour de l'incubation est considéré comme jour de la fertilisation, il constitue le jour 0 de développement (appelé E0 pour « Embryon de 0 jours »). Au 3^{ème} jour de développement (E3), une fenêtre a été réalisée sur le dessus de la coquille après incision de la chambre à air. La fenêtre a été scellée avec du ruban Durapore. Tous les œufs sont sacrifiés au maximum au 17^{ème} jour de développement (E17).

Implantation des cellules

A E10, les cellules ont été lavées avec du PBS, détachées avec de la trypsine/EDTA, re-suspendues dans le milieu de culture. Deux méthodes d'implantation ont été réalisées. Soit, $0,5 \cdot 10^6$, $1 \cdot 10^6$ ou $2 \cdot 10^6$ cellules ont été incluses dans $40 \mu\text{L}$ de Matrigel[®] (50% milieu de culture/50% Matrigel[®], 8mg/mL, réduit en facteurs de croissance, Corning), incubées 45 minutes à 37°C pour la polymérisation du Matrigel[®], puis déposées sur la CAM après une légère lacération de la membrane. Alternativement, des anneaux en plastiques (lamelles Nunc perforées, Thermanox) ont été stérilisés, déposés sur la CAM, puis $0,5 \cdot 10^6$, $1 \cdot 10^6$ ou $2 \cdot 10^6$ cellules re-suspendues uniquement dans $20 \mu\text{L}$ de milieu de culture ont été disposées au centre de l'anneau après une légère lacération de la membrane. Le jour d'implantation constitue le jour 0 de développement des tumeurs (T0 ou E10/T0).

Suivi des tumeurs

Des images des tumeurs ont été prises tous les jours jusqu'au 17^{ème} jour de développement (E17/T7) avec un stéréomicroscope (SMZ745T, Nikon) et une caméra (DS-Fi2, Nikon) équipée d'un module fluorescent. Les images ont été analysées avec le logiciel NIS-Elements D (Nikon). Un jour (T1), quatre jours (T4) et sept jours (T7) après l'implantation des cellules, les masses tumorales ont été prélevées et pesées sur une balance de précision.

Extraction de l'ARN des masses tumorales

Un jour (T1), quatre jours (T4) et sept jours (T7) après l'implantation des cellules, les CAM contenant les tumeurs (E11/T1, E14/T4 et E17/T7) et des CAM contrôles dont la coquille a été ouverte mais qui n'ont pas été implantées avec des cellules (CAM contrôles non implantées ; E11, E14 et E17) ont été découpées du reste de l'embryon. L'excédent de membrane autour des tumeurs a été retiré autant que possible. Les prélèvements ont été lavés en PBS, puis congelés immédiatement et conservés dans l'azote liquide. Les prélèvements ont été pesés en les maintenant congelés. Ils ont été plongés dans 10 volumes de tampon de lyse (*mirVana*TM miR isolation kit, Life technologies) par masse de tissu avec deux billes de tungstène (3mm, Qiagen). Ils ont été immédiatement broyés à l'aide d'un broyeur (MM302, Retsch) deux fois 1 minute à la puissance 1/15. L'extraction des ARNs a ensuite été réalisée à l'aide du kit *mirVana*TM miR isolation (Life technologies) selon le protocole du fabricant. Les ARNs des cellules Huh6 en culture ont également été extraits après deux lavages PBS à l'aide du même kit selon le protocole du fabricant. La qualité des ARNs (RIN>9) a été vérifiée à l'aide du kit *Agilent RNA 6000 Nano* au bioanalyseur Agilent 2100 (Agilent Technologies).

Séquençage ARN et analyse bioinformatique

Un total de 4µg d'ARN total a été utilisé pour générer une banque de séquençage à l'aide du kit *TruSeq Stranded mRNA Sample Preparation* (Illumina) selon le protocole standard du fabricant. La préparation des banques et le séquençage ont été effectués par la plateforme MGX-Montpellier GenomiX. Trois réplicats biologiques de cellules Huh6 implantées à trois temps différents (E11/T1, E14/T4 et E17/T7) et trois réplicats biologiques de CAM non implantées à trois temps différents (E11, E14, E17) ont été séquencés. Les 18 échantillons ont été séquencés sur le HiSeq 2500 (Illumina) en utilisant les trois pistes d'une puce (ou *flow cell*) par la méthode de *Single-read* (lecture simple). La profondeur de séquençage moyenne de chaque échantillon a été de 40 millions de lectures (ou *reads*) d'une longueur de 50 nt. De plus, quatre échantillons d'extraits ARNs issus de cellules Huh6 en culture ont été séquencés sur le HiSeq 2500 (Illumina) en utilisant la moitié d'une puce (ou *flow cell*) par la méthode de *Paired-end* (lecture pairée). La profondeur de séquençage moyenne de chaque échantillon est de 34 millions de lectures (ou *reads*). Pour chaque échantillon, toutes les séquences ont été alignées sur les génomes et les transcriptomes de référence de l'homme (GR38) et du poulet (GalGal4) par *hisat2* (2.0.3-beta) avec les paramètres par défaut [PMID: 25751142]. Les séquences alignées sur le génome ou le transcriptome des deux espèces ont été éliminées. L'expression des gènes a été quantifiée en comptant le nombre de *reads* associés à chaque gène par *featureCounts* [PMID: 24227677] et à l'aide de la base Ensembl 82. L'analyse de l'expression différentielle des gènes a été réalisée avec *DESeq2* [PMID: 25516281]. Les *heatmaps* (variation de l'intensité de couleur en fonction de l'expression des gènes) ont été générées à partir des comptages normalisés et transformées par stabilisation de la variance (*DESeq2*). Le regroupement des données a été réalisé par la fonction *heatmap.2* du package R *gplot* (ou par *pheatmap*) en utilisant la distance euclidienne. L'expression différentielle des gènes résultant de *DESeq2* a également été analysée en utilisant le logiciel *Ingenuity® Pathway Analysis* (IPA®, Qiagen, <http://www.ingenuity.com>) en se focalisant sur les régulateurs transcriptionnels en amont, les réseaux moléculaires affectés et leurs effets.

Histologie et immunohistochimie

Un jour (T1), quatre jours (T4) et sept jours (T7) après l'implantation des cellules, les CAM contenant les tumeurs (E11/T1, E14/T4 et E17/T7) ont été fixées *in situ* 1 heure avec du formol (Diapath). En parallèle, des CAM contrôles dont la coquille a été ouverte mais qui n'ont pas été implantées avec des cellules (CAM contrôles non implantées ; E11, E14 et E17) ont été fixées dans les mêmes conditions.

Après fixation, toutes les CAM ont été découpées du reste de l'embryon, lavées en PBS et conservées en éthanol 70°. En parallèle, des cellules Huh6 en culture ont été lavées en PBS et décollées à l'aide de trypsine. Après un nouveau lavage au PBS, elles ont été fixées 10 minutes avec du formol (Diapath) puis lavées à nouveau. Elles ont été suspendues dans de l'agarose 1% puis conservées en éthanol 70%. Tous les échantillons ont ensuite été imprégnés en paraffine à l'aide d'une machine d'imprégnation Citadel 1000 (Thermo Scientific Shandon) puis inclus dans des blocs de paraffine. Les blocs ont été coupés en sections frontales de 5µm à l'aide d'un microtome puis disposées sur des lames de verres. La veille de la coloration ou de l'immunomarquage, les lames ont été placées en étuve à 56°C.

La coloration Hématoxyline/Eosine/Safran (HES) a été réalisée à l'aide d'un automate (Autostainer XL, Leica). Les coupes ont été déparaffinées en les plongeant successivement dans deux bains de toluène (deux fois 5 minutes), deux bains d'éthanol 100° (deux fois 1 minute) et un bain d'éthanol 95% (une fois 1 minute) avant d'être réhydratées dans l'eau (5 minutes). Elles ont ensuite été incubées dans un bain d'hémalum (Labonord, 3 minutes) puis rincées à l'eau. Elles ont été placées dans un bain d'eau ammoniacuée 1% (3 minutes) puis rincées à l'eau. Elles ont été incubées avec de l'éosine 2% (Labonord, 5 minutes) puis à nouveau rincées à l'eau. Les coupes ont ensuite été déshydratées rapidement dans de l'éthanol 100% (15 secondes) puis plongées dans une solution de Safran 1% (7 minutes).

Pour les immunomarquages, le déparaffinage et le démasquage des sites antigéniques ont été réalisés à l'aide de l'automate PT link (Dako). Les coupes ont été immergées dans un tampon citrate pH6 ou un tampon Tris/EDTA pH9 (*EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution*, Dako) (voir Tableau 2) et chauffées à 97°C durant 30 minutes, puis refroidies à 65°C. Ensuite, les lames ont été placées dans un automate Autostainer Plus (Dako) pour la réalisation des immunomarquages selon les programmes spécifiques à chaque anticorps décrits dans le Tableau 1 et le Tableau 2. Les solutions utilisées et les anticorps secondaires proviennent du kit *EnVision™ FLEX* (Dako) excepté l'anticorps secondaire anti-chèvre (*ImPRESS™ HRP anti-goat IgG*, Vector Laboratories). Les anticorps primaires ont été dilués dans la solution *EnVision™ FLEX antibody diluent* (Dako).

Enfin, les coupes colorées au HES et immunomarquées ont toutes été déshydratées en les plongeant dans des bains successifs d'éthanol 95% (une fois 1 minute), d'éthanol 100% (deux fois 1 minute) et de toluène (deux fois 5 minutes) avant de monter les lamelles à l'aide de Pertex (Labonord). Les images des lames ont été prises à l'aide d'un automate NanoZoomer (Hamamatsu) du Centre d'Imagerie de Bordeaux (BIC, <http://www.bic.u-bordeaux.fr>).

Tableau 1: Liste des anticorps utilisés en immunohistochimie

Antigène	Anticorps primaire	Source	Dilution
β -caténine	BD Biosciences (Clone 14, 610154)	Anticorps monoclonal de souris	1/5000
EpCAM	Dako (Clone Ber-EP-4, M0804)	Anticorps monoclonal de souris	1/250
CK19	Dako (Clone RCK108, M0888)	Anticorps monoclonal de souris	1/50
Ki67	Dako (Clone MIB-1, M7240)	Anticorps monoclonal de souris	1/100
Caspase 3 activée	R&D Systems (AF835)	Anticorps polyclonal de lapin	1/200
Meprin1 α	R&D Systems (AF3220)	Anticorps polyclonal de chèvre	1/100

Tableau 2: Programmes des immunomarquages réalisés pour chaque anticorps

β -caténine	EpCAM	CK19	Ki67	Caspase 3 activée	Meprin1 α
Démasquage des sites antigéniques (EnVision™, Dako)					
pH 6	pH 6	pH 9	pH 6	pH 6	pH 6
Rinçage au tampon (EnVision™, Dako)					
H2O2 3% 10 minutes					
Rinçage au tampon (EnVision™, Dako)					
Anticorps primaire (voir dilution dans le Tableau 1)					
45 minutes	45 minutes	30 minutes	30 minutes	45 minutes	45 minutes
Rinçage au tampon (EnVision™, Dako)					
Anticorps secondaire couplé à la HRP (Horseradish peroxidase)					
FLEX (EnVision™, Dako) – 20 minutes	FLEX (EnVision™, Dako) – 20 minutes	FLEX (EnVision™, Dako) – 20 minutes	FLEX (EnVision™, Dako) – 20 minutes	FLEX (EnVision™, Dako) – 20 minutes	ImPRESS™ (Vector Laboratories) – 30 minutes
Rinçage au tampon (EnVision™, Dako)					
Rinçage au tampon (EnVision™, Dako)					
DAB (3,3'-diaminobenzidine ; EnVision™, Dako)					
5 minutes	10 minutes	10 minutes	10 minutes	10 minutes	10 minutes
Rinçage à l'eau					
Hématoxyline (EnVision™, Dako) - 3 minutes					
Rinçage à l'eau					
Eau ammoniacuée - 2 minutes					
Rinçage à l'eau					

RESULTATS

1. Mise au point des conditions d'implantation des cellules Huh6

Lors de leur implantation sur le modèle CAM, certaines lignées cellulaires sont capables de former une masse tumorale seules, comme les cellules Huh7 dérivées de CHC (Figure 24) ou encore les cellules d'ostéosarcome (Balke et al., 2010). En revanche, d'autres cellules ont besoin de l'apport d'une matrice extracellulaire tel que le Matrigel® (Kisker et al., 2001).

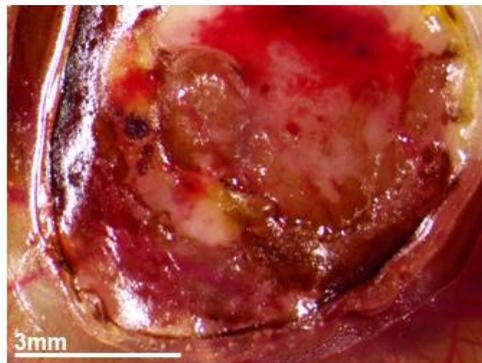


Figure 24 : Masse tumorale formée en sept jours par l'implantation de 2.10^6 cellules Huh7 sur la CAM (image d'Angélique Desplat)

La xéno greffe de 2.10^6 de cellules Huh7 sur la CAM de poulet par la méthode d'implantation en anneau (sans apport de matrice extracellulaire) conduit à la formation d'une masse tumorale sanguinolente qui recouvre intégralement l'intérieur de l'anneau.

Les cellules Huh6 dérivées d'HBL n'ont jamais été implantées sur la CAM de poulet. Dans un premier temps, il a donc fallu déterminer les conditions optimales d'implantation des cellules Huh6 permettant la formation d'une masse tumorale sur la CAM. Dans ce but, j'ai implanté $0,5.10^6$, 1.10^6 ou 2.10^6 de cellules Huh6-GFP sur la CAM sans Matrigel® (implantation en anneau ; Figure 25, Figure 26A) ou avec Matrigel® (Figure 25, Figure 26B). J'ai réalisé un suivi macroscopique du développement des masses tumorales en lumière blanche (Figure 26) et en fluorescence (Figure 27). A T4 et à T7, j'ai fixé certains échantillons (Figure 28) afin d'observer l'état et l'organisation des cellules Huh6 sur la CAM par une coloration HES (Figure 29).

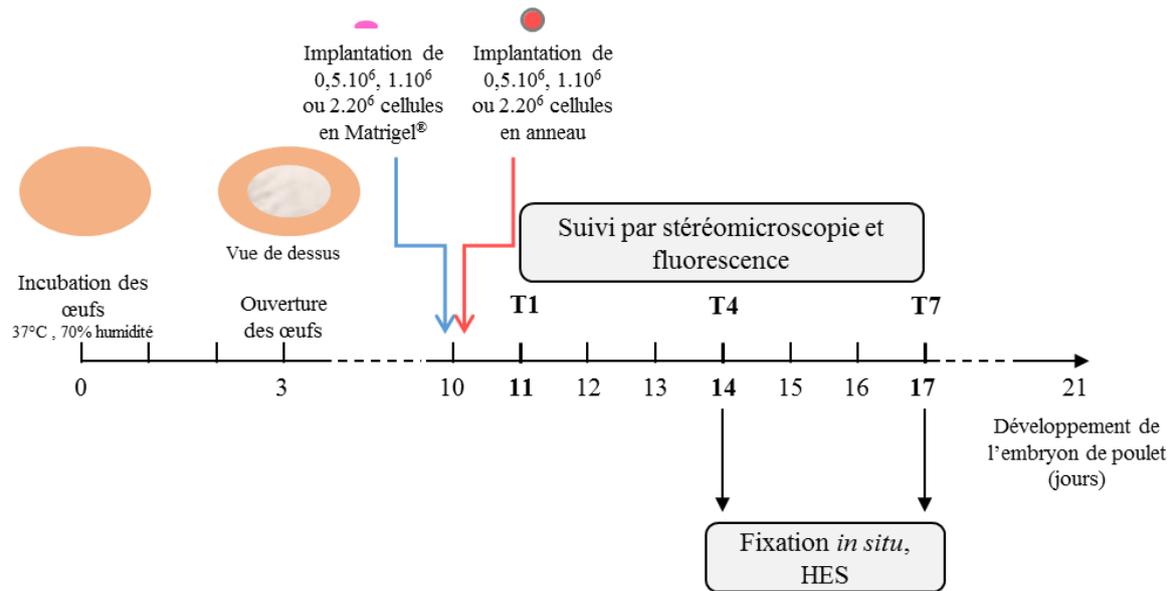


Figure 25 : Frise chronologique des étapes de la mise au point de l'implantation des cellules Huh6 sur la CAM

Le jour d'incubation des œufs correspond à leur premier jour de développement (E0 pour Embryon 0). A E10, $0,5 \cdot 10^6$, $1 \cdot 10^6$ ou $2 \cdot 10^6$ de cellules Huh6 ont été implantées sur la CAM (voir Matériels et méthodes). Le suivi macroscopique en lumière blanche et en fluorescence a été réalisé à partir du lendemain de l'implantation des cellules Huh6 (E11/T1) pendant sept jours (E17/T7). Des CAM contenant les masses de cellules Huh6 ont été prélevées et fixées à T4 et à T7 pour analyser leur composition cellulaire grâce à une coloration HES.

Tout d'abord, le suivi macroscopique montre que l'implantation de $0,5 \cdot 10^6$, $1 \cdot 10^6$ ou $2 \cdot 10^6$ de cellules Huh6 sans matrice extracellulaire semble conduire à la formation d'un tapis cellulaire à la surface de la CAM (Figure 26A). En effet, nous observons une couche plus opaque et granuleuse qui apparaît au centre de l'anneau au cours du temps. Cependant, aucun nodule n'est observé sept jours après l'implantation (T7). En revanche, l'apport de Matrigel® lors de l'implantation permet aux cellules Huh6 de former un nodule dans toutes les conditions (Figure 26B). En moyenne, ces nodules ont un diamètre supérieur à 2mm à T7. L'implantation de $0,5 \cdot 10^6$ de cellules conduit à la formation de masses tumorales blanchâtres dans la moitié des cas (Figure 26B, panel du haut). Dans l'autre moitié la masse de cellules semble sécher et mourir. De manière remarquable, plus de 2/3 des implantations d' $1 \cdot 10^6$ de cellules Huh6 avec du Matrigel® conduisent à la formation de masses tumorales recouvertes de vaisseaux sanguins du poulet (Figure 26B, panel du milieu). Ces nodules semblent avoir été recouverts totalement ou partiellement de membrane à T7 et être passés en profondeur dans la CAM. L'implantation de $2 \cdot 10^6$ de cellules conduit à la formation de masses tumorales blanchâtres dans la plupart des cas (Figure 26B, panel du bas). Ces masses sont comparables en taille à celles formées par $1 \cdot 10^6$ de cellules mais ne sont jamais vascularisées.

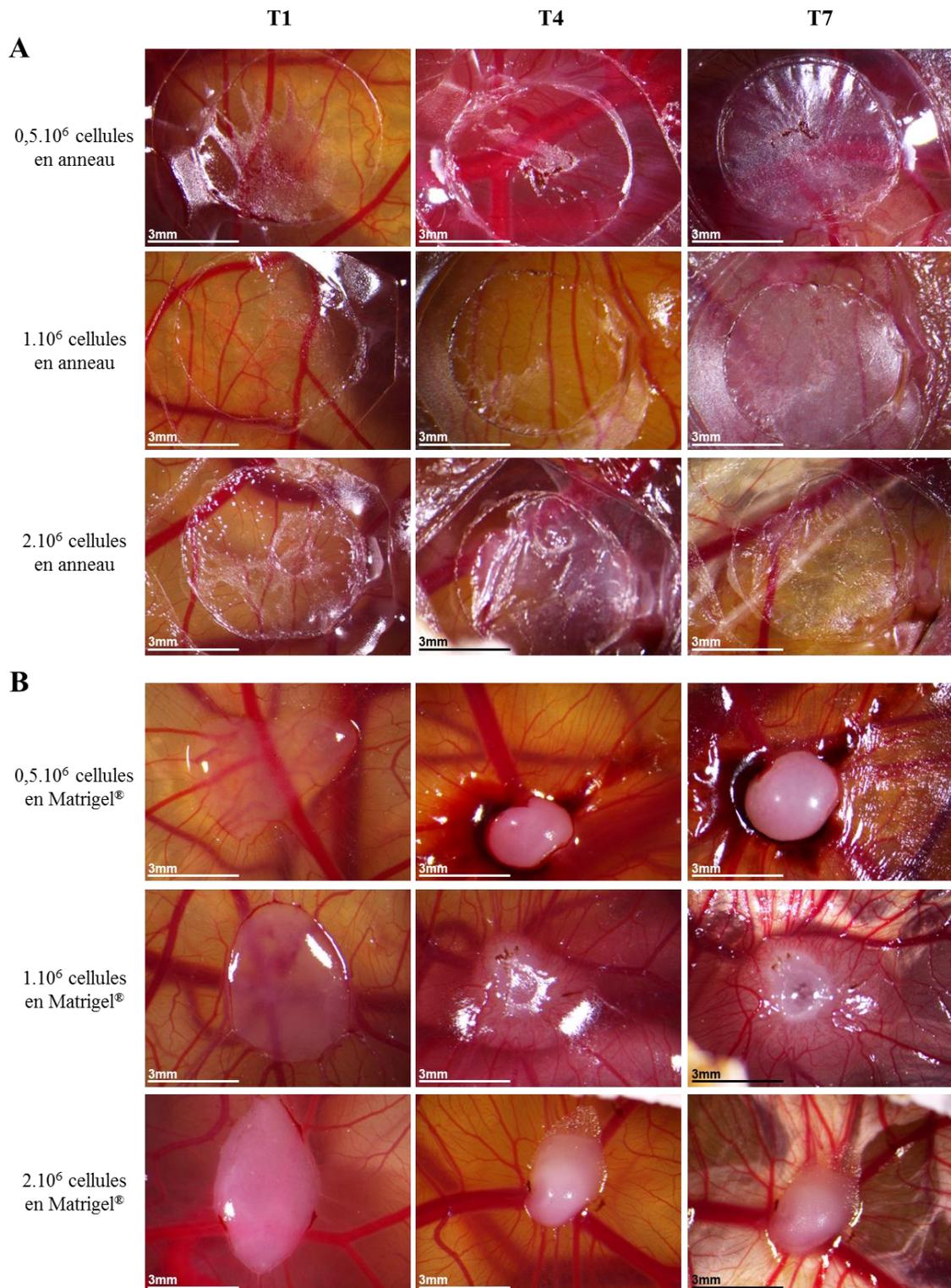


Figure 26 : Suivi macroscopique des masses tumorales formées par les cellules Huh6 implantées sur la CAM

Soit 0,5.10⁶, 1.10⁶ ou 2.10⁶ de cellules Huh6 ont été déposés sur la CAM de poulet à E10 (T0) dans des anneaux en plastique (A) ou incluses en Matrigel® (B). Le devenir des cellules a été suivi par stéréomicroscopie en lumière blanche tous les jours à partir de T1 jusqu'à T7. La présence de sang autour de certains nodules est une conséquence d'un saignement occasionné lors de la légère lacération de la CAM pour l'implantation des cellules.

Afin de mieux visualiser la formation des masses tumorales sur la CAM, j'ai implanté des cellules Huh6 exprimant la protéine fluorescente GFP (Huh6-GFP ; Figure 27). Dans cette Figure 27, seulement les implantations avec 1.10^6 de cellules sont représentées car les autres conditions ne sont pas plus informatives que le suivi macroscopique (Figure 26). Contrairement à ce que l'analyse macroscopique en lumière blanche semblait suggérer (Figure 26A), les cellules Huh6 implantées en anneau ne forment pas de tapis uniforme sur toute la surface intérieure de l'anneau déposé sur la CAM, quelle que soit la quantité de cellules (Figure 27, panel du haut, et données non montrées). La fluorescence est observée localement et les cellules ne se dispersent pas au cours du temps (T4, T7). Autant de cellules ont été implantées sans ou avec Matrigel[®] à T0. Or, dès T1 on remarque une forte différence de taille et d'intensité de la masse fluorescente entre les deux conditions. Le Matrigel[®] seul n'émet pas de fluorescence (données non montrées). La présence d'une matrice extracellulaire semble donc nécessaire à la survie et à la croissance des cellules Huh6 sur la CAM (Figure 27, panel du bas). Les hématies des vaisseaux sanguins de l'embryon de poulet ne laissent pas passer la fluorescence. Cette particularité permet de confirmer le développement d'un réseau vasculaire sur et autour du nodule formé en présence de Matrigel[®] (Figure 26 ; Figure 27). Cette expérience montre également que, pour les deux types d'implantation, aucune cellule ne semble migrer à l'extérieur de l'anneau ou du nodule. Cela indique que les cellules Huh6 ne seraient pas capables de migrer au sein de l'hôte.

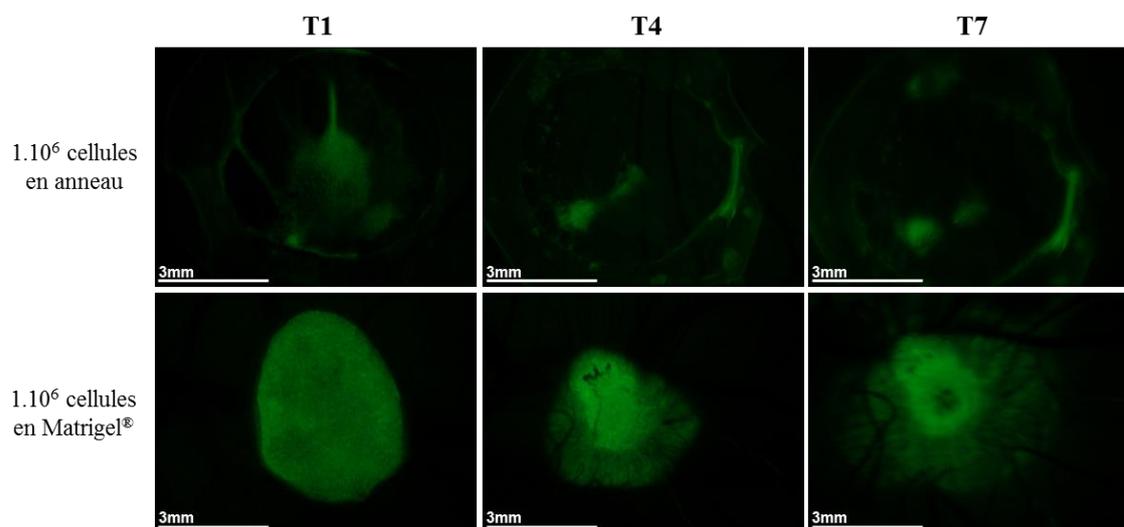


Figure 27 : Suivi macroscopique en fluorescence des masses tumorales formées par les cellules Huh6-GFP implantées sur la CAM

Les cellules Huh6-GFP ont été implantées à T0 à raison de 1.10^6 de cellules par CAM en absence (panel du haut) ou en présence (panel du bas) de matrice extracellulaire. Des images ont été prises chaque jour jusqu'à T7. Les réglages de fluorescence sont identiques pour toutes les conditions.

En l'absence de Matrigel[®], le suivi macroscopique montre des résultats identiques quel que soit le nombre de cellules (Figure 26A). En présence de Matrigel[®], les tumeurs sont vascularisées seulement lors de l'implantation de 1.10^6 de cellules (Figure 26B), bien que l'implantation de $0,5.10^6$ et 2.10^6 de cellules permette la formation de nodules tumoraux. Ainsi, 1.10^6 semble être le nombre de cellules optimal pour l'implantation de la lignée cellulaire Huh6 sur la CAM et la formation de tumeurs analysables. J'ai donc choisi d'étudier plus en détails les tumeurs issues des implantations de 1.10^6 de cellules dans les deux conditions: sans et avec Matrigel[®].

Comme indiqué dans la frise chronologique (Figure 25), j'ai prélevé certains échantillons à T4 et T7 afin de déterminer la composition cellulaire des masses tumorales après plusieurs jours d'implantation. Avant d'inclure les échantillons en paraffine, j'ai pris des images afin de mieux observer le résultat de l'implantation hors de l'hôte (Figure 28). Dans la condition d'implantation sans Matrigel[®] (Figure 28, panel du haut) nous observons la présence de tâches de sang dès T4, ces tâches sont encore plus visibles à T7. Ces zones pourraient être formées par l'attraction des vaisseaux sanguins par les cellules Huh6 pour survivre. Dans la condition d'implantation en Matrigel[®] (Figure 28, panel du bas), les images confirment la formation d'un nodule solide, encapsulé dans la CAM. La vue de dessous montre la vascularisation autour du nodule dès T4. Cette vascularisation est encore plus importante avec la présence de plus gros vaisseaux accolés à la masse tumorale à T7.

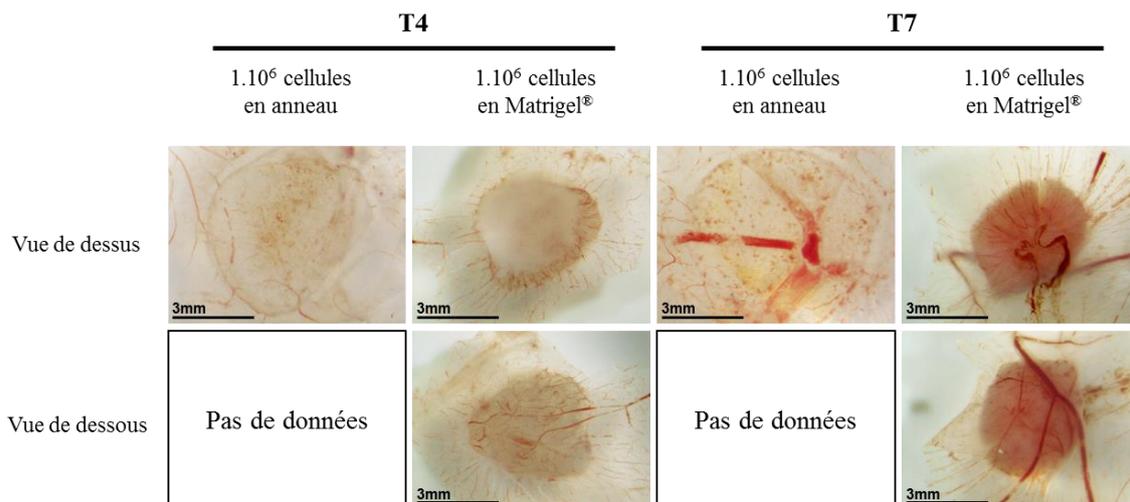


Figure 28 : Images macroscopiques réalisées après prélèvement des masses tumorales formées par les cellules Huh6 implantées sur la CAM

Les masses tumorales formées par 1.10^6 de cellules Huh6 implantées en anneau ou en Matrigel[®] ont été fixées en formol puis prélevées hors de l'œuf. Des images ont été prises seulement vue de dessus pour l'implantation en anneau, et vue de dessus et de dessous pour l'implantation en Matrigel[®].

Comme observé au suivi macroscopique (Figure 26), les analyses histologiques montrent que les cellules Huh6 implantées en anneau forment des masses moins développées que les cellules implantées en Matrigel® (Figure 29). En effet, à T4 et T7, les masses de cellules implantées en anneau mesurent moins d'1 mm de largeur pour environ 0,5 mm de hauteur et leurs diamètres ne sont pas réguliers, comme nous avons pu l'observer en fluorescence (Figure 27). Les cellules Huh6 sont amassées au-dessus de la CAM et semblent abîmées et moins viables, surtout à T7 (Figure 29). En revanche, les nodules formés par les cellules implantées en Matrigel® ont une forme cylindrique. Ils mesurent entre 2 et 4 mm de diamètre pour 1 mm de hauteur (Figure 29). Ces nodules semblent se rétracter entre T4 et T7 pour former une structure plus compacte et plus concentrée en cellules. Les cellules Huh6 sont dissociées dans le nodule et s'organisent en travées qui se creusent de cavités plus grandes à T7. Dans cette condition, les cellules humaines représentent moins de 30% du volume du nodule à T4. Ce pourcentage augmente jusqu'à plus de 50% à T7, suggérant une prolifération cellulaire. L'environnement cellulaire est riche en collagène, certainement dû à la présence de Matrigel® (de couleur rose pâle/jaune). Nous observons parfois la présence d'un stroma composé de fibroblastes et de cellules inflammatoires à T7.

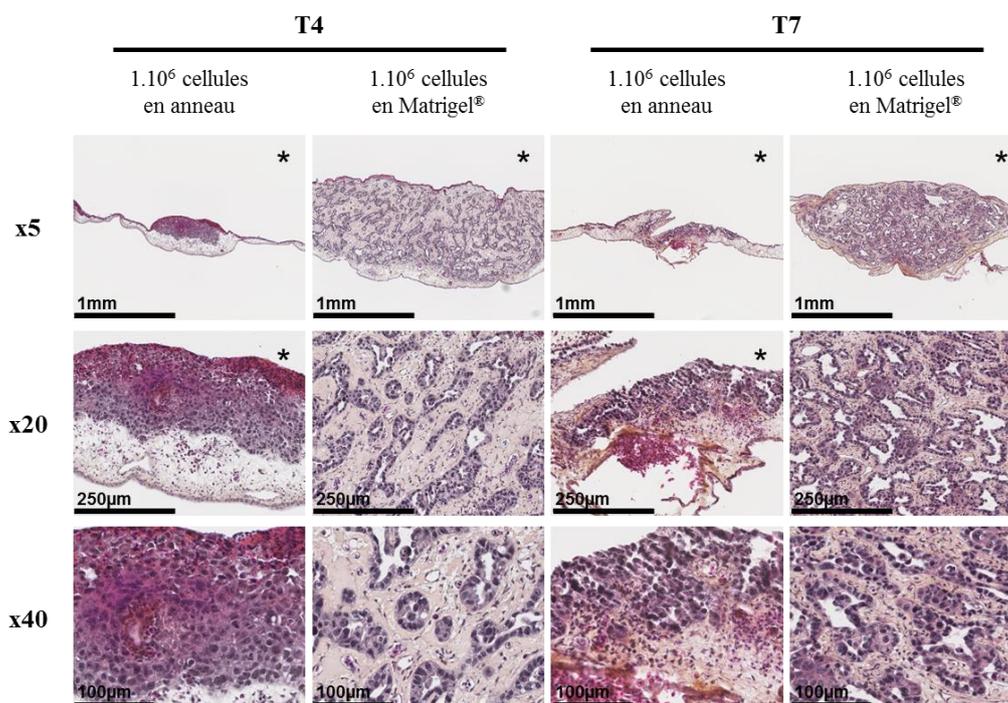


Figure 29 : Organisation cellulaire des masses tumorales formées par les cellules Huh6 implantées en anneau ou en Matrigel® à T4 et à T7

Les masses tumorales formées par les cellules Huh6 implantées en anneau ou en Matrigel® ont été prélevées et des sections frontales de 5µm d'épaisseur ont été réalisées. Ces sections ont été colorées au HES. L'étoile (*) indique la partie externe de la CAM où les cellules ont été déposées. L'objectif utilisé est indiqué à gauche.

Les analyses effectuées pour la mise au point de l'implantation des cellules Huh6 sur la CAM montrent un développement tumoral plus important lorsque les cellules sont implantées avec une matrice extracellulaire, le Matrigel®. La quantité de cellules optimale est d' 1.10^6 de cellules. Planter moins de cellules conduit à la formation de nodules dans seulement la moitié des cas. Planter plus de cellules permet le développement de nodules, mais ceux-ci sont peu vascularisés.

2. Caractérisation de l'implantation des cellules Huh6 sur la CAM de poulet

Sur la base de mes premiers résultats, nous avons souhaité caractériser l'évolution de la formation de la masse tumorale après l'implantation des cellules Huh6 sur le modèle de CAM de poulet. Dans ce but, nous avons réalisé des analyses histologiques et moléculaires. Nous avons choisi de prélever des tumeurs à différents temps après l'implantation : le lendemain (T1), à quatre jours (T4) et à sept jours (T7) (Figure 30). En parallèle, des CAM contrôles non implantées ou implantées avec seulement du Matrigel® aux mêmes stades de développement (E11, E14 et E17) ont été prélevées. Une frise plus détaillée correspondant à la stratégie utilisée pour les analyses des séquençages ARN apparaît en Figure 37 (voir section 2.2).

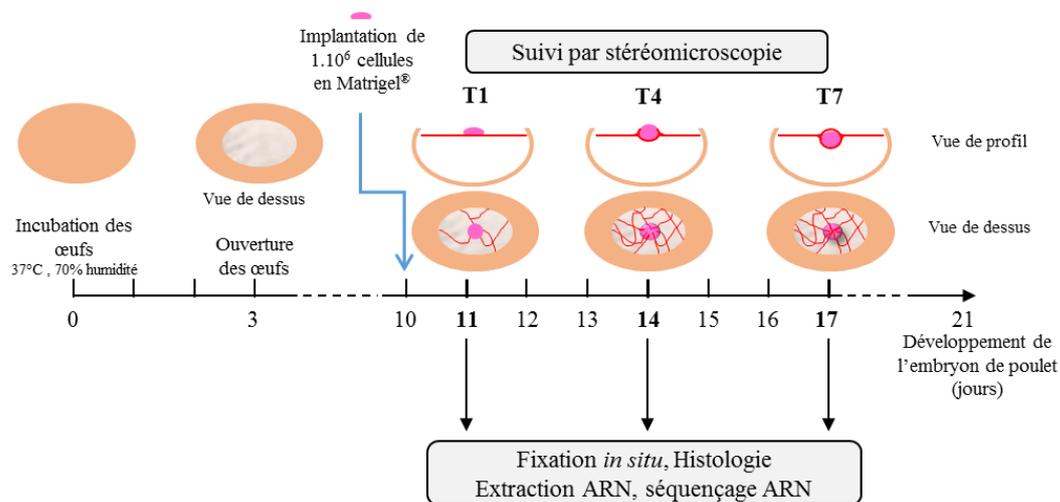


Figure 30 : Frise chronologique des étapes de la caractérisation de l'implantation des Huh6 sur la CAM

Le jour d'incubation des œufs correspond à leur premier jour de développement (E0 pour Embryon 0). A E10, 1.10^6 de cellules Huh6 ont été implantées sur la CAM (voir Matériels et méthodes). Le suivi macroscopique en lumière blanche a été réalisé à partir du lendemain de l'implantation des cellules (E11/T1) pendant sept jours (E17/T7). A T1, T4 et T7, des CAM contenant les masses de cellules Huh6 ont été prélevées et fixées pour des analyses histologiques, ou prélevées et congelées pour analyser leur composition en ARN par séquençage. En parallèle, des CAM non implantées ont également été prélevées (E11, E14, E17).

2.1. Caractérisation histologique de l'implantation des cellules Huh6 sur la CAM de poulet

2.1.1 Evolution de la CAM au cours de l'embryogenèse

Tout d'abord, des CAM non implantées ont été analysées par une coloration HES (Figure 31). La CAM est composée de deux membranes de type séreux. A E11 (Figure 31, panel de gauche), elle mesure environ 200µm d'épaisseur. Elle est unistratifiée du côté interne et bistratifiée du côté externe. Cette bistratification est due à l'exposition de la membrane directement à l'air après l'ouverture des œufs à E3. Entre les couches interne et externe nous observons la présence d'un stroma composé majoritairement de fibroblastes. A E14 (Figure 31, panel du milieu), la CAM mesure toujours 200µm d'épaisseur. Les couches internes et externes se sont épaissies. Le stroma est plus dense et des vaisseaux sanguins sont apparus. A E17 (Figure 31, panel de droite), les membranes internes et externes sont multistratifiées. La CAM s'est amincie, elle mesure moins de 150µm d'épaisseur. Cet amincissement a déjà été étudié (Makanya et al., 2016). Il serait causé par la régression et la dégénération de la CAM lorsque les poumons de l'embryon commencent à devenir fonctionnels et vascularisés.

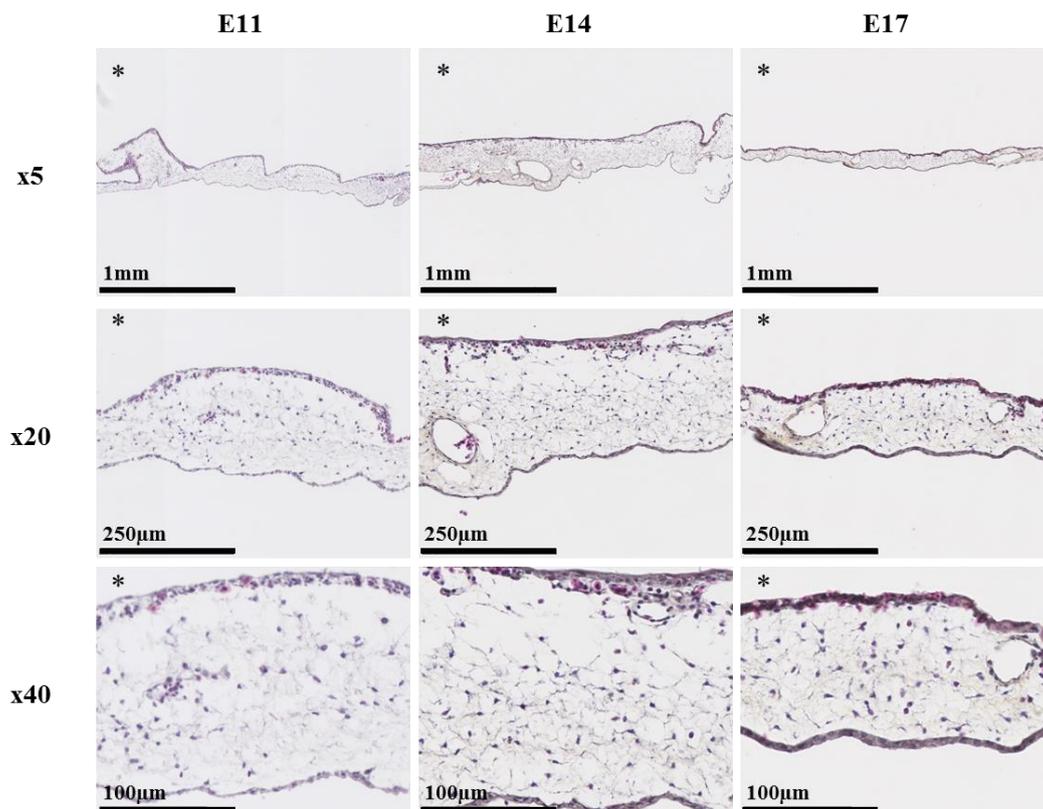


Figure 31 : Organisation cellulaire de la CAM durant l'embryogenèse entre E11 et E17

Les CAM non implantées ont été prélevées à E11, E14 et E17 et des sections frontales de 5µm d'épaisseur ont été réalisées. Ces sections ont été colorées au HES. L'étoile (*) indique le côté externe de la CAM. Les hématies de poulet sont nucléées. L'objectif utilisé est indiqué à gauche.

Des CAM implantées avec seulement du Matrigel[®] ont également été analysées par une coloration HES. Le Matrigel[®] n'induit pas de changements dans l'organisation cellulaire du tissu (données non montrées).

2.1.2 *Caractérisation histologique du développement des nodules tumoraux*

Comme observé lors de la mise au point (voir section 1, Figure 26), l'implantation des cellules Huh6 en présence de matrice extracellulaire conduit à la formation de nodules qui se vascularisent au cours du développement (Figure 32A).

A T1 (Figure 32A, panel de gauche), la masse de cellules englobées dans le Matrigel[®] est plate sur la CAM. Nous observons la présence de sang à la périphérie de la masse due à la légère lacération de la membrane avant l'implantation. A T4 (Figure 32A, panel du milieu), le nodule commence à prendre forme, la masse de cellules s'est rétractée et s'est bombée. Des vaisseaux sanguins apparaissent à la périphérie du nodule dans un bourgeonnement membranaire qui commence à passer au-dessus des cellules implantées (côté gauche sur l'image représentative, Figure 32A). A T7 (Figure 32A, panel de droite), le nodule a une forme cylindrique. Il est recouvert par la CAM dans la majorité des cas et entouré de vaisseaux sanguins du poulet.

Les marquages histologiques (Figure 32B) montrent qu'à T1 (Figure 32B, panel de gauche) les cellules Huh6 sont très peu organisées au sein de la masse tumorale. Nous observons des petites travées composées de quelques cellules entourées de Matrigel[®]. La plupart des cellules Huh6 ont un aspect hépatocytaires: elles sont polygonales, ont un gros noyau central hyperchromatique et un cytoplasme abondant et granuleux. Une faible proportion de cellules a un aspect biliaire: elles ont un noyau localisé au pôle basal et sont organisées en palissades. L'apparition de cet aspect est un signe de dédifférenciation. Cependant, dans les deux cas les cellules Huh6 gardent un aspect très immature. Nous notons la présence de vacuoles dans certaines cellules. Nous observons également la présence d'hématies nucléées de poulet dispersées, provenant certainement des vaisseaux sanguins situés à proximité dans la CAM. En résumé, ces données montrent qu'à T1, les cellules Huh6 ont une organisation en petites travées avec un début de dédifférenciation des cellules hépatocytaires en cellules biliaires immatures.

A T4 (Figure 32B, panel du milieu), les travées formées par les cellules Huh6 se sont agrandies. Elles ne possèdent pas de cavité. Nous observons toujours la présence de cellules à l'aspect hépatocytaire mais de plus en plus de cellules changent de forme et adoptent un aspect biliaire immature. Cependant, aucune sécrétion de bile n'est observée. Certaines cellules sont en mitose ou en apoptose, montrant une activité proliférative. Nous observons également la présence de vaisseaux sanguins au cœur du nodule montrant le début du développement d'un stroma. A T4, les cellules Huh6 se sont donc organisées en structures trabéculaires anastomotiques peu différenciées.

Enfin, à T7 (Figure 32B, panel de droite), les travées formées par les cellules Huh6 se sont creusées. Il y a des petites cavités, mais aussi des cavités plus grandes aux bords sinueux. Les cellules ont pris une forme cubique et ont une organisation pseudostratifiée, c'est-à-dire que leurs noyaux sont irréguliers et les cellules ne sont pas agencées en une palissade régulière. Contrairement à T1, le pourcentage de cellules à l'aspect biliaire est supérieur à celui des cellules à l'aspect hépatocytaire montrant une dédifférenciation de plus en plus importante. Des cellules en mitose sont encore observées ainsi que des cellules qui desquament au centre des cavités. Un stroma s'est développé dans certaines tumeurs (données non montrées), avec l'apparition de fibroblastes polynucléés et de cellules inflammatoires. De nombreux vaisseaux sanguins du poulet apparaissent également au sein de la masse tumorale.

Ainsi, l'implantation des cellules Huh6 sur la CAM conduit à leur dédifférenciation en cellules progénitrices immatures. En sept jours, elles forment un nodule tumoral à l'organisation trabéculaire anastomotique très indifférencié.

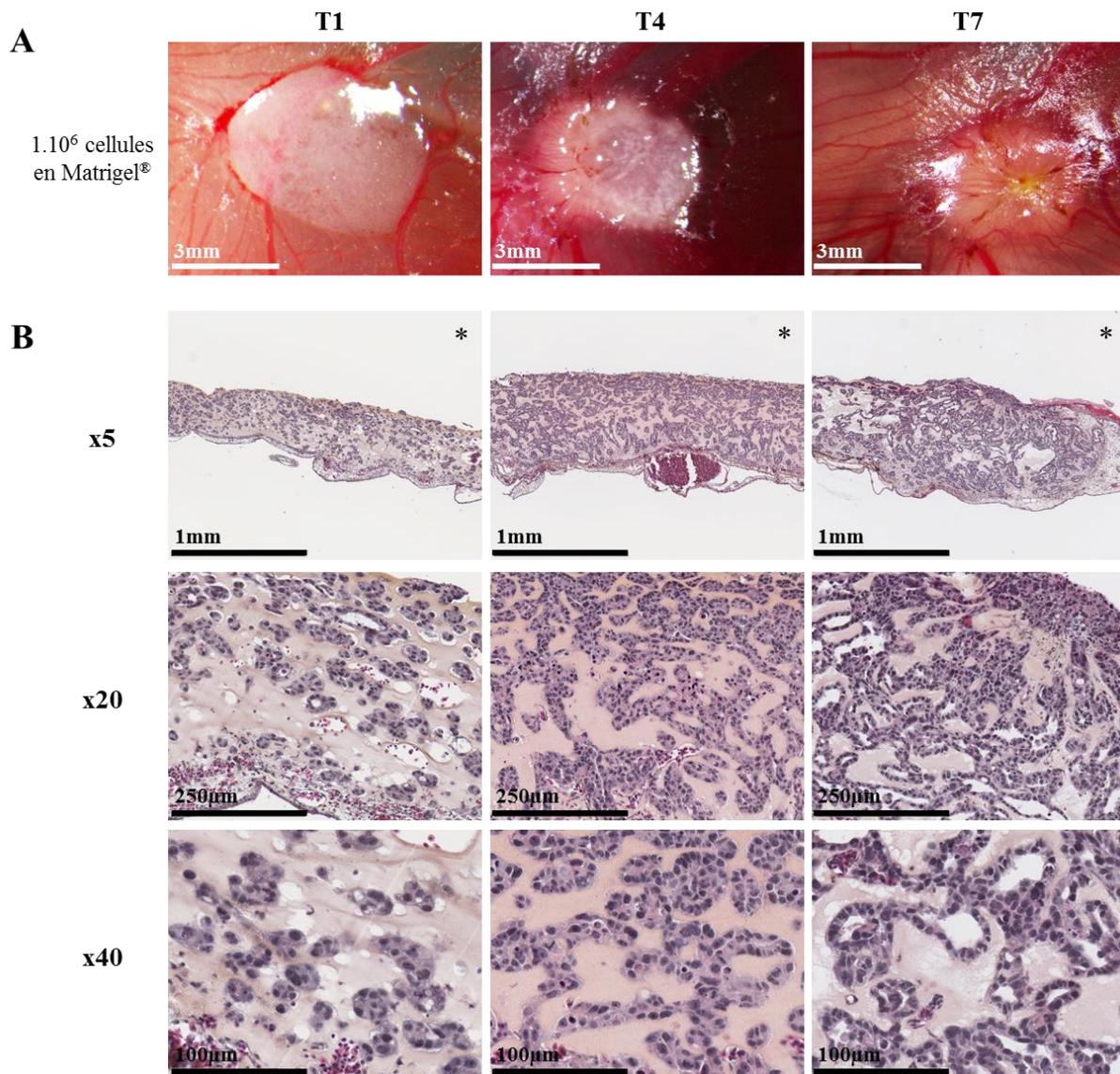


Figure 32 : Organisation des nodules tumoraux formés par les cellules Huh6

1.10^6 de cellules ont été implantées sur la CAM en Matrigel®. (A) Le suivi macroscopique des tumeurs a été réalisé entre T1 et T7. (B) Les nodules tumoraux ont été prélevés à T1, T4 et T7 et des sections frontales de $5\mu\text{m}$ d'épaisseur ont été réalisées. Ces sections ont été colorées au HES. L'étoile (*) indique le côté externe de la CAM où les cellules ont été déposées. L'objectif utilisé est indiqué à gauche.

Afin de déterminer de façon plus précise les mécanismes qui se déroulent durant la formation du nodule tumoral, j'ai ensuite réalisé des marquages immunohistochimiques de protéines d'intérêt.

L'antigène Ki67 est localisé au niveau nucléaire. Il est exprimé durant toutes les phases actives du cycle cellulaire (G1, synthèse, G2, mitose) excepté dans les cellules en phase G0. De plus, il a été montré que son expression est strictement corrélée à la prolifération cellulaire (Scholzen and Gerdes, 2000). L'anticorps anti-Ki67 utilisé ne réagit pas avec les cellules aviaires (données non montrées). L'immunomarquage du Ki67 (Figure 33) nous montre que l'activité proliférative des cellules Huh6 en culture et dans les nodules est constante. Les cellules implantées sont viables et le développement tumoral progresse. Nous remarquons une diminution de la taille des noyaux entre T1 et T7 en accord avec la dédifférenciation des cellules observée en HES (Figure 32).

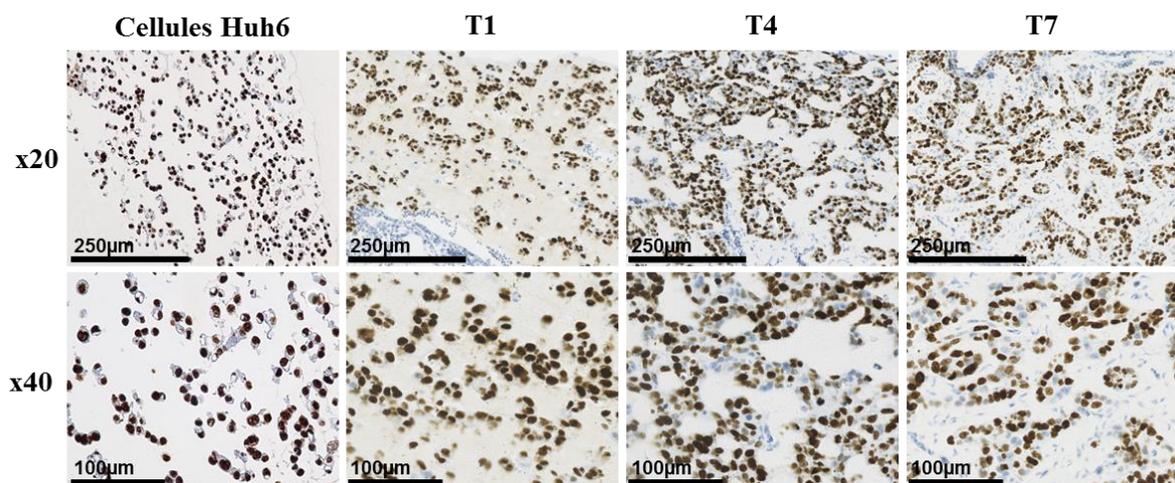


Figure 33 : Expression du marqueur de prolifération Ki67 dans les cellules Huh6 en culture et au cours du développement du nodule tumoral

Ki67 a été marqué par immunohistochimie dans les cellules Huh6 et les nodules tumoraux de cellules Huh6 à T1, T4 et T7. L'objectif utilisé est indiqué à gauche.

La cytokératine 19 (CK19) est une kératine de type I. Elle est surtout exprimée dans les cellules épithéliales, notamment dans les épithéliums canaux et glandulaires. Son expression est souvent liée au caractère indifférencié et progéniteur des cellules du foie (Ruck et al., 1996 ; Schmelzer et al., 2007). Afin de confirmer la dédifférenciation des cellules Huh6, j'ai marqué CK19 dans les cellules Huh6 en culture et les nodules tumoraux aux différents temps (Figure 34). L'anticorps anti-CK19 utilisé ne réagit pas avec les cellules aviaires, mais un bruit de fond est parfois observé dans la matrice extracellulaire pour les contrôles implantés seulement avec du Matrigel® (données non montrées). Les cellules en culture semblent déjà exprimer CK19 au niveau membranaire. Dans les cellules implantées sur la CAM, le marquage est également membranaire. Il est plus faible à T1 et s'intensifie à T4 et T7. De plus, les noyaux des cellules Huh6 deviennent plus petits au cours du développement tumoral. Ces propriétés correspondent à la transformation des cellules d'aspect hépatocytaire en cellules d'aspect biliaire déjà observée en HES (Figure 32).

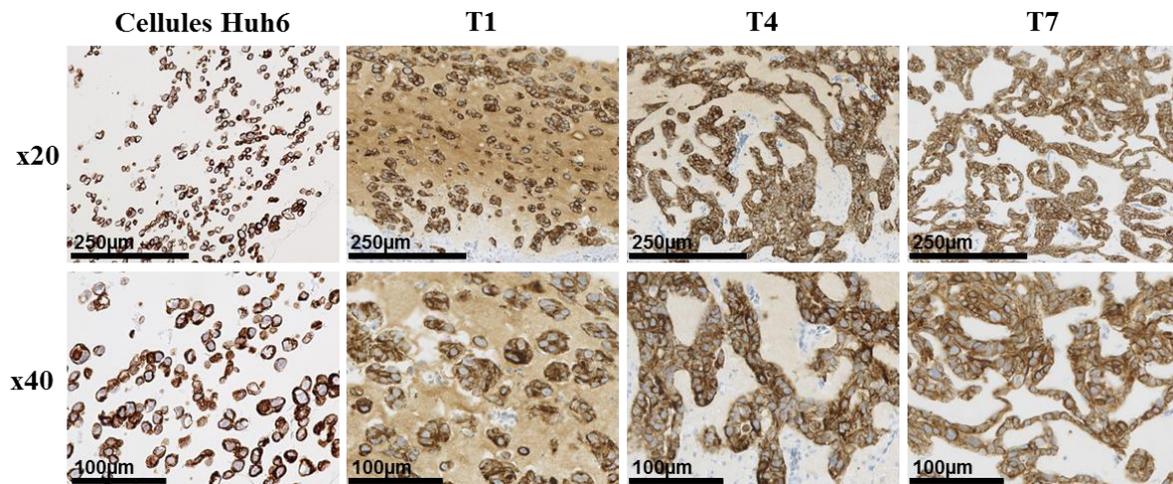


Figure 34 : Expression du marqueur de dédifférenciation biliaire CK19 dans les cellules Huh6 en culture et au cours du développement du nodule tumoral

CK19 a été marqué par immunohistochimie dans les cellules Huh6 et les nodules tumoraux de cellules Huh6 à T1, T4 et T7. L'objectif utilisé est indiqué à gauche.

Comme son nom l'indique, la protéine EpCAM (Epithelial Cell Adhesion Molecule) est une glycoprotéine transmembranaire exprimée spécifiquement par la plupart des cellules épithéliales. C'est un marqueur fortement exprimé dans les cellules fœtales indifférenciées du foie (Zhao et al., 2009 ; Schmelzer et al., 2007). L'anticorps anti-EpCAM utilisé ne réagit pas avec les cellules aviaires (données non montrées). Les cellules Huh6 et les tumeurs formées sur la CAM expriment fortement EpCAM à la membrane (Figure 35). De manière remarquable, nous observons que l'expression d'EpCAM augmente au cours du développement de la tumeur. A T7, nous observons que les cellules Huh6 prennent une forme cubique et leurs volumes cytoplasmiques diminuent. Ces données sont en accord avec la dédifférenciation des cellules Huh6.

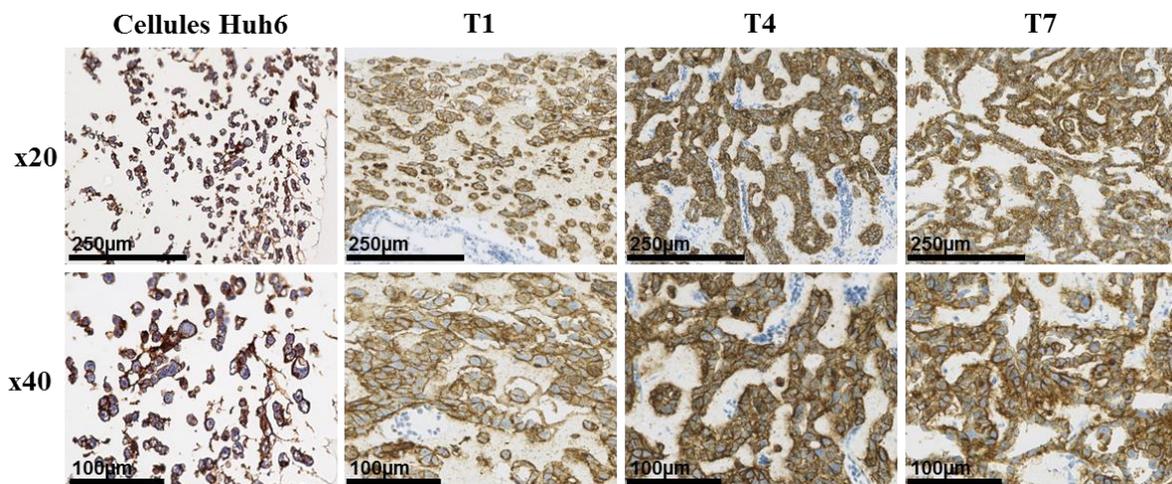


Figure 35 : Expression du marqueur de dédifférenciation des cellules épithéliales EpCAM dans les cellules Huh6 en culture et au cours du développement du nodule tumoral

EpCAM a été marqué par immunohistochimie dans les cellules Huh6 et les nodules tumoraux de cellules Huh6 à T1, T4 et T7. L'objectif utilisé est indiqué à gauche.

Comme décrit en section II.3 de l'Introduction de ce manuscrit, le gène de la β -caténine est fréquemment muté dans l'HBL, conduisant à l'expression altérée de la protéine. Les cellules Huh6, dérivée d'HBL, possède une mutation ponctuelle sur un des allèles de *CTNNB1*. Elles expriment donc une version de la β -caténine mutée dans l'exon 3 (G34V) qui s'accumule dans le cytoplasme et/ou dans le noyau des cellules. L'anticorps anti- β -caténine utilisé réagit avec les cellules des membranes externe et interne de la CAM (données non montrées), mais le marquage observé est uniquement membranaire dans ces cellules, et distinguable du marquage observé dans les cellules implantées. Les cellules Huh6 en culture semblent exprimer la β -caténine au niveau membranaire, mais nous n'observons pas de

marquage cytoplasmique et nucléaire (Figure 36). Une raison qui pourrait expliquer ce marquage altéré est l'utilisation du même protocole que pour les nodules tumoraux implantés sur la CAM. Ce protocole inclut une dilution très forte de l'anticorps (1/5000) et il n'est pas optimisé pour les cellules isolées en culture. Il serait donc nécessaire d'effectuer une nouvelle mise au point afin de déterminer le protocole à utiliser dans cette condition spécifique. En revanche, nous observons un marquage intense de la β -caténine dans le cytoplasme et le noyau des cellules Huh6 implantées sur la CAM. Ces données confirment l'accumulation de la β -caténine dans le cytoplasme et sa translocation dans le noyau des cellules Huh6.

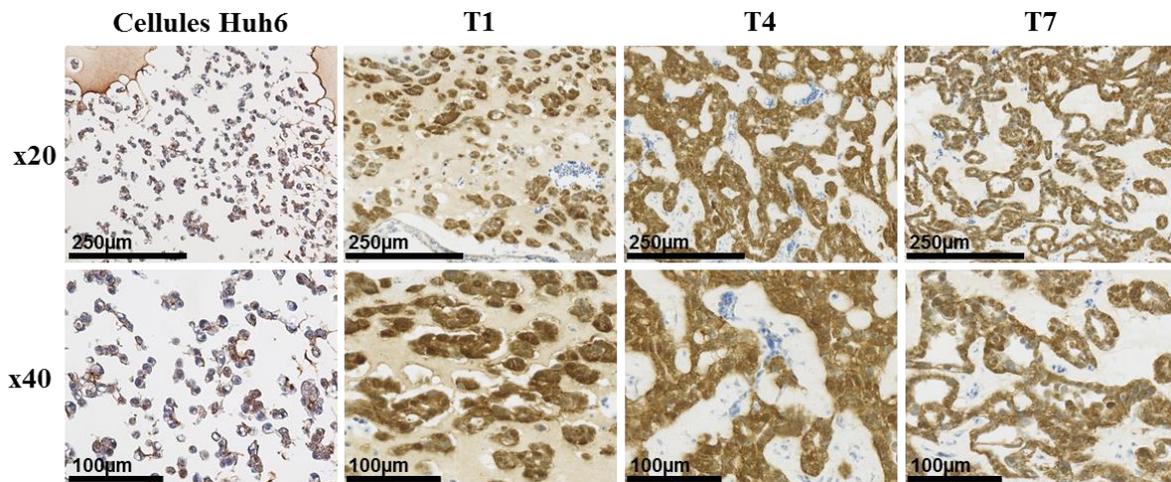


Figure 36 : Expression de la β -caténine dans les cellules Huh6 en culture et au cours du développement du nodule tumoral

La β -caténine a été marquée par immunohistochimie dans les cellules Huh6 et les nodules tumoraux de cellules Huh6 à T1, T4 et T7. L'objectif utilisé est indiqué à gauche.

Les marquages histologiques effectués sur les tumeurs formées par les cellules Huh6 implantées sur la CAM montrent qu'au cours du développement du nodule tumorale, les cellules s'organisent en structures trabéculaires et se différencient en cellules progénitrices encore plus immatures. A T1, les cellules Huh6 ont un aspect hépatocytaire. Elles prolifèrent constamment et se transforment en cellules de type biliaire. Elles s'organisent en travées où s'ouvrent des cavités d'aspect sinueux et hétérogène, au sein desquelles aucune sécrétion de bile n'est observée. La β -caténine s'accumule dans le cytoplasme et le noyau des cellules, contribuant à la progression tumorale. Dans certains cas, il y a un développement de stroma et une légère réaction inflammatoire à T7 avec la présence de fibroblastes et de granulocytes. De plus, de nombreux vaisseaux sanguins du poulet se développent autour et dans la tumeur permettant son alimentation et la survie des cellules.

2.2. Caractérisation moléculaire des nodules formés par les cellules Huh6 sur la CAM de poulet

Afin d'aller plus loin dans la compréhension des mécanismes utilisés par les cellules Huh6 pour survivre et former des nodules tumoraux sur la CAM de poulet, nous avons séquencé les ARNs exprimés au sein de ces tumeurs et des membranes aviaires adjacentes. Dans ce but, j'ai suivi la même cinétique d'implantation et de prélèvement que pour l'analyse histologique (section 2.1 ; Figure 30). La stratégie suivie pour l'analyse du séquençage ARN est modélisée plus en détails en Figure 37 et dans chaque partie.

J'ai extrait les ARNs totaux issus de CAM contrôles non implantées à E11, E14 et E17 (Figure 37, panel de droite) afin de caractériser l'évolution moléculaire de la CAM au cours de l'embryogenèse entre E11 et E17. En parallèle, j'ai extrait les ARNs totaux des nodules formés par les cellules Huh6 aux stades T1 (E11/T1), T4 (E14/T4) et T7 (E17/T7) et je les ai fait séquencer (Figure 37, panel de droite). Nous avons également fait séquencer les ARNs issus de cellules Huh6 en culture. Les nodules de cellules HuH6 sont déposés sur/entourés de CAM. Ainsi, parmi les séquences identifiées dans les extraits ARNs issus des nodules tumoraux, une partie provient des cellules Huh6 et une autre partie provient des cellules de la CAM du poulet adjacente. L'analyse des séquences issues des cellules humaines permettra de déterminer les changements moléculaires qui ont lieu au sein des cellules durant le développement des nodules. L'analyse de ces séquences issues des CAM du poulet adjacentes a pour but de déterminer la réaction du microenvironnement de l'hôte à l'implantation des cellules Huh6. Le séquençage ARN a été effectué par la plateforme MGX-Montpellier GenomiX. L'analyse des séquences obtenues a été réalisée par Katarzyna B. Hooks, post-doctorante dans l'équipe.

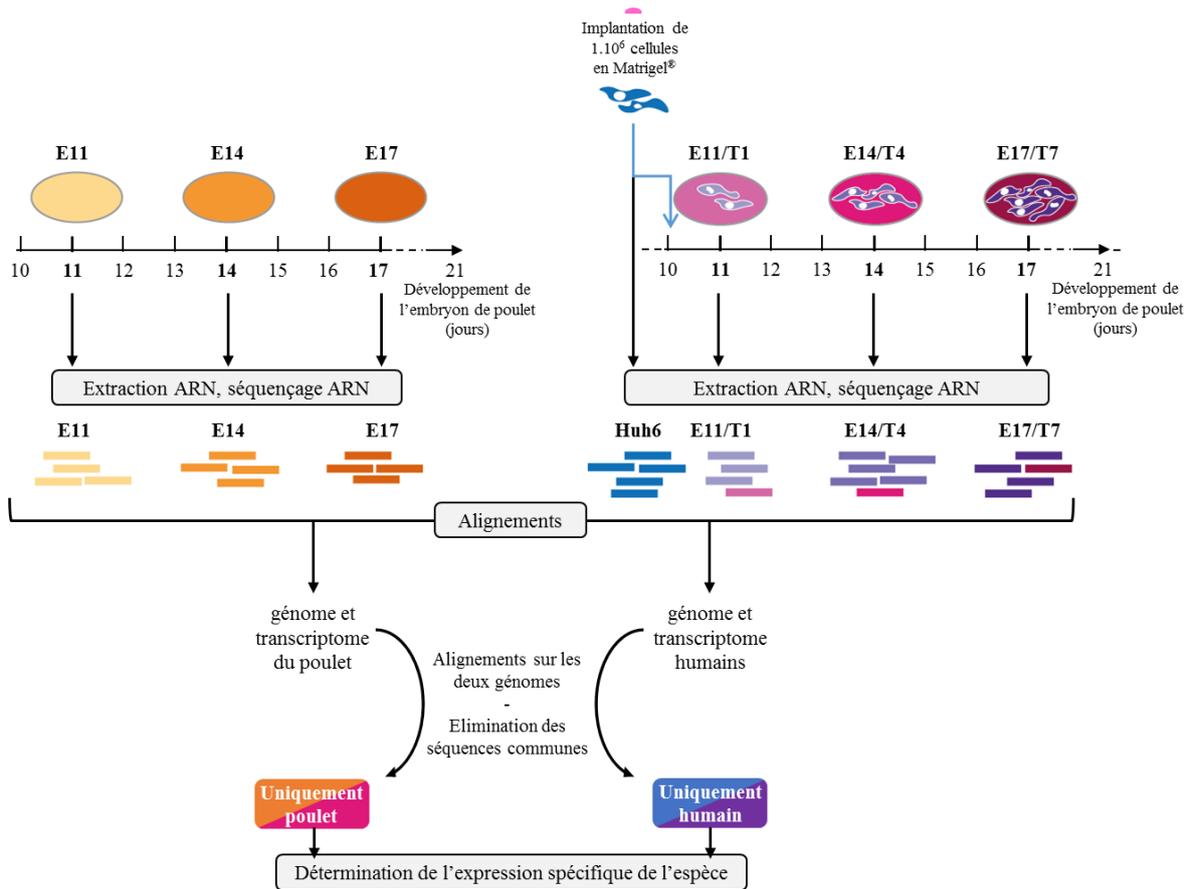


Figure 37 : Frises chronologiques reflétant la stratégie utilisée pour l'analyse moléculaire des nodules formés par l'implantation des cellules Huh6 par séquençage ARN

Le jour d'incubation des œufs correspond à leur premier jour de développement (E0 pour Embryon 0). A E10, 1.10^6 de cellules Huh6 ont été implantées sur la CAM (panel de droite ; voir Matériels et méthodes). Des CAM contenant les masses de cellules Huh6 ont été prélevées à T1, T4 et à T7. Des cellules Huh6 en culture ont également été prélevées. En parallèle, des CAM contrôles non implantées ont également été prélevées (panel de gauche ; E11, E14, E17). Les ARNs issus de tous les échantillons ont été extraits et séquencés. Les séquences obtenues ont été alignées sur les génomes et les transcriptomes de l'homme et du poulet. Celles qui s'alignent sur les deux génomes et transcriptomes ont été éliminées. L'expression des gènes de chaque espèce a été quantifiée pour chaque échantillon. Les séquences en nuances d'orange/rose correspondent aux séquences alignées sur le génome et le transcriptome du poulet. Les séquences en nuances de bleu/violet correspondent aux séquences alignées sur le génome et le transcriptome humains.

2.2.1 *Statistiques de la cartographie des séquences et expression des gènes*

Tout d'abord, 13 à 15% des séquences de chaque série d'échantillons n'ont pu être alignés ni sur les génome et transcriptome de l'homme, ni sur ceux du poulet (Figure 38A). Seulement 1% des séquences de chaque série sont retrouvés à la fois chez l'homme et chez le poulet (Figure 38A). Il est donc possible de distinguer les séquences provenant des deux espèces sans une perte importante de données, ce qui est important pour les analyses des tumeurs de cellules Huh6 entourées de CAM. Les séquences alignées sur aucun des deux génomes et transcriptomes, ainsi que les séquences communes aux deux génomes et transcriptomes ont été éliminées des analyses suivantes. Ainsi, 86% des séquences issues des cellules Huh6 en culture et 83% des séquences issues des CAM de poulet ont pu être analysées. Parmi les séquences identifiées dans les nodules de cellules Huh6 entourées de CAM, en moyenne 63% de ces séquences proviennent des cellules Huh6 et 23% proviennent de la CAM du poulet (Figure 38A). Ce pourcentage montre la prédominance de ces cellules humaines par rapport aux cellules de poulet dans les échantillons analysés.

La première observation est que le transcriptome de l'hôte évolue entre T1 et T7 avec au total 867 gènes du poulet différentiellement exprimés (Figure 38B ; 539 gènes sur-exprimés et 328 gènes sous-exprimés). De nombreux gènes sont différentiellement exprimés entre les cellules en culture et les cellules implantées à T1, T4 ou T7 (Figure 38C). Ces changements moléculaires importants montrent une adaptation des cellules à leur nouvel environnement. Lors de leur croissance sur la CAM, les cellules Huh6 modifient l'expression de 772 gènes entre T1 et T7 (Figure 38D ; 513 gènes sur-exprimés et 259 gènes sous-exprimés). Nous remarquons que seulement 15 gènes ont une expression différentiellement régulée entre T4 et T7, montrant que la plupart des changements ont lieu rapidement après l'implantation, comme observé par marquage histochimique (Figure 32). Dans la plupart des cas, il y a environ deux à trois fois plus de gènes sur-exprimés que de gènes sous-exprimés.

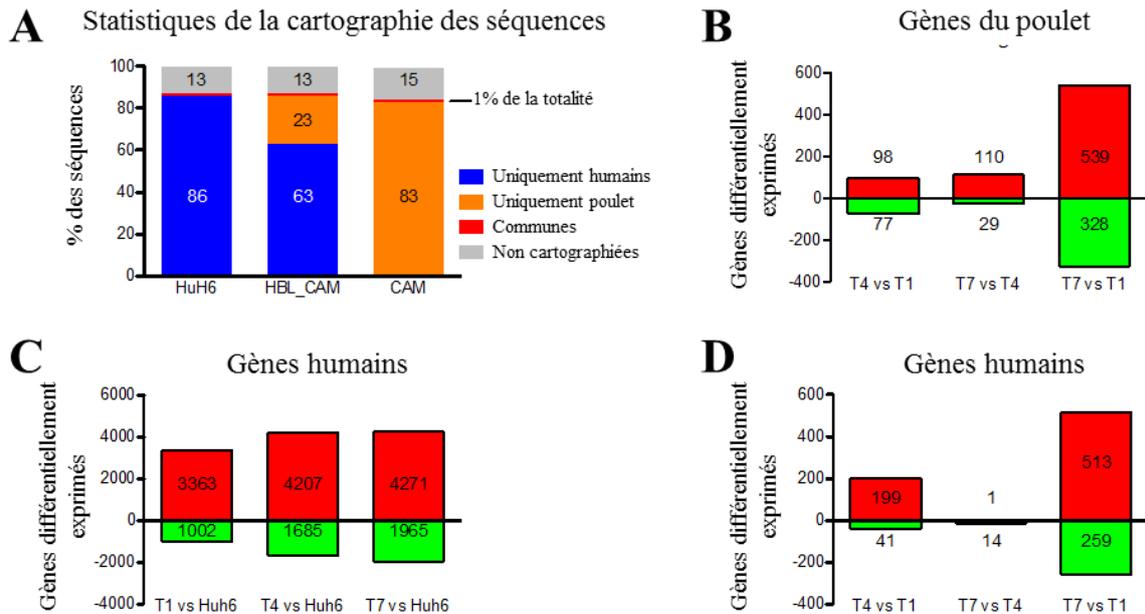


Figure 38 : Statistiques de la cartographie des séquences et gènes significativement dérégulés

(A) Les séquences générées par le séquençage ARN ont été alignées sur les génomes et transcriptomes de l'homme (GR38) et du poulet (GalGal4). Les séquences alignées sur aucun génome ni transcriptome, ainsi que les séquences communes aux deux espèces ont été éliminées. (B) Comparaison du nombre de gènes spécifiques du poulet différentiellement régulés après l'implantation des cellules Huh6 entre T1, T4 et T7. (C) Comparaison du nombre de gènes spécifiques de l'homme différentiellement régulés entre les cellules Huh6 en culture et les tumeurs à T1, T4 ou T7. (D) Comparaison du nombre de gènes spécifiques de l'homme différentiellement régulés après implantation sur la CAM entre T1, T4 et T7. (B-D) Les barres rouges représentent les gènes dont l'expression est augmentée, les barres vertes représentent les gènes dont l'expression est diminuée.

2.2.2 Evolution de la CAM au cours de l'embryogenèse

Parallèlement à l'analyse histologique (voir section 2.1.1 ; Figure 31), nous avons voulu étudier les changements moléculaires qui ont lieu au sein de la CAM lors de sa maturation et de son développement entre E11 et E17. Nous avons analysé les gènes du poulet exprimés dans des CAM non implantées au cours des trois étapes E11, E14 et E17 (Figure 39) et comparé ceux qui sont le plus différentiellement exprimés entre E11 et E17 (Figure 40).

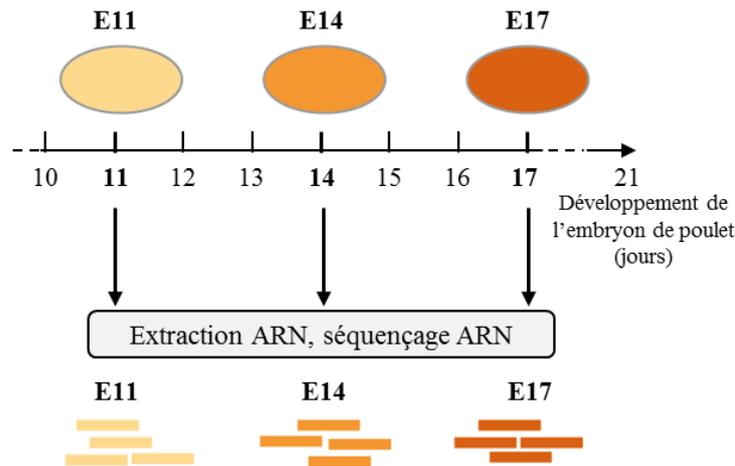


Figure 39 : Stratégie d'analyse: comparaison des gènes exprimés dans les CAM non implantées entre E11 et E17

Ces analyses (Figure 40) montrent que plusieurs gènes impliqués dans le métabolisme des lipides ont une expression qui augmente au cours du développement de la CAM, tels que *MAL2*, *CAV2*, *PLB1*, *LPINI*, *ALK*. L'augmentation de l'expression de ces gènes peut être liée à la maturation et à la différenciation de la CAM. De manière remarquable, parmi les 40 gènes les plus différenciellement exprimés entre E11 et E17, huit (20%) sont des gènes intervenant dans le développement membranaire. L'expression de *LAMA1* (*laminin*) diminue, mais en parallèle celle de *LAMC2* augmente considérablement entre E11 et E17. Ces laminines sont des glycoprotéines de la matrice extracellulaire impliquées dans de nombreux processus biologiques tels que la différenciation, l'adhésion, la signalisation ou encore la migration cellulaires. Le gène *PTGSI* permet l'expression d'une enzyme qui stimule l'angiogenèse en augmentant l'expression du VEGF dans les kératinocytes (Goren et al., 2015). De plus, l'augmentation de l'expression du gène *SCE* conduit à l'expression d'une protéine, la scielline, qui régule l'assemblage des molécules dans la couche cornée des tissus kératinisés. Concernant la kératinisation de la CAM, trois gènes exprimant des cytokératines ont une expression qui augmente entre E11 et E17 : *KRT4*, *KRT15* et *KRT6A*. Le gène *KRT15* exprime une kératine de type I, alors que *KRT4* et *KRT6A* expriment des kératines de type II. Un gène permettant l'expression de la chaîne α -1 du collagène de type XVII (*COL17A1*) a aussi une expression augmentée au cours du temps.

Ces données montrent l'expression de facteurs conduisant à la maturation de la CAM. A E14, la maturation de la CAM est terminée et l'embryon entre dans le dernier tiers de son

développement (Nowak-Sliwinska et al., 2014). C'est pourquoi nous montrons davantage un changement d'expression des gènes impliqués dans la construction d'une matrice extracellulaire et la kératinisation des tissus. Ces données sont en accord avec la kératinisation de la CAM observée en Figure 31.

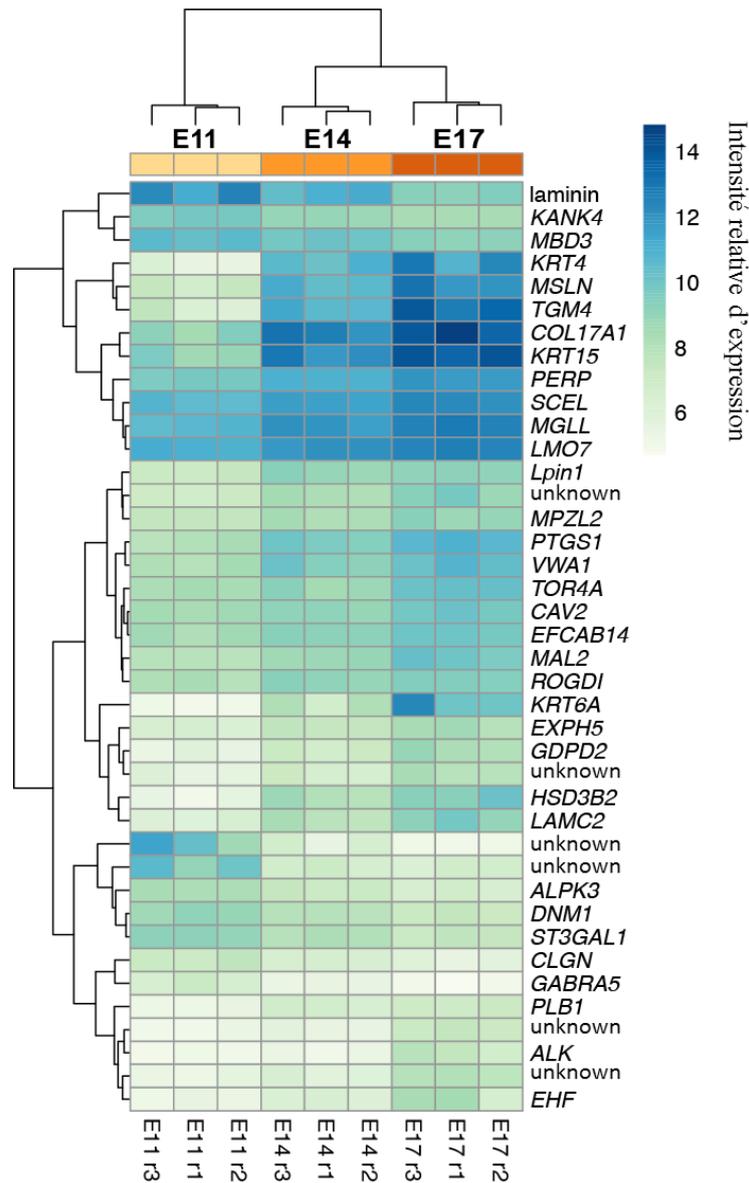


Figure 40 : Analyse comparative des 40 gènes du poulet les plus différenciellement exprimés entre E11 et E17 dans les CAM non implantées

Heatmap des 40 gènes du poulet les plus différenciellement exprimés au sein de la CAM entre les stades de développement E11 et E17. Trois réplicats ont été analysés pour chaque condition (r1, r2 et r3). L'intensité représente le degré d'expression relatif du gène dans chaque échantillon. Les gènes dont les protéines n'ont pas été caractérisées sont appelés « unknown ».

2.2.3 *Influence du développement du nodule tumoral de cellules Huh6 sur le développement de la CAM*

Afin de déterminer l'influence des cellules Huh6 sur la maturation et le développement de la CAM, nous avons analysé les gènes du poulet exprimés au cours du développement du nodule tumoral, à E11/T1, E14/T4 et E17/T7 (Figure 41 ; Figure 42).

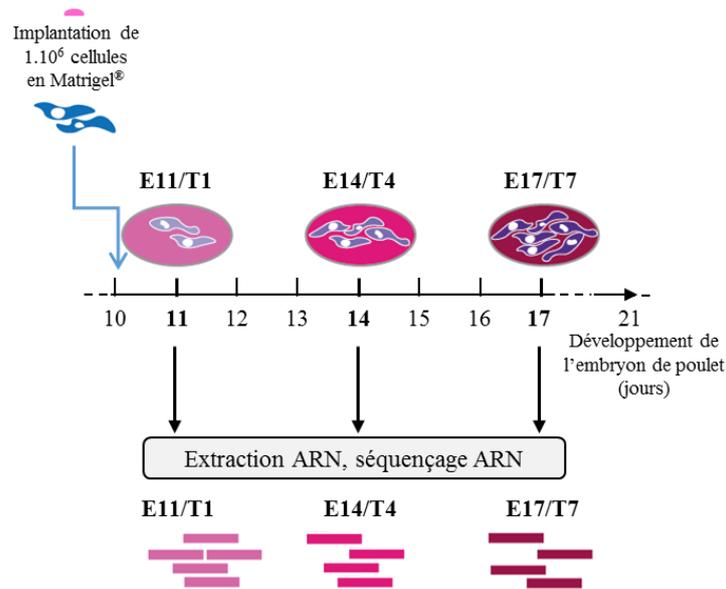


Figure 41 : Stratégie d'analyse: comparaison des gènes exprimés dans les CAM implantées avec les cellules Huh6 entre E11 et E17

Nous avons analysé les 40 gènes du poulet les plus différenciellement exprimés entre les CAM entourant les nodules tumoraux formés par les cellules Huh6 à E11 et à E17 (Figure 42). Ces gènes ont des fonctions très diverses. Par exemple, on y retrouve des régulateurs du métabolisme des lipides et de la différenciation cellulaire (*LPL*, *CAV2*, *DISP3*), du métabolisme des glucides (*SLC2A9*, *MGLL*) ou encore un régulateur hormonal (*ALDH1A2*). L'augmentation de l'expression de ces gènes illustre une activité proliférative intense. Quatre gènes dont les protéines ont un rôle dans la réponse immunitaire ont une expression augmentée (*FKBP51*, *JAM2*, *IGSF10*, *SPINK5*). Ces augmentations suggèrent le déclenchement d'une réponse immunitaire du poulet suite à l'implantation des cellules tumorales. De plus, parmi ces 40 gènes de la CAM on retrouve 10 gènes (soit 25%) que nous avons déjà identifiés parmi les plus différenciellement exprimés dans les CAM non implantées entre E11 et E17 (Figure 40) : *MSLN*, *COL17A1*, *MGLL*, *LMO7*, *HSD3B2*, *PTGS1*, *VWAI*,

CAV2, *RODGI* et *KRT6A*. La redondance de ces gènes dans les deux analyses suggère que l'implantation des cellules Huh6 a un impact partiel sur la maturation et la différenciation de la CAM.

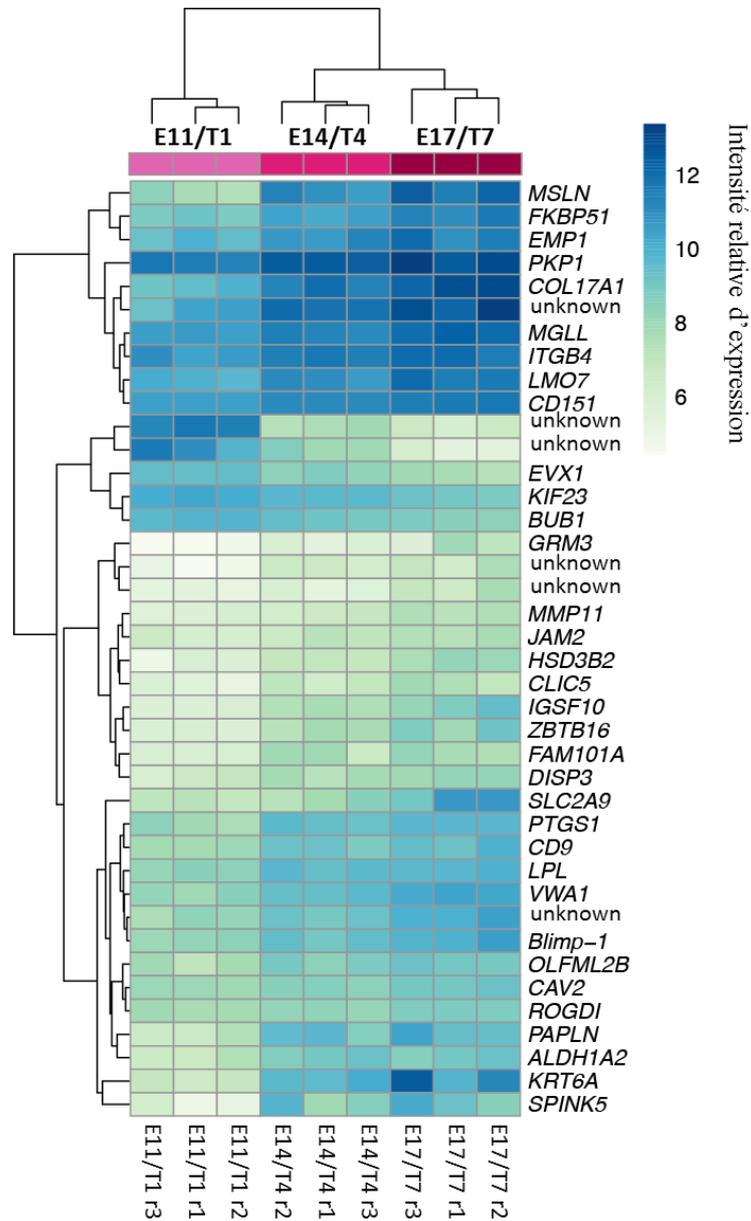


Figure 42 : Analyse comparative des 40 gènes du poulet les plus différenciellement exprimés entre E11 et E17 dans les CAM implantées avec des cellules Huh6

Heatmap des 40 gènes du poulet les plus différenciellement exprimés dans le stroma et la CAM entourant les tumeurs formées par les cellules Huh6 entre T1 (E11) et T7 (E17). Trois réplicats ont été analysés pour chaque condition (r1, r2 et r3). L'intensité représente le degré d'expression relatif du gène dans chaque échantillon. Les gènes dont les protéines n'ont pas été caractérisées sont appelés « unknown ».

Dans le but de déterminer si la dérégulation des gènes du poulet, en présence de cellules Huh6, est due au processus normal de maturation et de développement de la CAM ou à l'influence de la tumeur, nous avons comparé les gènes exprimés dans les CAM non implantées et dans les CAM implantées avec des cellules Huh6 (Figure 43 ; Figure 44 ; Figure 45 ; Figure 46).

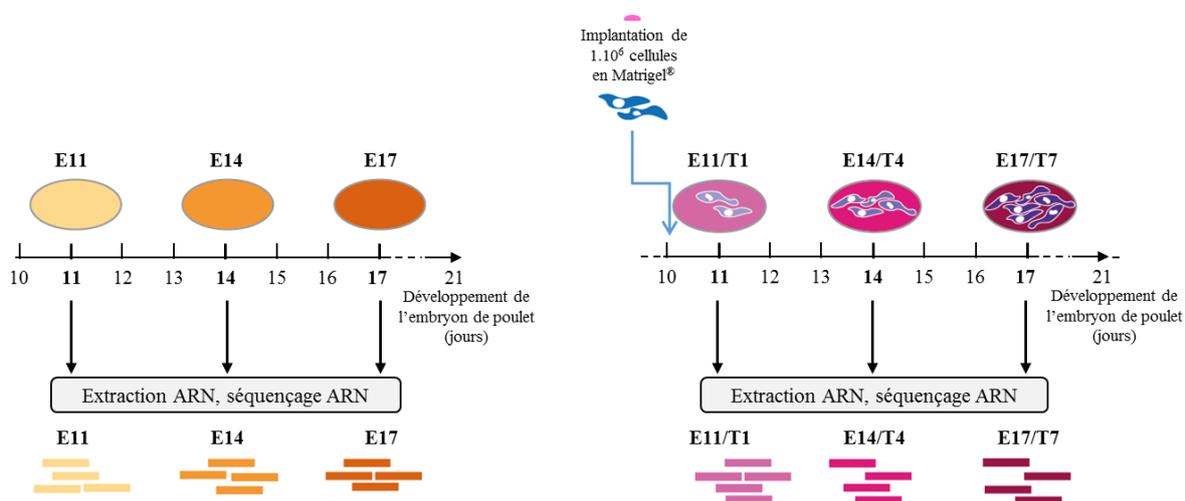


Figure 43 : Stratégie d'analyse: comparaison entre les gènes exprimés dans les CAM non implantées et les CAM implantées avec les cellules Huh6 entre E11 et E17

Tout d'abord, nous avons réalisé une analyse des composantes principales (ACP) entre les 18 échantillons : trois réplicats pour chaque condition correspondant aux CAM implantées avec les cellules Huh6 à E11, E14 et E17 et aux CAM non implantées à E11, E14 et E17 (Figure 43). L'ACP est une représentation graphique des résultats en deux dimensions, permettant d'identifier les variations entre les échantillons analysés (Figure 44).

Ces données montrent une variance relativement importante entre les trois réplicats de CAM non implantées à E11 (orange clair, Figure 44). Cette distribution hétérogène illustre les différences de vitesse de développement entre les œufs à un stade auquel la CAM est en pleine maturation (Nowak-Sliwinska et al., 2014). La même variation est retrouvée entre les trois réplicats de CAM implantées de cellules Huh6 à E11 (rose clair, Figure 44). Les cellules Huh6 semblent avoir peu d'impact sur le développement de la CAM à ce stade.

A E14, il y a peu de différences entre les trois réplicats de CAM non implantées (orange, Figure 44). La maturation de la CAM est terminée et l'embryon entre dans le dernier tiers de son développement. De même, les trois réplicats de CAM implantées avec les cellules Huh6 sont très proches à ce stade (rose, Figure 44). Nous remarquons que les CAM non implantées et les CAM implantées à E14 sont très similaires. Comme à E11, les cellules Huh6 ne semblent pas avoir un impact important sur le développement de la CAM.

A E17, les trois réplicats de CAM non implantées ont une distribution plus hétérogène (orange foncé, Figure 44). A ce stade, les embryons de poulet atteignent la fin de leur développement, leur système immunitaire est activé. En revanche, à E17, les trois réplicats de CAM implantées avec des cellules Huh6 sont peu variables entre eux (rose foncé, Figure 44). De manière surprenante, ils sont également très similaires aux CAM non implantées et aux CAM implantées à E14.

Ainsi, les échantillons de CAM non implantées sont plus ou moins variables selon le stade de l'embryogenèse. Ces variations illustrent les différences de développement entre chaque individu. L'implantation des cellules Huh6 semble causer un retard de développement de la CAM, observé à un stade tardif, à E17. Les cellules Huh6 pourraient inhiber le développement de la CAM au profit de leur croissance pour la formation d'un nodule tumoral.

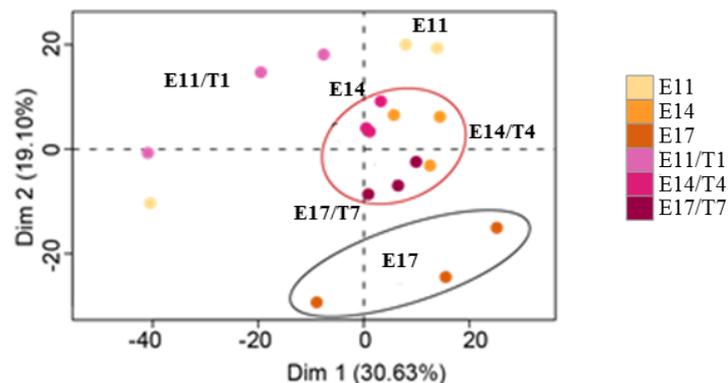


Figure 44 : Variations entre les échantillons de CAM au cours de l'embryogenèse et par l'influence des cellules Huh6

L'ACP a été effectuée à partir des données d'expression des gènes. Elle montre les similarités et les différences biologiques entre les 18 échantillons de CAM contrôles non implantées (E11, E14, E17) et implantées (E11/T1, E14/T4 et E17/T7). Trois réplicats ont été effectués pour chaque condition.

Nous avons ensuite analysé les 40 gènes du poulet les plus différentiellement exprimés entre les CAM contrôles non implantées, et les CAM implantées par les cellules Huh6 (Figure 45). Nous retrouvons des gènes sur-exprimés appartenant à la même famille que ceux augmentés au cours du développement de la CAM (Figure 40) et au cours du développement de la CAM implantée avec les cellules Huh6 (Figure 42).

Parmi eux, deux gènes, *COL18A1*, *COL22A1*, conduisent à l'expression de sous-unités du collagène. De même, *LEPREL1* conduit à l'expression d'une protéine permettant l'assemblage et la stabilité du réseau de collagène. Ainsi, l'implantation des cellules Huh6 influence partiellement la formation de la matrice extracellulaire.

Plusieurs gènes conduisant à l'expression de protéines importantes pour la prolifération cellulaire, l'adhésion, la réparation des tissus et/ou l'angiogenèse ont une expression augmentée dans les CAM implantées avec les cellules Huh6. Il s'agit de *HHIP*, *MKP3*, *ER81*, *EPDR1* et *FGF10*. Particulièrement, *FGF10* est impliqué dans la kératinisation des cellules. Ainsi, l'implantation des cellules Huh6 n'arrête pas le développement de la CAM. Elle semble impacter plus spécifiquement la différenciation des cellules de la CAM. Cependant, *UPK1B* et *EMP2*, deux gènes qui expriment des protéines transmembranaires impliquées dans l'adhésion et la prolifération des cellules sont sous-exprimés dans les CAM implantées avec les cellules Huh6. Leurs protéines pourraient avoir un rôle suppresseur de tumeur. Les cellules Huh6 pourraient influencer l'inhibition de leur expression. De plus, l'expression des gènes *PLEKHO1* et *CARD9* est augmentée. Ces gènes conduisent à l'expression de protéines induisant l'activation de l'apoptose. Les cellules Huh6 pourraient ainsi envoyer des signaux aux cellules de la CAM du poulet pour activer leur mort.

Deux gènes, *SNED1* et *F8*, dont l'expression est augmentée, expriment des protéines qui circulent dans le réseau vasculaire. *SNED1* serait impliqué particulièrement dans l'angiogenèse. Ces données confirment la présence de cellules sanguines dans le nodule tumoral et correspondent au développement de la vascularisation observée en macroscopie (Figure 31).

Enfin, sept gènes parmi 40 (15% ; *IL7R*, *C3d*, *IL13RA2*, *MADCAM1*, *C7*, *SBNO2* et *KIF26A*) sont impliqués dans la réaction immunitaire. Ils sont tous sur-exprimés en présence de cellules Huh6. Cette sur-expression montre une réaction des cellules de la CAM du poulet à l'implantation des cellules Huh6. De manière étrange, certains de ces gènes sont sur-exprimés dès E11 alors que le système immunitaire du poulet n'est pas encore fonctionnel. C'est certainement la présence de facteurs sécrétés par les cellules Huh6 qui conduit à l'expression de ces gènes dans la CAM à un stade si précoce.

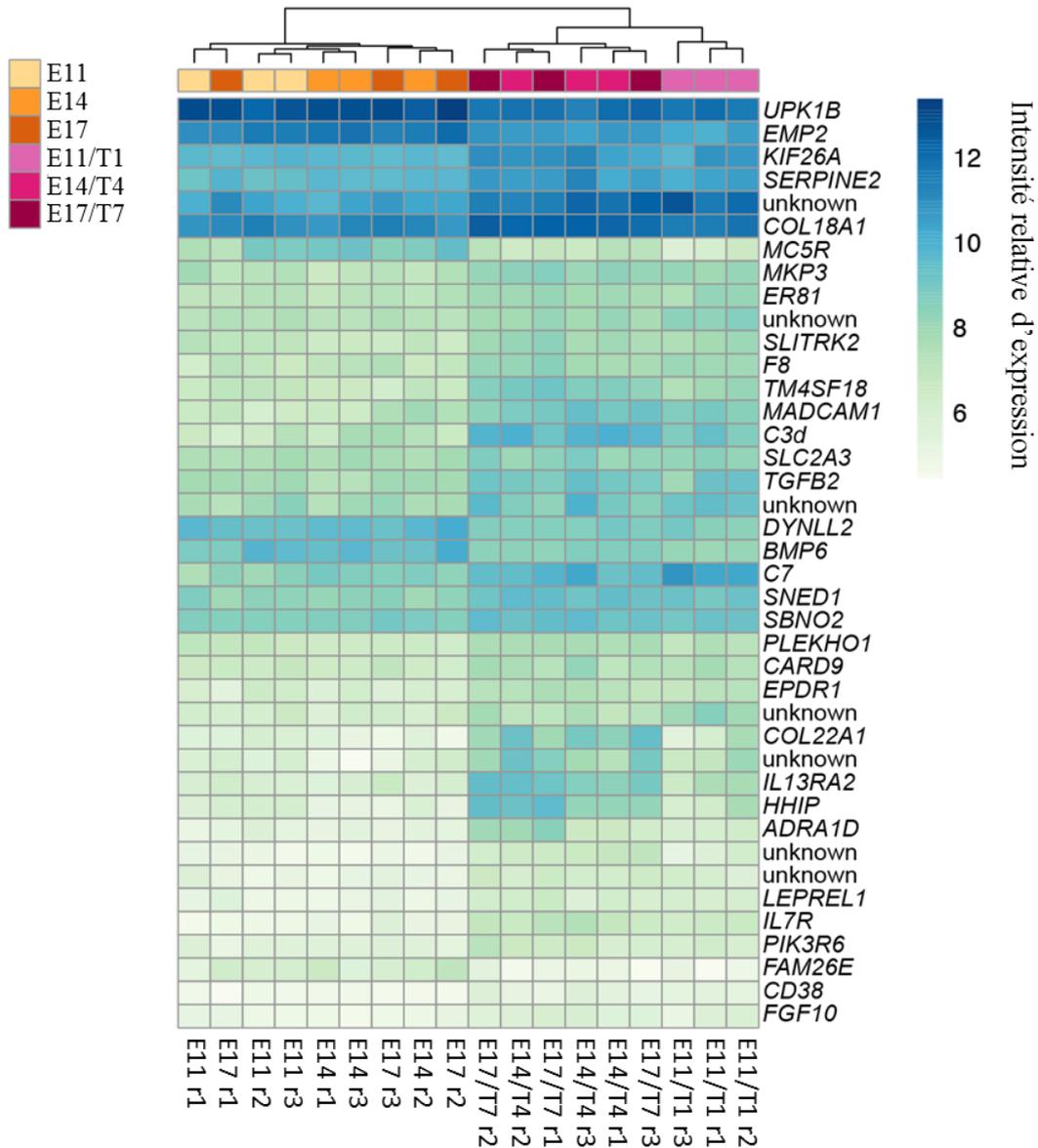


Figure 45 : Influence de l'implantation des cellules Huh6 sur le transcriptome des cellules de la CAM de poulet

Analyse comparative des 40 gènes les plus différentiellement exprimés entre les CAM non implantées et CAM implantées de cellules Huh6. L'intensité représente le degré d'expression relatif du gène dans chaque échantillon. Les gènes dont les protéines n'ont pas été caractérisées sont appelés « unknown ».

En complément de ces informations, nous avons également réalisé une analyse globale des processus dérégulés entre les CAM non implantées et les CAM implantées avec les cellules Huh6 en intégrant tous les gènes différentiellement exprimés du poulet dans le logiciel *Ingenuity® Pathway Analysis* (IPA®, Qiagen ; Figure 46). Ces analyses confirment que les voies les plus influencées par l'implantation des cellules Huh6 sont la différenciation des cellules sanguines, la néovascularisation, l'adhésion des cellules endothéliales et la réponse inflammatoire par phagocytose des cellules tumorales.

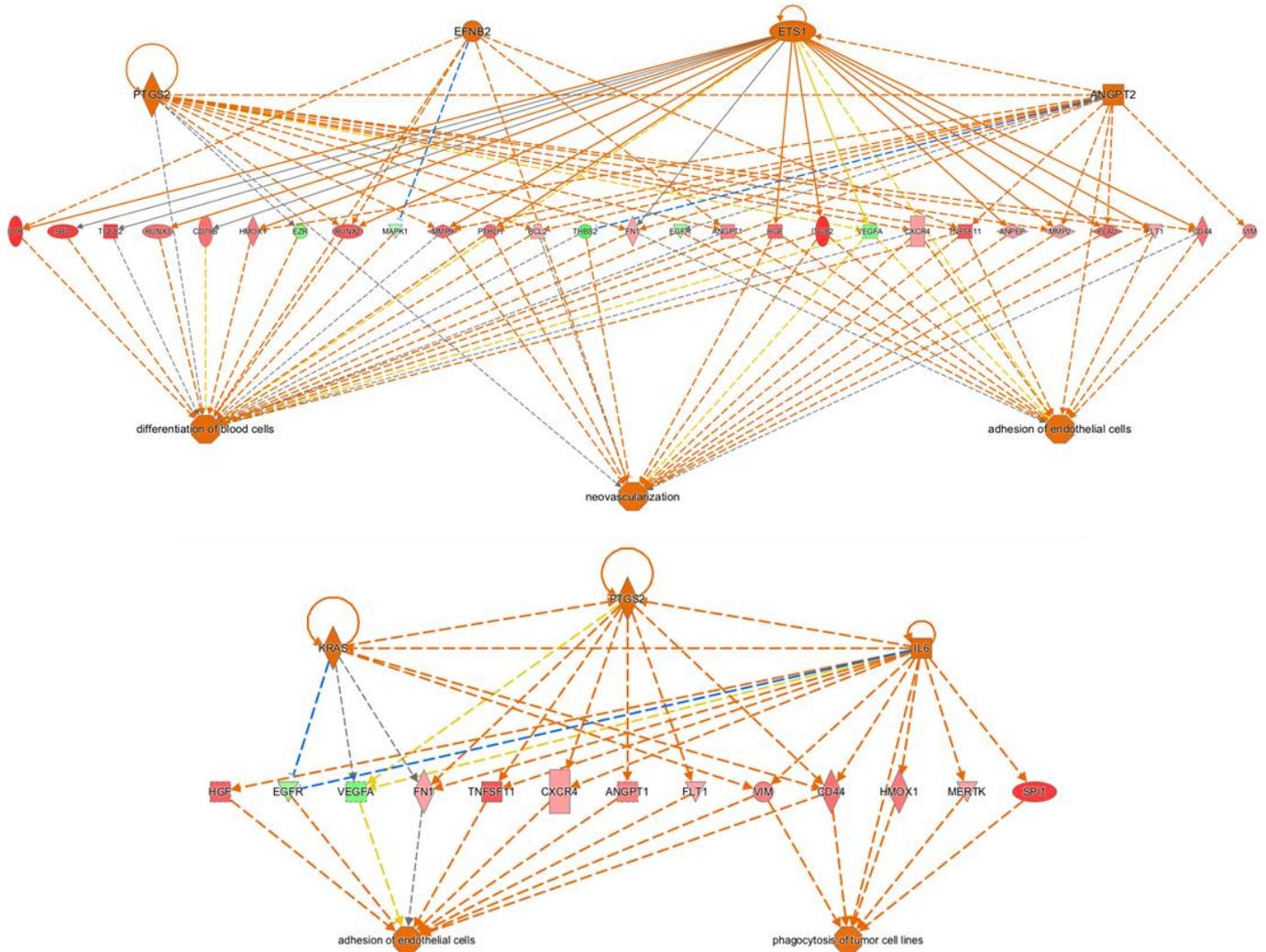


Figure 46 : Analyse globale de l'influence de l'implantation des cellules Huh6 sur le transcriptome des cellules de la CAM de poulet

Une analyse globale de tous les gènes différentiellement exprimés entre les échantillons de CAM contrôles non implantées (E11, E14, E17) et implantées (E11/T1, E14/T4 et E17/T7) a été réalisée. Les données obtenues ont été intégrées au logiciel IPA® (Qiagen) et les voies cellulaires impliquant un grand nombre de gènes différentiellement régulés ont été mises en valeur. Les gènes dont l'expression augmente entre les CAM contrôles non implantées et les CAM implantées sont indiqués en nuances de rouges, ceux dont l'expression diminue sont indiqués en nuances de vert. L'intensité représente le degré de dérégulation des gènes. Au bas de chaque graphique, en orange, sont indiquées les voies identifiées.

Pour conclure, l'implantation des cellules Huh6 a une influence modérée sur la maturation et le développement de la CAM de poulet entre E11 et E17. A E11 et E14, de très faibles différences sont observées entre les deux conditions. L'impact des cellules Huh6 est plus important à E17. Elles semblent induire la croissance et la différenciation des cellules de la CAM, mais également activer des processus menant à leur apoptose. De plus, les cellules Huh6 induisent le développement du réseau vasculaire au sein du nodule tumoral, suggérant qu'elles utilisent le réseau de l'hôte pour s'alimenter en nutriments et facteurs importants pour leur survie. Enfin, la présence des cellules Huh6 conduit à l'activation d'une réponse immunitaire par les cellules de la CAM du poulet.

2.2.4 Caractérisation moléculaire du développement des nodules tumoraux

2.2.4.a Comparaison entre cellules Huh6 implantées sur la CAM et les cellules Huh6 in vitro

Comme nous l'avons observé grâce aux marquages histologiques, les cellules Huh6 subissent de nombreux changements morphologiques après leur implantation sur la CAM. Nous avons donc comparé les gènes humains les plus différentiellement exprimés entre les cellules Huh6 en culture et les cellules Huh6 implantées sur la CAM à T7 (Figure 47 ; Figure 48).

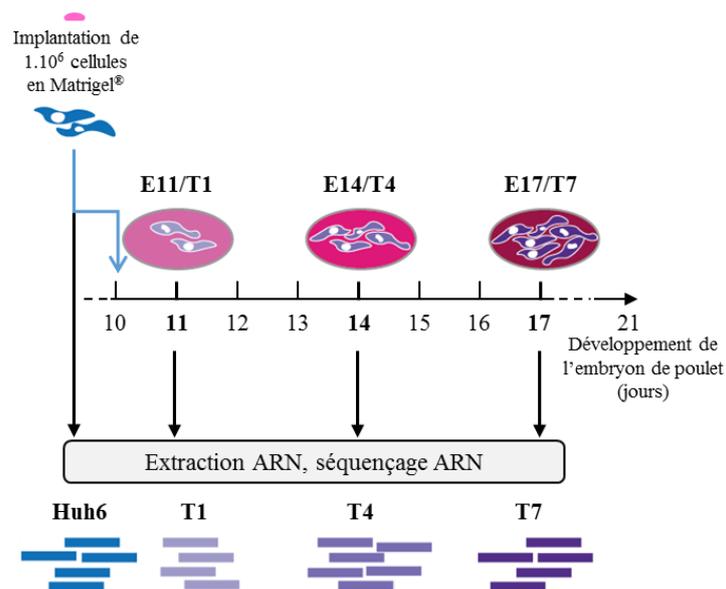


Figure 47 : Stratégie d'analyse: comparaison des gènes exprimés entre les cellules Huh6 en culture et les cellules Huh6 implantées sur la CAM

Parmi les gènes les plus différenciellement exprimés entre les cellules Huh6 en culture et les cellules Huh6 implantées sur CAM au cours du développement du nodule (Figure 48), quatre gènes codant pour l'expression de peptides de la famille des humanines ont une expression augmentée : *MTRNR2L8*, *MTRNR2L12*, *MTRNR2L10* et *MTRNR2L1*. Les peptides de la famille de l'humanine sont des facteurs anti-apoptotiques (Ikonen et al., 2003 ; Guo et al., 2003). Leur sur-expression participerait à la survie des cellules Huh6 implantées sur la CAM. Ces gènes sont localisés dans le génome mitochondrial des cellules. Les mitochondries sont des organites impliqués dans de nombreuses fonctions biologiques essentielles au fonctionnement de la cellule. L'une de ces fonctions est la production d'énergie sous forme d'ATP via les phosphorylations oxydatives (OXPHOS).

Parmi les 40 gènes identifiés dans cette analyse, 10 (25%, *MT-TL1*, *MTRNR2L8*, *MTRNR2L12*, *MTRNR2L10*, *MTRNR2L1*, *HSPD1*, *SQLE*, *TXNIP*, *ACSS2* et *MT-TC*) ont un rôle associé à la mitochondrie et aux mécanismes des OXPHOS. Pour la plupart, ils ont une expression augmentée, excepté *ACSS2* dont la fonction est consommatrice d'énergie. Ces données suggèrent que les processus générateurs d'énergie sont activés alors que ceux consommateurs d'énergie sont inhibés.

De plus, les gènes *RPL6*, *RPL7* et *RPS3A* expriment des composants protéiques de la grande sous-unité ribosomique 60S. Ils sont parmi les plus sous-exprimés après l'implantation des cellules Huh6 sur la CAM. L'altération globale de l'activité traductionnelle est un caractère connu dans les cancers (Lorenzi et al., 2014). La diminution de l'expression de composants impliqués dans l'assemblage des ribosomes pourrait contribuer à la diminution de la traduction spécifique de facteurs bloquant la différenciation et la croissance cellulaire. Cependant ces hypothèses nécessitent des analyses plus spécifiques. La traduction des ARNm en protéines est un processus qui requiert de grosses dépenses énergétiques, elle pourrait également être ralentie pour éviter aux cellules une trop forte consommation d'énergie.

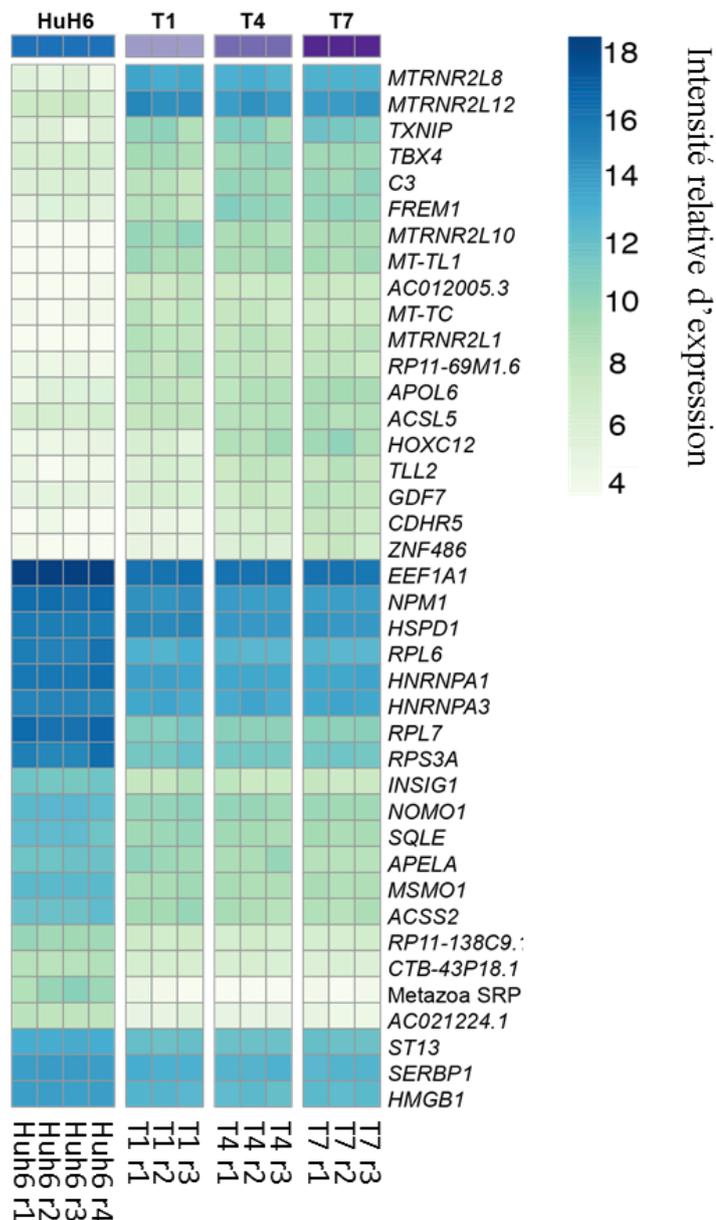


Figure 48 : Analyse comparative des 40 gènes humains les plus différenciellement exprimés entre les cellules Huh6 en culture et les cellules Huh6 implantées sur la CAM

Heatmap des 40 gènes humains les plus différenciellement exprimés entre les cellules Huh6 en culture *in vitro* et les Huh6 implantées sur la CAM à T7. Trois ou quatre réplicats ont été analysés pour chaque condition (r1, r2, r3 et r4). L'intensité représente le degré d'expression relatif du gène dans chaque échantillon.

L'analyse globale des gènes humains les plus différenciellement exprimés par le logiciel IPA® (Qiagen) n'a pas permis de mettre en évidence des voies de signalisations particulièrement influencées par l'implantation des cellules Huh6 sur la CAM de poulet. Cependant, cette analyse a montré que, bien que ne faisant pas partie des 40 gènes les plus différenciellement exprimés, de nombreux gènes de la famille Hox sont sur-exprimés (Figure 49). Ces gènes ont un rôle majeur dans le développement des organes embryonnaires et pourraient être impliqués dans la dédifférenciation des cellules Huh6 implantées sur la CAM.

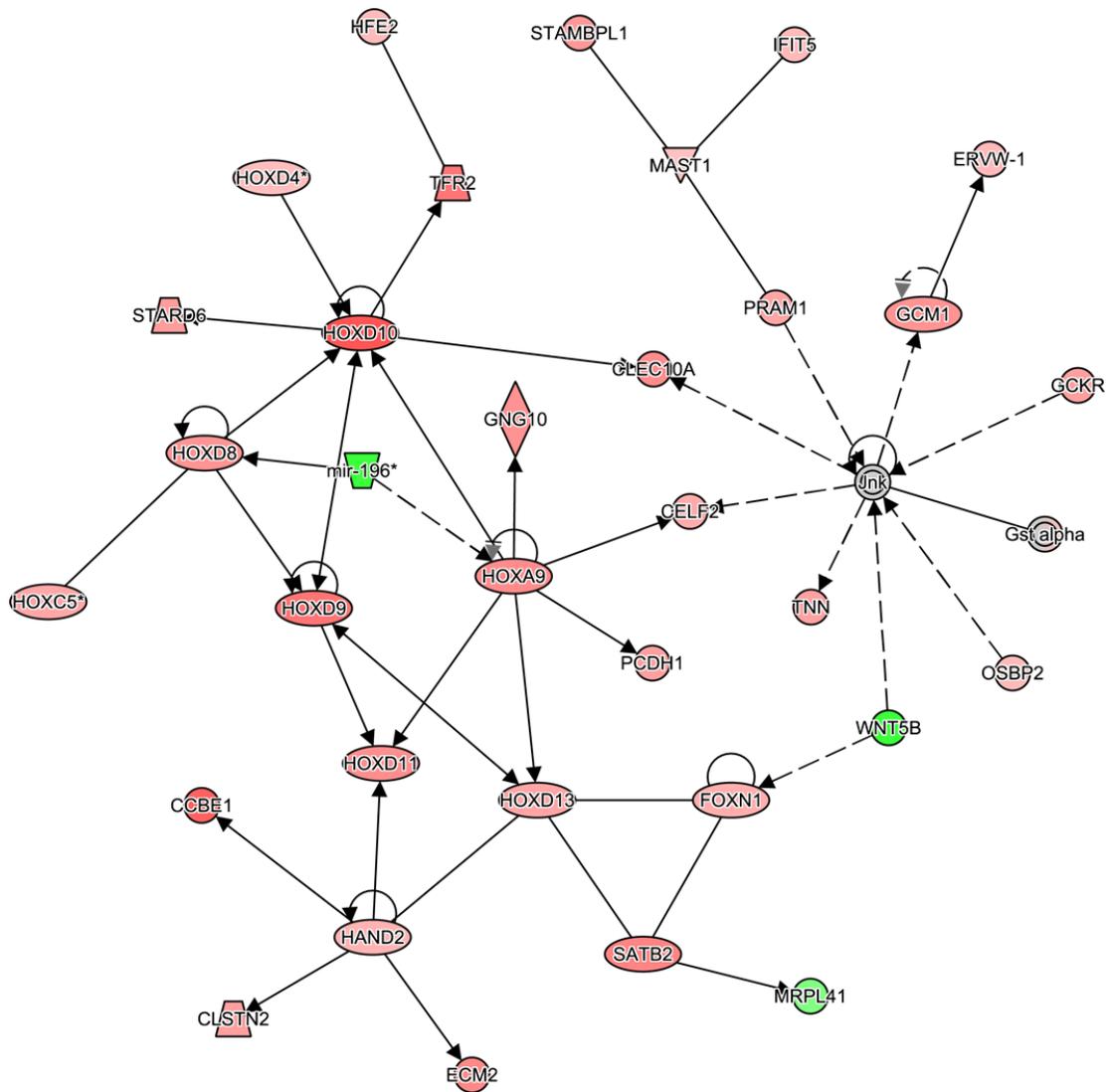


Figure 49 : Analyse globale des gènes humains les plus différenciellement exprimés entre les cellules Huh6 en culture et les cellules Huh6 implantées sur la CAM

Une analyse globale de tous les gènes différenciellement exprimés entre les cellules Huh6 en culture *in vitro* et les Huh6 implantées sur la CAM à T7 a été réalisée. Les données obtenues ont été intégrées au logiciel IPA® (Qiagen). Les gènes dont l'expression augmente entre les cellules Huh6 en culture *in vitro* et les Huh6 implantées sur la CAM sont indiqués en nuances de rouges, ceux dont l'expression diminue sont indiqués en nuances de vert. L'intensité représente le degré de dérégulation des gènes.

2.2.4.b *Comparaison entre les cellules Huh6 implantées sur la CAM au cours du développement des nodules tumoraux*

Afin d'étudier particulièrement les mécanismes permettant la survie, la prolifération et la dédifférenciation des cellules Huh6 après leur implantation sur la CAM, nous avons comparé les gènes humains exprimés différemment entre T1 et T7 (Figure 50, Figure 51).

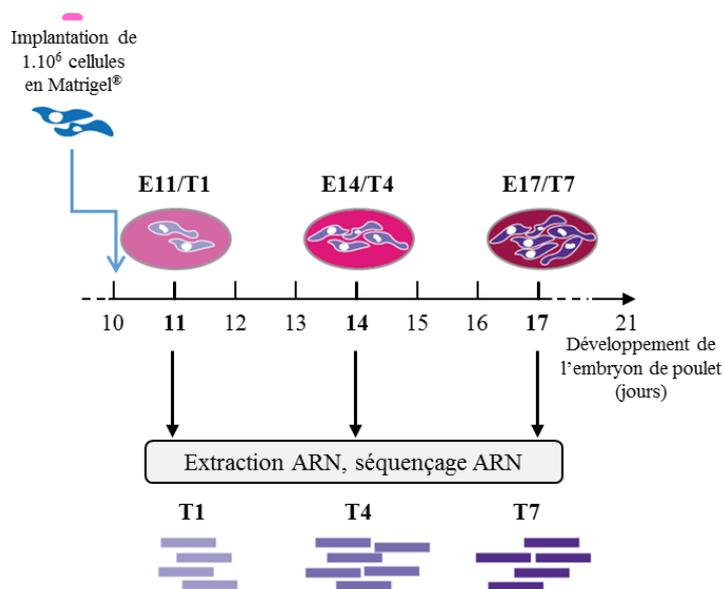


Figure 50 : Stratégie d'analyse: comparaison des gènes exprimés par les cellules Huh6 implantées sur la CAM entre T1 et T7

La comparaison des gènes les plus différenciellement exprimés durant la progression du nodule tumoral (Figure 51) a conduit à l'identification de trois gènes également identifiés lors de la comparaison avec le transcriptome des cellules Huh6 (Figure 48) : *HSPD1*, *CDHR5* et *C3*.

HSPD1 exprime une protéine appartenant à la famille des protéines *Heat shock* permettant le repliement et l'assemblage des protéines importées à la mitochondrie. Cette protéine est sur-exprimée dans de nombreux cancers, notamment dans certains CHC (Lim, 2005).

Le gène *C3* conduit à l'expression de la protéine du complément C3. C'est une protéine clef dans l'activation du système du complément qui régule la réaction immunitaire et les processus inflammatoires. Cependant, des études suggèrent que les cellules tumorales peuvent se servir de l'activation de ces processus pour promouvoir leur survie et leur prolifération (Pio et al., 2013).

CDHR5 conduit à l'expression d'une protéine de la famille des cadhérines dont l'activité est calcium-dépendante. Elle contrôle l'adhésion cellulaire *via* des interactions entre les microvillosités. Son activité est favorisée par la proximité des vaisseaux sanguins du poulet transportant du calcium de la coquille à l'embryon.

Ces trois gènes étant dérégulés dès l'implantation des cellules Huh6 sur la CAM, la sous-expression de *HSPD1* et la sur-expression de *C3* et *CDHR5* contrôlent la survie et le développement du nodule tumoral.

Le gène *HMGCS2* est le plus différenciellement exprimé au cours du développement tumoral. Ce gène conduit à l'expression de l'enzyme mitochondriale HMG-CoA synthase (hydroxyméthylglutaryl-CoA synthase). Cette enzyme intervient dans la production de corps cétonique participant à la croissance tumorale (Martinez-Outschoorn et al., 2012).

Nous observons également l'augmentation de l'expression de *MEPIA* conduisant à l'expression de la sous-unité α de la Méprine 1. La Méprine 1 α est une métalloprotéase connue pour être sur-exprimée dans les cancers, notamment dans le CHC et qui contribue à la progression tumorale (OuYang et al., 2016).

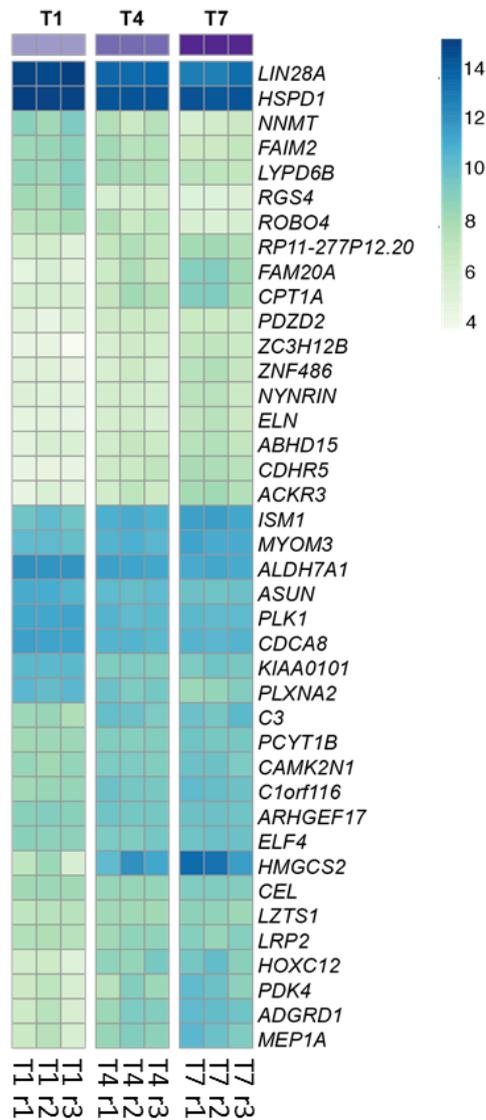


Figure 51 : Analyse comparative des 40 gènes humains les plus différenciellement exprimés au cours de la formation du nodule tumoral par les Huh6 entre E11 (T1) et E17 (T7)

Heatmap des 40 gènes humains les plus différenciellement exprimés dans les cellules Huh6 entre un (T1), quatre (T4) et sept (T7) jours d'implantation. Trois réplicats ont été analysés pour chaque condition (r1, r2 et r3). L'intensité représente le degré d'expression relatif du gène dans chaque échantillon.

L'analyse globale des processus différenciellement exprimés au cours du développement du nodule tumoral par le logiciel IPA® (Qiagen) a montré une augmentation générale du métabolisme des lipides, particulièrement au niveau des gènes impliqués dans la synthèse, le transport et le relargage des lipides. Nous avons particulièrement identifié l'augmentation de l'expression des gènes des apolipoprotéines (*APOA4*, *APOC2*) en encore du gène *SLC10A1* qui exprime une protéine de la famille des co-transporteurs du sodium et de l'acide biliaire (Figure 52). Ces données sont en accord avec la transformation des cellules Huh6 de type hépatocytaire en des cellules de type biliaire (voir section 2.1.2 ; Figure 32).

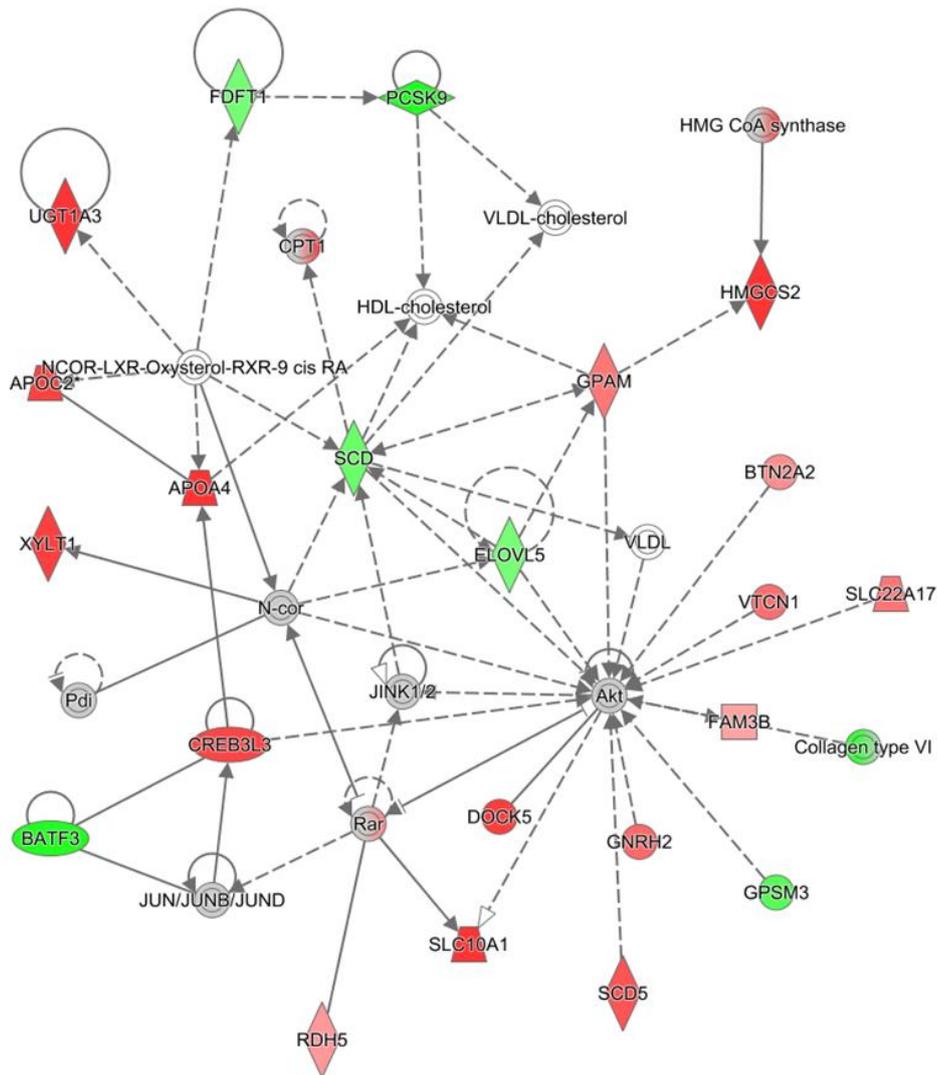


Figure 52 : Analyse globale des gènes humains les plus différenciellement exprimés entre les cellules Huh6 en culture et les cellules Huh6 implantées sur la CAM

Une analyse globale de tous les gènes différenciellement exprimés entre les Huh6 implantées sur la CAM à T1 et à T7 a été réalisée. Les données obtenues ont été intégrées au logiciel IPA® (Qiagen). Les gènes dont l'expression augmente entre les cellules Huh6 à T1 et les cellules Huh6 à T7 sont indiqués en nuances de rouges, ceux dont l'expression diminue sont indiqués en nuances de vert. L'intensité représente le degré de dérégulation des gènes.

Au niveau moléculaire nous avons observé une augmentation de l'expression de la *MEP1A* au cours de la formation du nodule tumoral (Figure 51) et des données de la littérature montrent que la Méprine 1 α est sur-exprimée dans le CHC (OuYang et al., 2016). Pour aller plus loin, nous avons étudié son expression en immunohistochimie dans des échantillons de patients atteints d'HBL (Figure 53). Dans le foie normal (NL), nous observons un marquage cytoplasmique des cellules endothéliales de la veine porte et des cellules endothéliales des sinusoides. Dans l'HBL, nous observons encore un marquage cytoplasmique des cellules endothéliales des sinusoides. En revanche, il y a également un marquage nucléaire et périnucléaire. Ce marquage est plus hétérogène et beaucoup plus intense, correspondant à une sur-expression de la Méprine 1 α dans l'HBL.

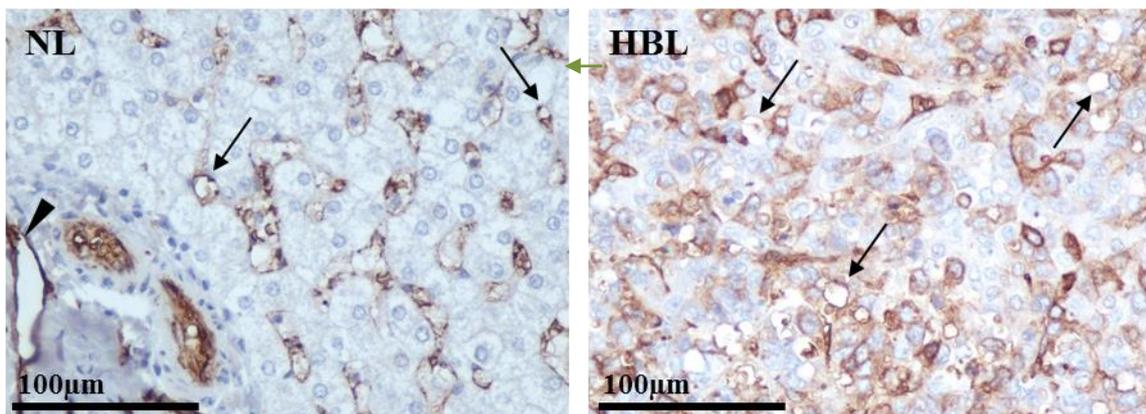


Figure 53 : Immunomarkage de la Méprine 1 α dans le foie normal et dans l'HBL

La sous-unité 1 α de la Méprine a été marquée par immunohistochimie dans un échantillon de foie normal (NT) et un échantillon d'HBL. La veine porte est indiquée par la tête de flèche noire. Des sinusoides sont indiqués par les flèches noires.

J'ai également étudié par immunohistochimie l'expression de la Méprine 1 α dans les échantillons issus des cellules Huh6 implantées sur la CAM (Figure 54). L'anticorps anti-Méprine 1 α utilisé ne réagit pas avec les cellules du poulet (données non montrées). Les cellules Huh6 en culture semblent exprimer fortement la Méprine 1 α au niveau membranaire (Figure 54, panel de gauche). Comme dans le cas de la β -caténine (Figure 36) et des autres marquages, les conditions d'immunohistochimie utilisées sont optimales pour les cellules incluses dans la CAM et non pour les cellules en culture. La concentration d'anticorps et les temps d'incubations, peut-être trop forts, pourraient conduire à un marquage aspécifique.

Au cours du développement du nodule tumoral (Figure 54, T1 à T7), nous observons que l'expression de la Méprine 1 α est de plus en plus intense. A T1, le marquage est essentiellement cytoplasmique et localisé au pôle biliaire. A T4 le marquage au cytoplasme est granuleux et plus présent. Il peut être également nucléaire dans certains cas. A T7, le marquage semble être plus dispersé dans le cytoplasme, il est parfois localisé au pôle basal, parfois au pôle luminal. La Méprine 1 α est surtout exprimée dans les amas de cellules à l'aspect biliaire alors que les cellules d'aspect hépatocytaire ne l'expriment pas. L'augmentation de l'expression de la Méprine 1 α au cours du développement observée dans les analyses moléculaires pourrait être une conséquence de l'augmentation du pourcentage de cellules biliaires dans les tumeurs.

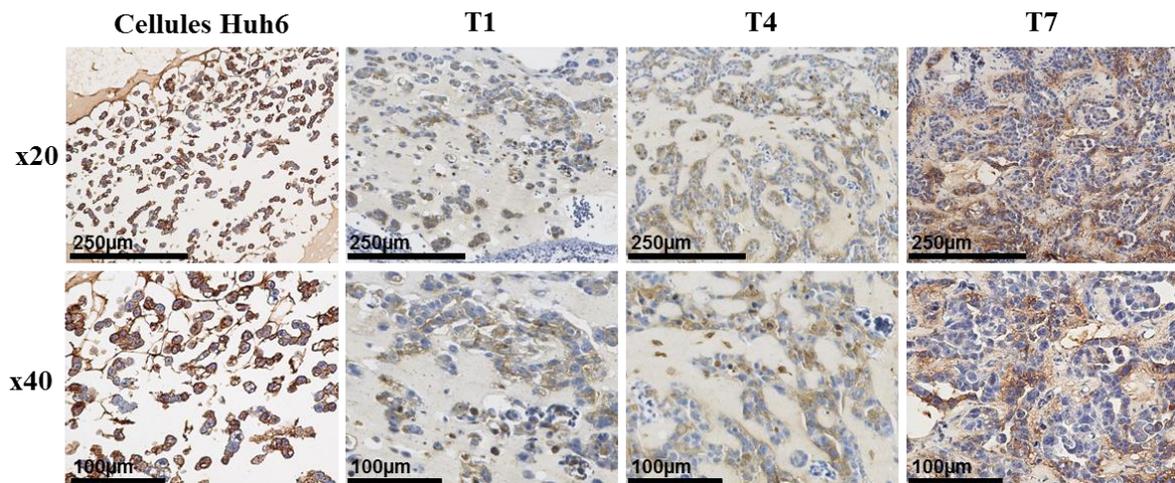


Figure 54 : Immunomarquage de la Méprine 1 α dans les cellules Huh6 en culture et dans les tumeurs formées par les cellules Huh6 implantées sur la CAM

La Méprine 1 α a été marquée par immunohistochimie dans les cellules Huh6 et les nodules tumoraux de cellules Huh6 à T1, T4 et T7. L'objectif utilisé est indiqué à gauche.

Pour conclure l'analyse moléculaire, nous avons observé que l'implantation des cellules Huh6 sur la CAM de poulet induit des changements dans le transcriptome du poulet, ainsi que dans celui des cellules humaines.

Lors de l'implantation des cellules Huh6, la CAM est en pleine maturation et développement. De nombreux gènes impliqués dans la formation de la matrice extracellulaire, la prolifération et la différenciation des cellules sont sur-exprimés au cours du temps. L'implantation des cellules Huh6 induit des changements minimes sur ces processus. Cependant, elle favorise l'adhésion cellulaire entre les cellules du poulet et la néovascularisation de la membrane. Ainsi, les cellules Huh6 semblent envoyer des signaux aux cellules du poulet pour permettre la création d'un environnement propice à leur prolifération. Cependant, nous observons le déclenchement d'une réponse immunitaire de la part de l'hôte.

Concernant les cellules Huh6, les processus consommateurs d'énergie sont diminués et ceux qui en produisent sont augmentés. En revanche, plusieurs voies impliquées dans le métabolisme des lipides sont fortement augmentées au cours du développement du nodule tumoral. De plus, l'activité traductionnelle tend à être diminuée par la sous-expression de protéines ribosomiques au cours du développement du nodule. Nous observons également le déclenchement de processus anti-apoptotiques et l'activation de gènes conduisant à la progression tumorale. Ces résultats montrent que les cellules Huh6 adaptent leur métabolisme pour survivre et proliférer dans la CAM de poulet.

3. Effet de la chimiothérapie au cisplatine sur les tumeurs formées par les cellules Huh6 sur la CAM

J'ai également étudié le potentiel de ce modèle d'implantation de cellules Huh6 sur la CAM pour tester les effets de molécules thérapeutiques sur la formation d'une tumeur d'HBL. Dans ce but, j'ai traité des cellules Huh6 implantées avec le cisplatine (CDDP), qui est l'agent chimiothérapeutique le plus utilisé dans le traitement de l'HBL (voir I.2.2.2). J'ai effectué le traitement des cellules le jour de l'implantation, au moment de la mise en suspension des cellules dans le Matrigel® (E10, Figure 55). Le suivi macroscopique des tumeurs a été réalisé quotidiennement jusqu'à T7. J'ai ensuite prélevé des tumeurs à T1, T4 et T7 pour les peser, ainsi qu'à T4 et T7 pour effectuer une analyse histologique. Je n'ai pas réalisé d'analyses histologiques sur les tumeurs à T1 puisqu'à ce stade (le lendemain du traitement) le cisplatine n'a pas encore d'effet sur les cellules Huh6.

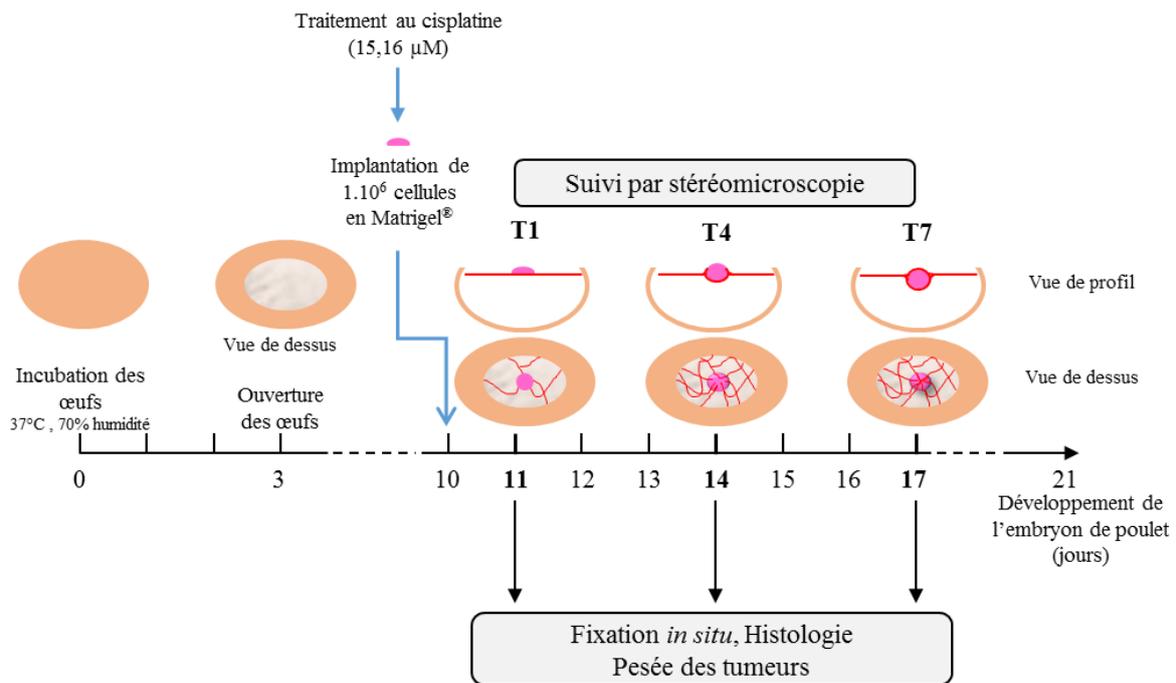


Figure 55 : Frise chronologique reflétant les étapes pour l'analyse des effets de la chimiothérapie au cisplatine sur les nodules tumoraux formés par les cellules Huh6 sur la CAM

Le jour d'incubation des œufs correspond à leur premier jour de développement (E0 pour Embryon 0). A E10, 1.10⁶ de cellules Huh6 ont été traitées avec 15,16µM de cisplatine et implantées sur la CAM (voir Matériels et méthodes). Le suivi macroscopique en lumière blanche a été réalisé à partir du lendemain de l'implantation des cellules Huh6 (E11/T1) pendant sept jours (E17/T7). Des CAM contenant les masses de cellules Huh6 ont été prélevées à T1, T4 et T7 pour les peser. D'autres CAM ont été fixées à T4 et à T7 pour analyser leur composition cellulaire par des analyses histologiques.

Le suivi macroscopique montre que les tumeurs de cellules Huh6 traitées au cisplatine ont plus de difficultés à se développer que les cellules non traitées (Figure 56). A T1 (Figure 56, panel de gauche), nous n'observons pas de différences entre les cellules implantées non traitées et traitées. A T4 (Figure 56, panel du milieu), les tumeurs non traitées commencent à être vascularisées et à être recouverte par la CAM. Les tumeurs traitées au cisplatine commencent également à être vascularisées, mais nous observons un blanchiment sur le dessus. Ce blanchiment est observé sur la plupart des tumeurs traitées, il pourrait correspondre à la nécrose des cellules induite par le traitement au cisplatine. Enfin, à T7 (Figure 56, panel de droite), les tumeurs non traitées sont entièrement vascularisées et ont pénétré dans la CAM. En revanche les tumeurs traitées sont vascularisées seulement en périphérie, montrant que les cellules Huh6 ont plus de difficultés à survivre et à attirer les vaisseaux du poulet. Un blanchiment est observé sur le dessus des tumeurs, comme à T4, mais il s'étend plus en profondeur.

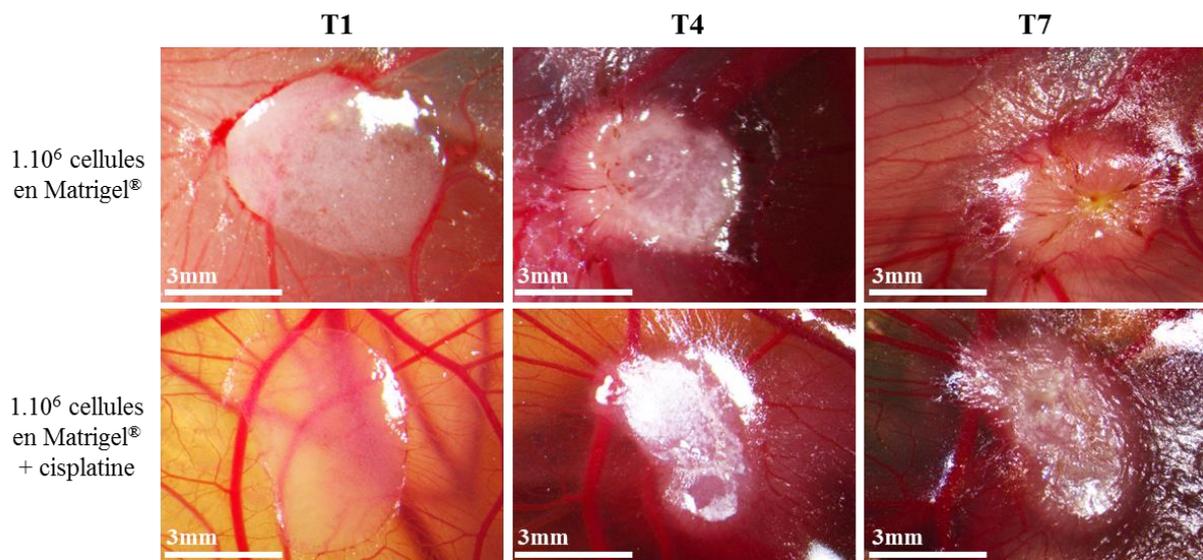


Figure 56 : Suivi macroscopique du développement des nodules tumoraux formés par les cellules Huh6 non traitées et traitées au cisplatine

L'analyse histologique (Figure 57) montre que les tumeurs formées par les cellules Huh6 traitées au cisplatine sont plus petites (environ 1,5mm) et surtout moins épaisses que les tumeurs formées par les cellules non traitées (environ 250µm comparé à 500µm). Ces données indiquent que le cisplatine a empêché le développement du nodule malgré la vascularisation en périphérie de la masse cellulaire.

A T4 (Figure 57, panels de gauche), en présence de cisplatine, nous observons une forte quantité de collagène du côté exposé à l'air. Il pourrait s'agir de restes de Matrigel® ou de collagène produit par les cellules humaines ou du poulet. En effet, la nécrose des cellules peut conduire à une fibrose dont une des caractéristiques est l'expression de collagène. Dans la condition traitée au cisplatine, la proportion de cellules par rapport au stroma est fortement inférieure à celle des cellules non traitées. L'aspect des cellules est difficile à déterminer car elles sont très abîmées.

A T7 (Figure 57, panels de droite), en présence de cisplatine, nous observons la formation d'un stroma tumoral avec l'apparition de vaisseaux sanguins du poulet et de fibroblastes, confirmant la vascularisation de la masse tumorale. L'apparition de plasmocytes et des lymphocytes montrent une réaction immunitaire de l'hôte. Comme dans la condition sans cisplatine, les cellules ont un aspect plutôt biliaire avec des noyaux très nucléolés comme dans les HBL, mais elles sont très abîmées.

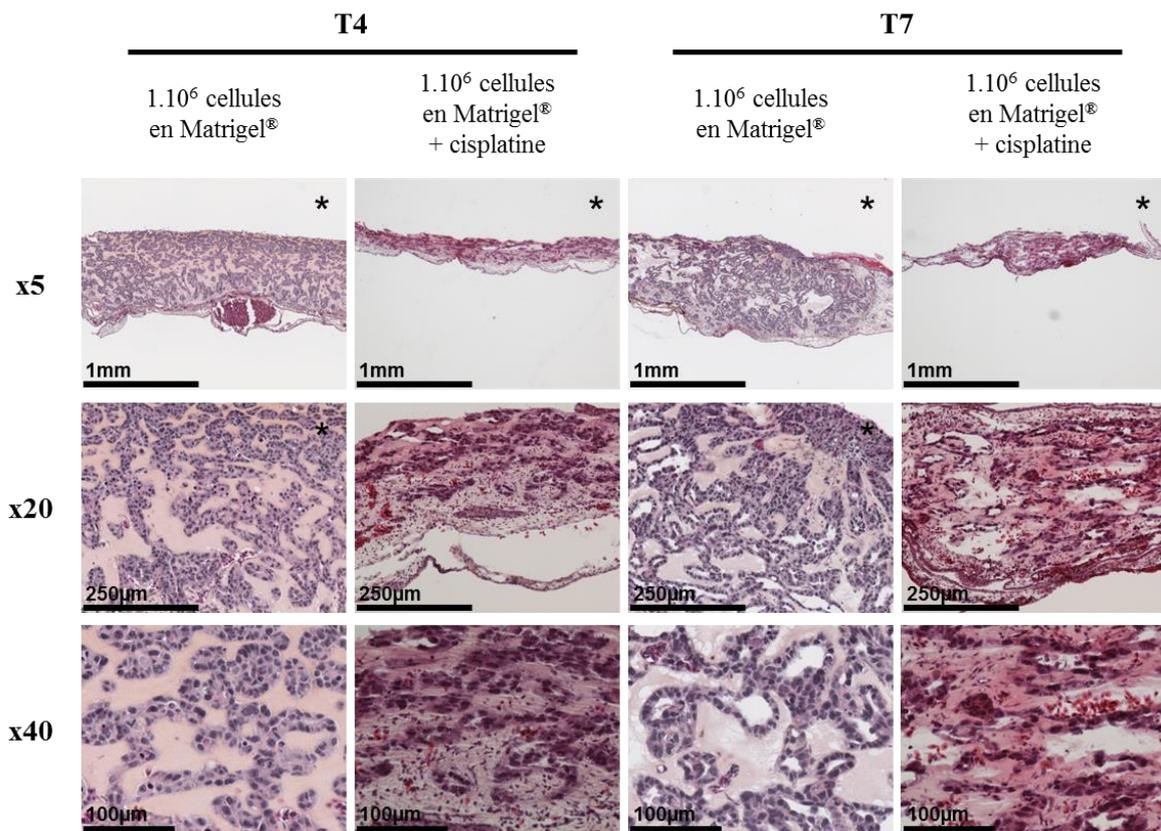


Figure 57 : Organisation des nodules tumoraux formés par les cellules Huh6 non traitées et traitées au cisplatine

1.10⁶ de cellules ont été traitées ou non au cisplatine et implantées sur la CAM en Matrigel®. Les nodules tumoraux ont été prélevés à T4 et T7 et des sections frontales de 5µm d'épaisseur ont été réalisées. Ces sections ont été colorées au HES. L'étoile (*) indique le côté externe de la CAM où les cellules ont été déposées. L'objectif utilisé est indiqué à gauche.

La pesée des tumeurs à T1, T4 et T7 montre une augmentation légère du poids des tumeurs non traitées au cours du développement (Figure 58, barres blanches). Au contraire, le poids des tumeurs traitées au cisplatine diminue de presque 20% entre T1 et T4 (Figure 58, barres grises). En effet, les tumeurs pèsent en moyenne de 15,6 mg à T1 et 12,6 mg à T4. A T7, le poids des tumeurs traitées au cisplatine reste stable par rapport à T4 montrant qu'il n'y a pas de reprise de la progression tumorale.

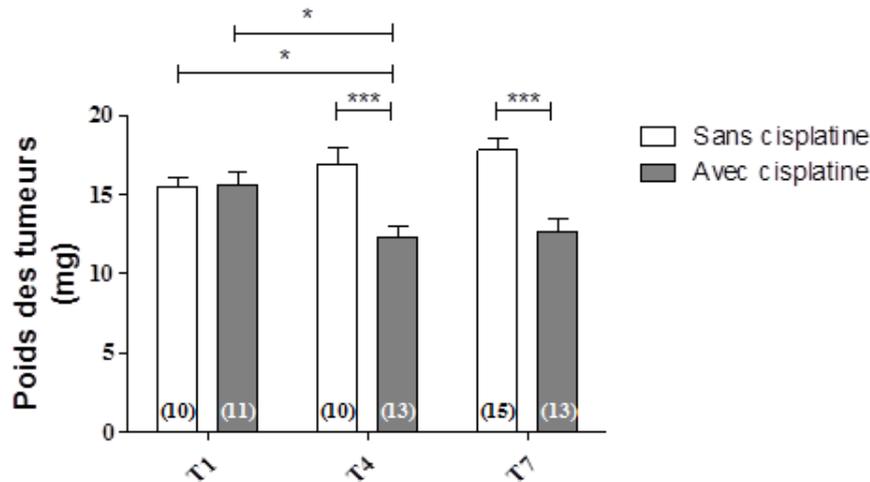


Figure 58 : Evolution du poids des tumeurs formées par les cellules Huh6 non traitées et traitées au cisplatine

Les masses tumorales formées par les cellules Huh6 non traitées et traitées au cisplatine ont été prélevées. Après avoir éliminé l'excès de membrane autour des masses, elles ont été pesées avec une balance de précision. Le nombre total de tumeurs pesées par condition est indiqué entre parenthèses à la base de chaque barre. Les barres représentent la moyenne \pm ES (Erreur standard) (n=3, ANOVA $p < 0.0001$). * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$.

L'état et la petite taille des tumeurs (Figure 57) ainsi que la perte de masse tumorale observés (Figure 58) illustrent une diminution de la quantité de cellules dans les tumeurs traitées au cisplatine. Cette diminution peut être la conséquence de l'arrêt de la prolifération cellulaire et/ou de la mort des cellules, j'ai donc étudié ces processus par immunohistochimie.

Tout d'abord, l'anticorps anti-Ki67 utilisé ne marque pas les cellules du poulet (données non montrées). Le marquage nucléaire de Ki67 montre clairement une plus faible quantité de cellules humaines dans les tumeurs traitées au cisplatine en comparaison avec les tumeurs non traitées (Figure 59). Le pourcentage de cellules humaines par rapport aux cellules du poulet est très faible dans ces tumeurs. A T4 (Figure 59, panels de gauche), la plupart des cellules humaines expriment le marqueur Ki67 dans les deux conditions. A T7 (Figure 59, panels de droite), presque la totalité des cellules Huh6 non traitées expriment Ki67. En revanche, beaucoup moins de cellules expriment ce facteur de prolifération dans les tumeurs traitées au cisplatine, et l'intensité du marquage est plus faible.

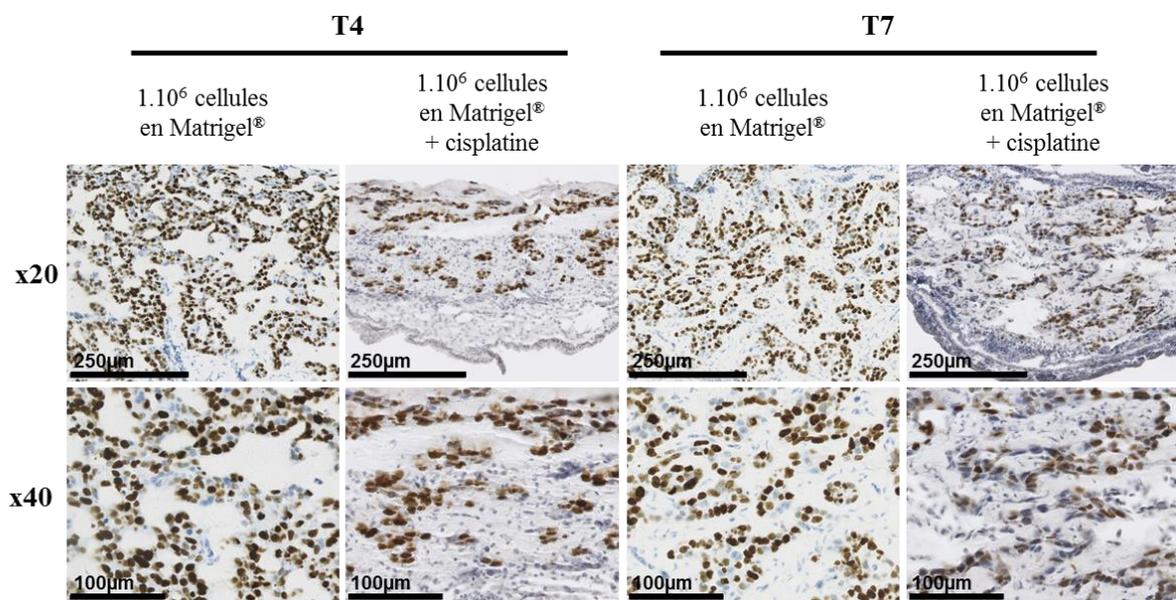


Figure 59 : Expression du marqueur de prolifération Ki67 dans les tumeurs formées par les cellules Huh6 non traitées et traitées au cisplatine

Ki67 a été marqué par immunohistochimie à T4 et T7 dans les nodules tumoraux de cellules Huh6 non traités et traités au cisplatine. L'objectif utilisé est indiqué à gauche.

La Caspase-3 est une enzyme de la famille des protéases. Son activation, contrôlée par son clivage, induit la mort cellulaire par apoptose. J'ai réalisé le marquage spécifique de la forme activée de la Caspase-3 dans les échantillons issus de tumeurs non traitées et traitées au cisplatine (Figure 60). L'anticorps anti-caspase 3 utilisé ne réagit pas avec les cellules du poulet (données non montrées). Nous remarquons une expression très faible de la Caspase-3 activée dans les cellules tumorales non traitées à T4 (Figure 60, panel de gauche). Cette expression est plus forte dans certaines cellules à T7 (Figure 60, panel de droite), montrant le

déclenchement d'une légère apoptose à ce stade de développement. En revanche, l'expression de la Caspase-3 activée est beaucoup plus intense dans les cellules Huh6 traitées au cisplatine à T4, ainsi qu'à T7. A T4 (Figure 60, panel de gauche), son expression est cytoplasmique alors qu'à T7 (Figure 60, panel de droite) elle est devenue nucléaire. Cette localisation reflète le déroulement du processus apoptotique. En effet, lors de son activation la Caspase-3 est localisée dans le cytoplasme, puis elle est transloquée dans le noyau lors de l'activation de l'apoptose (Kamada et al., 2005).

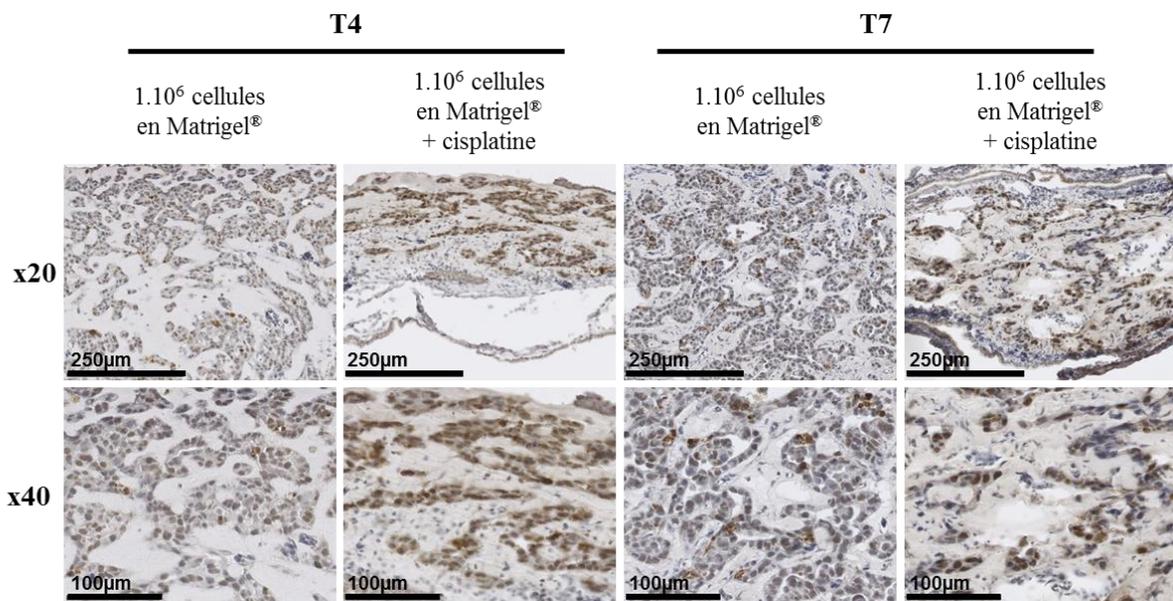


Figure 60 : Expression du marqueur apoptotique Caspase-3 activée dans les tumeurs formées par les cellules Huh6 non traitées et traitées au cisplatine

La Caspase-3 activée a été marquée par immunohistochimie à T4 et T7 dans les nodules tumoraux de cellules Huh6 non traités et traités au cisplatine. L'objectif utilisé est indiqué à gauche.

Ainsi, un traitement unique des cellules Huh6 au cisplatine conduit à la formation de masses tumorales peu développées et constituées de cellules très abîmées sur la CAM. L'activité proliférative des cellules Huh6 diminue au cours du temps en association avec l'activation de l'apoptose sept jours après le traitement. Ces données démontrent l'utilité et l'intérêt du modèle *in vivo* d'implantation des cellules Huh6 dérivées d'HBL pour tester l'effet de molécules thérapeutiques.

4. Résultats préliminaires de l'implantation d'un modèle PDX dérivé d'HBL sur la CAM de poulet

Dans le but d'utiliser le modèle CAM pour l'implantation d'autres lignées cellulaires dérivées d'HBL ou pour l'implantation de pièces opératoires, j'ai commencé la mise au point de l'implantation d'un modèle de cellules PDX (Patient-Derived Xenograft) nommées HB-214-J sur la CAM. Les PDX sont souvent utilisées pour des études *in vivo* (voir section I.4).

Comme pour la lignée cellulaire Huh6 (voir Projet 1, section 1), j'ai testé l'implantation des cellules HB-214-J avec et sans Matrigel[®] ainsi qu'avec différentes quantités de cellules (Figure 61). J'ai suivi la même frise chronologique que pour la mise au point de l'implantation des cellules Huh6 (Figure 25).

Tout d'abord, nous observons que l'implantation de $0,5 \cdot 10^6$ de cellules HB-214-J sans Matrigel[®] (Figure 61A, panel du haut) conduit à la formation d'aucune masse tumorale. En effet, jusqu'à T7 l'anneau semble vide. L'implantation d' $1 \cdot 10^6$ de cellules dans cette condition (Figure 61A, panel du milieu) conduit au développement d'un tapis de cellules entre T1 et T4. Ce tapis est encore plus développé à T7 où la couche cellulaire sur la CAM semble être plus épaisse, mais ne permet pas la formation d'une masse tumorale. En revanche, l'implantation de $2 \cdot 10^6$ de cellules (Figure 61A, panel du bas) conduit à la formation d'une masse plus compacte, notamment dans la partie inférieure gauche de l'image représentative (Figure 61A, panel du bas, T7). Nous observons la présence de vaisseaux sanguins du poulet autour de cette masse et de plusieurs zones de saignement dans l'anneau. Ces images montrent que les cellules HB-214-J semblent pouvoir former une masse tumorale en absence de Matrigel[®] lorsqu'au minimum $2 \cdot 10^6$ de cellules sont implantées.

Dans la condition d'implantation en présence de Matrigel[®] (Figure 61B), l'implantation de $0,5 \cdot 10^6$ de cellules HB-214-J (Figure 61B, panel du haut) conduit à la formation d'une masse qui sèche au cours du temps. Ainsi, malgré la présence de Matrigel[®], les cellules meurent après leur dépôt sur la CAM. Lorsque $1 \cdot 10^6$ de cellules HB-214-J sont implantées (Figure 61B, panel du milieu), nous observons la formation d'une petite masse ronde à T4. Cette masse a grossi à T7 et elle s'est vascularisée dans la zone inférieure droite de l'image représentative (Figure 61B, panel du milieu, T7). Cependant, ce nodule est plutôt transparent et ne semble donc pas être constitué de beaucoup de cellules. Cette caractéristique pourrait correspondre au développement d'un œdème. La condition d'implantation avec $2 \cdot 10^6$ de cellules en présence de Matrigel[®] (Figure 61B, panel du bas) permet la formation d'une

masse tumorale opaque et vascularisée en périphérie. Cette masse ressemble aux nodules formés par les Huh6 en présence de Matrigel® avec 1.10^6 de cellules. Nous observons un blanchiment sur le dessus de la masse tumorale correspondant peut être à un début de nécrose.

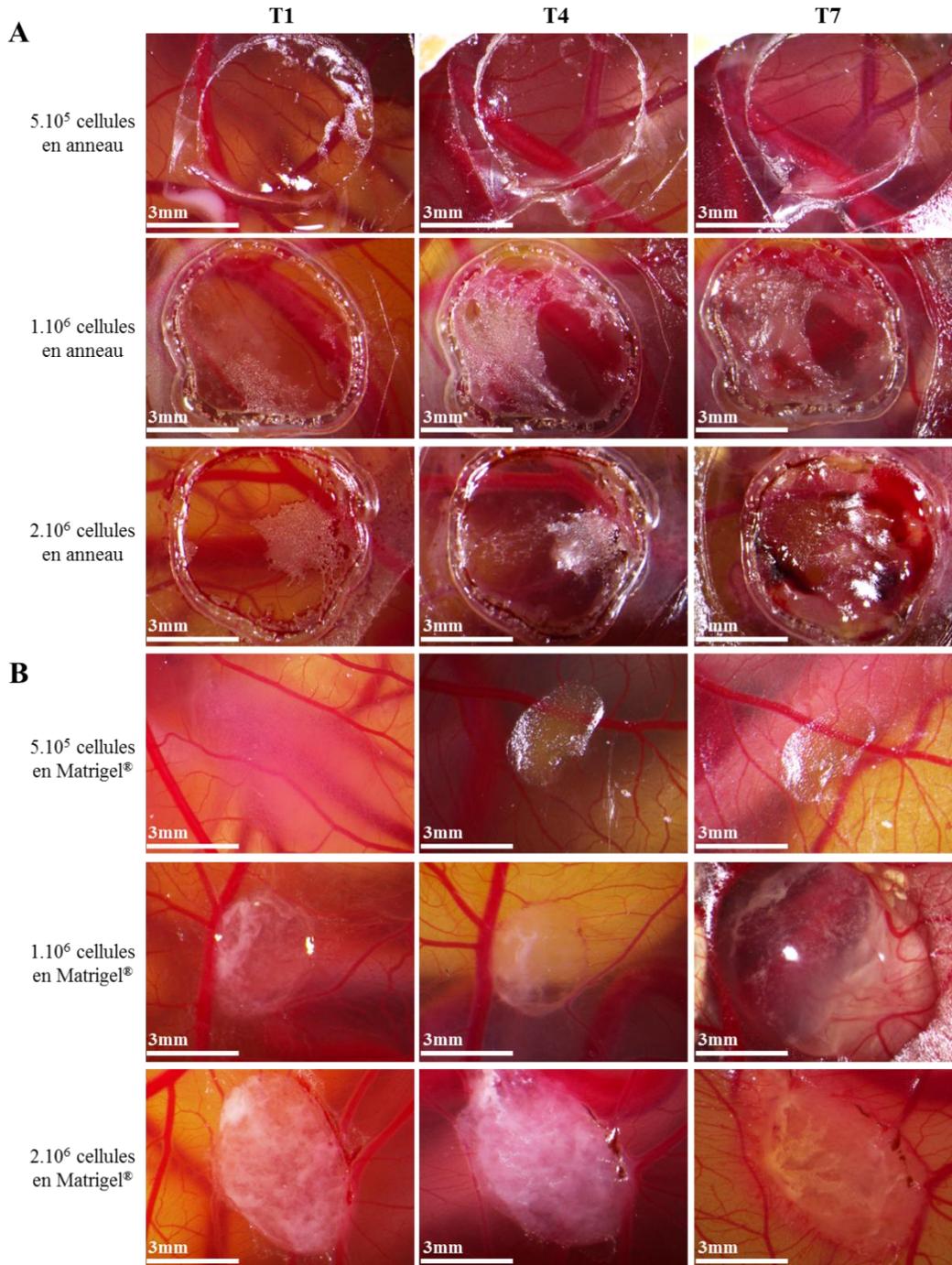


Figure 61 : Suivi macroscopique des masses tumorales formées par les cellules HB-214-J implantées sur la CAM

$0,5.10^6$, 1.10^6 ou 2.10^6 de cellules HB-214-J ont été déposées sur la CAM de poulet à E10 (T0) dans des anneaux en plastique (A) ou incluses en Matrigel® (B). Le devenir des cellules a été suivi tous les jours par stéréomicroscopie en lumière blanche, de T1 à T7. La présence de sang autour de certains nodules est une conséquence de la légère lacération de la CAM lors de l'implantation.

Ainsi, les cellules PDX HB-214-J semblent pouvoir s'implanter sur la CAM dans des conditions similaires aux cellules Huh6. Il est possible que ces cellules n'aient pas besoin de l'apport d'une matrice extracellulaire pour survivre et former une tumeur *in vivo*. Il semble nécessaire d'implanter plus de $2 \cdot 10^6$ de cellules. Ce nombre de cellules HB-214-J permet dans les deux conditions le développement d'une masse tumorale plus importante et vascularisée. Des tests supplémentaires devront être réalisés afin de déterminer plus précisément les conditions optimales d'implantation. Ces résultats montrent que les cellules dérivées d'HBL sont compatibles avec le modèle de xénogreffe, permettant d'envisager des tests de molécules thérapeutiques à plus grande échelle sur ce modèle.

CONCLUSION ET DISCUSSION

Dans ce travail, j'ai montré la capacité de la lignée cellulaire Huh6 à former des nodules tumoraux *in vivo* lorsqu'elles sont implantées sur la CAM de poulet. Au cours du développement du nodule, les cellules prolifèrent et passent d'un aspect hépatocytaire à un aspect biliaire, gardant cependant un caractère très immature. Elles adoptent une organisation trabéculaire creusée d'une lumière, caractéristique des cellules hépatiques. En parallèle, elles sur-expriment des gènes impliqués dans la différenciation cellulaire et dans les voies de production, de transport et de relargage des lipides. Cependant, ni bile, ni lipides ne sont observés au sein des nodules tumoraux. Les nodules formés par les cellules Huh6 sont vascularisés par les vaisseaux sanguins du poulet. Ce réseau vasculaire permet le transport des déchets, mais aussi de l'oxygène et des nutriments nécessaires à l'embryon de poulet pour son développement. Les cellules Huh6 attirent ces vaisseaux autour mais également à l'intérieur du nodule pour y puiser les ressources nécessaires à leur fonctionnement et à leur survie. Des fibroblastes et des cellules inflammatoires de poulet apparaissent dans certaines tumeurs. La formation des nodules tumoraux aboutit également à un retard de développement de la CAM sous-jacente. De plus, j'ai démontré l'efficacité de ce modèle pour tester l'impact de molécules thérapeutiques sur les cellules dérivées d'HBL. Le traitement chimiothérapeutique des cellules Huh6 au cisplatine permet d'inhiber la prolifération cellulaire, le développement tumoral et d'activer l'apoptose des cellules cancéreuses. Enfin, j'ai montré qu'il était possible d'implanter sur la CAM d'autres cellules issues d'un patient présentant un HBL.

- **L'importance de l'apport d'une matrice extracellulaire**

Lors de la mise au point de l'implantation des cellules Huh6 sur la CAM (voir section 1), nous avons montré que la présence d'une matrice extracellulaire était nécessaire à la formation d'un nodule tumoral. Nous avons utilisé une matrice appelée Matrigel[®]. C'est un extrait protéique issu de la matrice extracellulaire de la lignée de sarcome EHS (Engelbreth-Holm-Swarm) implantée chez la souris. L'utilisation de cette matrice extracellulaire améliore l'adhésion des cellules. Elle permet aux cellules Huh6 de survivre, de proliférer, de s'organiser en structures trabéculaires sur la CAM, notamment grâce à la présence de facteurs de croissance. Cependant, nous avons utilisé du Matrigel[®] réduit en facteur de croissance. Cette matrice permet de favoriser la différenciation et l'organisation des cellules Huh6 sur la

CAM, mais ce n'est pas elle qui leur confère ces propriétés. Elle sert d'échafaudage structural aux cellules Huh6, leur permettant d'améliorer leur survie sur la CAM et de faciliter leur transformation.

- **Choix de la lignée cellulaire Huh6**

Une lignée cellulaire ne peut pas représenter les HBL de manière générale. En effet, comme discuté en introduction (voir section I), les HBL sont des tumeurs extrêmement hétérogènes. Une majorité des HBL sont dérivés d'un précurseur hépatique et récapitulent les différentes étapes de développement du foie (López-Terrada et al., 2014). Ils ne sont pas composés d'un type cellulaire unique (Weinberg and Finegold, 1983), mais la plupart sont constitués de cellules épithéliales (López-Terrada et al., 2014). Certains HBL contiennent également des composantes non épithéliales, ils sont appelés mixtes ou tératoïdes (López-Terrada et al., 2014 ; Manivel et al., 1986). Nous avons choisi d'effectuer les premières analyses d'implantations de cellules dérivées d'HBL sur le modèle *in vivo* de CAM de poulet en utilisant la lignée cellulaire Huh6. Cette lignée, de nom complet Huh6 clone-5, a été isolée à partir d'un HBL mixte chez un enfant masculin âgé d'un an (Doi, 1976). Les cellules Huh6 ont une morphologie épithéliale. Comme la plupart des cellules dérivées d'HBL, ces cellules ont une mutation ponctuelle hétérozygote dans le gène *CTNNB1*. Cette mutation conduit à l'expression d'une protéine β -caténine mutée dans l'exon 3, à proximité des sites de phosphorylation par le complexe de dégradation (voir section II.2). Par conséquent, ce variant de la β -caténine est moins dégradé et s'accumule dans le cytoplasme et dans le noyau des cellules (Figure 36 ; de la Coste et al., 1998). Cette lignée est largement utilisée dans les études *in vitro* et *in vivo* de l'HBL (Cairo et al., 2008 ; Ellerkamp et al., 2011 ; Eicher et al., 2013).

- **Evolution de la CAM au cours de l'embryogenèse et influence des cellules Huh6 de E11 à E17**

Le développement de la CAM est un processus qui démarre au 3^{ème} jour de développement (E3) et qui est constitué de plusieurs phases (Nowak-Sliwinska et al., 2014). Entre E3 et E10, la CAM est dans un processus de maturation. Les cellules sont dans une phase active de prolifération (Nowak-Sliwinska et al., 2014). Entre E10 et E13, les cellules de la CAM se différencient afin de former un organe respiratoire et protecteur efficace. En parallèle, le réseau vasculaire se développe jusqu'à E13 (Javerzat et al., 2009). Après E13, la

CAM est complètement fonctionnelle, elle continue à acheminer les gaz et les molécules, comme le calcium, nécessaires au développement de l'embryon. De plus, elle s'épaissit, formant une barrière protectrice pour la protection de l'embryon vis-à-vis de l'environnement extérieur.

Les analyses histologiques (section 2.1.1, Figure 31) et moléculaires (section 2.2.2, Figure 40) nous permettent de confirmer le développement de la CAM entre les jours E11 et E17. Au niveau histologique, l'absence de vaisseaux sanguins à E11 et leur présence à E14 et E17 montrent que le réseau vasculaire s'est développé. Les vaisseaux sont plus épais et se sont ramifiés. Entre E11 et E17, nous avons également observé une augmentation de l'expression de gènes impliqués dans l'angiogenèse. Ces données suggèrent que l'angiogenèse continue jusqu'à E17. De plus, la CAM continue sa maturation et sa différenciation entre E11 et E17. En effet, l'expression de plusieurs gènes impliqués dans la différenciation, l'adhésion et la prolifération cellulaires est augmentée. Les cellules de la CAM sur-expriment également de nombreux composants de la matrice extracellulaire. Nous avons montré une diminution de l'épaisseur de la CAM à E17, ainsi qu'une multistratification des membranes externe et interne de la CAM. Ces analyses sont confirmées par l'augmentation de l'expression de gènes impliqués dans la kératinisation. L'ensemble de ces données montre que les processus d'angiogenèse, de développement, de maturation et de différenciation de la CAM ne s'arrêtent pas à E13 mais continuent au minimum jusqu'à E17.

Les cellules Huh6 ont une influence sur le développement de la CAM. Nous avons montré qu'à E11 et E14 le transcriptome de la CAM varie peu en présence de cellules Huh6, comparé aux CAM non implantées. En revanche, à E17, les CAM implantées avec les cellules humaines ont un transcriptome proche des CAM non implantées à E14. Les cellules Huh6 induisent le renforcement de la matrice extracellulaire, l'augmentation des processus d'adhésion et de prolifération, ainsi qu'une augmentation de l'angiogenèse. De plus, l'augmentation de l'expression de certains gènes impliqués dans l'apoptose suggère que les cellules Huh6 pourraient envoyer des signaux aux cellules du poulet pour induire leur mort. En parallèle, les cellules aviaires semblent déclencher une réponse immunitaire à la présence des cellules Huh6. Cette réponse semble très précoce car le système immunitaire n'est normalement actif qu'à partir de E15, mais elle ne semble pas avoir d'impact sur le développement des cellules Huh6. Ces données confirment que les cellules Huh6 sont capables d'influencer le développement de la CAM pour créer un environnement propice au développement du nodule tumoral.

- **Les cellules Huh6, des cellules hépatiques progénitrices**

Comme décrit dans l'introduction (voir section I.3.2), Cairo et ses collaborateurs (2008) ont établi une classification moléculaire des HBL à partir d'une signature de 16 gènes. Les HBL de type C2 sont plus agressifs et ont un pronostic de survie plus mauvais que les HBL de type C1. Leurs profils d'expression sont enrichis en marqueurs spécifiques des cellules progénitrices tels que *AFP*, *KRT19* (CK19) et *TACSTD1* (EpCAM) (Cairo et al., 2008 ; Roskams, 2006). Au contraire, les marqueurs des hépatocytes matures tels que *ALAS1*, *ALDH2* et *UGT2B4* sont moins exprimés dans les tumeurs de type C2 que dans celles de type C1. Ces données sont confirmées par des analyses histologiques, montrant que les HBL de type C2 sont majoritairement embryonnaires et/ou fœtaux (López-Terrada et al., 2014). De plus, les HBL de type C2 sont des tumeurs plus prolifératives, comme le montrent l'expression élevée de Ki67 (Cairo et al., 2008). Enfin, elles expriment la β -caténine majoritairement au noyau plutôt qu'au niveau membranaire, montrant une activation excessive de son activité transcriptionnelle, responsable de la tumorigenèse.

L'étude de la signature moléculaire des 16 gènes permettant la classification des tumeurs en C1 ou C2 a montré que les cellules Huh6 ont un profil correspondant aux tumeurs C2 (Cairo et al., 2008). Dans notre modèle d'implantation de cellules Huh6 sur la CAM de poulet, nous observons également l'expression des marqueurs de cellules progénitrices CK19 (Figure 34) et EpCAM (Figure 35). Les cellules Huh6 sont également très proliférantes et expriment constamment le marqueur de prolifération Ki67 au cours du temps (Figure 33). De plus, ces cellules ont initialement un aspect hépatocytaire très immature (Figure 32). Les données de la littérature (Cairo et al., 2008) et les données obtenues dans mes travaux confirment que les cellules Huh6 sont dérivées d'un progéniteur à un stade précoce dans les étapes de développement du foie. Ces cellules reflètent les caractéristiques tumorales des HBL de type C2. De plus, au cours du développement du nodule, l'expression et la localisation de la β -caténine est inchangée. Ainsi, ce modèle permet de tester l'effet de traitements inhibiteurs de la β -caténine dans les HBL.

- **La dédifférenciation des cellules Huh6 en cellules immatures d'aspect biliaire**

Comme je l'ai décrit dans la partie résultat (voir section 2.1.2 ; Figure 32), au cours du développement du nodule tumoral, les cellules Huh6 immatures d'aspect hépatocytaire adoptent un aspect plutôt biliaire et expriment fortement le marqueur de cellules biliaires CK19 à la membrane (Figure 34). Etrangement, au fur et à mesure de cette transformation les cellules Huh6 s'organisent en travées plutôt caractéristiques des hépatocytes matures (Figure 62). La présence de cellules d'aspect biliaire suggère que ces travées pourraient être des canalicules biliaires, mais aucune sécrétion de bile n'y est observée. Afin de poser une hypothèse plus précise sur la transformation de ces cellules, des marquages supplémentaires spécifiques des différents types de cellules hépatiques seront nécessaires, tels que la cytokératine 7 (CK7) ou la vimentine. Une étude a montré la sécrétion de bile par les cellules Huh6 lors de leur maintien prolongé en culture *in vitro* (Amuro et al., 1982). Ces données confirment que les cellules Huh6, qui sont des cellules plutôt hépatocytaires, pourraient se dédifférencier en cellules biliaires lors d'un maintien long en culture ou dans un environnement propice à leur dédifférenciation *in vivo*. Cependant, ces cellules gardent un aspect très immature et ne sont pas capables de se différencier en cellules hépatiques matures.

Au niveau moléculaire, l'expression de nombreux gènes de la famille Hox est augmentée entre les cellules HuH6 *in vitro* et les cellules implantées sur la CAM à T7 (Figure 49). Les gènes HOX codent pour des facteurs de transcription dont les profils d'expression sont spécifiques du développement des organes et des organismes (Mallo and Alonso, 2013). L'expression de cette famille de gènes est caractéristique de l'état immature des cellules Huh6 et de leur transformation au cours de la formation du nodule tumoral sur la CAM. Ces données tendent vers l'hypothèse d'un mécanisme de différenciation ou de dédifférenciation des cellules Huh6.

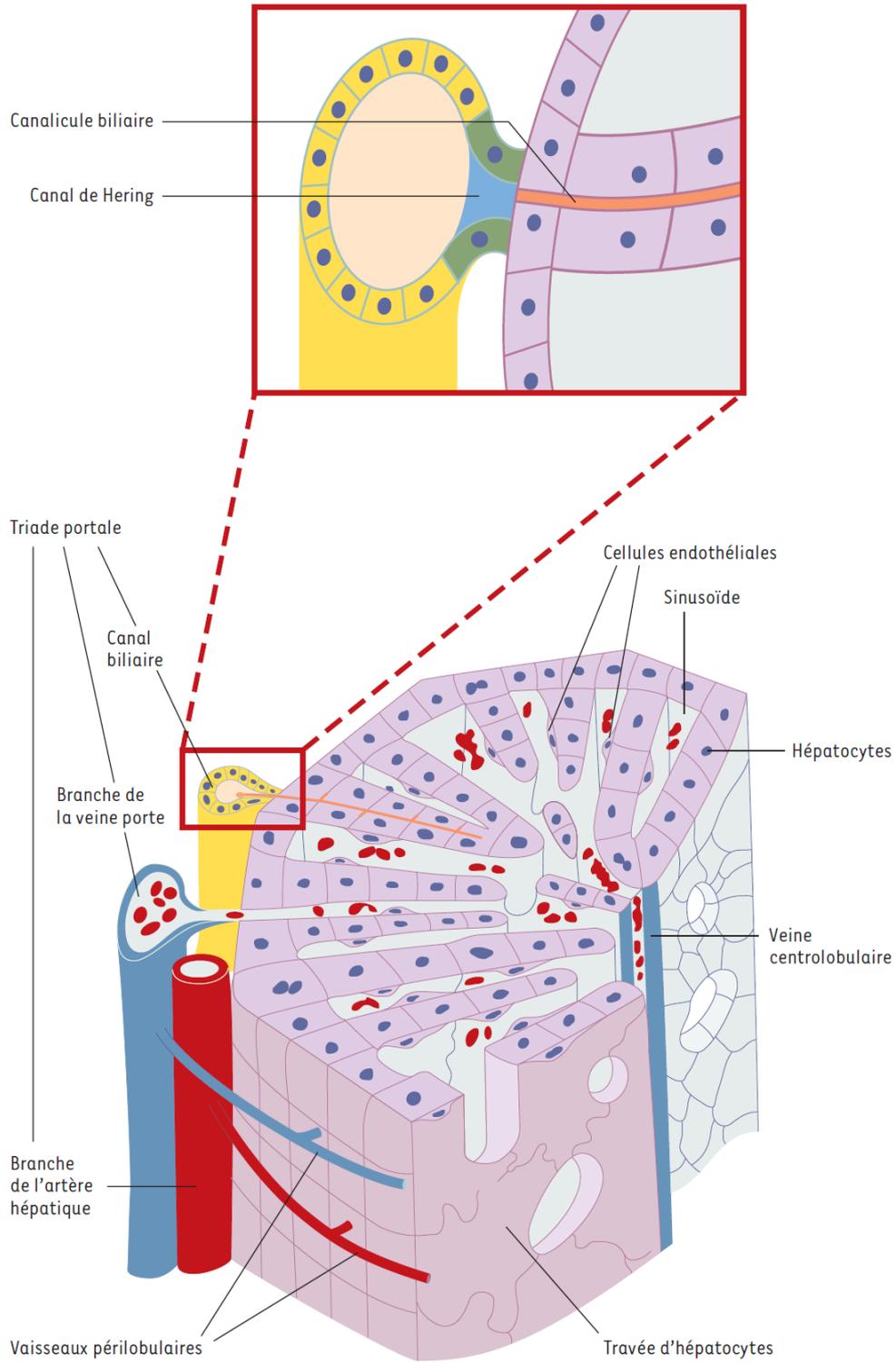


Figure 62 : Représentation tridimensionnelle de l'architecture du parenchyme hépatique (d'après Laperche, 2003)

- **Le traitement des cellules au cisplatine**

Dans ce travail, nous avons analysé l'effet du traitement au cisplatine sur le développement du nodule tumoral. Le cisplatine (CDDP) est la molécule la plus efficace en chimiothérapie dans l'HBL. Il a permis d'améliorer considérablement la survie des patients diagnostiqués pour un HBL (voir section I.2.2.2).

Nous avons précédemment analysé l'effet d'une autre condition de traitement au cisplatine sur les cellules Huh6. Dans cette condition, j'utilisais une dose correspondant à 8 fois l'EC50 (EC50: concentration efficace médiane d'une molécule) de 30,32 μ M que je déposais en goutte sur le nodule tumoral à E12, E13 et E14. Je commençais le traitement à E12 pour que les cellules Huh6 aient le temps de commencer à former le nodule tumoral. Cependant, je n'ai observé aucun effet sur le développement dans ces conditions de traitement (données non montrées). Etant donné que l'embryon de poulet bouge constamment dans l'œuf, la première hypothèse serait que la goutte se soit dispersée et la tumeur ait reçu une quantité insuffisante de cisplatine. La deuxième hypothèse serait que la présence du Matrigel[®] et la conformation en trois dimensions de la tumeur ne permettent pas l'absorption du cisplatine en profondeur du nodule. Une autre hypothèse serait que le traitement à E12 est trop tardif, ne laissant pas le temps au cisplatine d'agir sur les cellules. Ainsi, j'ai utilisé une autre technique d'administration consistant à réaliser un traitement unique à une concentration de 15,16 μ M (4 fois l'EC50). Ce traitement est administré aux cellules le jour de l'implantation, lors du mélange des cellules avec le Matrigel[®]. Ce type d'administration a l'avantage de permettre le contrôle de la concentration exacte de cisplatine administrée. De plus, il permet de mettre le cisplatine au contact de toutes les cellules du nodule. Ce traitement a un effet inhibiteur sur le développement du nodule tumoral. En effet, à E17, les nodules tumoraux traités ont une masse 30% inférieure aux nodules tumoraux non traités. C'est la conséquence d'une diminution de la prolifération cellulaire et d'une activation de l'apoptose. Les cellules Huh6 traitées au cisplatine sont très abîmées, montrant l'effet positif du traitement sur les cellules tumorales. L'efficacité du traitement montre une utilisation possible de ce modèle pour analyser l'effet de molécules thérapeutiques sur les cellules d'HBL. Le traitement comme nous l'avons réalisé à l'implantation n'étant possible que pour les cellules en suspension, il reste nécessaire de déterminer une autre condition d'administration des drogues dans le cas des pièces opératoires fraîches.

Une limite de ce modèle est l'observation à court terme du développement tumoral. En effet, l'implantation des cellules ayant lieu à E10 et l'éclosion à E21, ce modèle permet de suivre le développement tumoral sur 10 jours maximum. Cela est suffisant pour étudier les mécanismes de dédifférenciation et de progression tumorale. Cependant, ce délai est insuffisant pour étudier l'effet d'un traitement à long terme. Comme nous l'avons observé, le traitement au cisplatine conduit au blocage de la prolifération cellulaire, à l'activation de l'apoptose et à la diminution de la taille des tumeurs, mais nous ne savons pas si à plus long terme le traitement permet d'éradiquer la tumeur formées dans ce modèle.

- **L'implantation d'un autre modèle de cellules dérivées d'HBL**

Pour aller plus loin, j'ai également testé l'implantation de cellules PDX (HB-214-J) provenant d'HBL sur la CAM de l'embryon de poulet. Ces données sont préliminaires et je n'ai pas récupéré les masses formées par les HB-214-J pour réaliser des analyses histologiques et moléculaires.

Les cellules HB-214-J sont issues d'une tumeur primaire d'HBL diagnostiquée chez un enfant de deux ans et demi. Cette tumeur a été classée en stade PRETEXT II (voir section I.2.1.2 et Figure 3), correspondant à un HBL de risque standard. Cependant, une invasion du réseau vasculaire, la présence de nodules multiples et de métastases ont été observées chez ce patient. De plus, le niveau d'AFP était élevé avant la chimiothérapie. Au niveau histologique, c'était un HBL de type épithélial mixte (40% embryonnaire, 60% fœtale). D'après la classification moléculaire de Cairo et al. (2008), cette tumeur est de type C1 (voir section I.3.2), mais elle est très proche des cellules Huh6 qui sont de type C2 (Cairo et al., 2008). Notamment, nous avons observé une forte expression des marqueurs de prolifération, dont *TOP2A* (données non montrées et non publiées faisant partie d'un autre projet de l'équipe). Une délétion hétérozygote dans le gène *CTNNB1* a été identifiée dans ces cellules, et confirmée par notre équipe par séquençage ARN (données non montrées). Elle conduit à l'expression d'une version de la β -caténine déléetée de l'exon 3, et qui s'accumule certainement dans le cytoplasme et/ou le noyau de ces cellules.

De manière surprenante et contrairement aux Huh6, les cellules HB-214-J ne semblent pas avoir besoin d'être implantées en présence de Matrigel[®] pour survivre et proliférer sur la

CAM. Cependant, sans matrice extracellulaire elles ne forment pas de masse tumorale vascularisée. L'ajout de Matrigel[®] permet la formation de masses qui semblent se comporter comme les tumeurs formées par les cellules Huh6 et qui sont vascularisées. Ces données sont cohérentes avec la proximité moléculaire entre les HB-214-J et les Huh6. Contrairement aux cellules Huh6 dont l'implantation d' 1.10^6 de cellules permettait la formation d'un nodule tumoral vascularisé, au moins 2.10^6 de cellules HB-214-J doivent être implantées pour permettre le développement d'une masse tumorale. Des analyses complémentaires seront nécessaires pour confirmer et caractériser l'implantation de cellules dérivées de patients sur la CAM.

Ces travaux montrent que les cellules tumorales dérivées d'HBL s'implantent facilement sur la CAM et que l'environnement est permissif pour leur prolifération cellulaire. Cela permet d'envisager l'implantation d'autres cellules PDX et de pièces opératoires fraîches de tumeurs d'HBL afin de mieux étudier les caractéristiques des HBL et de tester l'impact de molécules thérapeutiques sur leur développement.

La cinétique de développement de la CAM et de l'implantation des cellules nécessite une organisation particulière pour recevoir les pièces tumorales lorsque l'embryon est à 10 jours de développement. Ainsi, la planification de l'implantation de pièces tumorales fraîches requiert une étroite collaboration entre les chirurgiens et les chercheurs et reste à mettre au point.

En conclusion, la CAM est un tissu sur lequel il est possible d'implanter des cellules issues de lignées bien établies ou dérivées de patients (PDX). Les données obtenues dans ce travail montrent que ce modèle est très utile pour des études *in vivo* rapides, relativement faciles à mettre en place et peu onéreuses. L'implantation des cellules reflète le développement tumoral *via* l'activation de processus de dédifférenciation et l'induction de changements du microenvironnement stromal favorable à la progression tumorale. A terme, ce type d'étude pourrait permettre d'envisager des études précliniques et la sélection de traitement individualisé pour les différents types d'HBL.

PARTIE 2 :
IDENTIFICATION DE MIARNS REGULATEURS
DE LA β -CATENINE ET DES PROCESSUS
ONCOGENIQUES DANS L'HBL

INTRODUCTION

A ce jour, plusieurs dizaines de miARNs ont été identifiés comme dérégulés dans l'HBL (voir section IV.4.1). Les données sont encore peu nombreuses et très variables d'une étude à l'autre, probablement en raison du faible nombre d'échantillons analysés, de l'hétérogénéité des HBL et des différentes techniques utilisées. Bien qu'intéressants d'un point de vue diagnostique et pronostic, aucun de ces miARNs n'est connu pour cibler et réguler l'expression de la β -caténine dans l'HBL.

Le but de ce travail a été d'identifier les miARNs capables de réguler l'expression de la β -caténine dans l'HBL et ayant un éventuel intérêt thérapeutique dans ce cancer. La plupart des HBL étant caractérisés par une sur-expression de la β -caténine au niveau protéique (voir section II.3), ainsi qu'au niveau ARNm (Figure 63), nous nous sommes plus particulièrement intéressés aux miARNs capables d'inhiber son expression et d'agir comme des suppresseurs de tumeur *in vitro* et *in vivo*.

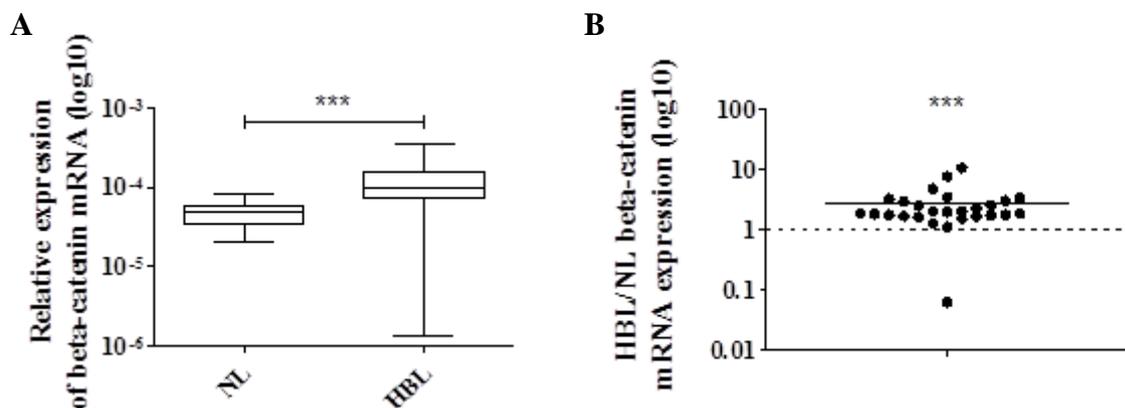


Figure 63 : Expression relative de l'ARNm de la β -caténine dans l'HBL

Niveau d'expression relatif de l'ARNm de la β -caténine dans 36 échantillons d'HBL et 33 échantillons de foies normaux (NL) incluant 27 paires. (A) Les échantillons non-pairés sont représentés sous forme de boîtes à moustache avec les valeurs minimales et maximales. Un *t-test* a été réalisé. (B) Les échantillons pairés sont représentés sous forme de points correspondant au ratio d'expression de la β -caténine dans la tumeur par rapport au NL adjacent dans chaque paire. Les échantillons ne suivent pas une loi normale d'après le test d'Agostino & Pearson. Un *One Sample t-test* a donc été réalisé en comparant les valeurs des ratios à la valeur hypothétique 1. ****p*<0.001.

Afin de sélectionner des miARNs candidats, nous avons réalisé un crible à l'aide d'une banque de 1712 miARNs (Qiagen, miRBase Version 17.0) et d'un système de mesure comparative de la régulation post-transcriptionnelle précédemment développé au laboratoire, le *dual fluorescence (DF)-FunREG system* (Laloo et al., 2009 ; Maurel et al., 2013b). Ce crible est divisé en deux étapes: (i) le crible primaire permet de sélectionner les miARNs candidats d'intérêt qui régulent l'expression de la β -caténine *via* sa 5'NT et/ou sa 3'NT (Figure 64, panel de gauche), (ii) le crible secondaire permet d'éliminer d'éventuels faux-positifs et de déterminer la spécificité d'action sur la 5'NT et/ou la 3'NT des miARNs sélectionnés lors du crible primaire (Figure 64, panel de droite).

Le système (DF)-FunREG est basé sur l'utilisation de lignées cellulaires transgéniques issues des cellules Huh6. Chaque lignée exprime deux transgènes lentiviraux sous le contrôle transcriptionnel du même promoteur constitutif et ubiquitaire EF1 α : le premier est le transgène de **référence**, il exprime la protéine fluorescente Tomato (EF1 α -Tomato) ; le second est le transgène **test**, il exprime la protéine fluorescente GFP sous le contrôle de différentes régions NT de la β -caténine selon l'étape du crible.

Dans le crible primaire (Figure 64, panel de gauche), la lignée cellulaire transgénique utilisée contient le transgène **test** qui exprime la protéine fluorescente GFP sous le contrôle des régions 5'NT et 3'NT de la β -caténine (EF1 α -5'NT β cat-GFP-3'NT β cat). Après transfection des cellules transgéniques avec chacun des miARNs de la banque, les fluorescences des protéines GFP et Tomato sont mesurées. Le rapport d'expression GFP/Tomato est alors calculé pour chaque miARN et comparé à celui d'un petit ARN contrôle négatif (Ctrl). Les différences d'expression par rapport au Ctrl (Fold change ratio [FCR]) permettent d'établir le niveau de régulation de la GFP, reflétant l'effet régulateur de chaque miARN sur les régions NT de la β -caténine. Sur la base d'une baisse du FCR, correspondant à une inhibition des régions NT de la β -caténine, des miARNs candidats ont été sélectionnés pour la suite de l'étude.

Dans le crible secondaire (Figure 64, panel de droite), une première étape consiste à éliminer les éventuels miARNs ayant un effet non spécifique. La lignée cellulaire utilisée pour cette étape contient le transgène **test contrôle** qui exprime la protéine fluorescente GFP sans les régions NT de la β -caténine (EF1 α -GFP). Après transfection des miARNs candidats sélectionnés à l'aide du crible primaire, la fluorescence des deux rapporteurs est mesurée et le FCR est déterminé. Cette étape permet de détecter les miARNs qui ont un effet non

spécifique, et donc, qui induisent une variation du FCR en l'absence des régions NT de la β -caténine.

Dans la deuxième étape du crible secondaire (Figure 64, panel de droite), les lignées cellulaires utilisées pour la détermination de la spécificité des miARNs candidats contiennent le transgène **test** qui exprime la protéine fluorescente GFP sous le contrôle de la région 5'NT de la β -caténine (EF1 α -5'NT β cat-GFP) ou sous le contrôle de la région 3'NT de la β -caténine (EF1 α -GFP-3'NT β cat). Comme pour l'élimination des éventuels miARN non spécifiques, les cellules ont été transfectées par chaque miARN candidat sélectionné à l'aide du crible primaire, puis le rapport d'expression GFP/Tomato et le FCR ont été calculés. Cette étape permet de déterminer si les miARNs candidats ciblent préférentiellement la région 5'NT et/ou la région 3'NT de la β -caténine.

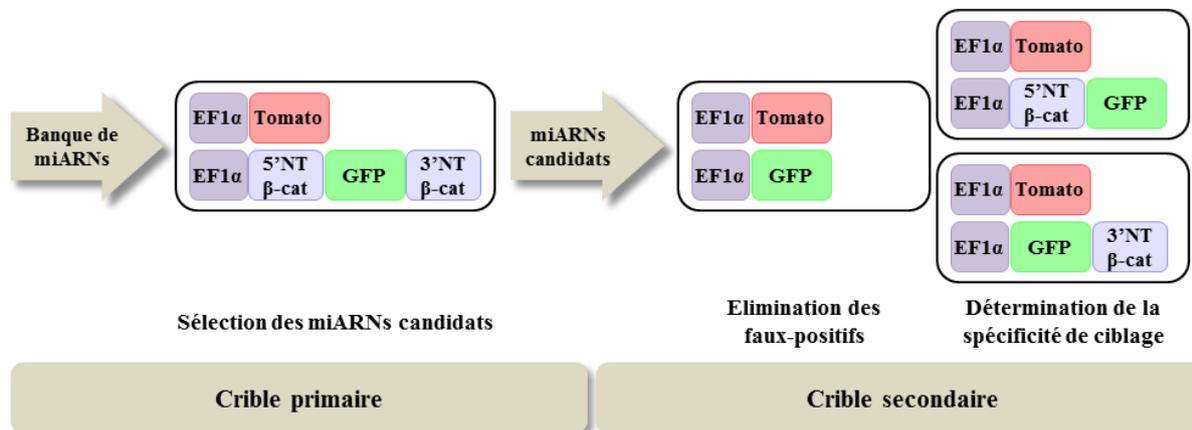


Figure 64 : Stratégie de crible utilisant la méthode (DF)-FunREG

Les plasmides rapporteurs EF1 α -5'NT β cat-GFP-3'NT β cat, EF1 α -5'NT β cat-GFP, EF1 α -GFP-3'NT β cat ont été construits par le Docteur Francis Sagliocco à partir du plasmide « EF1 α -GFP » (ou pL-GFP ; Maurel et al., 2013a). Le plasmide rapporteur EF1 α -Tomato a été construit par le Docteur Marion Maurel, ancienne doctorante de l'équipe (pL-Tomato ; Maurel et al., 2013a). Les lentivirus ont été produits par la Plateforme de Vectorologie de l'Université de Bordeaux et les lignées transgéniques ont été établies par Sarah Lesjean. Le crible primaire de la banque de 1712 miARNs à l'aide des cellules exprimant le transgène de **référence** Tomato et le transgène **test** GFP sous le contrôle des deux régions NT de la β -caténine a été réalisé par Sarah Lesjean et Francis Sagliocco. Sarah Lesjean a ensuite analysé les données du crible primaire et sélectionné les miARNs candidats pour le crible secondaire

qu'elle a réalisé avec l'aide de Francis Sagliocco. Lors de mon arrivée au laboratoire, j'ai travaillé sur les résultats des cribles primaire et secondaire et j'ai redéfini les miARNs que nous allons étudier par la suite. J'ai ensuite vérifié leurs effets sur la β -caténine endogène dans les lignées cellulaires Huh6 et HepG2 dérivées d'HBL. Sarah Lesjean a mesuré l'expression des miARNs candidats dans les échantillons de patients et Francis Sagliocco a mesuré l'expression de la β -caténine dans ces mêmes échantillons. Puis, j'ai réalisé les études fonctionnelles *in vitro* visant à étudier l'impact des miARNs candidats sur la progression tumorale. J'ai également utilisé le modèle décrit dans la Partie 1 : « Elaboration d'un nouveau modèle d'étude de L'HBL *in vivo* » pour valider l'effet du miARN candidat le plus intéressant sur des tumeurs formées par la xéno greffe de cellules dérivées d'HBL dans le modèle animal. Ce travail fait l'objet d'une publication soumise dans un journal scientifique dans laquelle je suis premier auteur.

Les résultats issus de ce projet ont également fait l'objet du dépôt d'une demande internationale de brevet PCT/EP2016/065938 sous priorité de la demande prioritaire EP15 306113.0 aux noms de l'Université de Bordeaux / INSERM / UNIVERSITE PARIS SUD - PARIS XI (Annexe 2). Le titre de cette demande de brevet est « USE OF CATENIN- BETA 1-TARGETING MICRO RNAs FOR TREATING LIVER CANCER ». Je suis associée à ce brevet en tant que co-inventeur.

En parallèle à ce projet, j'ai eu l'opportunité de participer à un autre projet dirigé par le Docteur Christophe Grosset et mené par le Docteur Flora Cartier, une post-doctorante de mon équipe. Ce projet a utilisé la même stratégie expérimentale et visait à identifier des miARNs régulateurs du *GPC3* dans le CHC, ainsi que dans l'HBL. Ce travail fait l'objet d'une publication dans laquelle je suis deuxième auteur et qui est actuellement en révision dans un journal scientifique (Annexe 3).

MANUSCRIT

β -CATENIN-REGULATING MICRORNAS INHIBIT HEPATOBLASTOMA CELL GROWTH THROUGH WNT SIGNALING INACTIVATION

Emilie Indersie^{1,2,3,4}, Sarah Lesjean^{1,2,3,4}, Katarzyna Barbara Hooks^{1,2,3,4}, Francis Sagliocco^{1,2,3,4}, Tony Ernault^{5,6}, Stefano Cairo^{7,8}, Maria Merched-Sauvage⁹, Anne Rullier⁹, Brigitte Le Bail⁹, Sophie Taque¹⁰, Michael Grotzer¹¹, Sophie Branchereau¹², Catherine Guettier¹², Monique Fabre¹³, Laurence Brugières¹⁴, Martin Hagedorn^{1,2,3,4}, Marie-Annick Buendia^{5,6}, Christophe François Grosset^{1,2,3,4}.

Affiliations

¹ University of Bordeaux, Physiopathology of liver cancer, U1053, F-33000 Bordeaux, France.

² University of Bordeaux, Biotherapy of Genetic Diseases, Inflammatory disorders and Cancer, U1035, F-33000 Bordeaux, France.

³ INSERM, Physiopathology of liver cancer, U1053, F-33000 Bordeaux, France.

⁴ INSERM, Biotherapy of Genetic Diseases, Inflammatory disorders and Cancer, U1035, F-33000 Bordeaux, France.

⁵ INSERM, UMR1193, Paul-Brousse Hospital, Hepatobiliary Centre, F-94800 Villejuif, France.

⁶ University Paris Saclay, F-94800 Villejuif, France.

⁷ XenTech, 4 rue Pierre Fontaine, Evry, France.

⁸ LTTA Center, Department of Morphology, Surgery and Experimental Medicine, University of Ferrara, Italy.

⁹ Bordeaux University Hospital, France.

¹⁰ Rennes University Hospital, France.

¹¹ The SIOPEL Liver Tumor and Tissue Banking Program, University Children's Hospital, Zürich, Switzerland.

¹² Bicêtre Hospital, Le Kremlin-Bicêtre, France.

¹³ Necker Hospital, Paris, France

¹⁴ Gustave Roussy Cancer Campus, Villejuif, France.

Corresponding author: Christophe Grosset, INSERM U1035, Biothérapie des Maladies Génétiques, Inflammatoires et du Cancer, Université de Bordeaux, 146, rue Léo Saignat, Bordeaux, France; christophe.grosset@inserm.fr; Tel: +33 557 574 630; Fax: +33 557 571 374.

Key words: liver, cancer, pediatric, hepatoblastoma, screening, microRNA, Wnt signaling, chick chorioallantoic membrane.

Electronic words count: 5991 words from Abstract to Figure Legends

Number of Figures: 7

Conflict of interest: All authors concurred to the submission and the manuscript is not considered for publication elsewhere. The authors declare no conflict of interest with any company or advisory board.

Financial support: This study was supported by grants from the French National Cancer Institute (grant INCa_TRANSLA_2013_209) to CFG, EI and MAB, the French Ministry of Health (grant n°DGOS/PF4/0013/105) to LB, the Fondation pour la Recherche Médicale (grant n°DBI20131228566) to CFG, the Ligue Nationale contre le Cancer (LNCC) to CFG, the Cancéropôle Grand Sud-Ouest to CFG, the French State in the framework of the "Investments for the future" Programme IdEx Bordeaux (grant ANR-10-IDEX-03-02) to KBH and the charity associations Eva Pour La Vie, Aidons Marina, Fondation Flavien and E.S.C.A.P.E. to MH, EI and CFG.

Contributors: FS and SL constructed plasmids and performed the screening. EI, SL, FS and TE performed the cellular and molecular analyses. EI performed *in vivo* and histological analyses. EI and KBH performed bioinformatic and biostatistic analyses. MAB, SC, MF, AR, BLB, LB, ST, SB, CG and MG provided HBL samples and clinical data. CFG, MAB and MH supervised the work. EI, KBH, MH and CFG wrote the manuscript. CFG, KBH, LB and MAB obtained the different grants supporting this work.

Abbreviations: HBL; hepatoblastoma; CTNNB1, catenin-beta 1 (beta-catenin); TCF/LEF, T-cell-specific factor/lymphoid enhancer-binding factor; CCND1, cyclin D1; miRNAs: microRNAs; mRNA, messenger RNA; RISC, RNA-induced silencing complex; UTR, untranslated regions; siRNAs, small interfering RNAs; DF-FunREG, Dual Fluorescence FunREG; NL, normal liver; CAM, chorioallantoic membrane; Ctrl, negative control RNA; FCR, fold change ratio; si- β -catenin, siRNA against beta-catenin.

ABSTRACT

Backgrounds & aims: Hepatoblastoma (HBL) is the most common pediatric liver cancer. In this malignant neoplasm, beta-catenin is a key therapeutic target. However, controlling beta-catenin abundance with therapeutic molecules has been challenging. In this study we aim at identifying microRNAs (miRNAs) that target beta-catenin and block HBL cell proliferation *in vitro* and tumor growth *in vivo*.

Methods: Using the Dual Fluorescence (DF)-FunREG system we screened a library of 1712 miRNA mimics and selected candidates inhibiting CTNNB1 reporter expression through interaction with its untranslated regions (UTR). After validating the regulatory effect of candidate miRNAs on beta-catenin we measured their expression in patient samples and investigated their tumor suppressive roles in HBL cells *in vitro* and *in vivo* using the chick chorioallantoic membrane (CAM) assay.

Results: Let-7i-3p, miR-449b-3p, miR-624-5p and miR-885-5p were identified as negative regulators of beta-catenin in HBL cells. All were significantly decreased in tumor tissue compared to normal liver and inhibited HBL cell growth and Wnt signaling activity *in vitro*, partly through beta-catenin down-regulation. Additionally, miR-624-5p induced cell senescence *in vitro*, blocked experimental HBL growth *in vivo* and directly targeted the 3'-UTR of the three beta-catenin mRNA variants.

Conclusion: Our results shed light on how beta-catenin-regulating miRNAs control HBL progression through Wnt signaling inactivation. In particular, miR-624-5p constitute a promising candidate for miRNA-replacement therapy for HBL patients.

Lay summary:

Our work led to the identification of four miRNAs regulating beta-catenin in hepatoblastoma cells and acting as tumor suppressors. MiR-624-5p, which was particularly efficient in blocking HBL cell proliferation and tumor growth, is a good candidate for the treatment of pediatric patients with primary liver cancer.

INTRODUCTION

Hepatoblastoma (HBL) is the most common pediatric liver cancer and develops in a histologically normal liver [1]. HBL is classified into several histological subtypes which recapitulate different stages of liver development [2, 3]. Chemotherapy associated with tumor resection or liver transplantation is the cornerstone of HBL treatment, resulting in a five-year patient survival of over 80% [1, 4]. Cisplatin used alone or in combination with carboplatin or doxorubicin is generally effective except for chemoresistant tumors. However, high-dose chemotherapy in developing children causes severe side effects resulting in deafness and cardiovascular disease [5]. Therefore, new effective and less toxic therapeutics are needed.

HBL is molecularly characterized by a high rate (76-80%) of mutations in exon 3 of *CTNNB1*, encoding for beta-catenin protein. These mutations prevent beta-catenin degradation by the proteasome through phosphorylation-dependent mechanisms [3, 6, 7]. Mutated beta-catenin accumulates in the cytoplasm and translocates into the nucleus where it interacts with T-cell-specific factor/lymphoid enhancer-binding factor (TCF/LEF) and activates the transcription of oncogenes such as *CCND1* and *MYC* [1, 3]. Overactivation of Wnt signaling pathway deregulates basic liver developmental and hepatocyte differentiation, thereby driving HBL progression [3, 8]. Thus, beta-catenin is a key oncogene in HBL, but its druggability remains challenging [8, 9].

MicroRNAs (miRNAs) are small noncoding RNAs that fine-tune gene expression. They guide the association of RNA-induced silencing complex (RISC) with target mRNAs, mostly through interactions with 3'-untranslated region (UTR), resulting in translational repression and mRNA destabilization [10, 11]. Deregulation of miRNA biogenesis and expression is a hallmark of cancer [11] and has been reported in HBL [12-14]. Unlike small interfering RNAs (siRNAs), miRNAs can simultaneously target multiple genes and pathways. This makes them particularly interesting for anti-cancer therapy [10, 11]. Many miRNAs have been reported to target beta-catenin: miR-200a in human meningioma [15], miR-34 in lung and breast carcinomas [16], miR-483-3p in breast and colon cancers [17] and miR-214 in hepatocellular carcinoma [18]. However, it is unknown if one of these miRNAs targets beta-catenin in HBL and no systematic study has been performed to uncover beta-catenin-regulating miRNAs in HBL.

To identify miRNAs targeting beta-catenin we screened a library of 1712 miRNA mimics using our Dual Fluorescence (DF)-FunREG screening system [19]. Then, we validated their regulatory effects on endogenous beta-catenin in the two HBL-derived cell

lines Huh6 and HepG2 [6, 7]. Expression of candidate miRNAs was measured in HBL samples and compared to normal liver (NL). We investigated effects of most relevant miRNAs on HBL cell growth *in vitro* and on a novel *in vivo* HBL tumor model in the chick chorioallantoic membrane (CAM). Our work identified four miRNAs inhibiting the expression and the transcriptional activity of beta-catenin acting as tumor suppressors in HBL cells. The most potent miRNA also presented antitumoral effects *in vivo*, demonstrating its potential as a candidate for miRNA-replacement therapy in HBL patients.

MATERIALS AND METHODS

Liver Samples and Clinical Data

All samples were recruited in accordance with European and French law and institutional ethical guidelines. A set of 69 liver samples (36 HBL and 33 normal liver [NL] samples including 27 pairs of tumor and adjacent NL) was collected from 42 patients treated at French University Hospitals or from the SIOPEL Liver Tumor and Tissue Banking (www.siopep.org).

Cell lines

The HBL-derived HepG2 and Huh6 cells were grown as described before [20, 21]. Additional information can be found in the Supplementary Materials.

Plasmids construction

The lentiviral plasmids pL-GFP and pL-Tomato have been described previously [19]. The lentiviral plasmids pL-GFP-5'UTR-BCAT, pL-GFP-3'UTR-BCAT and pL-GFP-5'+3'UTR-BCAT have been constructed as described in the Supplementary Materials.

Small RNAs, miRNA mimic library and cell transfection

Cell transfection was carried out as described previously [19-21] using the following small RNAs: the Human miScript miRNA Mimic 96 Set (miRBase V17.0) and AllStars Negative control siRNA (Qiagen, Hilden, Germany), the *CTNNB1* small interfering RNA 5' ACCAGTTGTGGTTAAGCTCTT 3' (si β -catenin ; Eurofin MWG Operon, Ebersberg, Germany).

Chick CAM assays

Animal procedures were carried out in agreement with the European (directive 2010/63/UE) and French (decree 2013-118) guidelines. Procedures are described in the Supplementary Materials.

RESULTS

Twenty-six miRNA candidates regulate beta-catenin expression

To identify miRNAs controlling beta-catenin expression through its UTRs in HBL cells we screened a library of 1712 miRNA mimics using the DF-FunREG system (figure 1A, left panel) [19]. This screening allowed the identification of 26 miRNA candidates regulating 5'- and 3'- beta-catenin UTRs by inducing a 42% decreased or more of GFP-5'+3'UTR-BCAT transgene expression compared to control (figure 1B-C, and Supplementary Table S2). This selection comprised miR-885-5p which is decreased in HBL tumors [13] and miR-483-3p which regulates beta-catenin [17]. In a second step we studied the targeting preference of the 26 candidates for the beta-catenin 5'- and/or 3'-UTR using Tomato-positive cells expressing GFP with specific UTRs (figure 1A, right panel and Supplementary figure S1A). Twenty-four miRNAs exerted a specific regulatory effect through beta-catenin 3'-UTR and two targeted beta-catenin 5'- and 3'-UTR (figure 1A, right panel and Supplementary figure S1B). No false-positive hits were detected.

Nine miRNAs regulate beta-catenin expression in HBL cells

Next we assessed the regulatory effect of selected miRNA candidates on endogenous beta-catenin mRNA and protein in Huh6 and HepG2 cell lines (figure 2A-D and Supplementary figures S2, light grey bars) and compared with the effect of Ctrl RNA or si β -catenin (figure 2A-D and Supplementary figures S2, black bars). Although miR-34a-5p and miR-200a-3p were not selected in the screening (FCR = -0.265 and -0.093, respectively) we also evaluated their regulatory activity as they were described as beta-catenin regulators (figures 2A-D and Supplementary figures S2, dark grey bars) [15, 16]. Nine out of 26 miRNA candidates significantly decreased beta-catenin protein expression in Huh6 cells, which carry the beta-catenin missense G34V mutation (figure 2A). Most of them also negatively regulated beta-catenin mRNA level (figure 2B). We then tested the regulatory effects of the nine candidate miRNAs in HepG2 cell line, which carry a deletion in *CTNNB1* exon 3. In these cells the nine miRNAs had also a negative effect on beta-catenin expression, except miR-449b-3p (figure 2C). As the two beta-catenin protein variants can be easily differentiated by immunoblotting in HepG2 cells, we evaluated the effect of candidate miRNAs on each form (Supplementary figure S2). All miARNs efficiently down-regulated wild-type beta-catenin but the deleted form was less responsive to miRNAs, especially with miR-885-5p and miR-

449b-3p. Such small RNA-silencing resistance of deleted beta-catenin was previously described for miR-483-3p [17] and a siRNA against beta-catenin [3]. We speculate that a longer protein half-life could be a reason for a lesser inhibitory effects, since exon 3 deletion allows beta-catenin to escape from proteosomal degradation. This hypothesis is supported by a decrease of total beta-catenin mRNA in HepG2 cells after transfection with miR-548z, miR-5095, miR-624-5p, let-7i-3p, miR-885-5p and miR-581 (figure 2D). In accordance with the screening data, miR-34a-5p and miR-200a-3p had no significant effect on beta-catenin expression in any of the two HBL cell lines (figures 2A-D). Altogether these data lead to the identification of nine miRNAs regulating beta-catenin.

Four beta-catenin-regulating miRNAs are down-regulated in HBL

Next we measured the expression of the nine miRNA candidates in 36 HBL and 33 NL samples comprising 27 pairs of tumor/adjacent NL (figure 3, Supplementary figure S3A). MiR-34a-5p expression was measured in parallel to assess the relevance of MRX34-based therapy in HBL [11]. As shown in figure 3A, miR-34a-5p was not deregulated in HBL compared to NL and slightly increased in paired samples (Supplementary figure S3A). As supported by a recent report in adult liver cancer [22], a therapy using MRX34 is not applicable to the treatment of patients with HBL. Among the nine beta-catenin-regulating miRNAs, miR-581, miR-1205 and miR-492 were not detected in liver tissues and miR-548z and miR-5095 were not deregulated in HBL compared to NL (figure 3A, Supplementary figure 3A). Contrarily, miR-624-5p, let-7i-3p, miR-885-5p and miR-449b-3p were down-regulated in tumors (figure 3A) supporting previous result for miR-885-5p [13]. Relating miRNAs expression to the clinical information we noticed that low expression of miR-885-5p was correlated with the presence of multiple nodules and an advanced stage of the disease (figure 3B) suggesting this miRNA expression could be a prognostic factor. We also confirmed the overexpression of beta-catenin mRNA in HBL described by Cairo et al. [3] and showed that the three 3'-UTR alternatively spliced isoforms [23] are equally affected in tumors (Supplementary figures S3B and S3C). None of four decreased miRNAs inversely correlated with the level of total beta-catenin mRNA (Supplementary figure S4A) or of any of its 3'UTR variants (data not shown) in HBL tissues. However, miR-885-5p inversely correlated with beta-catenin mRNA level in tumors carrying a deletion in *CTNNB1* exon 3 (Supplementary figure S4B). Unfortunately, due to the lack of available tissue samples we were unable to perform correlative analyses between miRNAs expression and beta-catenin

protein amount. Altogether our data showed that beta-catenin-regulating miR-624-5p, let-7i-3p, miR-885-5p and miR-449b-3p are decreased in HBL.

MiR-624-5p, let-7i-3p, miR-885-5p and miR-449b-3p exert an anti-tumoral effect *in vitro*

We investigated the effect of these four beta-catenin-regulating miRNAs on HBL cell proliferation and survival using Huh6 and HepG2 cell lines. All miRNAs blocked HBL cell proliferation through G0/G1 phase elongation and S phase reduction, except miR-449b-3p which displayed lower effects in Huh6 cells (figures 4A and 4B and Supplementary figure S5A and S5B). Patterns of growth inhibition were slightly different between Huh6 and HepG2 cells (figures 4A and 4B, left and right panels respectively). Notably, let-7i-3p modestly inhibited the growth of HepG2 cells (figure 4A, right panel) while it was particularly efficient in Huh6 cells (figure 4A, left panel). Inversely, miR-449b-3p efficiently inhibited the growth of HepG2 cells, while it had a modest effect on Huh6 cell growth. Although the increase in the percentage of HepG2 cells in G0/G1 phase was not significant (figure 4B, right panel and Supplementary figure S5B), these data are in agreement with the cell growth inhibition observed with each miRNA (compare figures 4A and 4B, right panels). Absence of significance may be due to the fact that HepG2 cells grow as aggregates and thus, their DNA is less prone to incorporate dyes. Moreover, these cells display a longer doubling time than Huh6 cells (compare left and right panels in figure 4B) [24]. Beta-catenin is the main effector of the Wnt signaling pathway and induces the transcription of numerous oncogenes such as cyclin *DI* when associated to its transcriptional partner TCF4. Thus, we evaluated the effect of the four miRNAs on the transcriptional activity of the Wnt pathway. With the exception of miR-449b-3p in Huh6 cells, all miRNAs strongly inhibited Wnt pathway activity (figure 4C). Interestingly, in both tested HBL cell lines, the pattern of growth inhibition mediated by the four miRNAs was very similar to that observed when measuring Wnt signaling activity (compare Figures 4A and 4C). These data further confirm the key role played by this pathway in HBL cell growth. Moreover, contrarily to Huh6 cells, the growth inhibition mediated by the four miRNAs in HepG2 cells did not fully associate with a corresponding decrease of beta-catenin protein (compare data in figure 4A and figures 2A and C). This was particularly clear for miR-449b-3p, which efficiently inhibited HepG2 cell growth and Wnt pathway activation (Figures 4A and 4C) without affecting total beta-catenin expression (Figures 2C and 2D). These data suggest that other Wnt-associated factors are likely regulated by miR-449b-3p and that the cellular context could influence miRNA

activity. Therefore, identifying these other factors might shed some light on the phenotypical differences observed in these two HBL cell lines following transfection with these miRNAs.

As some miRNAs efficiently inhibited HBL cell growth we hypothesized they could also induce cell death. Unexpectedly, none of them promoted apoptosis of Huh6 cells (figure 4D and Supplementary figure S6). We observed a slight apoptotic activity in beta-catenin-silenced cells (figure 4D and Supplementary figure S6) suggesting that despite the strong decrease of this protein and inactivation of Wnt pathway after miRNAs transfection Huh6 cells survive. By measuring the effect of miRNAs on senescence, we found that Huh6 cells senesce only in presence of miR-624-5p (figure 4E and Supplementary figure S7). The absence of senescence in beta-catenin-silencing cells suggests that miR-624-5p targets other genes involved in HBL cell survival that remained to be identified. Altogether, our results demonstrated that miR-624-5p, let-7i-3p, miR-885-5p and miR-449b-3p act as potent tumor suppressors in HBL by inhibiting beta-catenin expression, blocking tumoral cell proliferation and inactivating the Wnt pathway.

MiR-624-5p directly targets the 3'-UTR of the three beta-catenin mRNA variants

Compared to others, miR-624-5p was the most efficient inhibitor and the only miRNA to induce HBL cell senescence. Therefore, its role in beta-catenin regulation and HBL carcinogenesis was further investigated. Based on the results obtained with miR-624-5p in the secondary screening (Supplementary figure S1A, top middle panel) we aimed at determining how miR-624-5p regulates beta-catenin through its 3'-UTR. Using various prediction algorithms (miRDB, RNA22-HSA and Miranda) we localized one miR-624-5p binding site at position 613-619 in the exon 16B of the 3'-UTR beta-catenin mRNA (figures 5A and 5B), which is common to the three beta-catenin mRNA variants [23]. To assess the relevance of this site, two point mutations (r.614G>C and r.618C>G) were inserted in the beta-catenin variant V3 3'-UTR (figure 5A) and functional analyses were performed using a reporter system [19, 20]. Mutations in the predicted site completely abolished post-transcriptional regulation of beta-catenin by miR-624-5p (figure 5C). Moreover, miR-624-5p overexpression in Huh6 cells decreased all beta-catenin mRNA variants level (figure 5D). These data demonstrate that miR-624-5p directly binds beta-catenin 3'-UTR and targets the three mRNA variants.

MiR-624-5p inhibits the transcriptional activity of Wnt pathway oncogenes

Having shown that miR-624-5p strongly inhibits Wnt pathway activity, we investigated the consequence of this inhibition on the downstream targets and associated genes. Expression of relevant Wnt pathway-related genes was measured in Huh6 cells transfected with miR-624-5p or si- β -catenin (Supplementary Table S3) and compared to cells transfected with control RNA. The genes downregulated by miR-624-5p (*NRP1*, *SIX1*, *BIRC5*, *ABCBI*, *CCND1* and *FGF9*) are involved in cell proliferation, cell cycle progression, cell survival, migration, tumor growth and/or drug resistance (figure 6A, left panel). *AXIN2*, a direct target of beta-catenin/TCF4/LEF transcription complex and a member of the beta-catenin degradation complex [8, 9], was also strongly inhibited by miR-624-5p. MiR-624-5p also caused the up-regulation of other genes (figure 6B, Supplementary Table S3) including tumor suppressors (*LRP1*, *EGR1*) or regulators of tumor growth (*FNI*, *FST*) and Wnt pathway (*AHR*). Others are oncogenes or known to be involved in cancer cell proliferation and invasion (*CDH1*, *EGFR*, *CCND2*, *MMP7*, *CTGF*, *PLAUR*), transcription (*RUNX2*), immune reaction (*B2M*) or vitamin signaling (*CUBN*). Therefore, we can speculate that following miR-624-5p-induced Wnt pathway inactivation, Huh6 cells activate specific mechanisms in order to compensate for the loss of this key pathway to survive. For instance, *CCND1* decrease was counterbalanced by *CCND2* increase. When Huh6 cells were transfected by a si- β -catenin, 23 genes were up-regulated and 21 genes were down-regulated including the six genes significantly decreased by miR-624-5p (figures 6A-B, Supplementary Table S3). These data suggest that miR-624-5p partly mimics siRNA-mediated beta-catenin silencing explaining the very similar cell phenotypes observed with this miRNA and the si- β -catenin *in vitro* (figure 4). Altogether our data demonstrate that miR-624-5p counterbalances the oncogenic function of the Wnt pathway and targets other genes involved in liver carcinogenesis leading to cell growth inhibition, cell division arrest and senescence.

MiR-624-5p inhibits HBL tumor growth *in vivo*

Since miR-624-5p acts as a tumor suppressor *in vitro*, we investigated its effect *in vivo* using chicken embryos (figure 7A). The tumor CAM model is a simple and robust xenograft model that recapitulates major stages of tumor progression including cell proliferation, angiogenesis and tumor cell-host interactions. It has been previously used for testing small non-coding RNA-mediated gene knockdown on tumor growth [25, 26]. No macroscopic

difference was visible between day 13 and 16 (figure 7B, row 1). However, after formalin-fixation we observed that engrafted Huh6 cells formed a vascularized tissue mass, which was clearly smaller with miR-624-5p compared to control (figure 7B, row 2). This observation was further confirmed by weighting resected tumors (figure 7C). Indeed, while control tumor volume increased over time, miR-624-5p-derived tumors were significantly smaller (figure 7C). Comparable results were obtained with tumors deriving from Huh6 cells transfected with si- β -catenin (Supplementary figure S8). At days 13 and 16, hematoxylin-eosin-saffron (HES) staining (figure 7B, row 3) and Ki67 immunostaining (figure 7B, row 4) showed that tumor cells were less abundant and less proliferative in miR-624-5p-transfected tumors compared to control tumors, confirming the inhibitory effect of miR-624-5p on HBL development. The decrease of beta-catenin staining in miR-624-5p tumors compared to control tumors further validated the beta-catenin inhibitory activity of miR-624-5p in this animal model (figure 6B, row 5). Altogether these results demonstrated the tumor suppressive function of miR-624-5p *in vivo*.

DISCUSSION

In this work, we used a functional screening technology [19] and identified nine novel miRNAs regulating beta-catenin expression in two HBL-derived cell lines (except miR-449b-3p in HepG2 cells). Interestingly, miR-1205 and let-7i are positively regulated by p53 [27, 28] and miR-885-5p and miR-449b activate the p53 pathway [29, 30]. Therefore, our results further strengthen the idea that the regulation of beta-catenin by miRNAs is linked to p53 signaling [16]. We noticed that exon 3 deletion in HepG2 cells made mutated beta-catenin more resistant to miRNAs, confirming previous data with miR-483-3p in colon cancer cells [17]. Such resistance was not measurable in Huh6 cells, which carry a single point mutation in one of beta-catenin alleles [7]. An increased half-life of the mutated beta-catenin protein following the loss of *casein kinase 1 α /glycogen synthase kinase 3 β* (CK1 α /GSK-3 β) phosphorylation sites, which tag beta-catenin for proteosomal degradation [9], might explain this phenotype. Indeed, six out of nine miRNAs significantly inhibited total beta-catenin mRNA in HepG2 cells (figure 2D). Surprisingly, several previously reported miRNAs with regulatory effect on beta-catenin, such as miR-34a and miR-200a [15, 16], had no such regulatory effect in HBL cells (figure 2).

CTNNB1 mRNA is alternatively spliced in the 3'UTR producing three beta-catenin mRNA variants with various decay kinetics [23]. We showed that all those variants are overexpressed in HBL and likely participate in beta-catenin overexpression (Supplementary figure S3B and S3C). The beta-catenin protein has been extensively studied in cancer [3, 9, 31], but the role of its post-transcriptional regulation and different 3'UTR variants remains poorly understood. Thus, new studies are required to address this question. Nevertheless, our data clearly demonstrate the contribution of post-transcriptional regulations in beta-catenin mRNA and protein overexpression in HBL.

Among the nine beta-catenin-regulating miRNAs identified, miR-624-5p, let-7i-3p, miR-885-5p and miR-449b-3p were downregulated in HBL compared to NL. This decrease was previously reported for miR-885-5p [13] and we further found that miR-885-5p decrease is associated with advanced HBL (figure 3B) and inversely correlates with beta-catenin mRNA in *CTNNB1*-deleted HBL tumors. These results suggest that the genetic status and transcriptional activity of beta-catenin is linked to miRNAs deregulation in cancer [10, 17, 32]. Surprisingly, no inverse correlation was observed between the four decreased miRNAs and the level of total beta-catenin mRNA in HBL tissues (Supplementary figure S4A). Since miR-624-5p, let-7i-3p, miR-885-5p and miR-449b-3p are decreased in HBL, our results

suggest that these miRNAs might differently or perhaps independently participate in beta-catenin mRNA increase depending on patients' tumor. Alternatively, beta-catenin expression and status might also affect their expression as reported by other groups [17, 32].

In HBL cells, miR-624-5p, let-7i-3p, miR-885-5p and miR-449b-3p acted as potent tumor suppressors (miR-624-5p being the most efficient). While such ability has been described for miR-449b-5p and let-7i-5p [33, 34], this is the first description of an antitumoral function for their miRNA "3p" counterparts and for miR-624-5p and miR-885-5p. By comparing the data in figures 2A, 2C, 4A and 4C, we noticed that the growth inhibition mediated by these miRNAs on HBL cells is strongly associated with the level of beta-catenin protein silencing and the degree of Wnt pathway inactivation. These data support a key role of beta-catenin and Wnt pathway in HBL development and its relevance as a therapeutic target in this pediatric cancer.

In our study, miR-885-5p and miR-624-5p were the most potent inhibitors of HBL cell proliferation, Wnt pathway activity and beta-catenin expression. As miR-885-5p down-regulation was already described in HBL [13], we focused on miR-624-5p, whose implication had never been described before in cancer. Moreover, miR-624-5p was the only beta-catenin-regulating miRNA to induce HBL cell senescence. Further experiments aiming at identifying the other targets of miR-624-5p in HBL cells should shed light on its potency to induce senescence. Additional experiments showed that miR-624-5p directly targets the 3'UTR of the three beta-catenin mRNA variants through one well-conserved site (figures 5) explaining its efficiency to inhibit beta-catenin. Moreover, the strong HBL cell growth arrest mediated by miR-624-5p was independent of the *CTNNB1* status (missense mutation *versus* exon 3 deletion). As miRNAs have pleiotropic effect, we studied the effect of miR-624-5p on Wnt pathway associated-genes and beta-catenin downstream targets. We showed that seven genes downregulated by miR-624-5p are also decreased in beta-catenin-silenced Huh6 cells (figure 6A). All these genes are involved in pro-tumoral processes. *CCND1*, *SIXT1*, *BIRC5* and *FGF9* promote cell proliferation and apoptosis resistance, *ABCB1* drug resistance and *NRP1* is pro-angiogenic. *AXIN2* is an inhibitor of Wnt pathway that counterbalances Wnt activity in cells. Its strong decrease in miR-624-5p-transfected Huh6 cells further confirmed that the Wnt pathway is switched-off. Taken together these results clearly demonstrated that miR-624-5p is a potent Wnt pathway inhibitor and an efficient tumor suppressor *in vitro* and *in vivo*.

Because of their small size, easy manufacturing, biodisponibility and pleiotropic effects, miRNAs are promising therapeutic molecules in clinical oncology [10, 11]. Moreover, small non-coding RNA therapeutic is usually well tolerated in patients with manageable side-

effects [35]. Two miRNA-replacement therapies are already involved in phase-I clinical trials in patients with cancer [10, 11]. However, MRX34 study in liver cancer has recently been terminated for immune related adverse effects (clinicaltrials.gov). The reasons of this failure should be known very soon. Given the rapid progress of siRNA- and miRNA-replacement therapy in cancer [10, 11], the identification of beta-catenin-regulating miRNAs provides new options to control the expression of this gene [9]. Thus, miR-624-5p-replacement therapy is a good option for the treatment of patients with HBL. Its use in other pathologies presenting over-activation of the Wnt pathway needs further investigations.

In summary, our work further demonstrates the antitumoral properties of miRNA mimics in HBL cells. It also brings new information about the complex miRNA:beta-catenin mRNA relationships and post-transcriptional regulations occurring in this pediatric liver neoplasm. We therefore expect that the data presented in this report will sustain the development of new therapeutic and less toxic solutions for the treatment of pediatric patients, especially those presenting high-risk HBL.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Hans Clevers for providing materials, Bordeaux Imaging Center (BIC, a service unit of the CNRS-INSERM and Bordeaux University) for providing access to imaging platform. We acknowledge Vincent Pitard from Bordeaux Flow cytometry platform, Xavier Gauthereau from Bordeaux qPCR platform and Nathalie Dugot-Senant from Bordeaux histology platform for their kind support.

REFERENCES

- [1] von Schweinitz D. Hepatoblastoma: recent developments in research and treatment. *Semin Pediatr Surg* 2012;21:21-30.
- [2] Lopez-Terrada D, Alaggio R, de Davila MT, Czauderna P, Hiyama E, Katzenstein H, et al. Towards an international pediatric liver tumor consensus classification: proceedings of the Los Angeles COG liver tumors symposium. *Mod Pathol* 2014;27:472-491.
- [3] Cairo S, Armengol C, De Reynies A, Wei Y, Thomas E, Renard CA, et al. Hepatic stem-like phenotype and interplay of Wnt/beta-catenin and Myc signaling in aggressive childhood liver cancer. *Cancer Cell* 2008;14:471-484.
- [4] Allan BJ, Parikh PP, Diaz S, Perez EA, Neville HL, Sola JE. Predictors of survival and incidence of hepatoblastoma in the paediatric population. *HPB (Oxford)* 2013;15:741-746.
- [5] Zsiros J, Brugieres L, Brock P, Roebuck D, Maibach R, Zimmermann A, et al. Dose-dense cisplatin-based chemotherapy and surgery for children with high-risk hepatoblastoma (SIOPEL-4): a prospective, single-arm, feasibility study. *The lancet oncology* 2013;14:834-842.
- [6] Rebouissou S, Franconi A, Calderaro J, Letouze E, Imbeaud S, Pilati C, et al. Genotype-phenotype correlation of CTNNB1 mutations reveals different ss-catenin activity associated with liver tumor progression. *Hepatology* 2016.
- [7] de La Coste A, Romagnolo B, Billuart P, Renard CA, Buendia MA, Soubrane O, et al. Somatic mutations of the beta-catenin gene are frequent in mouse and human hepatocellular carcinomas. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95:8847-8851.
- [8] Clevers H, Nusse R. Wnt/beta-catenin signaling and disease. *Cell* 2012;149:1192-1205.
- [9] Polakis P. Drugging Wnt signalling in cancer. *EMBO J* 2012.
- [10] Li Z, Rana TM. Therapeutic targeting of microRNAs: current status and future challenges. *Nat Rev Drug Discov* 2014;13:622-638.
- [11] Lam JK, Chow MY, Zhang Y, Leung SW. siRNA Versus miRNA as Therapeutics for Gene Silencing. *Mol Ther Nucleic Acids* 2015;4:e252.
- [12] Cairo S, Wang Y, de Reynies A, Duroure K, Dahan J, Redon MJ, et al. Stem cell-like microRNA signature driven by Myc in aggressive liver cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2010;107:20471-20476.
- [13] Magrelli A, Azzalin G, Salvatore M, Viganotti M, Tosto F, Colombo T, et al. Altered microRNA Expression Patterns in Hepatoblastoma Patients. *Transl Oncol* 2009;2:157-163.
- [14] von Frowein J, Pagel P, Kappler R, von Schweinitz D, Roscher A, Schmid I. MicroRNA-492 is processed from the keratin 19 gene and up-regulated in metastatic hepatoblastoma. *Hepatology* 2011;53:833-842.
- [15] Saydam O, Shen Y, Wurdinger T, Senol O, Boke E, James MF, et al. Downregulated microRNA-200a in meningiomas promotes tumor growth by reducing E-cadherin and activating the Wnt/beta-catenin signaling pathway. *Mol Cell Biol* 2009;29:5923-5940.
- [16] Kim NH, Kim HS, Kim NG, Lee I, Choi HS, Li XY, et al. p53 and MicroRNA-34 Are Suppressors of Canonical Wnt Signaling. *Sci Signal* 2011;4:ra71.
- [17] Veronese A, Visone R, Consiglio J, Acunzo M, Lupini L, Kim T, et al. Mutated beta-catenin evades a microRNA-dependent regulatory loop. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2011;108:4840-4845.

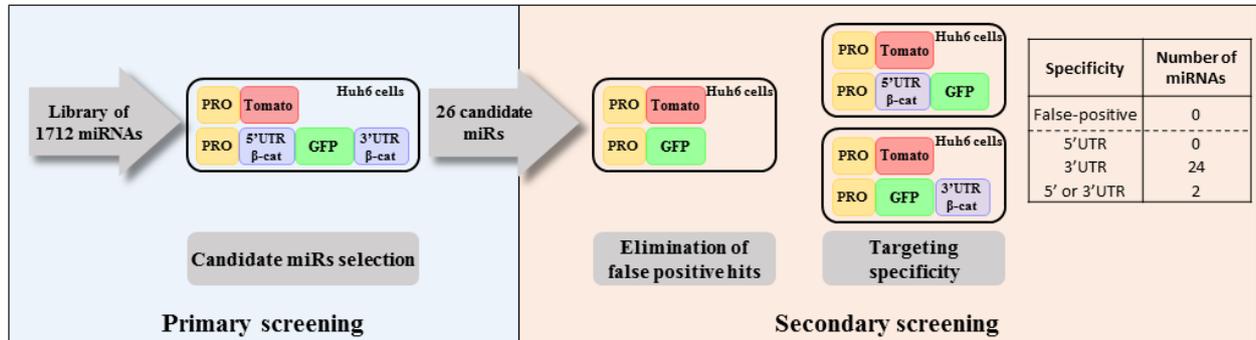
- [18] Wang X, Chen J, Li F, Lin Y, Zhang X, Lv Z, et al. MiR-214 inhibits cell growth in hepatocellular carcinoma through suppression of beta-catenin. *Biochem Biophys Res Commun* 2012;428:525-531.
- [19] Maurel M, Jalvy S, Ladeiro Y, Combe C, Vachet L, Sagliocco F, et al. A functional screening identifies five micromRNAs controlling glypican-3: role of mir-1271 down-regulation in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2013;57:195-204.
- [20] Laloo B, Simon D, Veilla V, Lauzel D, Guyonnet-Duperat V, Moreau-Gaudry F, et al. Analysis of post-transcriptional regulations by a functional, integrated, and quantitative method. *Mol Cell Proteomics* 2009;8:1777-1788.
- [21] Jalvy-Delvaile S, Maurel M, Majo V, Pierre N, Chabas S, Combe C, et al. Molecular basis of differential target regulation by miR-96 and miR-182: the Glypican-3 as a model. *Nucleic Acids Res* 2012;40:1356-1365.
- [22] Gougelet A, Sartor C, Bachelot L, Godard C, Marchiol C, Renault G, et al. Antitumour activity of an inhibitor of miR-34a in liver cancer with beta-catenin-mutations. *Gut* 2015.
- [23] Thiele A, Nagamine Y, Hauschildt S, Clevers H. AU-rich elements and alternative splicing in the beta-catenin 3'UTR can influence the human beta-catenin mRNA stability. *Exp Cell Res* 2006;312:2367-2378.
- [24] Schnater JM, Bruder E, Bertschin S, Woodtli T, de Theije C, Pietsch T, et al. Subcutaneous and intrahepatic growth of human hepatoblastoma in immunodeficient mice. *J Hepatol* 2006;45:377-386.
- [25] Dumartin L, Quemener C, Laklai H, Herbert J, Bicknell R, Bousquet C, et al. Netrin-1 mediates early events in pancreatic adenocarcinoma progression, acting on tumor and endothelial cells. *Gastroenterology* 2010;138:1595-1606, 1606 e1591-1598.
- [26] Asangani IA, Ateeq B, Cao Q, Dodson L, Pandhi M, Kunju LP, et al. Characterization of the EZH2-MMSET histone methyltransferase regulatory axis in cancer. *Mol Cell* 2013;49:80-93.
- [27] Subramanian M, Francis P, Bilke S, Li XL, Hara T, Lu X, et al. A mutant p53/let-7i-axis-regulated gene network drives cell migration, invasion and metastasis. *Oncogene* 2015;34:1094-1104.
- [28] Barsotti AM, Beckerman R, Laptenko O, Huppi K, Caplen NJ, Prives C. p53-Dependent induction of PVT1 and miR-1204. *J Biol Chem* 2012;287:2509-2519.
- [29] Afanasyeva EA, Mestdagh P, Kumps C, Vandesompele J, Ehemann V, Theissen J, et al. MicroRNA miR-885-5p targets CDK2 and MCM5, activates p53 and inhibits proliferation and survival. *Cell Death Differ* 2011;18:974-984.
- [30] Bou Kheir T, Futoma-Kazmierczak E, Jacobsen A, Krogh A, Bardram L, Hother C, et al. miR-449 inhibits cell proliferation and is down-regulated in gastric cancer. *Mol Cancer* 2011;10:29.
- [31] Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011;144:646-674.
- [32] Dias C, Feng J, Sun H, Shao NY, Mazei-Robison MS, Damez-Werno D, et al. beta-catenin mediates stress resilience through Dicer1/microRNA regulation. *Nature* 2014;516:51-55.
- [33] Yang X, Feng M, Jiang X, Wu Z, Li Z, Aau M, et al. miR-449a and miR-449b are direct transcriptional targets of E2F1 and negatively regulate pRb-E2F1 activity through a feedback loop by targeting CDK6 and CDC25A. *Genes Dev* 2009;23:2388-2393.
- [34] Su Z, Hou XK, Wen QP. Propofol induces apoptosis of epithelial ovarian cancer cells by upregulation of microRNA let-7i expression. *Eur J Gynaecol Oncol* 2014;35:688-691.
- [35] Zuckerman JE, Davis ME. Clinical experiences with systemically administered siRNA-based therapeutics in cancer. *Nat Rev Drug Discov* 2015;14:843-856.

Figure 1. Selection of 26 miRNAs controlling beta-catenin by functional screening.

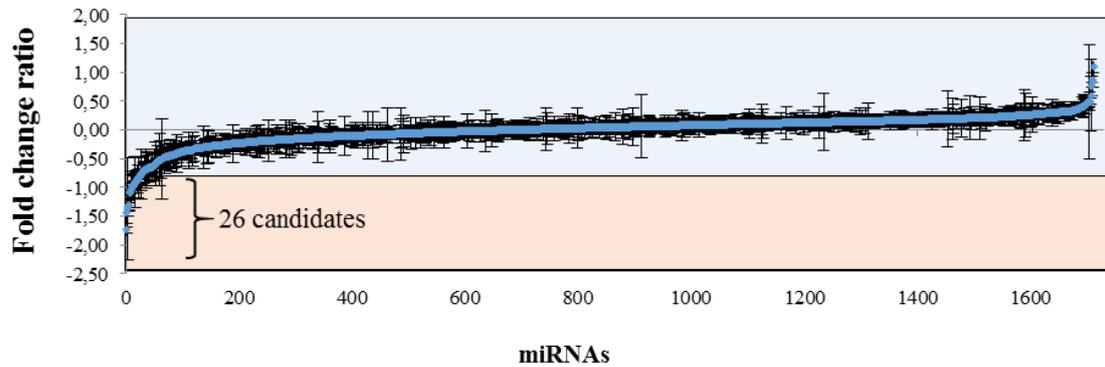
(A) DF-FunREG screening pipeline comprising the Primary (left panel) and Secondary (right panel) screenings. See Supplementary Data for detailed experimental procedures. No false positive hits were detected. 24 miRNAs acted through beta-catenin 3'-UTR and two targeted either the 5'- or the 3'-UTR. (B-C) Panel B: Primary screening data (see Supplementary Table S2). 26 miRNA candidates were selected according to a decrease of GFP/Tomato fold change ratio of -0.780 or less (see bottom area and Supplementary Table S2). Dots represent means +/- standard deviation (SD) (n=3). (C) The 26 miRNAs retained following the DF-FunREG screening are shown with their names in the V17.0 and V21.0 versions of miRBase, as well as their mean +SD.

Indersie E et al, Figure 1

A



B



C

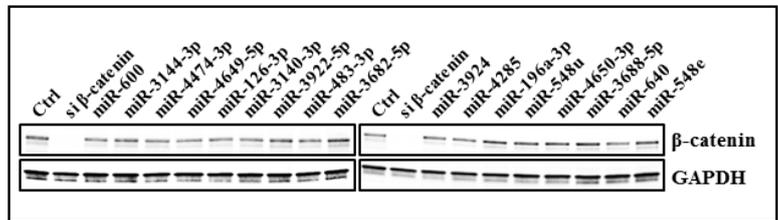
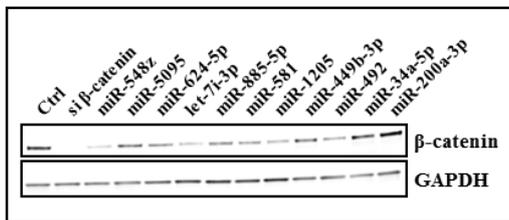
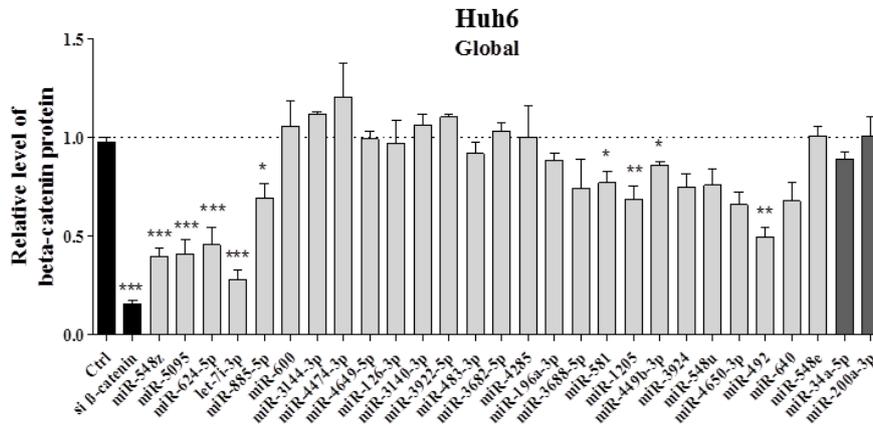
miRNA (miRBase V17.0)	miRNA (miRBase V21.0)	Mean	SD
hsa-miR-4649-5p	hsa-miR-4649-5p	-1,741	0,112
hsa-miR-4474-3p	hsa-miR-4474-3p	-1,447	0,036
hsa-miR-196a*	hsa-miR-196a-3p	-1,372	0,188
hsa-miR-548z	hsa-miR-548z	-1,324	0,899
hsa-miR-449b*	hsa-miR-449b-3p	-1,311	0,194
hsa-miR-1205	hsa-miR-1205	-1,311	0,060
hsa-miR-3922-5p	hsa-miR-3922-5p	-1,101	0,077
hsa-miR-483-3p	hsa-miR-483-3p	-1,083	0,185
hsa-miR-600	hsa-miR-600	-1,044	0,040
hsa-miR-5095	hsa-miR-5095	-1,038	0,079
hsa-miR-3688-5p	hsa-miR-3688-5p	-0,983	0,325
hsa-let-7i*	hsa-let-7i-3p	-0,977	0,052
hsa-miR-548u	hsa-miR-548u	-0,973	0,192
hsa-miR-3924	hsa-miR-3924	-0,969	0,224
hsa-miR-4650-3p	hsa-miR-4650-3p	-0,957	0,064
hsa-miR-3682-5p	hsa-miR-3682-5p	-0,905	0,086
hsa-miR-3144-3p	hsa-miR-3144-3p	-0,903	0,445
hsa-miR-4285	hsa-miR-4285	-0,901	0,132
hsa-miR-624*	hsa-miR-624-5p	-0,878	0,151
hsa-miR-492	hsa-miR-492	-0,878	0,190
hsa-miR-126	hsa-miR-126	-0,853	0,132
hsa-miR-640	hsa-miR-640	-0,833	0,227
hsa-miR-548e	hsa-miR-548e	-0,829	0,357
hsa-miR-3140-3p	hsa-miR-3140-3p	-0,816	0,161
hsa-miR-581	hsa-miR-581	-0,799	0,125
hsa-miR-885-5p	hsa-miR-885-5p	-0,781	0,099

Figure 2. Nine miRNAs regulate beta-catenin expression.

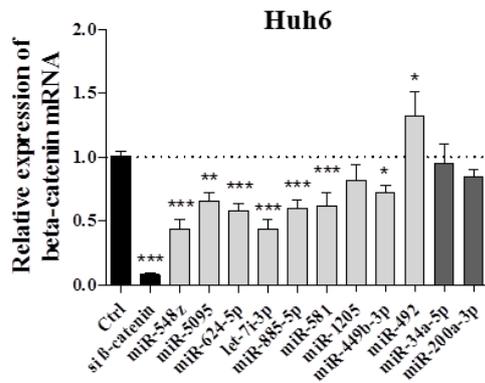
Relative expression of beta-catenin in Huh6 (A, protein; B, mRNA) and HepG2 (C, protein; D, mRNA) cells following transfection with the indicated small RNAs. Beta-catenin expression after transfection with each miRNA was normalized on its expression in non-transfected cells and compared with the effect of Ctrl RNA or a siRNA against beta-catenin (black bars). (A) Relative expression of beta-catenin protein in Huh6 cells. Representative blots with effective (left panel) and ineffective (right panel) miRNAs are shown on the bottom (n=3-6, ANOVA $p < 0.0001$). (B) Relative expression of beta-catenin mRNA in Huh6 cells (n=5, ANOVA $p < 0.0001$). (C) Relative expression of beta-catenin protein in HepG2 cells. A representative blot is shown at the bottom (n=3, ANOVA $p < 0.0001$). (D) Relative expression of beta-catenin mRNA in HepG2 cells (n=3, ANOVA $p < 0.0001$). (A-D) Bars represent means + SEM. For all data in this figure and the following, the ANOVA test was followed by a multiple comparison post-test (see Supplementary Data), * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Indersie E et al, Figure 2

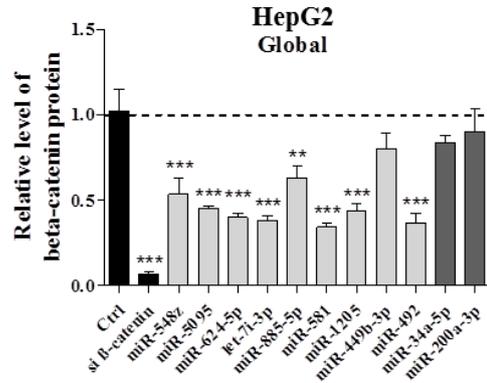
A



B



C



D

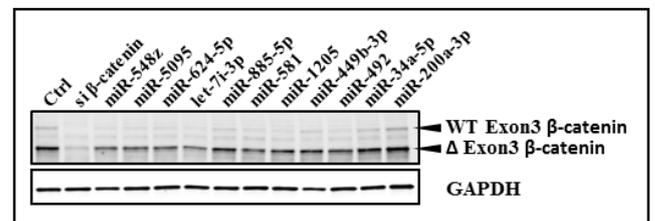
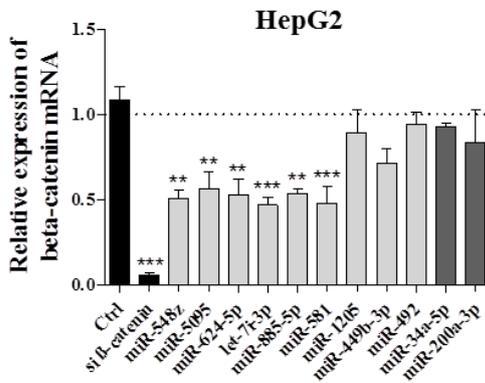
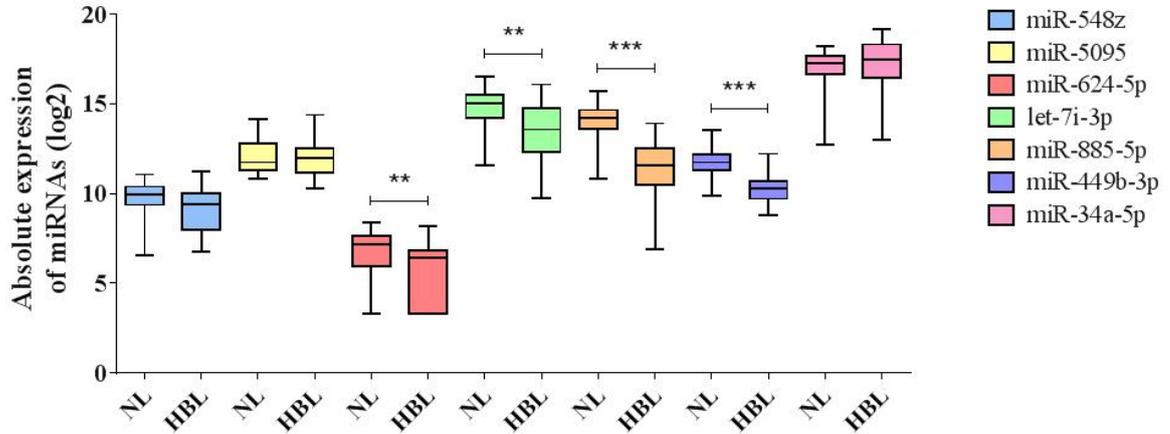


Figure 3. Four beta-catenin-regulating miRNAs are decreased in HBL.

(A) Absolute expression of the indicated miRNAs in 33 NL and 36 HBL. Data are presented as box and whiskers with minimal and maximal values. Two-tailed unpaired *t* test was used. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. (B) Heatmap of the relationships between miRNA expression and clinical traits (see Supplementary Table S1). P-values and Pearson correlation coefficients are as presented for each relationship. Each interaction is coloured according to the *r* coefficient (see legend on the right).

Indersie E et al, Figure 3

A



B

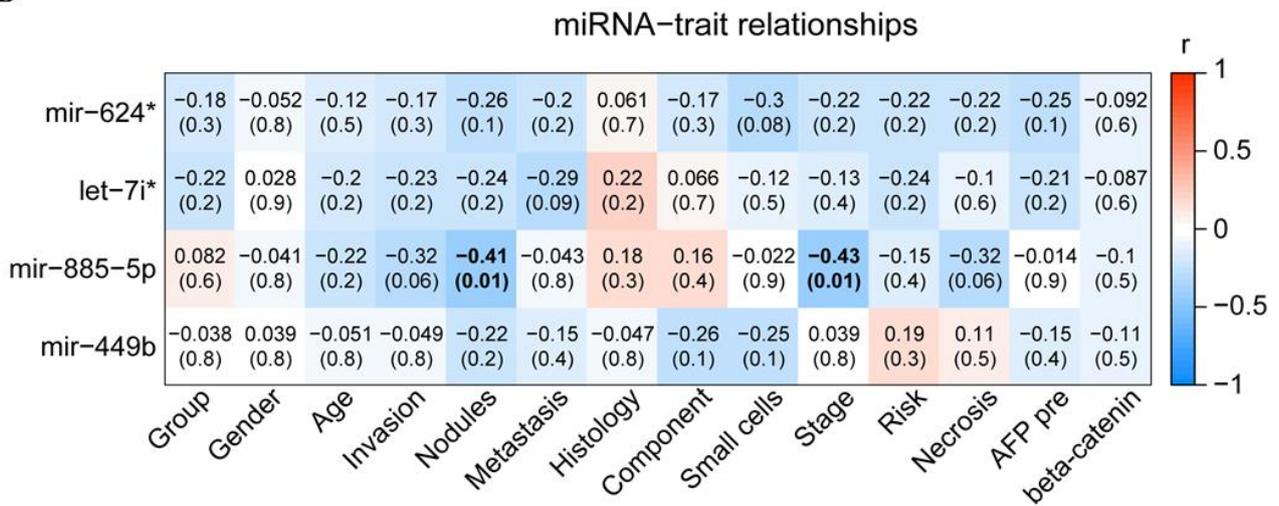


Figure 4. MiR-624-5p, let-7i-3p, miR-885-5p and miR-449b-3p exert an antitumoral effect on HBL cells.

Huh6 (left panel) or HepG2 (right panel) cells were transfected with the indicated small RNAs. Effects of each miRNA on the different phenotypes was normalized to non-transfected cells and compared with the effect of Ctrl RNA or a siRNA against beta-catenin. (A) Following transfection, cell growth was measured between day 1 and day 6 (n=3, ANOVA $p < 0.0001$). (B) Three days after transfection, cell cycling was measured in Huh6 (left panel) or HepG2 (right panel) cells. The percentages of cells in S, G0/G1 and G2/M phases are as shown (left and right panels n=3, ANOVA $p < 0.01$). (C) In parallel, Wnt pathway transcriptional activity was measured in Huh6 (left panel) or HepG2 (right panel) cells (n=3, ANOVA $p < 0.0001$). (D-E) Huh6 cells were transfected with the indicated small RNAs or treated with 200 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ etoposide (ETO). (D) Three days later, the percentage of apoptotic cells was determined by TMRM staining (n=3, ANOVA $p < 0.0001$). (E) Senescent Huh6 cells were counted by beta-galactosidase activity staining (n=4, ANOVA $p < 0.0001$). (A-E) Bars represent means \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Indersie E et al, Figure 4

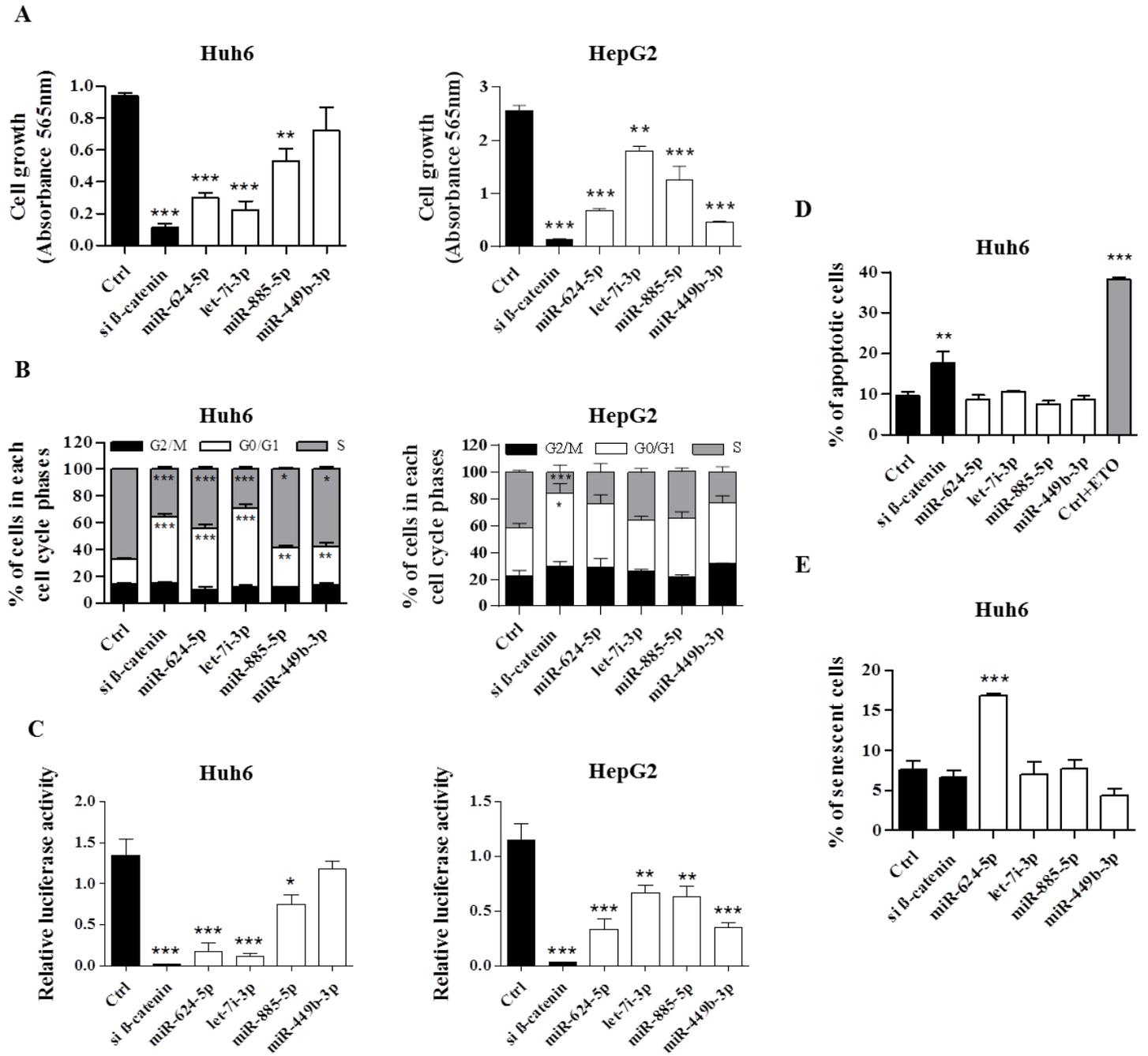


Figure 5. MiR-624-5p directly interacts with beta-catenin 3'-UTR mRNA variants.

(A) Predicted interactions between beta-catenin 3'-UTR and miR-624-5p. The two point mutations inserted in beta-catenin 3'-UTR are as shown. (B) Schematic representation of the three beta-catenin mRNA variants and localization of the predicted miR-624-5p site (thick line). (C) Huh6 cells expressing the GFP transgene bearing the wild-type (WT) or mutated (MUT) beta-catenin variant 3 (V3) 3'-UTR were transfected with Ctrl or miR-624-5p. GFP expression was analyzed using flow cytometry (n=3, ANOVA $p < 0.0001$). (D) Relative expression of total beta-catenin mRNA and of each variant after Huh6 cells transfection with the indicated small RNAs (n=3, ANOVA $p < 0.0001$). (C and D) Bars represent means \pm SEM. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Indersie E et al, Figure 5

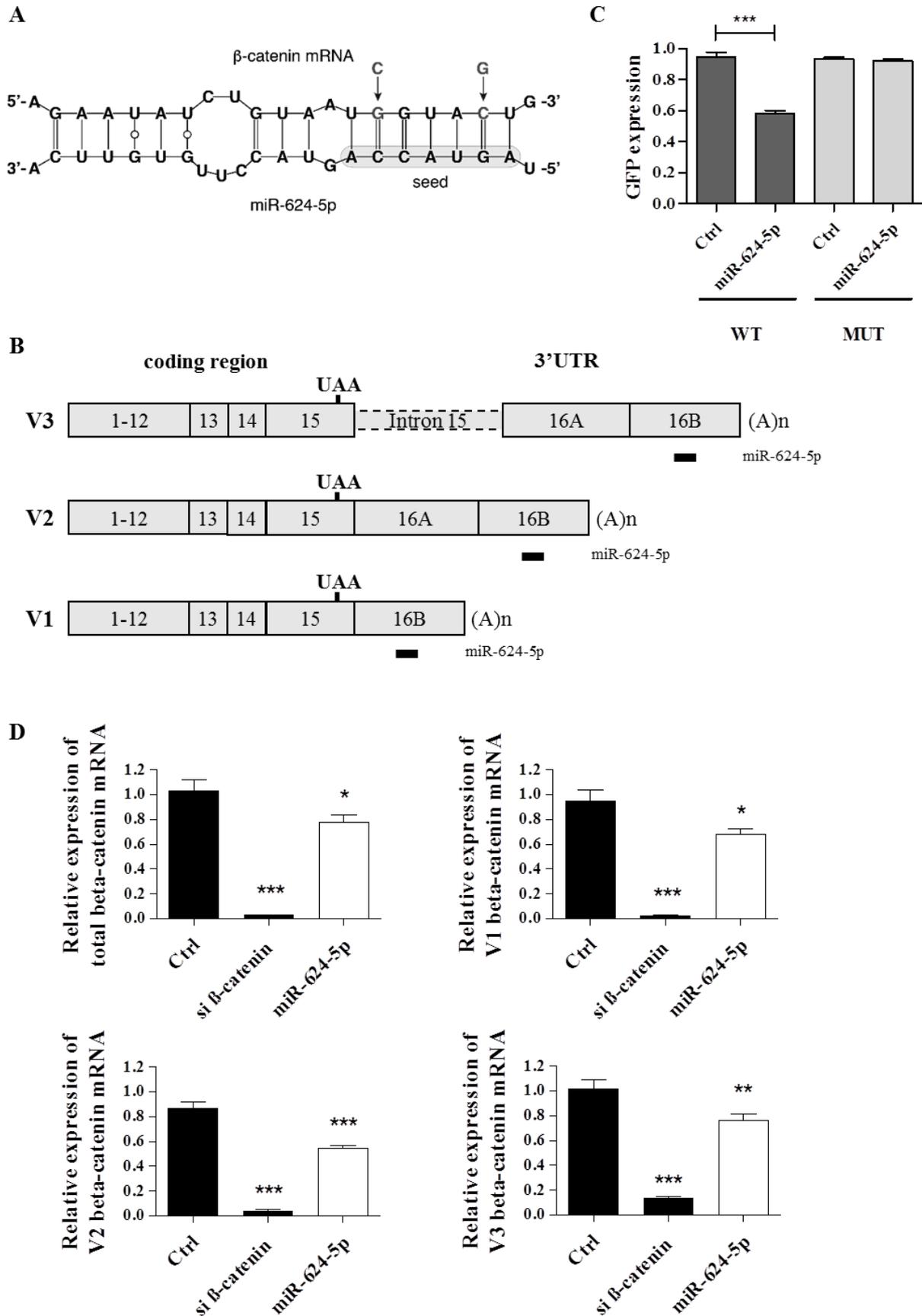
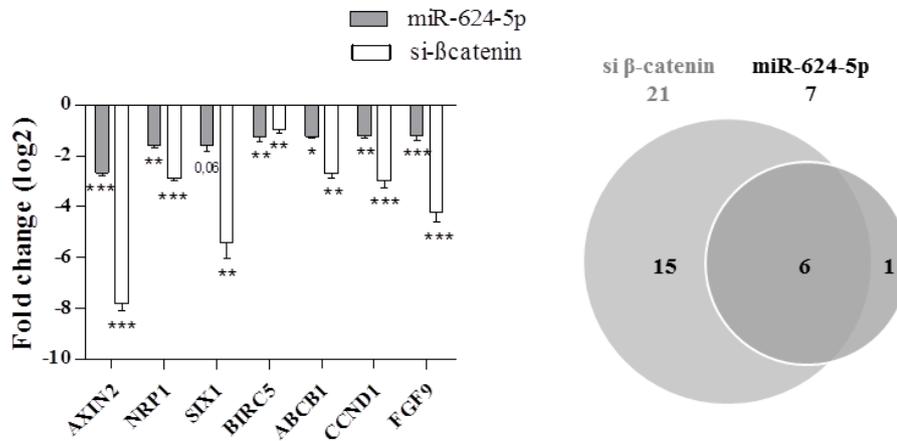


Figure 6. MiR-624-5p inhibits several Wnt pathway-associated genes.

(A-B) Huh6 cells were transfected with Ctrl, miR-624-5p or si- β -catenin and the relative expression of Wnt signaling-associated mRNA genes was measured. Genes down- (A, left panel) or up- (B) regulated by more than 50% in miR-624-5p-transfected Huh6 cells are as shown and were compared to those deregulated in si- β -catenin-transfected cells. Data are presented as Log₂ fold-change ratio between miR-624-5p- or si- β -catenin- and Ctrl-transfected cells. Bars represented means \pm SEM (n=3, ANOVA p<0.0001). *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001. (A) Right panel: Venn diagram illustrates the comparison between genes down-regulated by miR-624-5p and by si- β -catenin.

Indersie E et al, Figure 6

A



B

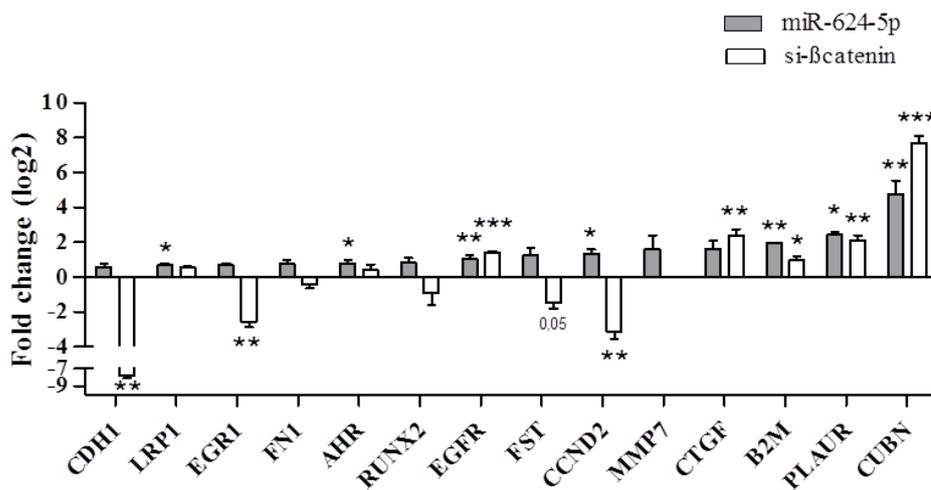
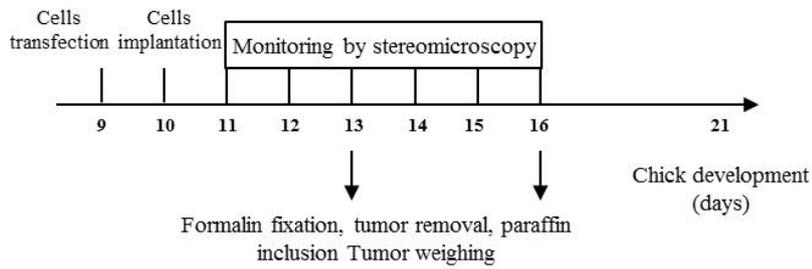


Figure 7. MiR-624-5p inhibits HBL tumor development *in vivo*.

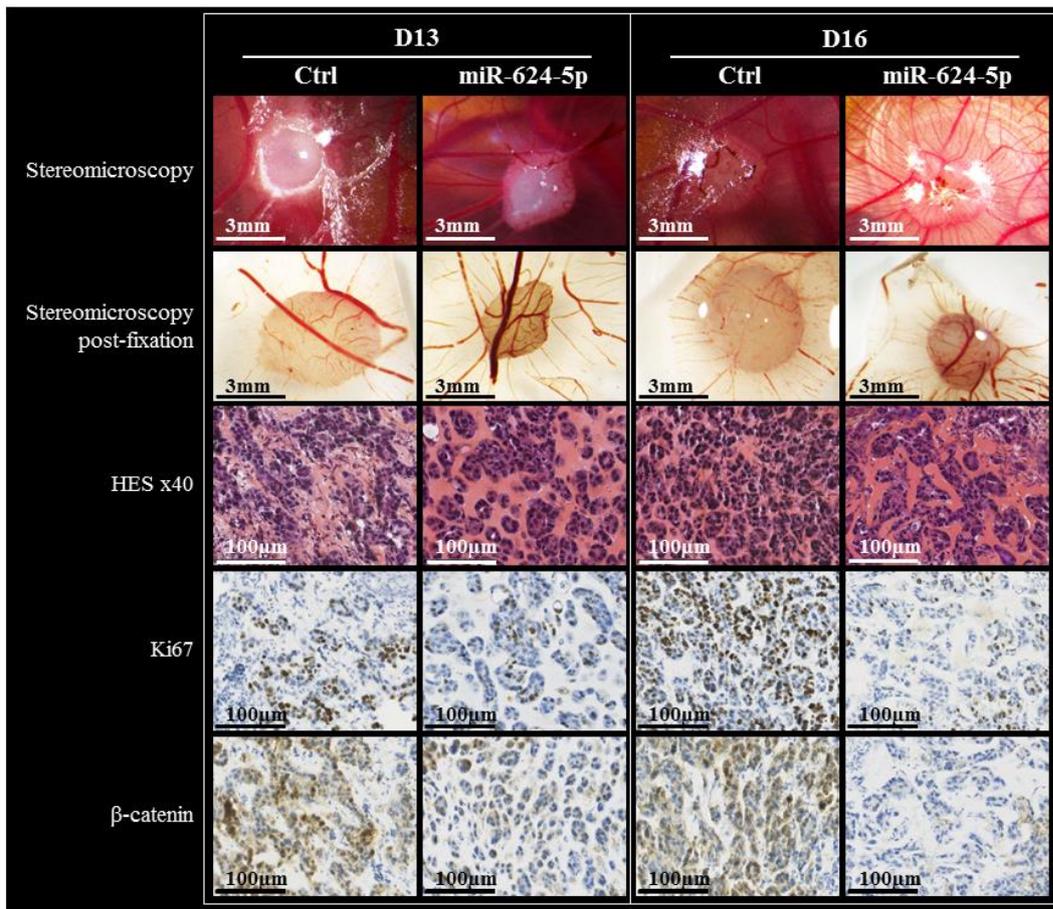
(A) Huh6 cells were transfected with Ctrl or miR-624-5p. 24 hours later, cells were collected and grafted on the chick CAM at day 10 of embryonic development. The tumor growth was monitored from day 11 to day 16. (B) Lanes 1 and 2: Representative pictures of tumors having grown on CAM (top panels; scale bars = 3mm) and after resection and formalin fixation (lane 2 panels; scale bars = 3mm) at days 13 and 16. Lane 3: Tumor sections stained by Hematoxylin eosin safran (HES, middle panels; scale bars = 100 μ m). Lanes 4 and 5: Ki67- (lane 4 panels) and beta-catenin- (bottom panels) immunostainings (scale bars = 100 μ m). (C) One, 3 and 6 days after miR-624-5p- or Ctrl-transfected Huh6 cells implantation, tumors were resected and weighed. Left panel: Representative pictures of extracted tumors. Right panel: Bars represented means \pm SEM (n=3, ANOVA p<0.0001). The total number of eggs analyzed in each group is indicated in brackets in graph bars. ***p<0.001.

Indersie E et al, Figure 7

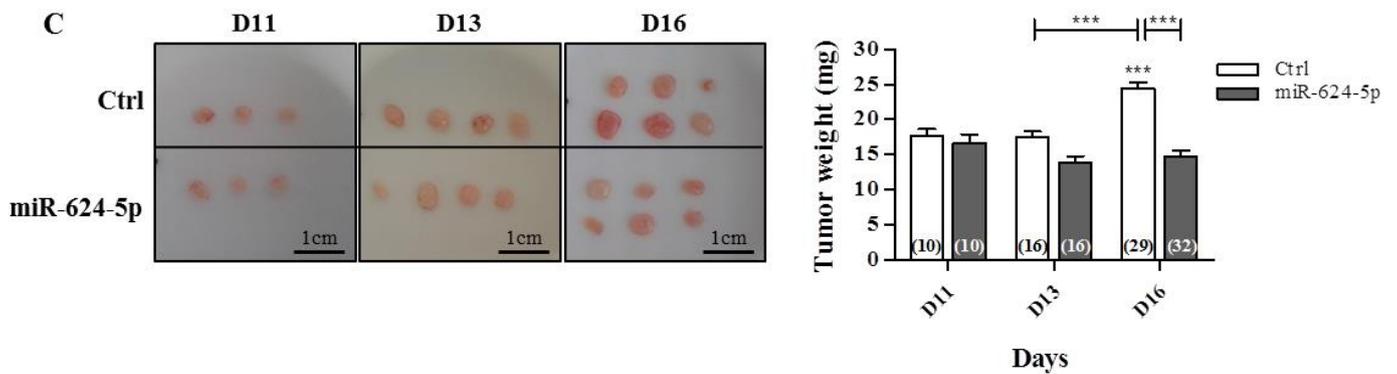
A



B



C



SUPPLEMENTARY MATERIAL AND METHODS

Liver Samples and Clinical Data

Samples were obtained with written informed consent and the study protocol was approved by the ethic committees of SIOPEL and of the French Government (HEPATOBIO project: N°ID-RCB-A00180-49; CPP N°CO-15-003; CNIL N°915640; CCTIRS N°15.700; MESR N°DC2009-939). Liver samples were clinically, histologically, and genetically characterized (Supplementary Table S1). Liver tissues were immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until used for molecular studies.

Cell lines

The HBL-derived Huh6 cells were grown in DMEM 1g/L (Invitrogen, Carlsbad, California, USA) containing 10% fetal bovine serum (FBS) and penicillin/streptomycin (1000 units/mL). Cells were identified using STR PCR once per year and regularly tested for mycoplasma-free infection. Stable Huh6 cell lines co-expressing Tomato and GFP transgenes containing either the beta-catenin 5'-UTR, 3'-UTR, both, none of them or the mutated 3'UTR "BCAT-3'UTR-MUT" were developed as described previously [1].

Plasmids construction

The lentiviral pL-GFP-5'UTR-BCAT was obtained by inserting the beta-catenin 5'UTR in the BamH I site of the pL-GFP plasmid [2]. The lentiviral pL-GFP-3'UTR-BCAT was obtained by inserting the 3'UTR sequence of beta-catenin variant 3 minus the last 23nt [3] in the Nde I-Kpn I sites of the pL-GFP plasmid [2]. The pL-GFP-5'+3'UTR-BCAT construct was obtained by inserting beta-catenin 5'- and 3'-UTRs in the pL-GFP as described for pL-GFP-5'UTR-BCAT and pL-GFP-3'UTR-BCAT plasmids, respectively. The NM_001904.3 sequence was used as reference for beta-catenin 5'- and/or 3'-UTR cloning. The pL-GFP-BCAT-3'UTR-MUT construct was as follow. The BCAT-3'UTR-MUT containing the C>G mutation at position r.614 and a G>C mutation at position r.618 was produced by gene synthesis and inserted in the pEX-K4 plasmid (Eurofin MWG Operon, Ebersberg, Germany). The 3'UTR-BCAT-MUT insert was subcloned in the pL-GFP as described for pL-GFP-3'UTR-BCAT plasmid. All constructions were verified by DNA sequencing. The pRL-TK-Renilla plasmid was obtained from Promega (Madison, Wisconsin, USA). The TCF luciferase reporter constructs pGL4-TOP (wild-type reporter, test) and pGL4-FOP (mutant reporter,

negative control) plasmids were kindly provided by Pr. Hans Clevers (Utrecht, The Netherlands) [4].

Reverse transcription and real-time quantitative PCR

Total RNA was isolated from cell lines with the TRI Reagent (Sigma, Saint-Louis, Missouri, USA) or NucleoMag® RNA kit (Macherey-Nagel, Hoerd, France) following manufacturer's instructions. Total RNA was isolated from liver samples with mirVana™ miRNA Isolation Kit (Life Technologies, Carlsbad, California, USA). To quantify mRNA expression, complementary DNA was synthesized with the Maxima Reverse Transcriptase (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). Real-time quantitative PCR (QPCR) amplifications were performed in 12 μ L multiplex PCR reactions containing 1X SYBR® Green Supermix (Quanta Biosciences, Beverly, Massachusetts, USA). The primers used for real-time quantitative PCR are:

Primer	Sequence
Forward total beta-catenin	5'- TCTTACACCCACCATCCCAC-3'
Reverse total beta-catenin	5'- GCACGAACAAGCAACTGAAC-3'
Forward beta-catenin V1	5' - GGAGTGGTTTAGGCTATTTG - 3'
Reverse beta-catenin V1	5' - GATCACATAACAACCAGAAATC - 3'
Forward beta-catenin V2	5' - GTAAATCATCCTTTAGCTGTATTG - 3'
Reverse beta-catenin V2	5' - GAAACTCAGCTTGGTTAGTG - 3'
Forward beta-catenin V3	5' - ATCATCCTTTAGGAGTAACAATAC - 3'
Reverse beta-catenin V3	5' - AAGCAAGGCTAGGGTTTG - 3'
Forward 18s	5'-GGATCCATTGGAGGGCAAGT-3'
Reverse 18s	5'-CCGCTCCCAAGATCCAATA-3'

The 18s ribosomal RNA served as internal control for normalization. MiScript PCR system (Qiagen, Hilden, Germany) were used to quantify the absolute expression of mature miRNAs. The combination of the small RNAs SNORD48, SNORD95 and RNU6B (defined using the qbase+ software; Biogazelle) served as internal controls for normalization. Subsequent data analyses were performed using the CFX Manager software (Bio-Rad, Hercules, California, USA).

Lentiviral production and titration, cell transduction and flow cytometry analyses

Production and titration of infectious lentiviral particles, cell transduction, as well as biosafety considerations, procedures and policies have been described previously [1, 2, 5].

DF-FunREG screening, FunREG analyses

FunREG and DF-FunREG analyses were performed three days after transfection as previously described [1, 2, 5] with minor modifications including fluorescence measurements using an Envision multiplate reader (Perkin Elmer, Waltham, Massachusetts, USA). Primary screening: Huh6 cells stably expressing the Tomato and GFP-5'+3'UTR-BCAT transgenes were transfected by each mimic of a library of 1712 miRNAs or a negative control RNA (Ctrl). GFP/tomato fluorescence ratio were measured for each miRNA and normalized to Ctrl ratio. The miRNAs inducing a 42% decreased or more in GFP expression compared to control [fold change ratio (FCR) = -0.780 or less] were selected as candidates. This limited number of candidates was high enough to easily manage the subsequent experimentations without precluding our chance to identify biologically relevant miRNAs. Secondary screening: Huh6 cells, expressing the Tomato transgene and a GFP transgene either lacking beta-catenin UTRs (CT) or bearing the beta-catenin 5'- (GFP-5'UTR-BCAT) or 3'-UTR (GFP-3'UTR-BCAT) were transfected by each of the 26 selected miRNAs.

Antibodies, immunoblot analysis

Antibodies are the following: anti-beta-catenin (catalog number 610153, monoclonal mouse antibody, 1/4000 dilution; BD Biosciences, San Jose, California, USA) and anti-GAPDH (catalog number sc-25778, polyclonal rabbit antibody, 1/2000 dilution; Santa Cruz, Dallas, Texas, USA). Immunoblots were done as described previously [5] except that proteins were separated on 4-15% precast polyacrylamide gel (Biorad, Hercules, California, USA) and blotted onto nitrocellulose membranes (0.2 μ m nitrocellulose, Biorad, Hercules, California, USA). Then, membranes were saturated in PBS containing 2% BSA. Specific protein signals were normalized to GAPDH protein.

Cell growth and proliferation assays

Cell growth was measured using the In vitro Toxicology assay kit (Sigma, Saint-Louis, Missouri, USA) as described previously [2], except that absorbance was measured at 565 nm using the CLARIOstar multiplate reader (BMG Labtech, Ortenberg, Allemagne). For the

analyses, 3,500 Huh6 cells, 4,500 HepG2 cells and 10,000 PDX cells were seeded into 96-well plates and transfected.

Cell cycle assay

Cell cycle was studied with the APC BrdU flow kit (BD Biosciences, San Jose, California, USA) according to manufacturer's instructions. Briefly, 200,000 Huh6 cells or 350,000 HepG2 cells were seeded into 6-well plates in a volume of 2 mL and transfected. Three days later, BrdU was added in each well and incorporated for 45 minutes into newly synthesized DNA by cells entering and progressing through the S phase of the cell cycle. The incorporated BrdU was detected using an APC anti-BrdU fluorescent antibody and the levels of cell-associated BrdU were measured by flow cytometry using a FACS CANTO II (BD Biosciences, San Jose, California, USA).

Cell death assays

Prior to apoptosis detection 200,000 cells were seeded into a 6-well plate in a volume of 2 mL and transfected. Three days later, total cells were collected and apoptosis was analyzed using tetramethylrhodamine methyl ester (TMRM, 150nM; Invitrogen, Carlsbad, California, USA) by flow cytometry using a FACS CANTO II (BD Bioscience, San Jose, California, USA).

Cell senescence assay

Senescence was measured using the Senescence beta-Galactosidase Staining kit (Cell Signaling, Danvers, Massachusetts, USA) according to manufacturer's instructions. Briefly, 200,000 cells were seeded on a coverslip into a 6-well plate in a volume of 2 mL and transfected. Three days later, cells were fixed and beta-galactosidase activity was revealed by the addition of X-gal and staining solution. Thus cells were stained with Eosin 0.5% and observed under microscope. Cells undergoing senescence showed a blue staining and were numbered.

TOPflash/FOPflash assay and Wnt associated reagents

First, 200,000 Huh6 cells or 350,000 HepG2 cells were seeded into 6-well plates in a volume of 2 mL and transfected with small RNAs. Two days later 10,000 Huh6 cells or 15,000 HepG2 cells were collected, seeded into 96-well plates in a volume of 100 μ L and transfected with the control plasmid pRL-TK-Renilla (Promega, Madison, Wisconsin, USA) and either the pGL4-TOP or pGL4-FOP plasmid [4]. Twenty-four hours later, cells were lysed and

luciferase activity was measured using the Dual-Luciferase[®] Reporter Assay System (Promega, Madison, Wisconsin, USA) according to manufacturer's instructions.

The Human Wnt Signaling Targets RT² Profiler PCR Array was purchased from Qiagen (Hilden, Germany) and performed according to manufacturer's instructions.

Chick CAM assays

Fertilized embryos were received at the stage of segmentation and then incubated at 37.4°C and 70% humidity. At day three of development, the eggshell was opened on the top and the opening sealed with medical-grade Durapore tape. When embryos were at day 9 of development, Huh6 cells were transfected with either Ctrl or miR-624-5p as described above. One day later, cells were washed with PBS, detached with trypsin/EDTA and, 1 million Huh6 cells were included in Matrigel[®] (growth-factor reduced, Corning, Corning, New York, USA) droplets (40 μ L) and deposited on the CAM. Pictures of the growth tumor were taken every day (until six days) using a stereomicroscope (SMZ745T) and camera (DS-Fi2) from Nikon and then analyzed with the NSI Element D software (Nikon, Tokyo Japan). One, 3 and 6 days after deposition of tumor cells, tumor masses were weighed on precision weighing balance. In parallel, 3 and 6 days after deposition of tumor cells, CAMs were formalin-fixed and processed for histology. Four μ m-cut-sections of the tumor-containing CAM were performed and stained with Eosin/hematoxylin/safran or immunostained with mouse monoclonal anti-beta-catenin antibody (1/5000 dilution; BD Bioscience, San Jose, California, USA) or mouse monoclonal anti-Ki-67 antibody (clone MIB-1, 1/100 dilution; Dako, Les Ulis, France) and visualized with EnVision FLEX kit (Dako, Les Ulis, France). The microscopy was done using Nanozoomer Digital slide scanner (Hamamatsu, Hamamatsu, Japan) in the Bordeaux Imaging Center.

Bioinformatic tools

Different algorithms of prediction were used to investigate target-miRNA interactions: miRDB [6], TargetScan [7], RNA22-HAS [8], TargetMiner [9] and RNA Hybrid [10]. The structure of miR-624-5p:beta-catenin 3'-UTR interaction was drawn using VARNA [11] based on miRNA-target pairing predicted by RNA hybrid [10].

Statistical analyses

Statistical analyses were done using GraphPad Prism 5.0 or 6.0 software as described before [2, 5, 12]. When experiment contained two paired groups, a normality test was used to

analyze the Gaussian distribution of values. When values followed a Gaussian distribution, the parametric paired t-test was used. If not, the non-parametric two-tailed Wilcoxon matched-pairs signed ranked test was used. When experiment contained three groups or more, the ANOVA test was followed by the Bonferroni's multiple-comparison post-test. For each figure, the number of independent experiments (n) and the ANOVA p-value are indicated in brackets. Results were considered significant when $p < 0.05$. For all data in figures, the p value is indicated at the bottom of each Figure legend; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

SUPPLEMENTARY REFERENCES

- [1] Laloo B, Simon D, Veilla V, Lauzel D, Guyonnet-Duperat V, Moreau-Gaudry F, et al. Analysis of post-transcriptional regulations by a functional, integrated, and quantitative method. *Mol Cell Proteomics* 2009;8:1777-1788.
- [2] Maurel M, Jalvy S, Ladeiro Y, Combe C, Vachet L, Saggiocco F, et al. A functional screening identifies five micrnas controlling glypican-3: role of mir-1271 down-regulation in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 2013;57:195-204.
- [3] Thiele A, Nagamine Y, Hauschildt S, Clevers H. AU-rich elements and alternative splicing in the beta-catenin 3'UTR can influence the human beta-catenin mRNA stability. *Exp Cell Res* 2006;312:2367-2378.
- [4] Korinek V, Barker N, Morin PJ, van Wichen D, de Weger R, Kinzler KW, et al. Constitutive transcriptional activation by a beta-catenin-Tcf complex in APC-/- colon carcinoma. *Science* 1997;275:1784-1787.
- [5] Jalvy-Delvaille S, Maurel M, Majo V, Pierre N, Chabas S, Combe C, et al. Molecular basis of differential target regulation by miR-96 and miR-182: the Glypican-3 as a model. *Nucleic Acids Res* 2012;40:1356-1365.
- [6] Wang X. miRDB: a microRNA target prediction and functional annotation database with a wiki interface. *Rna* 2008;14:1012-1017.
- [7] Friedman RC, Farh KK, Burge CB, Bartel DP. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res* 2009;19:92-105.
- [8] Miranda KC, Huynh T, Tay Y, Ang YS, Tam WL, Thomson AM, et al. A pattern-based method for the identification of MicroRNA binding sites and their corresponding heteroduplexes. *Cell* 2006;126:1203-1217.
- [9] Bandyopadhyay S, Mitra R. TargetMiner: microRNA target prediction with systematic identification of tissue-specific negative examples. *Bioinformatics* 2009;25:2625-2631.
- [10] Rehmsmeier M, Steffen P, Hochsmann M, Giegerich R. Fast and effective prediction of microRNA/target duplexes. *Rna* 2004;10:1507-1517.
- [11] Darty K, Denise A, Ponty Y. VARNA: Interactive drawing and editing of the RNA secondary structure. *Bioinformatics* 2009;25:1974-1975.
- [12] Maurel M, Dejeans N, Taouji S, Chevet E, Grosset CF. MicroRNA-1291-mediated silencing of IRE1alpha enhances Glypican-3 expression. *RNA* 2013;19:778-788.

Indersie E et al, Supplementary Table S1

Patient features	Features	Number of cases (%)
Gender	Male/Female	23/13 (63.89/36,11)
Age (month)	Mean (min, max)	2.76 (0.60, 15.97)
Invasion	Yes	14 (38.89)
Nodules	Single nodule	18 (50)
	Multiple nodules	17 (47.22)
Metastasis	Yes	7 (19.44)
Histology	Epithelial	14 (38.89)
	Mesenchymal	20 (55.56)
Component	Fœtal	25 (69.44)
	Fœtal-embryonal	3 (8.33)
	Embryonal-Fœtal atypic	3 (8.33)
	Mesenchymal	4 (11.11)
Small cells	Yes	15 (41.67)
PRETEXT stage	I	3 (8.33)
	II	14 (38.89)
	III	7 (19.44)
	III	5 (13.89)
	III	5 (13.89)
Risk	Standard risk	18 (50)
	High risk	13 (36.11)
Group	C1	25 (69.44)
	C2	11 (30.56)
Necrosis (%)	Mean (min, max)	35 (10, 70)
AFP level pre-operative (ng/mL)	Mean (min, max)	478738 (300, 2355000)
AFP level post-operative (ng/mL)	Mean (min, max)	183201 (4, 347000)
CTNNB1	Non-mutated	5 (13.89)
	Mutated	10 (27.78)
	Deleted	14 (38.89)

Supplementary Table S1. Biological and clinical data.

The percentage of tumor samples displaying annotated features is indicated in brackets.

Indersie E et al, Supplementary Table S2

miRNA	GFP/tomato ratio Fold change			Mean	Standard Deviation
	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3		
hsa-miR-4649-5p	-1,701	-1,655	-1,867	-1,741	0,112
hsa-miR-4474-3p	-1,407	-1,457	-1,477	-1,447	0,036
hsa-miR-196a*	-1,495	-1,156	-1,466	-1,372	0,188
hsa-miR-548z	-1,720	-1,957	-0,295	-1,324	0,899
hsa-miR-449b*	-1,531	-1,165	-1,236	-1,311	0,194
hsa-miR-1205	-1,303	-1,255	-1,375	-1,311	0,060
hsa-miR-3922-5p	-1,018	-1,115	-1,170	-1,101	0,077
hsa-miR-483-3p	-1,296	-0,988	-0,964	-1,083	0,185
hsa-miR-600	-1,088	-1,033	-1,011	-1,044	0,040
hsa-miR-5095	-1,114	-0,956	-1,043	-1,038	0,079
hsa-miR-3688-5p	-1,273	-0,632	-1,043	-0,983	0,325
hsa-let-7i*	-0,941	-1,036	-0,954	-0,977	0,052
hsa-miR-548u	-1,011	-0,765	-1,144	-0,973	0,192
hsa-miR-3924	-1,228	-0,830	-0,849	-0,969	0,224
hsa-miR-4650-3p	-0,979	-1,007	-0,884	-0,957	0,064
hsa-miR-3682-5p	-1,003	-0,840	-0,873	-0,905	0,086
hsa-miR-3144-3p	-1,209	-0,393	-1,109	-0,903	0,445
hsa-miR-4285	-0,902	-0,769	-1,033	-0,901	0,132
hsa-miR-624*	-0,887	-0,722	-1,025	-0,878	0,151
hsa-miR-492	-1,023	-0,948	-0,663	-0,878	0,190
hsa-miR-126	-1,003	-0,804	-0,752	-0,853	0,132
hsa-miR-640	-0,597	-1,051	-0,851	-0,833	0,227
hsa-miR-548e	-1,209	-0,500	-0,778	-0,829	0,357
hsa-miR-3140-3p	-0,995	-0,768	-0,685	-0,816	0,161
hsa-miR-581	-0,812	-0,668	-0,917	-0,799	0,125
hsa-miR-885-5p	-0,891	-0,752	-0,700	-0,781	0,099
hsa-miR-548ad	-0,914	-0,846	-0,550	-0,770	0,193
hsa-miR-3177-3p	-0,870	-0,438	-0,991	-0,766	0,291
hsa-miR-3130-3p	-1,154	-0,283	-0,856	-0,765	0,443
hsa-miR-4761-5p	-0,776	-0,814	-0,634	-0,741	0,095
hsa-miR-140-5p	-0,700	-0,690	-0,739	-0,710	0,026
hsa-miR-4718	-0,673	-0,608	-0,835	-0,705	0,117
hsa-miR-3200-5p	-0,853	-0,622	-0,615	-0,697	0,135
hsa-miR-1245b-3p	-0,583	-0,558	-0,944	-0,695	0,216
hsa-miR-378g	-0,579	-0,823	-0,665	-0,689	0,124
hsa-miR-4765	-0,855	-0,576	-0,618	-0,683	0,150
hsa-miR-4708-3p	-0,479	-1,065	-0,501	-0,682	0,332
hsa-miR-648	-0,762	-0,934	-0,340	-0,679	0,305
hsa-miR-3157-5p	-0,735	-0,528	-0,749	-0,671	0,124
hsa-miR-3139	-0,819	-0,793	-0,370	-0,661	0,252
hsa-miR-4687-5p	-0,826	-0,369	-0,782	-0,659	0,252
hsa-miR-3591-5p	-0,910	-0,696	-0,370	-0,659	0,272
hsa-miR-363*	-0,690	-0,590	-0,681	-0,654	0,055
hsa-miR-4759	-0,607	-0,578	-0,766	-0,650	0,101
hsa-miR-4269	-0,711	-0,504	-0,736	-0,650	0,127
hsa-miR-4650-5p	-0,809	-0,567	-0,562	-0,646	0,141
hsa-miR-3921	-0,723	-0,560	-0,647	-0,643	0,082
hsa-miR-4635	-0,862	-0,688	-0,373	-0,641	0,248
hsa-miR-4453	-0,585	-0,648	-0,688	-0,640	0,052
hsa-miR-1245	-0,731	-0,509	-0,595	-0,612	0,112
hsa-miR-573	-0,629	-0,569	-0,631	-0,610	0,035
hsa-miR-671-3p	-0,343	-0,599	-0,858	-0,600	0,258
hsa-miR-4709-3p	-0,829	-0,574	-0,392	-0,598	0,220
hsa-miR-657	-1,007	-0,226	-0,485	-0,573	0,398
hsa-miR-125b	-0,676	-0,511	-0,526	-0,571	0,091
hsa-miR-761	-0,669	-0,524	-0,451	-0,548	0,111
hsa-miR-4684-3p	-0,298	-0,808	-0,519	-0,542	0,256
hsa-miR-203	-0,306	-0,706	-0,602	-0,538	0,208
hsa-miR-4470	-0,606	-0,633	-0,346	-0,528	0,158
hsa-miR-4643	-0,433	-0,694	-0,453	-0,526	0,145
hsa-miR-582-3p	-0,640	-0,583	-0,350	-0,525	0,154
hsa-miR-1254	-0,983	-0,051	-0,534	-0,523	0,466
hsa-miR-409-5p	-0,374	-0,578	-0,612	-0,521	0,129
hsa-miR-3120-3p	-0,165	-0,712	-0,668	-0,515	0,304
hsa-miR-1972	-0,395	-0,566	-0,560	-0,507	0,097
hsa-miR-876-3p	-1,290	0,062	-0,258	-0,495	0,707

Supplementary Table S2. Primary screening data of DF-FunREG system. Only the first page of the table is shown, complete table is available in **Annexe 1**.

Calculated mean and standard deviation are shown. The 26 selected miRNAs are highlighted.

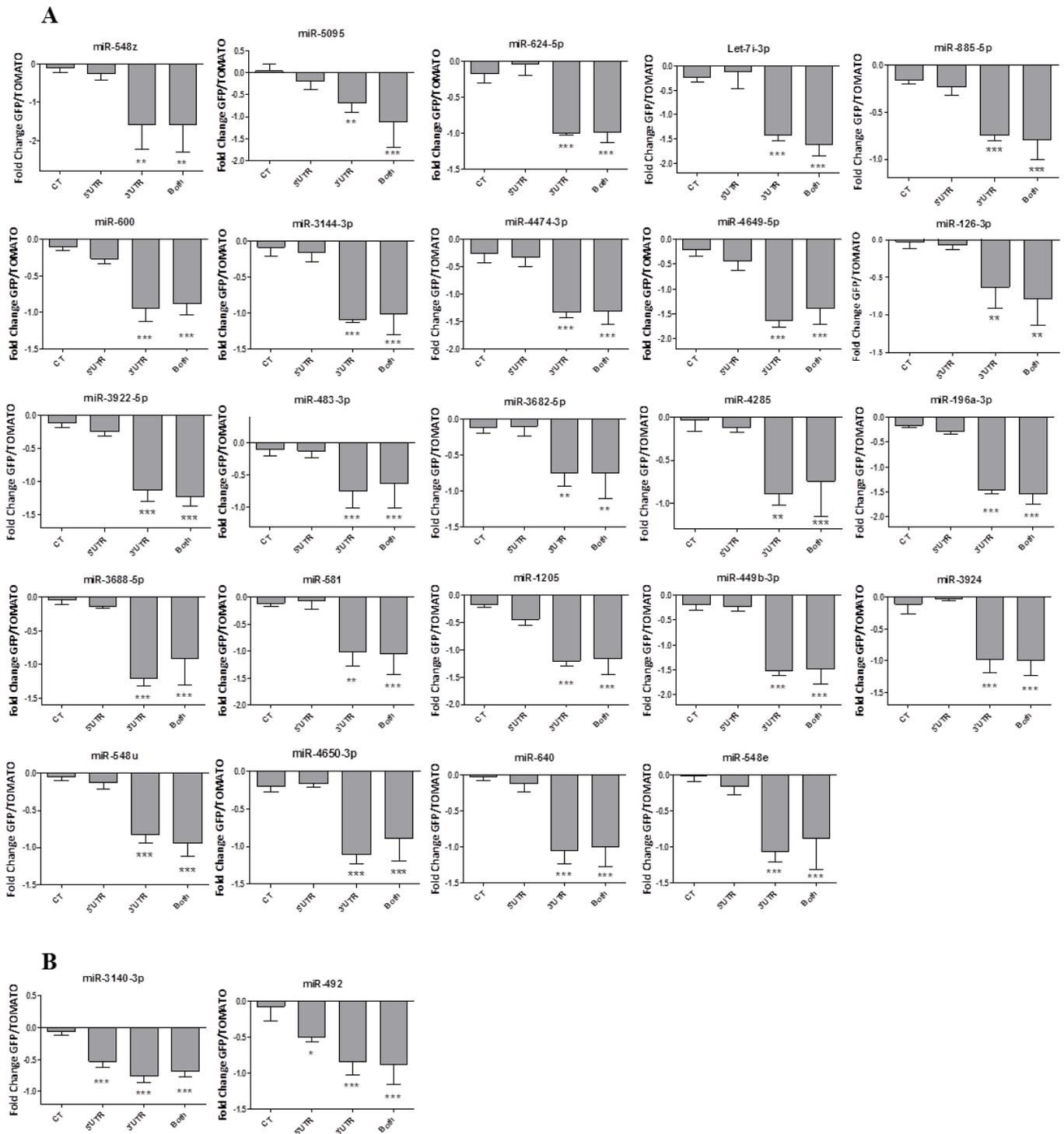
Indersie E et al, Supplementary Table S3

miR-624-5p					si- β -catenin						
Gene	LOG2 ratio		Gene	LOG2 ratio		Gene	LOG2 ratio		Gene	LOG2 ratio	
	Mean	SD		Mean	SD		Mean	SD		Mean	SD
<i>AXIN2</i>	-2,66	0,17	<i>TWIST1</i>	0,00	0,00	<i>AXIN2</i>	-7,80	0,48	<i>FGF20</i>	0,00	0,00
<i>NRP1</i>	-1,59	0,18	<i>WISP1</i>	0,00	0,00	<i>SIX1</i>	-5,39	1,10	<i>GDNF</i>	0,00	0,00
<i>SIX1</i>	-1,58	0,45	<i>WNT3A</i>	0,00	0,00	<i>SOX2</i>	-5,20	0,57	<i>IGF2</i>	0,00	0,00
<i>BIRC5</i>	-1,25	0,29	<i>WISP2</i>	0,00	0,01	<i>MYC</i>	-4,86	0,11	<i>IRS1</i>	0,00	0,00
<i>ABCB1</i>	-1,23	0,12	<i>SMO</i>	0,01	0,19	<i>FGF9</i>	-4,20	0,66	<i>MMP7</i>	0,00	0,00
<i>CCND1</i>	-1,21	0,15	<i>EFNB1</i>	0,01	0,42	<i>CCND2</i>	-3,13	0,72	<i>PTGS2</i>	0,00	0,00
<i>FGF9</i>	-1,18	0,33	<i>ACTB</i>	0,02	0,21	<i>TCF7</i>	-3,08	0,52	<i>SFRP2</i>	0,00	0,00
<i>TCF7</i>	-0,94	0,22	<i>BMP4</i>	0,04	0,15	<i>MMP2</i>	-3,04	0,08	<i>TWIST1</i>	0,00	0,00
<i>MYC</i>	-0,93	0,11	<i>WNT9A</i>	0,05	0,08	<i>CCND1</i>	-2,98	0,48	<i>WISP1</i>	0,00	0,00
<i>FGF4</i>	-0,72	1,16	<i>JAG1</i>	0,05	0,34	<i>SOX9</i>	-2,96	0,58	<i>WNT3A</i>	0,00	0,00
<i>SOX9</i>	-0,65	0,27	<i>CD44</i>	0,07	0,14	<i>NRP1</i>	-2,87	0,19	<i>DKK1</i>	0,08	0,13
<i>PTCH1</i>	-0,64	0,27	<i>TCF7L2</i>	0,07	0,05	<i>ABCB1</i>	-2,71	0,30	<i>CDON</i>	0,09	0,28
<i>IL6</i>	-0,62	1,62	<i>GJA1</i>	0,09	0,29	<i>EGR1</i>	-2,56	0,55	<i>T</i>	0,10	0,18
<i>BGLAP</i>	-0,54	0,21	<i>CDON</i>	0,10	0,27	<i>IGF1</i>	-2,46	0,31	<i>WNT9A</i>	0,14	0,15
<i>PPAP2B</i>	-0,40	0,30	<i>MET</i>	0,13	0,21	<i>NANOG</i>	-2,25	0,92	<i>TCF4</i>	0,15	0,37
<i>HPRT1</i>	-0,37	0,14	<i>CDKN2A</i>	0,13	0,23	<i>FOSL1</i>	-2,11	0,42	<i>PPARD</i>	0,35	0,40
<i>MMP2</i>	-0,36	0,19	<i>BTRC</i>	0,17	0,17	<i>FST</i>	-1,49	0,52	<i>AHR</i>	0,39	0,54
<i>GAPDH</i>	-0,34	0,20	<i>CEBPD</i>	0,21	0,61	<i>CD44</i>	-1,23	0,48	<i>ACTB</i>	0,43	0,18
<i>PITX2</i>	-0,30	0,15	<i>TLE1</i>	0,23	0,09	<i>PPAP2B</i>	-1,10	0,32	<i>PITX2</i>	0,50	0,20
<i>RPLP0</i>	-0,28	0,10	<i>POU5F1</i>	0,25	0,90	<i>CDKN2A</i>	-1,05	0,10	<i>BTRC</i>	0,51	0,19
<i>FOSL1</i>	-0,27	0,24	<i>TCF7L1</i>	0,28	0,49	<i>EFNB1</i>	-1,03	0,56	<i>LRP1</i>	0,55	0,12
<i>TCF4</i>	-0,16	0,07	<i>ETS2</i>	0,29	0,46	<i>DAB2</i>	-0,99	0,08	<i>WISP2</i>	0,60	1,03
<i>FZD7</i>	-0,14	0,10	<i>ID2</i>	0,33	0,33	<i>BIRC5</i>	-0,98	0,20	<i>ETS2</i>	0,65	0,32
<i>NANOG</i>	-0,14	0,13	<i>LEF1</i>	0,34	0,19	<i>RUNX2</i>	-0,93	1,21	<i>SMO</i>	0,69	0,18
<i>DAB2</i>	-0,13	0,22	<i>ANGPTL4</i>	0,36	0,21	<i>JAG1</i>	-0,82	0,45	<i>ANGPTL4</i>	0,71	0,31
<i>TGFB3</i>	-0,09	0,35	<i>PPARD</i>	0,42	0,14	<i>FGF4</i>	-0,72	1,16	<i>VEGFA</i>	0,77	0,19
<i>SOX2</i>	-0,07	0,28	<i>MMP9</i>	0,45	0,36	<i>RPLP0</i>	-0,60	0,09	<i>FGF7</i>	0,81	1,13
<i>DPP10</i>	-0,03	0,09	<i>NRCAM</i>	0,47	0,34	<i>KLF5</i>	-0,56	0,49	<i>POU5F1</i>	0,91	0,32
<i>WNT5A</i>	-0,03	0,16	<i>VEGFA</i>	0,50	0,33	<i>LEF1</i>	-0,55	0,65	<i>TGFB3</i>	0,91	0,22
<i>KLF5</i>	-0,02	0,03	<i>IGF1</i>	0,52	0,33	<i>BGLAP</i>	-0,52	0,15	<i>B2M</i>	0,95	0,46
<i>ANTXR1</i>	0,00	0,00	<i>CDH1</i>	0,60	0,34	<i>NRCAM</i>	-0,50	0,30	<i>DPP10</i>	1,21	0,27
<i>CACNA2D3</i>	0,00	0,00	<i>LRP1</i>	0,67	0,23	<i>GAPDH</i>	-0,50	0,16	<i>EGFR</i>	1,42	0,09
<i>DKK1</i>	0,00	0,00	<i>EGR1</i>	0,69	0,16	<i>FNI</i>	-0,40	0,39	<i>TCF7L1</i>	1,44	0,05
<i>DLK1</i>	0,00	0,00	<i>FNI</i>	0,74	0,42	<i>CDH1</i>	-0,36	0,05	<i>MET</i>	1,47	0,11
<i>FGF20</i>	0,00	0,00	<i>AHR</i>	0,77	0,33	<i>HPRT1</i>	-0,36	0,19	<i>FZD7</i>	1,49	0,38
<i>FGF7</i>	0,00	0,00	<i>RUNX2</i>	0,83	0,47	<i>MMP9</i>	-0,36	0,08	<i>CEBPD</i>	1,55	0,41
<i>GDF5</i>	0,00	0,00	<i>EGFR</i>	1,04	0,41	<i>PTCH1</i>	-0,20	0,49	<i>ID2</i>	1,63	0,23
<i>GDNF</i>	0,00	0,00	<i>FST</i>	1,22	0,79	<i>WNT5A</i>	-0,20	0,23	<i>GDF5</i>	1,80	1,55
<i>IGF2</i>	0,00	0,00	<i>CCND2</i>	1,35	0,41	<i>TCF7L2</i>	-0,16	0,38	<i>GJA1</i>	1,83	0,19
<i>IRS1</i>	0,00	0,00	<i>MMP7</i>	1,60	1,39	<i>BMP4</i>	-0,14	0,11	<i>NTRK2</i>	1,92	1,50
<i>NTRK2</i>	0,00	0,00	<i>CTGF</i>	1,60	0,83	<i>TLE1</i>	-0,08	0,17	<i>PLAUR</i>	2,10	0,52
<i>PTGS2</i>	0,00	0,00	<i>B2M</i>	1,94	0,05	<i>ANTXR1</i>	0,00	0,00	<i>IL6</i>	2,40	1,19
<i>SFRP2</i>	0,00	0,00	<i>PLAUR</i>	2,45	0,27	<i>CACNA2D3</i>	0,00	0,00	<i>CTGF</i>	2,40	0,63
<i>T</i>	0,00	0,00	<i>CUBN</i>	4,74	1,38	<i>DLK1</i>	0,00	0,00	<i>CUBN</i>	7,68	0,69

Supplementary Table S3. Wnt pathway-related gene expression in Huh6 cells transfected with miR-624-5p or si- β -catenin.

Data are presented as Log2 fold change ratio between miR-624-5p- or si- β -catenin- and Ctrl-transfected cells + standard deviation (SD).

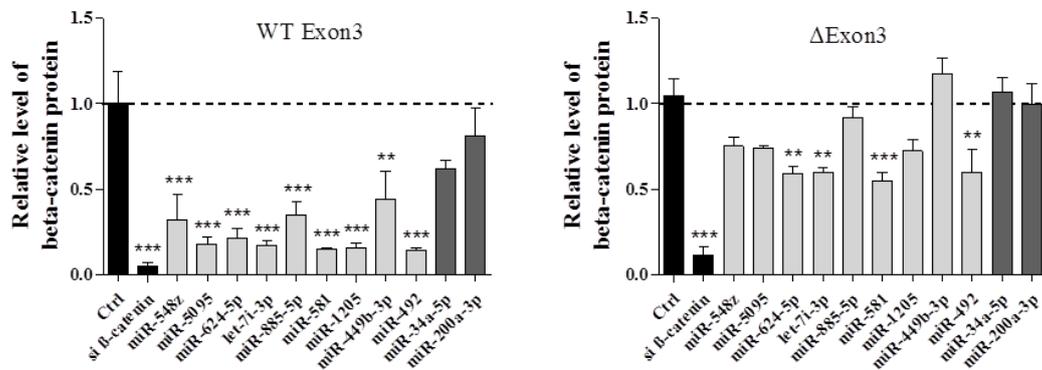
Indersie E et al, Supplementary figure S1



Supplementary figure S1. Secondary screening data of DF-FunREG system.

(A-B) Data of DF-FunREG secondary step. (A) 24 miRNAs inhibit the GFP/ Tomato ratio through beta-catenin 3'-UTR. (B) 2 miRNAs exert a negative effect through beta-catenin 5'- or 3'-UTR. Bars represent means + SD (n=3, ANOVA $p < 0.01$). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

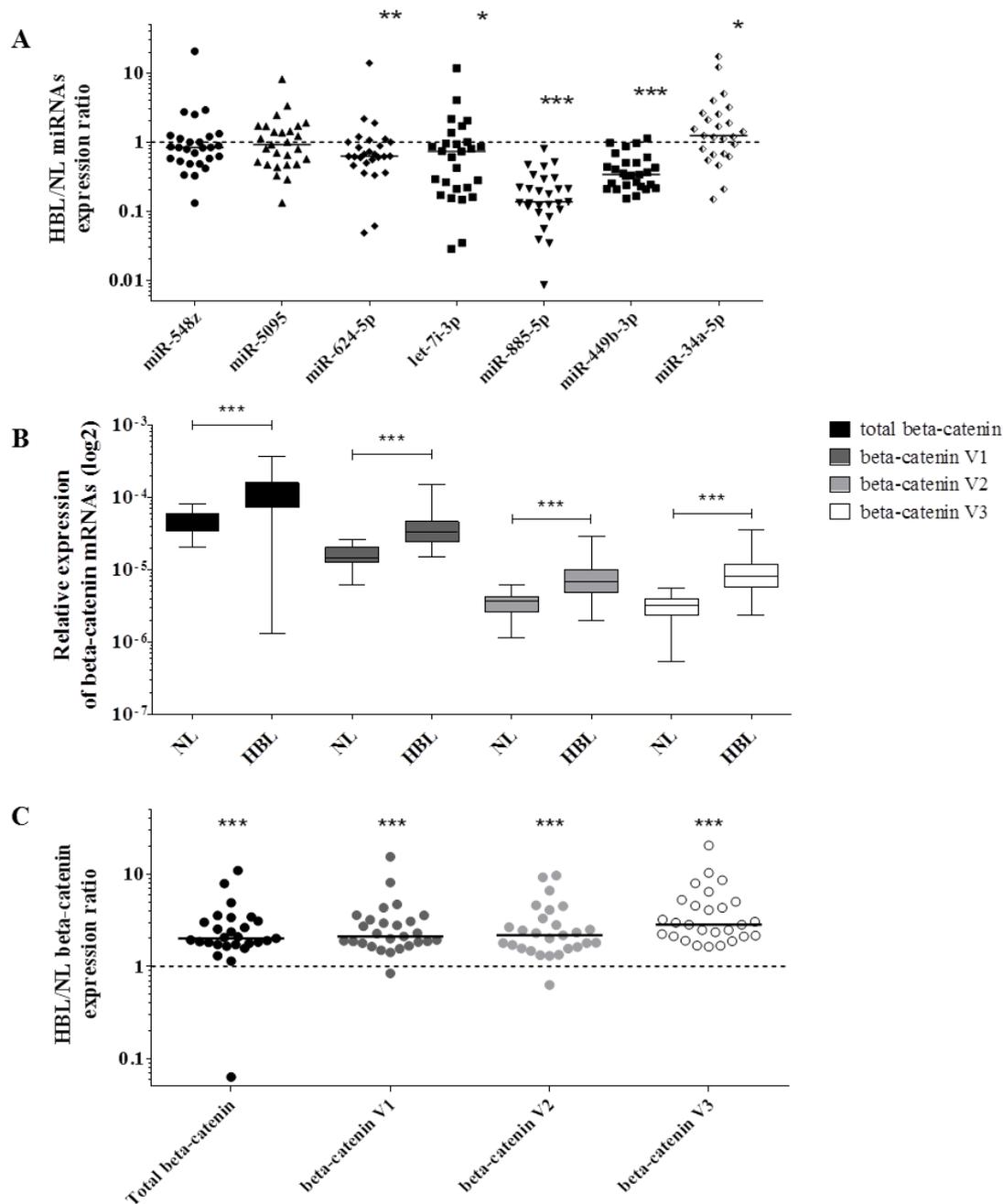
Indersie E et al, Supplementary figure S2



Supplementary figure S2. Regulation of beta-catenin wild-type and exon 3-deleted proteins in HepG2 cells.

HepG2 cells were transfected with the indicated small RNAs. Relative expressions of wild-type (WT Exon3; left panel) and exon 3-deleted (Δ Exon3; right panel) beta-catenin proteins were measured by immunoblotting. See Figure 2C for a representative blot. Bars represent means + SEM (n=3, ANOVA $p < 0.0001$). ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

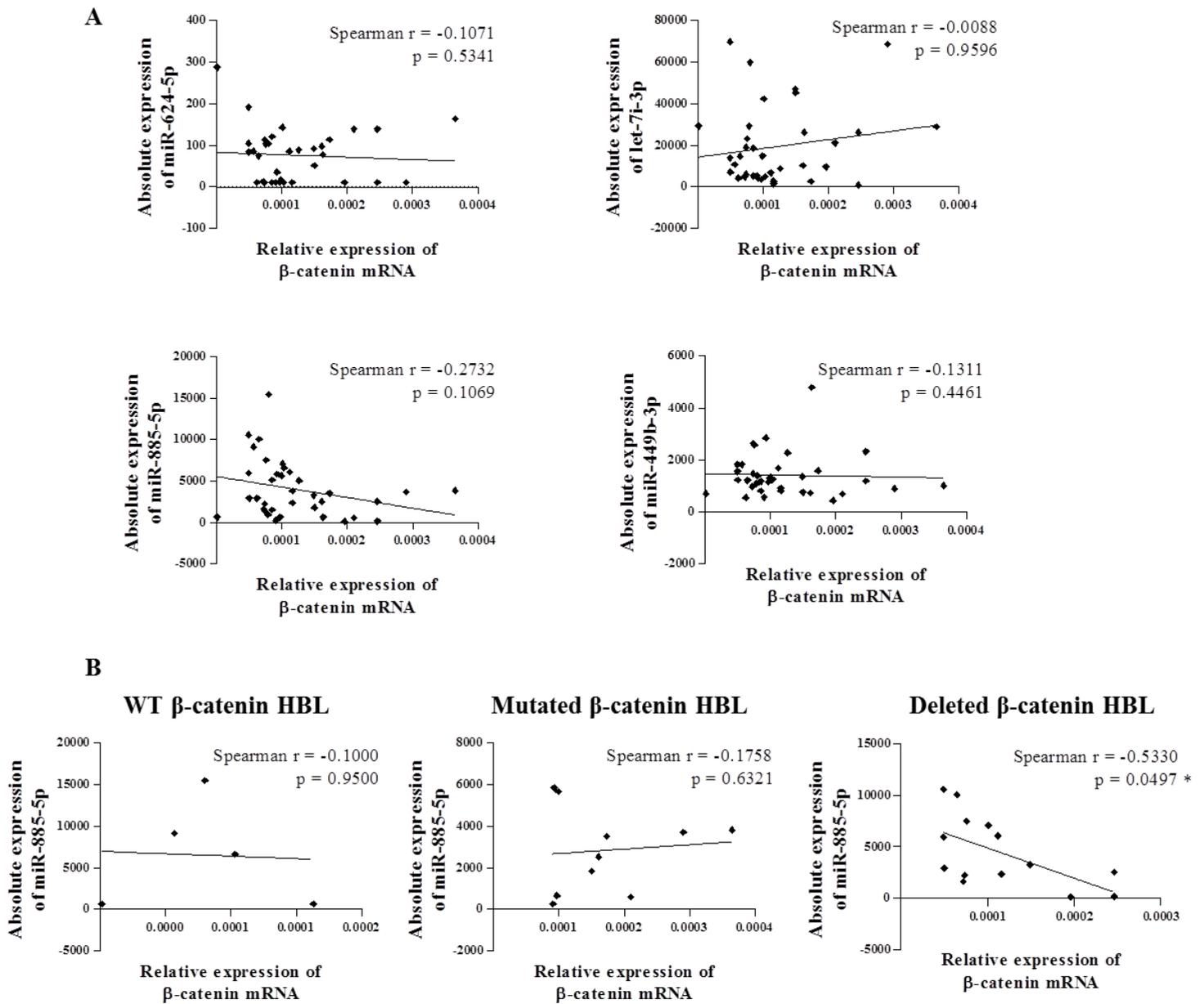
Indersie E et al, Supplementary figure S3



Supplementary figure S3. MiRNAs expression in HBL paired samples and beta-catenin mRNA expression in HBL samples.

(A) HBL/adjacent NL expression ratios of indicated miRNAs in 27 pairs of tumor samples. Ratios are represented as dots. A normality test was used to analyze samples. When data followed a Gaussian distribution the two-tailed t test was applied. When not, the two-tailed Wilcoxon test was applied. (B-C) The relative expression of total beta-catenin mRNA and of each of the 3 *CTNNB1* mRNA variants was measured in 33 NTL and 36 HBL (B) including 27 pairs of samples (C). (B) Unpaired data are presented as box and whiskers with minimal and maximal values. (C) Paired samples are presented as dot showing ratios of HBL/adjacent NL relative expression. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

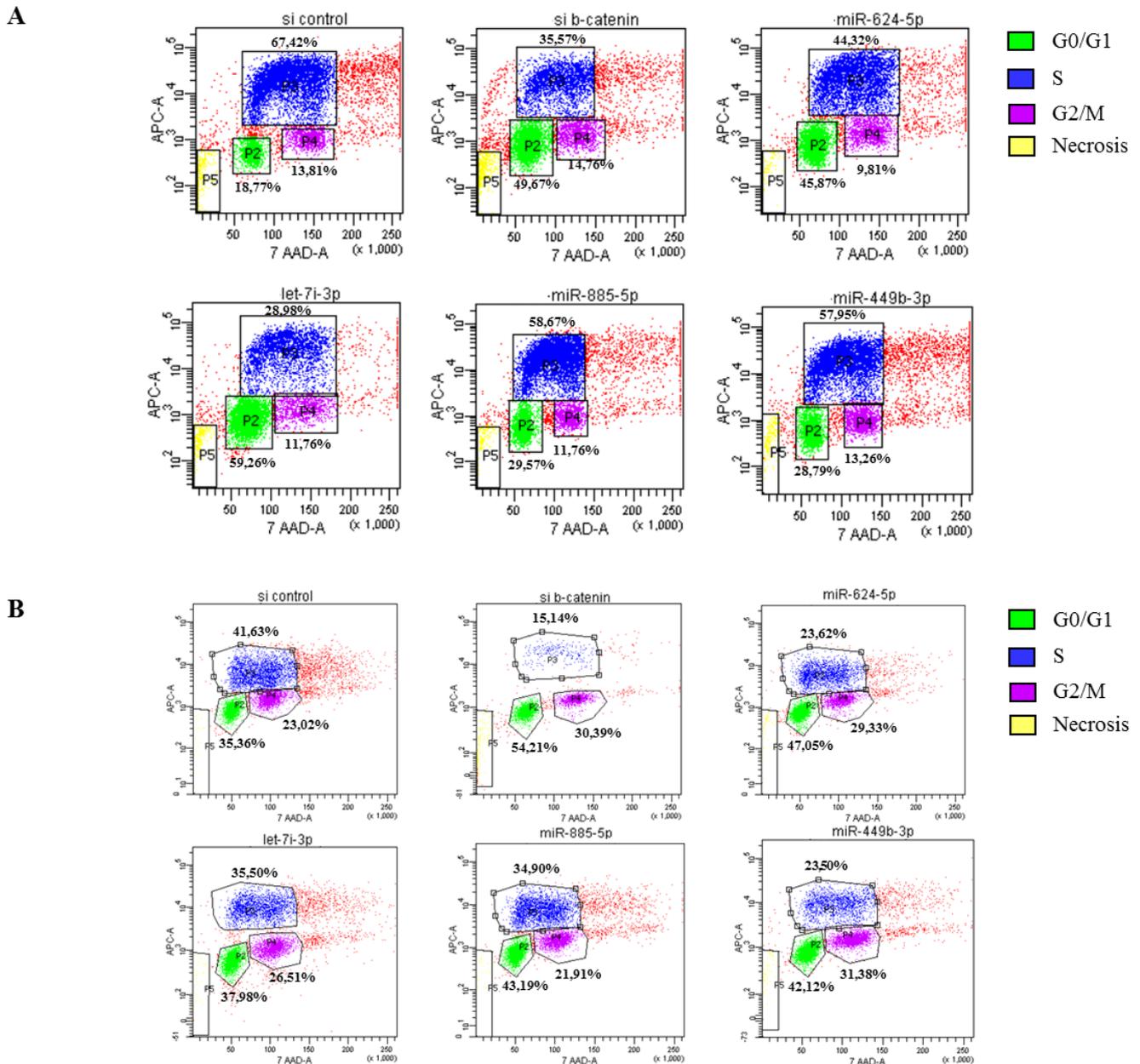
Indersie E et al, Supplementary figure S4



Supplementary figure S4. Correlations between miRNAs and beta-catenin mRNA in HBL samples.

(A) Expression of beta-catenin mRNA was correlated to the expression of miR-624-5p, let-7i-3p, miR-885-5p or miR-449b-3p in 36 HBL samples. (B) Expression of miR-885-5p was correlated to the expression of beta-catenin mRNA in 5 HBL with wild-type *CTNNB1* (left panel), 10 HBL carrying a point mutation in *CTNNB1* (middle panel) and 14 HBL carrying a deletion in *CTNNB1* (right panel). Spearman r correlations. * $p < 0.05$.

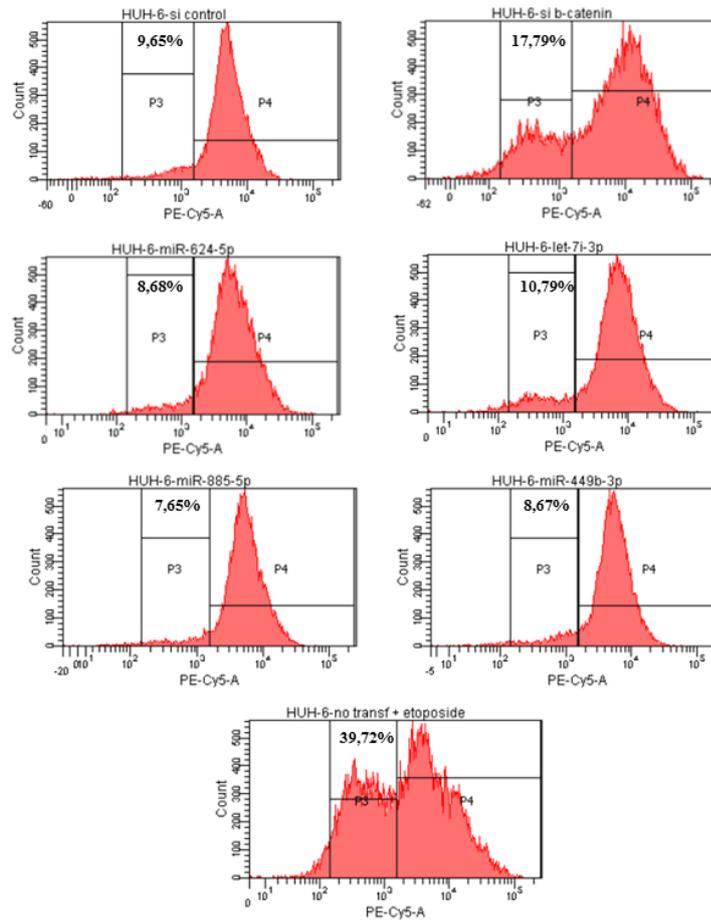
Indersie E et al, Supplementary figure S5



Supplementary figure S5. MiR-624-5p, let-7i-3p, miR-885-5p and miR-449b-3p inhibit HBL cells proliferation.

(A-B) Representative data of APC BrdU/7-AAD measurements performed by flow cytometry in Huh6 cells (A) and HepG2 cells (B) transfected with the indicated small RNAs.

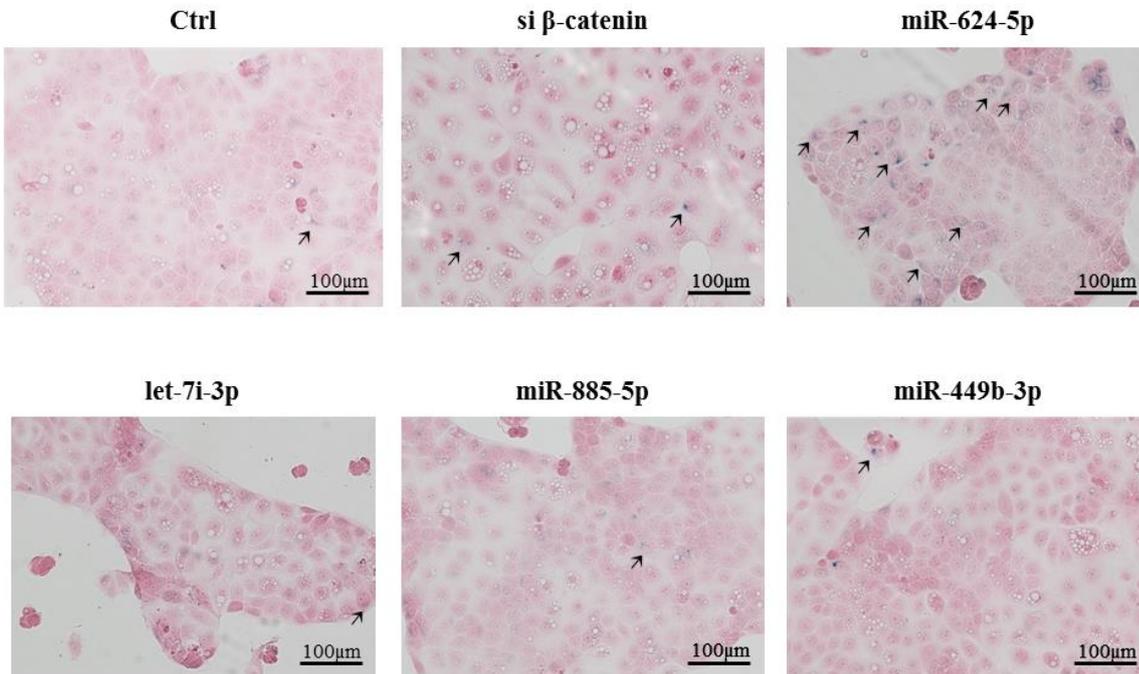
Indersie E et al, Supplementary figure S6



Supplementary figure S6. MiR-624-5p, let-7i-3p, miR-885-5p and miR-449b-3p do not induce apoptosis of HBL cells.

Representative data of TMRM staining measured by flow cytometry in Huh6 cells transfected with the indicated small RNAs or treated with etoposide (200 μ g/ μ L).

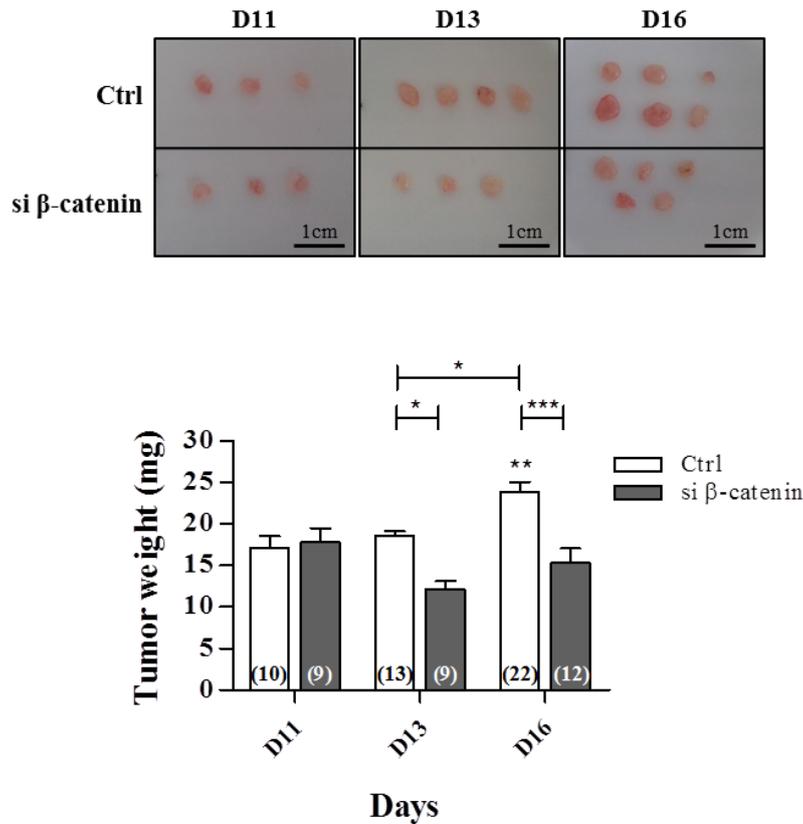
Indersie E et al, Supplementary figure S7



Supplementary figure S7. MiR-624-5p induces senescence of HBL cells.

Representative pictures of beta-galactosidase stained Huh6 cells three days after transfection with control RNA (Ctrl), si- β -catenin, miR-624-5p, let-7i-3p, miR-885-5p and miR-449b-3p. Cells were co-stained with eosin for analysis. Arrows show blue-stained senescent cells.

Indersie E et al, Supplementary figure S8



Supplementary figure S8. Beta-catenin silencing inhibits HBL tumor growth *in vivo*.

One, 3 and 6 days after implantation of si- β -catenin- or Ctrl-transfected Huh6 cells, tumors were extracted from the CAM and weighed. Top panel: Representative tumors at the indicated days. Bottom panel: Bars represented means \pm SEM (n=3, ANOVA p<0.0001). The total number of eggs analyzed in each group is indicated in brackets in graph bars. *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

CONCLUSION ET DISCUSSION

En utilisant un système rapporteur fluorescent sous le contrôle des régions 5'NT et 3'NT de la β -caténine, nous avons identifié neuf miARNs qui inhibent l'expression de la β -caténine endogène dans les deux lignées cellulaires dérivées d'HBL Huh6 et HepG2. Parmi ces neuf miARNs, quatre ont une expression diminuée dans les échantillons de patients atteints d'HBL en comparaison avec des échantillons de foies normaux. MiR-624-5p, let-7i-3p, miR-885-5p et miR-449b-3p inhibent également la croissance des cellules d'HBL *in vitro* en bloquant le cycle cellulaire en phase G0/G1. Cet effet est probablement une conséquence de l'inhibition de l'activité transcriptionnelle de la β -caténine par ces miARNs. Ces quatre miARNs sont donc des candidats intéressants pour une thérapie par remplacement de miARNs dans l'HBL, c'est pourquoi le dépôt d'une demande de brevet a été réalisée. Nous nous sommes particulièrement intéressés à miR-624-5p qui, en plus de son effet très efficace sur la croissance cellulaire dans les deux lignées étudiées, est le seul à induire la sénescence des cellules. Nous avons montré que ce miARN interagit de manière directe avec l'exon 16B situé dans la 3'NT de la β -caténine, comme suggéré dans le crible secondaire. MiR-624-5p inhibe directement la β -caténine ayant pour conséquence d'arrêter son activité transcriptionnelle et la croissance cellulaire *in vitro*. Nous avons également montré que miR-624-5p bloque la progression tumorale des nodules formés par la xéno greffe des cellules dérivées d'HBL sur la CAM de poulet *in vivo*.

- **Choix du système rapporteur portant les régions 5' et 3'NT de la β -caténine**

Dans ce travail, nous avons choisi d'utiliser un système rapporteur pour rechercher les miARNs capables de réguler la β -caténine *via* la 5'NT et/ou la 3'NT de son ARNm (Figure 64 ; Publication figure 1). Ce système permet d'étudier rapidement et de manière robuste l'effet d'un grand nombre de molécules sur les régions d'intérêt grâce à la lecture rapide de la fluorescence de deux gènes rapporteurs. Nous avons choisi d'étudier les deux régions non codantes de la β -caténine car les sites d'interaction des miARNs sont majoritairement décrits dans ces régions (Bartel, 2009 ; Lytle et al., 2007 ; Maurel et al., 2013a). Cependant, de plus en plus d'études montrent que les miARNs peuvent également s'hybrider sur la séquence codante des ARNm (Helwak et al., 2013 ; Tay et al., 2008), ou encore sur les promoteurs (Place et al., 2008). Il serait donc potentiellement intéressant de réaliser de nouveaux cribles

avec la région codante de la β -caténine ou avec son promoteur. Ces cribles pourraient permettre d'identifier de nouveaux miARNs régulateurs de la β -caténine et de décrypter de nouveaux mécanismes d'action au sein de ces régions.

- **Choix de la banque de miARNs synthétiques utilisée**

Le crible est basé sur une banque de 1712 miARNs synthétiques fournie par la société Qiagen, correspondant à la Version 17 de la miRBase (<http://www.mirbase.org/>). Le nombre de miARNs identifiés, toutes espèces confondues, a augmenté de façon exponentielle au cours des 25 dernières années (Figure 65). A ce jour, la miRBase répertorie 2603 miARNs matures chez l'homme (Version 21). Ainsi, la banque de miARNs utilisée pour le crible que nous avons réalisé correspond à 65% des miARNs humains connus en 2016.

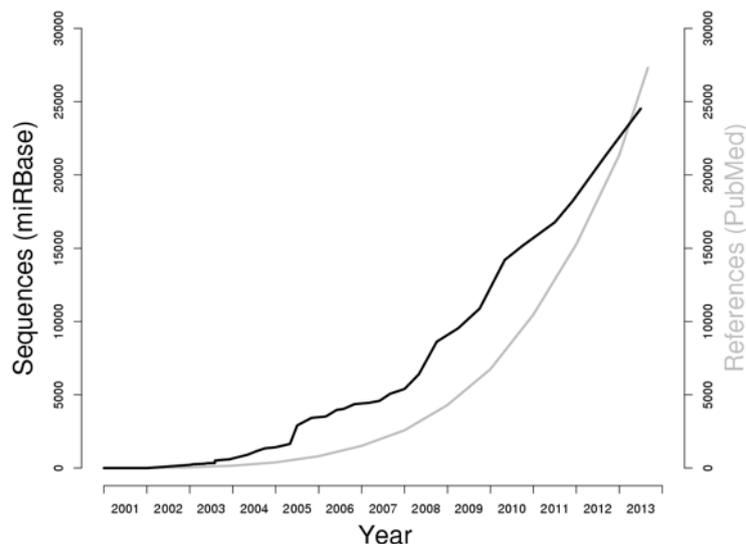


Figure 65 : Nombre de séquences de miARNs annotés dans miRBase et de publications étudiant les miARNs entre 2001 et 2013 (source <http://www.mirbase.org/>)

Les bases de données des miARNs contiennent également des séquences identifiées comme des miARNs mais dont la nature réelle est parfois incertaine. En effet, certains miARNs décrits pourraient être des artéfacts, correspondant aux séquences d'autres miARNs portant des mutations, ou encore à des parties d'autres ARNs plus longs (ARNm, ARNt, ARNr) (Hansen et al., 2011 ; Meng et al., 2012). Au cours des années précédentes, de gros efforts ont été faits afin de d'essayer de discriminer les miARNs réels des « faux » miARNs.

Notamment, miRBase a ajouté la notion de miARNs à « confiance élevée » à sa base de données (Kozomara and Griffiths-Jones, 2014). Cette notion est basée sur plusieurs critères qui permettent de donner une valeur de confiance quant à l'existence de chaque miARN. Ces critères sont notamment la grande profondeur de séquençage, le nombre de séquences alignées pour chaque brin du miARN (>10), l'abondance des séquences pour chaque brin du précurseur en épingle à cheveux, l'alignement des séquences au niveau de l'extrémité 5' du précurseur en épingle à cheveux, l'énergie libre du repliement en structure épingle à cheveux ou encore la présence de 2 nucléotides sortant à l'extrémité 3' (caractéristique du processus de maturation par Drosha et Dicer, voir section III.1.2). Seulement 20% des miARNs actuellement annotés répondent à ces critères (Kozomara and Griffiths-Jones, 2014), mais ce chiffre bas est souvent dû au nombre insuffisant de séquences alignées sur les deux brins pour certains miARNs. Ces miARNs ne sont donc pas enlevés de la miRBase, mais ils sont classés en miARNs de « confiance faible ».

Les miARNs synthétiques utilisés en recherche pour des analyses de sur-expression sont chimiquement modifiés pour augmenter leur efficacité et leur stabilité (voir section IV.3.2). Ces miARNs possèdent la même séquence nucléotidique que les miARNs endogènes, ils ont donc normalement les mêmes ARNm cibles. Cependant ces modifications changent la structure de ces miARNs. Ces changements moléculaires et structurels pourraient avoir un impact sur l'activité régulatrice des miARNs synthétiques, qui ne sont donc pas forcément le reflet de l'activité des miARNs endogènes.

Ainsi, il est nécessaire d'être prudent sur l'analyse et l'interprétation des données obtenues. L'effet d'un miARN synthétique pourrait varier légèrement par rapport au miARN endogène correspondant. Par exemple, son activité pourrait être plus efficace. Cependant, lorsqu'un miARN synthétique a un effet inhibiteur sur une cible d'intérêt ou sur des processus cellulaires, son activité régulatrice présente un intérêt thérapeutique.

Un moyen de vérifier l'effet spécifique d'un miARN est d'utiliser un oligonucléotide antisens du miARN d'intérêt (voir section IV.3.1). Cet antimir permet d'observer l'effet de l'inhibition du miARN endogène correspondant, et devrait provoquer un effet inverse par rapport à sa sur-expression par un miARN synthétique. Cependant, cet effet dépend également du niveau d'expression du miARN endogène dans la cellule d'intérêt. En effet, j'ai essayé de bloquer chacun des quatre miARNs qui ont un effet inhibiteur sur les processus oncogéniques (miR-624-5p, let-7i-3p, miR-885-5p et miR-449b-3p, voir Publication figure 4)

et d'analyser la conséquence de cette inhibition sur la prolifération cellulaire dans les cellules Huh6. L'utilisation combinée du miARN synthétique et de l'antimiR dans des conditions stœchiométrique permet de restaurer une prolifération cellulaire similaire au petit ARN contrôle (Ctrl) (données non montrées) [par rapport à l'inhibition de la prolifération causée par la réintroduction des miARNs synthétiques (Publication figure 4A, panel de droite)]. Ces données montrent que les antimiRs spécifiques utilisés sont capable de cibler les miARNs d'intérêt. Cependant, l'utilisation des inhibiteurs spécifiques de chaque miARN, seuls ou en combinaison, ne provoque pas d'augmentation de la prolifération cellulaire par rapport au Ctrl (données non montrées). Dans nos expériences, l'absence d'effet inverse de l'antimiR par rapport au miARN peut être expliquée par la faible expression de chacun des miARNs endogènes dans les cellules Huh6, ces miARNs étant sous-exprimés dans l'HBL (Publication figure 3).

- **Choix des miARNs candidats sélectionnés à partir des données du crible**

Lors de mon arrivée au laboratoire, j'ai analysé les données du crible primaire afin d'établir la liste des miARNs d'intérêt, dont nous allons analyser l'effet régulateur sur la β -caténine endogène. J'ai choisi de sélectionner seulement les miARNs qui ont un effet négatif sur l'expression du gène rapporteur. En effet, la β -caténine étant accumulée dans la majorité des HBL, nous souhaitons identifier des miARNs qui inhibent son expression. Une diminution d'expression de la cible ARNm de moitié confère un effet intéressant pour observer un impact sur les processus cellulaires régulés par la protéine correspondante (Selbach et al., 2008) et pour envisager l'utilisation d'un miARN synthétique comme molécule thérapeutique. Nous souhaitons donc sélectionner les miARNs dont le FCR est inférieur à -1 (inhibition de 50%), mais cela limitait la sélection à seulement 10 miARNs. J'ai donc choisi d'étendre la liste jusqu'au miR-885-5p (FCR = -0.781, inhibition du ratio GFP/Tomato supérieure à 42%), déjà décrit comme sous-régulé chez les patients atteints d'HBL (Magrelli et al., 2009). Au final, cette extension a conduit à la sélection de 26 miARNs candidats (Publication figure 1).

Le crible secondaire a ensuite été réalisé afin d'éliminer d'éventuels miARNs non spécifiques dans notre sélection et de déterminer avec laquelle des deux régions NT chacun des 26 miARNs candidats interagit (Figure 64). L'élimination des miARNs non spécifiques est une étape clef du crible. En effet, les séquences des rapporteurs GFP et Tomato n'existent

pas dans le transcriptome humain. Pour autant, cela ne signifie pas que les miARNs ne peuvent pas interagir avec ces régions et les réguler. Nous avons donc étudié la modulation du ratio GFP/tomato après l'introduction des miARNs candidats avec le rapporteur GFP qui ne porte pas les régions NT de la β -caténine. Dans le cas d'un effet non spécifique d'un miARN, nous aurions observé une variation du ratio GFP/tomato par rapport au petit ARN contrôle. Cette étape a permis de confirmer l'absence de faux-positifs dans notre sélection, démontrant la robustesse de notre approche et sa pertinence au niveau biologique. La deuxième partie de ce crible secondaire a également permis de déterminer que deux miARNs agissent sans distinction *via* les deux régions 5' et 3'NT de la β -caténine. Les 24 autres agissent uniquement *via* la région 3'NT de la β -caténine (Publication figure 1 et Supplementary figure S1). Ces résultats concordent avec les données de la littérature qui montrent que les miARNs agissent majoritairement *via* la 3'NT plutôt que la 5'NT (Lytle et al., 2007 ; Bartel, 2009 ; Maurel et al., 2013a ; Helwak et al., 2013). Afin d'affirmer que chacun des miARN a une action directe sur les régions NT de la β -caténine, des analyses fonctionnelles supplémentaires sont nécessaires. Nous avons fait ces analyses plus tard pour miR-624-5p (Publication figure 5).

- **Neuf miARNs candidats inhibent l'expression de la β -caténine endogène**

Suite aux deux phases du crible, j'ai analysé l'effet des 26 miARNs candidats sur la β -caténine endogène. J'ai d'abord réalisé ces analyses dans la lignée cellulaire dérivée d'HBL Huh6. Ces cellules portent une mutation hétérozygote de *CTNNB1*, conduisant à l'expression d'une version sauvage et d'une version mutée dans l'exon 3 (G34V) de la protéine. Cette mutation empêche la phosphorylation de la β -caténine mutée par le complexe de dégradation (voir Figure 6), et donc sa prise en charge par le protéasome. Par conséquent, la β -caténine s'accumule dans le cytoplasme et dans le noyau des cellules Huh6 (Figure 36 ; Cairo et al., 2008 ; Armengol et al., 2011 ; Tomlinson and Kappler, 2012 ; Jia et al., 2014 ; Buendia, 2014). La version mutée est donc probablement plus abondante que la version sauvage dans la cellule. Les deux versions de la β -caténine ayant la même séquence à un acide aminé près, elles font la même taille et il n'est pas possible de les distinguer en western blot.

J'ai analysé l'effet régulateur de chacun des 26 miARNs candidats sur la β -caténine totale au niveau protéique. Cette analyse a conduit à l'identification de neuf miARNs capables d'inhiber significativement l'expression protéique de la β -caténine dans les cellules Huh6 (Publication figure 2A). En plus de son accumulation au niveau protéique, l'ARNm de la β -

caténine est également augmentée dans les HBL (Figure 63). Parmi ces neuf miARNs, sept inhibent également son expression, un a un effet minime et un autre augmente légèrement son niveau d'ARNm (Publication figure 2B). Ces différences peuvent être liées aux mécanismes d'action des miARNs. En effet, ces petits ARNs inhibent l'expression de leur cible en dégradant l'ARNm dans 66 à 90% des cas, mais peuvent également empêcher la traduction de la protéine sans dégrader l'ARNm (voir section III.3.1 ; Subtelny et al., 2014 ; Eichhorn et al., 2014). Lorsque l'ARNm n'est pas dégradé il est maintenu dans le complexe miRISC. Ainsi, il est possible que l'augmentation du niveau d'ARNm observé avec miR-492 soit la conséquence du maintien du duplex miARN:ARNm au sein du RISC dans la cellule.

J'ai ensuite souhaité confirmer l'effet inhibiteur de ces neuf miARNs sur la β -caténine dans une autre lignée cellulaire dérivée d'HBL, HepG2. Cette lignée est assez particulière car elle est utilisée comme lignée de CHC ou comme lignée d'HBL. Elle a été établie en 1979 par B. Knowles et ses collaborateurs (Aden et al., 1979) et décrite comme dérivée du foie d'un adolescent de 15 ans avec un CHC bien différencié. A cause de la confusion entre les deux types de cancers, des analyses supplémentaires ont été effectuées *a posteriori*. Les caractéristiques histologiques, moléculaires et les anomalies chromosomiques indiquent toutes que les cellules HepG2 semblent issues d'un HBL plutôt qu'un CHC (López-Terrada et al., 2009b). De plus, ces cellules contiennent une délétion hétérozygote de *CTNNB1* qui conduit à l'expression d'une version de la β -caténine délétée dans l'exon 3. Comme pour les Huh6, la version de la β -caténine qui porte une délétion est plus difficilement dégradée et s'accumule dans le cytoplasme et le noyau. Elle est également plus abondante que la version sauvage dans la cellule mais, contrairement aux cellules Huh6, la différence de taille entre les deux versions de la β -caténine des HepG2 permet de les distinguer en western blot.

Par comparaison avec les Huh6, nous avons regardé l'effet des miARNs sur l'expression globale de la β -caténine dans les cellules HepG2. Huit des neuf miARNs ont un effet inhibiteur significatif, miR-449b-3p ayant un effet plus faible et inhibant l'expression globale de la β -caténine de 20% (Publication figure 2C). Cependant, la distinction des deux versions montre que les neuf miARNs ont un effet supérieur à 50% sur l'expression de la β -caténine sauvage alors que leur effet est moins important sur la β -caténine mutée (Supplementary figure S2). Cette observation a déjà été faite par d'autres équipes, mais aucune explication précise n'a été donnée pour le moment (Veronese et al., 2011 ; Cairo et al., 2008). L'inhibition de la β -caténine est confirmée en partie par une diminution globale de l'expression de l'ARNm pour six des neuf miARNs (Publication figure 2D et Figure 66, panel

de gauche). Pour comparaison, nous avons également analysé l'effet des miARNs uniquement sur l'expression de l'ARNm de la β -caténine sauvage [WT] (Figure 66, panel de droite). Nous n'avons pas d'oligonucléotides pour identifier uniquement la version délétée de la β -caténine dans cette expérience. Les résultats similaires obtenus concernant l'expression de la β -caténine globale comparée à celle de la sauvage uniquement (Figure 66, panel de gauche et panel de droite pour comparaison) suggèrent que les ARNm des deux versions de la β -caténine sont régulés de la même manière par les miARNs.

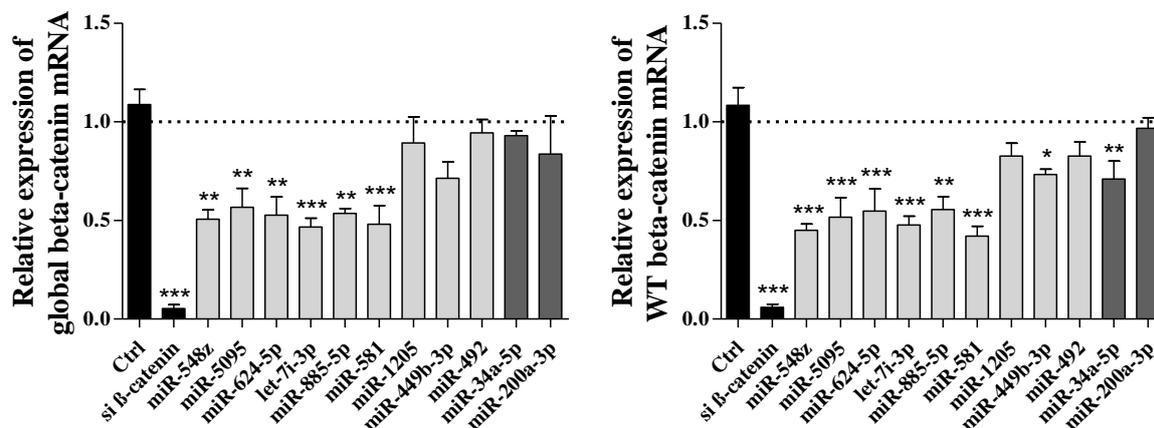


Figure 66 : Effet des miARNs sur l'expression de l'ARNm de la β -caténine dans les cellules HepG2

Expression relative de l'ARNm global de la β -caténine (sauvage + délété ; panel de gauche) et uniquement sauvage (WT, panel de droite) après transfection avec les petits ARNs indiqués, dans les cellules HepG2 (n=3, ANOVA $p < 0.0001$). Les barres représentent la moyenne \pm SE. Un test statistique ANOVA suivi d'un post-test Bonferroni a été réalisé. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Ces données suggèrent que les miARNs influencent l'expression de l'ARNm de la β -caténine, qu'il soit sauvage ou délété. Cependant, le statut délété de la β -caténine confère une certaine résistance au niveau protéique. Nous avons fait l'hypothèse que malgré l'inhibition par les miARNs, la version délétée de la β -caténine a une demi-vie plus longue dans la cellule du fait de son échappement au système de dégradation par le protéasome. La β -caténine mutée exprimée dans les cellules Huh6 pourrait également être plus résistante à l'inhibition par les miARNs pour les mêmes raisons, mais nous ne pouvons pas discriminer les deux versions dans cette lignée.

De manière générale, parmi les 26 miARNs candidats identifiés dans le crible, neuf régulent négativement l'expression de la β -caténine endogène au niveau protéique dans les deux lignées cellulaires dérivées d'HBL que j'ai testées.

- **Quatre miARNs candidats sont sous-exprimés dans les tumeurs**

Par la suite, nous nous sommes intéressés à l'expression des neufs miARNs régulant la β -caténine dans les échantillons de patients atteints d'HBL. En effet, mon travail a pour but l'identification de miARNs qui pourraient être utilisés en thérapie pour inhiber l'expression de la β -caténine et la croissance tumorale. Ainsi, je suis plus particulièrement intéressée par les miARNs sous-exprimés dans les tumeurs de patients afin d'envisager une stratégie de réintroduction de ces miARNs dans les cellules tumorales. Grâce à nos collaborateurs, dont Marie-Annick Buendia (INSERM UMR1193, Hôpital Paul Brousse, Villejuif, France), nous avons réussi à obtenir une collection de 36 échantillons tumoraux et 33 échantillons de foies sains incluant 27 paires. Etant donné le faible nombre de cas d'HBL, il s'agit d'une cohorte plutôt importante. Nous avons mis en évidence la sous-expression dans les HBL de quatre miARNs, miR-624-5p, let-7i-3p, miR-885-5p et miR-449b-3p, parmi les neufs candidats. Les autres miARNs sont trop faiblement exprimés pour être détectés ou non dérégulés entre les échantillons tumoraux et non tumoraux (Publication figure 3A et Supplementary figure S3A).

Au niveau expérimental, pour réaliser cette analyse, nous avons extrait les ARNs totaux issus des pièces tumorales grâce à un kit (*mirVana*TM miRNA Isolation Kit, Life Technologies) puis réalisé des RT-qPCR sur ces extraits. Les miARNs mesurant une vingtaine de nucléotides, il n'est pas possible d'amplifier un fragment de cette taille avec deux oligonucléotides classiques mesurant la même taille. Ainsi différents fournisseurs ont créé leurs propres techniques d'amplification. Nous avons choisi la technologie *MiScript PCR system* (Qiagen) dont le principe est basé sur la polyadénylation des ARNs avant l'étape de transcription inverse. La présence d'une queue poly(A) permet d'allonger les miARNs pour pouvoir les amplifier. Ensuite, un oligonucléotide universel est utilisé pour l'amplification de la queue poly(A) en *reverse*, et un oligonucléotide basé sur la séquence du miARN apporte la spécificité d'amplification en *forward*. Un inconvénient de ces kits est que les oligonucléotides sont modélisés par les fournisseurs et leur spécificité pour les miARNs d'intérêts est déterminée seulement de manière *in silico*. La présence d'un seul oligonucléotide spécifique en 5' pourrait conférer un manque de spécificité. Des petits ARNs ayant la même séquence « graine » que le miARN d'intérêt, ou des séquences proches, côté 5' pourraient également être amplifiés. Il est donc nécessaire de réaliser des contrôles en utilisant le miARN synthétique du miARN endogène d'intérêt en contrôle positif et en identifiant d'autres miARNs dont la séquence est proche de celui d'intérêt en contrôle négatif. Nous

avons toujours réalisé les contrôles positifs, mais il est parfois difficile de déterminer les contrôles négatifs qui permettront de détecter une aspécificité. Par conséquent, il est possible que la technologie d'amplification choisie pour mesurer le taux des miARNs d'intérêts influence le résultat final. L'idéal est de faire ces expériences avec plusieurs technologies différentes. Dans le cas des HBL, malgré les quantités restreintes d'ARNs pour réaliser ces analyses, nous avons séquencé les miARNs dans les mêmes tumeurs que celles analysées en RT-qPCR. Nous sommes actuellement en cours d'analyse de ces données.

Pour aller plus loin, nous avons également corrélé l'expression de ces quatre miARNs avec les données cliniques des échantillons analysés. Ces analyses montrent que l'expression de miR-885-5p est inversement corrélée au stade tumoral et à la présence de nodules multiples (Publication figure 3B). Cela signifie que plus le stade tumoral est avancé (voir section I.2.1.2) et plus le nombre de nodules augmente, moins miR-885-5p est exprimé. Ainsi, la diminution de l'expression de miR-885-5p, déjà observée au préalable par Magrelli et al. (2009), pourrait être un marqueur de diagnostic tardif et de mauvais pronostic pour l'HBL.

- **Les quatre miARNs candidats bloquent la croissance des cellules dérivées d'HBL**
- Les quatre miARNs inhibent la prolifération cellulaire

MiR-624-5p, let-7i-3p, miR-885-5p et miR-449b-3p inhibant l'expression de la β -caténine dans les lignées cellulaires dérivées d'HBL et étant sous-régulés chez les patients, j'ai analysé l'effet de leur réintroduction sur les processus oncogéniques. En effet, leur potentiel en tant que miARNs thérapeutiques dépend de leur effet sur le phénotype tumoral.

J'ai montré que ces quatre miARNs inhibent la prolifération des cellules d'HBL Huh6 et HepG2 (Publication figure 4A). Chaque miARN a un effet légèrement différent dans les deux lignées étudiées sauf miR-624-5p qui est très efficace dans les deux cas. Entre autres, miR-449b-3p a un effet modéré sur la prolifération des cellules Huh6 alors qu'il est très efficace dans les cellules HepG2. Cet effet est d'ailleurs plutôt étonnant car miR-449b-3p inhibe significativement l'expression de la β -caténine globale dans les cellules Huh6 (Publication figure 2A) alors que cette inhibition n'est pas significative dans les cellules HepG2 (Publication figure 2C). Ces résultats suggèrent que miR-449b-3p pourrait avoir une autre cible que la β -caténine dont l'inhibition expliquerait le phénotype observé, et dont le rôle serait particulièrement important dans les cellules HepG2.

- Les quatre miARNs bloquent le cycle cellulaire en G0/G1

L'étude du cycle cellulaire après transfection par chacun des quatre miARNs a montré une augmentation significative du pourcentage de cellules Huh6 en phase G0/G1 (Publication figure 4B, panel de gauche et Supplementary figure S5A). Cette augmentation n'est pas significative dans les cellules HepG2 lorsque les données de trois expériences indépendantes sont compilées (Publication figure 4B, panel de droite et Supplementary figure S5B), mais une tendance à l'arrêt du cycle en G0/G1 est observée. Cet effet moins drastique dans les cellules HepG2 pourrait être expliqué par deux phénomènes : (i) les cellules HepG2 poussant en agrégats, celles situées au centre de ces agrégats reçoivent peut-être moins de BrdU et donc en incorporent moins dans leur ADN lors de la réplication, (ii) les cellules HepG2 ont un temps de génération plus long que les cellules Huh6 (Schnater et al., 2006), elles incorporent donc moins rapidement le BrdU (le BrdU a été incubé durant 45 minutes pour les deux lignées cellulaires). Ces hypothèses sont soutenues par le fait que le pourcentage de cellules en phase S dans la condition contrôle (Ctrl) des cellules HepG2 est bien plus faible que celui des cellules Huh6 (Publication figure 4B), engendrant des écarts moins importants en présence des miARNs. Dans les deux lignées, les miARNs les plus efficaces sur l'inhibition de la prolifération cellulaire (Publication figure 4A) sont ceux qui ont l'impact le plus élevé sur l'augmentation du pourcentage de cellules en phase G0/G1 (Publication figure 4B).

- Les quatre miARNs inhibent l'activité transcriptionnelle de la β -caténine

L'augmentation de l'activité de la voie Wnt a un rôle essentiel dans la tumorigenèse et dans la progression tumorale de l'HBL (voir sections I.3.1.2 et II.3) et les quatre miARNs d'intérêt inhibent l'expression de la β -caténine (Publication figure 2). Dans les cellules HepG2, nous avons remarqué que les miARNs ont un impact plus fort sur la β -caténine sauvage que sur la β -caténine mutée (Supplementary figure S2). Cette dernière étant la forme protéique la plus abondante, j'ai vérifié si les miARNs d'intérêt sont capables d'induire une inhibition efficace de l'activité transcriptionnelle de la β -caténine, reflétant une inhibition de la β -caténine accumulée dans le noyau. Pour cela j'ai réalisé des analyses de « TOP Flash », largement utilisées pour étudier l'activité transcriptionnelle de la β -caténine (Korinek et al., 1997). Ces analyses sont basées sur l'utilisation de plasmides rapporteurs exprimant la luciférase sous le contrôle du site d'interaction du partenaire transcriptionnel de la β -caténine TCF avec ses gènes cibles (WRE), sous sa forme mutée (FOP, CCTTTGATC) ou sauvage (TOP, CCTTTGGCC). Le plasmide FOP sert de contrôle négatif puisque le complexe β -caténine/TCF n'est pas capable d'exercer son activité transcriptionnelle sur le site muté de la

cible. Si la β -caténine est transcriptionnellement active, le complexe β -caténine/TCF s'associe avec son site d'interaction sur le plasmide TOP. Une augmentation de l'activité luciférase est alors observée, reflétant le niveau d'activité transcriptionnelle de la β -caténine. Ces analyses montrent que les quatre miARNs d'intérêt inhibent l'activité transcriptionnelle de la β -caténine dans les deux lignées étudiées avec un effet variable (Publication figure 4C). Le profil d'inhibition de l'activité transcriptionnelle de la β -caténine est très similaire au profil d'inhibition de la prolifération cellulaire, sans qu'une corrélation significative n'ait été observée (données non montrées).

- Les quatre miARNs n'activent pas la mort cellulaire par apoptose

Pour aller plus loin, et vue la forte inhibition de la prolifération cellulaire causée certains miARNs, j'ai étudié l'effet des quatre candidats sur l'activation de la mort cellulaire par apoptose dans les cellules Huh6. J'ai utilisé trois techniques différentes pour détecter l'activation de l'apoptose : la détection du clivage des Caspases 3 et 7 par luminescence, la détection de la dépolarisation membranaire mitochondriale par le tetramethylrhodamine, methyl ester (TMRM) et la détection de la perte de l'intégrité membranaire par un marquage des phosphatidylsérines externalisés au PE (PE Annexin V). Ces trois techniques ont montré qu'aucun des quatre miARNs n'induit l'apoptose des cellules Huh6 (Publication figure 4D et Supplementary figure S6). Cependant, une légère augmentation de l'activité apoptotique est détectée avec le siARN spécifique de la β -caténine. Cette activation signifie qu'une forte inhibition de la β -caténine est capable d'induire l'apoptose des cellules Huh6. Les miARNs ayant un impact moins important que le siARN spécifique, ils ne semblent pas inhiber suffisamment la β -caténine pour induire l'activation de l'apoptose.

- Un miARN, miR-624-5p, active la sénescence cellulaire

Puisque les miARNs induisent un arrêt du cycle cellulaire en phase G0/G1, je me suis également intéressée à la sénescence. C'est un processus de mort cellulaire réversible lié au vieillissement. Un arrêt du cycle cellulaire en phase G0/G1 peut induire l'activation de la sénescence des cellules, et ce phénomène peut être lié à une activité suppresseur de tumeur (Serrano et al., 1997). De manière intéressante, seulement miR-624-5p induit la sénescence des cellules Huh6 (Publication figure 4E et Supplementary figure S7), alors que le siARN spécifique de la β -caténine n'a aucun effet. Ces données suggèrent que c'est l'action de miR-624-5p sur d'autres cibles qui serait responsable de l'induction de la sénescence observée. La nature de ces autres cibles reste à déterminer.

- Conclusion sur l'effet suppresseur de tumeur des quatre miARNs d'intérêts dans les cellules dérivées d'HBL

Pour conclure, la réintroduction de chacun des quatre miARNs candidats est capable d'induire une inhibition de la prolifération cellulaire dans les deux lignées dérivées d'HBL testées, Huh6 et HepG2. Cet arrêt de croissance est lié au blocage du cycle cellulaire en G0/G1 et à l'inhibition de l'activité transcriptionnelle de la β -caténine, mais n'est pas corrélé avec une activation de l'apoptose ni de la sénescence, sauf pour miR-624-5p.

La comparaison entre l'effet des quatre miARNs sur ces phénotypes oncogéniques et sur l'inhibition de la β -caténine montre des légères différences (Publication figure 2 et figure 4, pour comparaison). Notamment, miR-449b-3p inhibe faiblement l'expression de la β -caténine dans les cellules HepG2 mais a un fort effet sur les processus oncogéniques. Une explication concernant ces différences provient de la caractéristique principale des miARNs. En effet, les miARNs régulent plusieurs centaines de cibles à la fois (Friedman et al., 2009). Nous avons sélectionné ces miARNs à partir de leur effet sur la β -caténine, mais leur réintroduction impacte également l'expression de leurs autres cibles. Très souvent, un miARN régule plusieurs cibles impliquées dans la même voie de signalisation, ce qui engendre une réponse plus forte que l'inhibition d'une seule cible. Dans notre étude, il est intéressant de noter que, bien qu'il y ait une absence de corrélation, les profils d'inhibition de l'activité transcriptionnelle de la β -caténine sont très similaires aux profils d'inhibition de la prolifération et à ceux du blocage du cycle cellulaire en phase G0/G1. Cette propriété montre que ces miARNs d'intérêt modulent l'activation de la voie Wnt, et plus particulièrement la fonction transcriptionnelle de la β -caténine qui joue un rôle essentiel dans la croissance tumorale des cellules dérivées d'HBL.

• Les quatre miARNs candidats dans la littérature, leurs autres cibles potentielles et leurs sites d'interaction prédits sur l'ARNm de la β -caténine

Comme indiqué dans la section II.1, il existe trois variants de l'ARNm de la β -caténine (Figure 7 et Figure 67). Ces trois variants sont tous sur-exprimés dans les HBL (Supplementary figure S3B et S3C), le variant le moins abondant dans les HBL et dans les cellules Huh6 étant le variant 3 (Supplementary figure S3B, et données non montrées). Dans la Figure 67 sont représentés les différents sites d'interaction potentiels des miARNs avec la 3'NT de l'ARNm de la β -caténine.

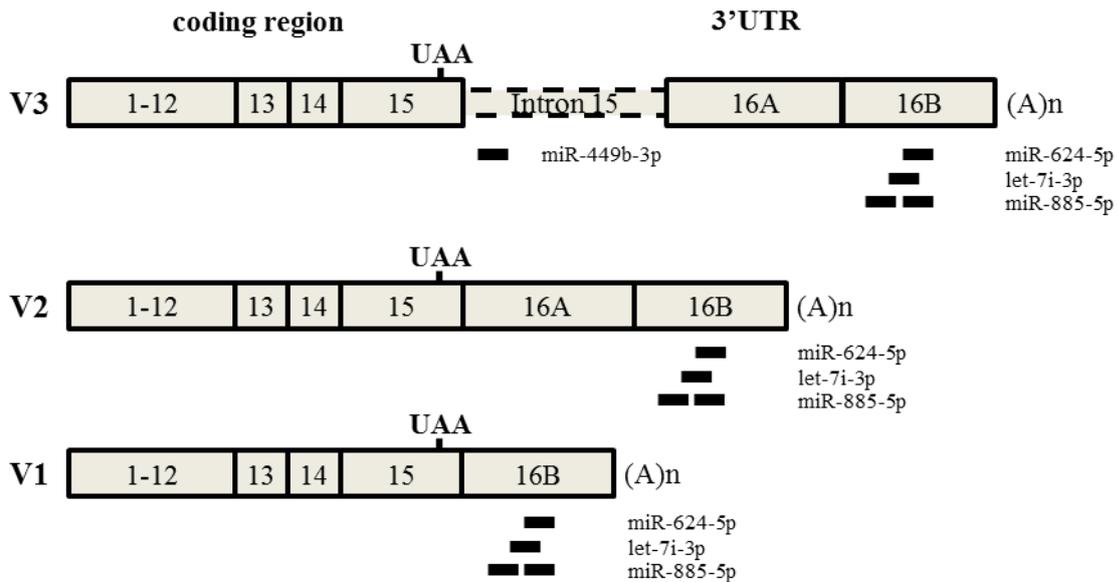


Figure 67 : Localisation des sites potentiels d'interaction des quatre miARNs d'intérêt sur les trois variants de l'ARNm de la β -caténine

V1, V2 et V3 représentent schématiquement les trois variants de la 3'NT de la β -caténine (Thiele et al., 2006). Chaque barre noire représente un miARN dont le nom est indiqué à droite. Chacune est située au niveau du site prédit d'interaction entre la région graine du miARN et la 3'NT de la β -caténine.

Les quatre miARNs que j'ai identifiés sont très peu décrits dans la littérature.

- MiR-885-5p

MiR-885-5p a été découvert pour la première fois en 2006 (Berezikov et al., 2006), il est classé par miRBase comme un miARN à « confiance élevée ». Il est le seul des quatre miARNs à avoir été décrit comme sous-exprimé dans l'HBL (Magrelli et al., 2009). Les résultats obtenus avec notre cohorte confirment cette baisse d'expression (Publication figure 3A et Supplementary figure 3A). Au contraire, l'expression de miR-885-5p est augmentée dans le sérum des patients atteints de CHC comparé son expression dans la tumeur primaire (Gui et al., 2011). Une hypothèse est que ce miARN pourrait-être sécrété par les cellules de la tumeur primaire dans la circulation et pourrait être un marqueur diagnostique sanguin dans les cancers du foie. Il serait intéressant d'analyser son expression dans le sérum des patients atteints d'HBL. De plus, son expression a été décrite comme diminuée dans le neuroblastome. La réintroduction d'un miR-885-5p synthétique dans les cellules dérivées de neuroblastome qui ne présentent pas d'altération de la voie de p53 provoque un arrêt de la prolifération et du cycle cellulaire en phase G0/G1 en ciblant *CDK2* et *MCM5* (Afanasyeva et al., 2011). Cette

réintroduction conduit également à une augmentation de l'activation de la voie du suppresseur de tumeur p53. Ces données suggèrent que l'activité anti-tumorale de miR-885-5p pourrait être liée à l'activité de p53 et dépend donc du contexte cellulaire. De plus, il a été montré que miR-885-5p cible également la Caspase 3 (Guan et al., 2013). La réintroduction de ce miARN peut donc permettre aux cellules d'échapper à la mort cellulaire par apoptose ou de devenir résistantes à la chimiothérapie. Ainsi, l'effet de miR-885-5p sur les processus oncogéniques doit être étudié dans le contexte tumoral d'intérêt avant d'envisager son utilisation dans une thérapie de remplacement de miARN.

De plus, la base de données miRDB (mirdb.org) indique que miR-885-5p a pour cibles potentielles les ARNm de protéines impliquées dans le cycle cellulaire (*CDK14* et *CDC73*), ainsi que des facteurs contrôlant la migration, la prolifération et la différenciation cellulaire (*FGF9*). Les résultats décrits dans la littérature et ses cibles potentielles sont cohérentes avec l'inhibition de la croissance cellulaire et le blocage du cycle cellulaire en G0/G1 par miR-885-5p. MiR-885-5p a également pour cibles prédites *CPEB-2* et *CPEB-3*, des facteurs essentiels à la polyadénylation des ARNm. Leur inhibition serait délétère à la stabilité des ARNm de manière globale dans la cellule.

MiR-885-5p a trois sites d'interaction potentiels dans la 3'NT de l'ARNm de la β -caténine (Figure 67). Un site est proche de la région codante (non schématisé), un autre est composé de seulement six nucléotides (6-mer) incluant le nucléotide 1 en 5' du miARN, et le troisième est un site 8-mer riche en adénosines et en uridines. Les deux premiers sites prédits ne sont pas conventionnels et ne favorisent pas une interaction efficace entre le miARN et l'ARNm cible (voir section III.2.2). Le site 8-mer est un site d'interaction potentiel intéressant qui pourrait permettre au miR-885-5p d'inhiber l'expression de la β -caténine *via* sa région 3'NT, comme observé dans le crible secondaire. Ce site d'interaction potentiel pourrait être confirmé par des études de mutagenèse.

- Let-7i-3p

Let-7i-3p appartient à la famille des let-7 qui contient 12 membres chez l'homme, dont le premier membre orthologue chez *C. elegans* a été découvert en 2000 (Reinhart et al., 2000 ; Pasquinelli et al., 2000). Un membre de cette famille, let-7e, a été décrit comme sur-exprimé dans l'HBL (Magrelli et al., 2009). Au contraire, le cluster miR-100/let-7a-2/miR-125b est sous-exprimé dans ce cancer (Cairo et al., 2010). De nombreux miARNs de la famille let-7 ont été identifiés comme suppresseurs de tumeurs et ont une expression diminuée dans les cancers (voir section IV.2.1 ; Calin et al., 2004 ; Takamizawa et al., 2004 ; Sempere et al.,

2007 ; Ozen et al., 2007 ; Dahiya et al., 2008 ; O'Hara et al., 2009) et ils ont déjà été décrits comme des inhibiteurs de la croissance cellulaire (Johnson et al., 2005). Cette observation est cohérente avec la diminution de l'expression de let-7i-3p dans l'HBL. Concernant spécifiquement let-7i-3p, sa seule description dans la littérature, à ce jour, est sa sous-expression dans le sérum des personnes fumeuses et des personnes atteintes d'un cancer du poumon (Huang et al., 2014), ainsi que sa sur-expression dans le sérum de patients atteints de prognathisme mandibulaire (Gu et al., 2014). Le niveau de confiance concernant l'existence biologique de ce miARN n'est pas annoté dans miRBase, certainement dû au faible nombre de séquences par rapport à let-7i-5p.

D'après miRDB (mirdb.org), let-7i-3p a pour cible potentielle l'ARNm de Dicer. La réintroduction expérimentale de let-7i-3p pourrait avoir un impact sur la diminution globale des processus de maturation des miARNs dans la cellule. La baisse de l'expression de let-7i-3p dans les HBL est plutôt contraire à l'inhibition globale de la maturation des miARNs dans les cancers (voir section IV.1 ; Karube et al., 2005 ; Lin et al., 2010). Cependant, nous n'avons pas vérifié l'expression de Dicer dans les HBL, ni si l'expression globale des miARNs est diminuée dans ce cancer.

Parmi les cinq algorithmes utilisés pour réaliser les prédictions (miRDB, TargetScan, RNA22, TargetMiner, RNA hybrid), seul RNA22 prédit un site d'interaction avec la 5'NT de la β -caténine. Cependant, lors du crible secondaire nous observons seulement un effet de let-7i-3p *via* la région 3'NT de la β -caténine (Supplemental figure S1). Nous avons donc utilisé le programme RNA hybrid, permettant de sélectionner soi-même les sites potentiels intéressants. Il nous a permis de sélectionner deux sites potentiels d'interaction entre le miARN et la 3'NT de la β -caténine. Un des deux est proche de la séquence codante (non schématisé), l'autre est un site 8-mer localisé dans l'exon 16B (Figure 67).

Ainsi, la régulation de la β -caténine et de l'activité de la voie Wnt par let-7i-3p pourrait principalement avoir lieu *via* une interaction directe avec sa région 3'NT, comme observé dans le crible secondaire. Cette hypothèse pourrait être confirmée par une étude de mutagenèse du site d'interaction 8-mer prédit.

- MiR-449b-3p

MiR-449b-3p est le brin 3' du précurseur du miR-449b mature. Le brin 5' du duplex, miR-449b-5p, a été identifié pour la première fois en 2006 (Cummins et al., 2006). Le niveau de confiance de leur existence biologique n'est pas annoté sur miRBase car ils ont été identifiés plutôt récemment et apparaissent dans peu d'expériences. MiR-449b-3p est sous-

exprimé dans les tissus endométriaux ectopiques et les kystes ovariens chez les patientes atteintes d'endométriose par rapport à son expression dans les tissus sains (Braza-Boils et al., 2014). Au contraire, son expression est augmentée spécifiquement dans les cancers gastriques négatifs pour l'infection à *Helicobacter pylori* (Chang et al., 2015). L'expression de ce miARN n'a pas été décrite dans d'autres cancers, notamment dans les HBL. Toutefois, il a été montré que le cluster miR-449a/b est capable de bloquer le cycle cellulaire et d'activer l'apoptose des cellules, ainsi que d'activer la voie p53 (Lizé et al., 2009).

Comme miR-885-5p, miR-449b-3p est prédit pour cibler un gène impliqué dans le cycle cellulaire, *CDH8*, ainsi que *FGF9* qui contrôle la migration, la prolifération et/ou la différenciation cellulaire d'après miRDB (mirdb.org). De plus, miR-449b-3p cible potentiellement les facteurs de l'initiation de la traduction des ARNm eIF4E et eIF4A, renforçant l'inhibition de la traduction des ARNm de manière globale.

Un seul site d'interaction 6-mer entre miR-449b-3p a été prédit par les algorithmes utilisés (miRDB, TargetScan, RNA22, TargetMiner, RNA hybrid). Ce site est proche de la séquence codante et surtout il est localisé au niveau de l'intron 15 (Figure 67). Or, cet intron est exprimé seulement dans le variant 3 et, bien que sur-exprimé dans les HBL, c'est le variant le moins abondant dans les HBL et les cellules Huh6 (Supplementary figure S3B et S3C, et données non montrées). Cet unique site d'interaction sur le variant le moins abondant de la β -caténine expliquerait l'action moins efficace de miR-449b-3p par rapport aux autres miARNs sur l'inhibition de l'expression de la β -caténine (Publication figure 2), et également sur les processus oncogéniques dans les cellules Huh6 (Publication figure 4). Les différences observées entre l'effet dans les Huh6 et celui dans les HepG2 suggèrent un transcriptome relativement différent d'un type cellulaire à un autre.

- MiR-624-5p

MiR-624-5p a été découvert pour la première fois dans la même étude que miR-449b-5p (Cummins et al., 2006), dans des cancers colorectaux. Malgré un faible nombre d'expériences recensant son séquençage, ce miARN est classé de « confiance élevé » par miRBase, certainement grâce à l'alignement très constant de ses séquences et à la faible différence entre le nombre de séquences du miR-624-5p et du miR-624-3p respectivement identifiées. Seulement deux études ont relevé une dérégulation de l'expression de ce miARN : il est sur-exprimé dans les plaquettes des patients atteints de maladie des artères coronaires

(Sondermeijer et al., 2011 ; Chen et al., 2014). Ainsi, l'implication de ce miR-624-5p dans les cancers reste inconnue.

Ce miARN a pour cibles prédites par miRDB (mirdb.org) plusieurs ARNm dont les protéines sont impliquées dans la voie de signalisation Wnt. Notamment, Wnt2 est un ligand de la famille Wnt permettant la transmission du signal dans la cellule, par l'intermédiaire du récepteur Frizzled, afin d'activer l'activité transcriptionnelle de la β -caténine. De plus, miR-624-5p est prédit pour cibler plusieurs facteurs impliqués dans la voie de signalisation TGF β , notamment *SMAD2*, *SMAD3* et le récepteur 1 à la TGF β (*TGF β RI*). La voie TGF β , comme la voie Wnt/ β -caténine, régule de nombreux processus et conduit à l'activation de la transcription d'ARNm impliqués dans la croissance cellulaire, la migration, l'invasion, le remodelage de la matrice extracellulaire ou encore la suppression de la réponse immunitaire.

Parmi les cinq algorithmes de prédiction utilisés (miRDB, TargetScan, RNA22, TargetMiner, RNA hybrid), seul TargetScan ne prédit pas de site d'interaction entre la 3'NT de la β -caténine et miR-624-5p. Les quatre autres conduisent à la prédiction d'un même site 7mer-m8 localisé dans l'exon 16B de la 3'NT de la β -caténine (Figure 67). Ce site potentiel d'interaction est donc présent sur les trois variants de l'ARNm de la β -caténine. La présence de ce site d'interaction unique pourrait expliquer l'inhibition efficace de la β -caténine par miR-624-5p dans les deux lignées cellulaires, et son fort effet sur l'activité de la voie Wnt/ β -caténine et sur la prolifération cellulaire. L'inhibition de la β -caténine ne provoquant pas d'activation de la sénescence, ces données suggèrent que miR-624-5p pourrait également agir sur une autre cible qui déclencherait ce processus. Ainsi, miR-624-5p est un miARN peu décrit, mais un bon candidat pour le blocage de la progression tumorale de l'HBL.

- **Un effet additif entre les miARNs et la chimiothérapie ?**

Les quatre miARNs identifiés induisent un arrêt du cycle cellulaire et de la prolifération, mais ne sont pas capables de provoquer la mort des cellules. Nous avons donc fait l'hypothèse qu'associer le traitement des cellules avec chaque miARN au traitement chimiothérapeutique le plus souvent utilisé dans l'HBL, le cisplatine, pourraient induire un effet additif conduisant à la mort cellulaire. Ainsi, j'ai traité successivement les cellules avec les miARNs synthétiques, puis avec le cisplatine (EC50 = 3,79 μ M) le lendemain. J'ai analysé l'effet sur la sénescence et l'apoptose des cellules trois jours après le traitement avec les miARNs. Cependant, nous n'avons pas observé d'effet additif entre les miARNs et le cisplatine (données non montrées). L'hypothèse la plus probable pour expliquer cette absence

d'effet est que les miARNs, bloquant le cycle cellulaire en phase G0/G1, empêchent le cisplatine d'entrer dans le noyau et de se lier aux bases puriques en phase de synthèse. Il serait donc intéressant d'envisager un traitement préalable des cellules par le cisplatine, puis par les miARNs, car l'action de ces derniers n'est pas dépendante de l'arrêt de la réplication des cellules.

- **La β -caténine, une cible directe de miR-624-5p**

Le miARN qui a l'effet le plus important sur l'expression de la β -caténine et sur les processus oncogéniques dans les deux lignées cellulaires dérivées d'HBL est miR-624-5p. De plus, ce miARN est le seul des quatre candidats à induire la sénescence des cellules Huh6. Dans le crible réalisé pour identifier les miARNs inhibant l'expression de la β -caténine, nous avons montré que miR-624-5p agit sur la région 3'NT de la β -caténine (Publication figure 1 et Supplementary figure S1). *In silico*, nous avons identifié un potentiel site d'interaction entre miR-624-5p et l'ARNm de la β -caténine dans cette région. Ce site est localisé en position 613-619, dans l'exon 16B (Figure 67). Ainsi, miR-624-5p pourrait potentiellement cibler les trois variants de la β -caténine (Publication figure 5B et Figure 67).

MiR-624-5p étant un candidat intéressant pour arrêter la progression tumorale *via* l'inhibition de la β -caténine dans l'HBL, nous nous sommes intéressés plus en détail à son interaction avec la β -caténine. Ainsi, nous avons inséré deux mutations (MUT ; r.614G>C et r.618C>G) au niveau du site potentiel d'interaction de ce miARN sur la β -caténine dans le plasmide rapporteur EF1 α -GFP-3'NT β cat (Publication figure 5A). Ce plasmide contient la séquence du variant 3 de la 3'NT de la β -caténine qui, étant le variant le plus long, contient tous les sites sur lesquels le miARN pourrait interagir avec la cible. De manière remarquable, la mutation de ces deux nucléotides empêche la reconnaissance du site par miR-624-5p, induisant une levée de l'inhibition du rapporteur comparé à la région 3'NT sauvage (WT) (Publication figure 5C). Cette expérience confirme la présence d'un site d'interaction unique de miR-624-5p, de type 7mer-m8, dans la 3'NT de l'ARNm de la β -caténine. De plus, nous avons montré que ce site d'interaction permet au miR-624-5p d'inhiber les trois variants de la β -caténine dans les cellules Huh6 (Publication figure 5D).

Ainsi, miR-624-5p interagit avec les trois variants de la 3'NT de la β -caténine au niveau d'un site unique, permettant d'inhiber efficacement l'ARNm et l'expression de la protéine dans les deux lignées d'HBL. Cette inhibition sur les trois variants lui confère un fort impact sur les processus oncologiques dans ces lignées.

- **MiR-624-5p inhibe la voie de signalisation Wnt**

Comme miR-624-5p a un effet inhibiteur très fort sur l'activité transcriptionnelle de la β -caténine (Publication figure 4C) nous avons souhaité déterminer l'impact de sa sur-expression sur les facteurs associés à la voie Wnt et sur les cibles en aval de la β -caténine. Nous avons analysé l'effet de miR-624-5p sur 84 de ces ARNm dans les cellules Huh6 et l'avons comparé à l'effet du petit ARN contrôle (Ctrl) (Publication figure 6 et Supplemental Table S3). En parallèle, nous avons également fait cette analyse après transfection du siARN dirigé contre la β -caténine (si- β -caténine).

De manière globale, les gènes qui sont le plus fortement sous-régulés par miR-624-5p le sont également par le si- β -caténine (Publication figure 6A et Supplemental Table S3). En effet, parmi les sept gènes inhibés de plus de 50% par le miARN, six sont également sous-régulés de plus de 50% par le si- β -caténine (Publication figure 6A). Ces gènes sont impliqués dans la prolifération, le cycle cellulaire, la survie, la migration, la croissance tumorale et/ou la résistance aux traitements. Nous pouvons remarquer qu'*AXIN2* est le gène le plus inhibé par miR-624-5p. C'est également le gène le plus inhibé par le si- β -caténine. Comme discuté en section II.2 de l'introduction, l'Axine 2 est une protéine qui participe à la régulation de l'expression de la β -caténine puisqu'elle sert de plateforme moléculaire, interagissant avec la β -caténine et stabilisant le complexe de dégradation. C'est également une cible directe du complexe de transcription formé par la β -caténine et TCF (Jho et al., 2002), formant une boucle de rétrocontrôle négatif. Ainsi, ces résultats confirment que l'inhibition directe de la β -caténine par miR-624-5p induit une forte inhibition de son activité transcriptionnelle, inhibant l'expression de ses cibles dont *AXIN2*.

La réintroduction de miR-624-5p induit également l'augmentation de l'expression de nombreux ARNm, dont 14 sont augmentés de plus de 50% par rapport au petit ARN contrôle (Publication figure 6B et Supplemental Table S3). Certains de ces facteurs sont impliqués dans la voie Wnt, la régulation de la croissance tumorale ou encore sont des gènes suppresseurs de tumeurs, mais d'autres sont des gènes connus pour leur oncogénicité ou sont impliqués dans la prolifération ou l'invasion tumorale. L'augmentation de ces facteurs est plus difficile à comprendre. Ils pourraient correspondre à l'activation de mécanismes par les cellules tumorales pour tenter de survivre et de proliférer malgré l'effet suppresseur de tumeur de miR-624-5p. Certaines de ces cibles ont une expression augmentée par la réintroduction de

miR-624-5p alors qu'elle ne l'est pas en présence du si- β -caténine, montrant un effet spécifiquement lié à ce miARN qui pourrait être dû l'activité régulatrice directe ou indirecte du miARN sur ses autres cibles.

Malgré l'observation d'un effet similaire de miR-624-5p sur les processus oncogéniques dans les cellules Huh6 et les cellules HepG2 (Publication figure 4), certains miARNs induisent des effets différents entre les deux types cellulaires. Afin de déterminer si miR-624-5p impacte les mêmes cibles associées à la voie Wnt parmi les 84 analysées, nous sommes actuellement en train de réaliser la même expérience avec les cellules HepG2.

De plus, afin d'aller plus loin dans l'identification de cibles directes et indirectes de miR-624-5p, il serait également intéressant d'étudier le transcriptome global des cellules après la réintroduction de ce miARN.

- **Effet de miR-624-5p sur la progression tumorale *in vivo***

Etant donné l'activité inhibitrice ciblée de miR-624-5p sur la β -caténine et son fort impact phénotypique sur les cellules d'HBL, j'ai choisi ce miARN afin de tester son effet sur le modèle CAM mis au point dans la Partie 1. Pour ce faire, j'ai transfecté les cellules Huh6 avec miR-624-5p ou avec le siARN contrôle (Ctrl) la veille de l'implantation sur la CAM de poulet. J'ai suivi la formation des nodules tumoraux au niveau macroscopique et j'ai récupéré des tumeurs un jour (D11), trois jours (D13) ou six jours (D16) après l'implantation des cellules afin de les peser et de réaliser des marquages histologiques (Publication figure 7A). Cette cinétique est différente de celle utilisée dans la Partie 1 pour la caractérisation de l'implantation (prélèvement à D11, D14 et D17) car l'analyse de l'effet de miR-624-5p comporte une étape supplémentaire de transfection cellulaire.

Les images macroscopiques (Publication figure 7B) et les pesées (Publication figure 7C) montrent une diminution de la taille des nodules tumoraux formés par les cellules Huh6 transfectées avec miR-624-5p par rapport aux cellules Huh6 transfectées avec le contrôle. Ces données sont confirmées par les marquages histologiques (Publication figure 7B) qui montrent une plus faible proportion de cellules (HES) et une baisse de la prolifération cellulaire (Ki67) dans les nodules transfectés avec le miR-624-5p à D13 et D16. De plus, les nodules tumoraux traités avec le miR-624-5p ont un poids 40% inférieur à celui des nodules contrôle (Publication figure 7C), confirmant une diminution de la croissance tumorale. J'ai

aussi confirmé que la réintroduction de miR-624-5p inhibe l'expression de la β -caténine dans les nodules tumoraux à D13 et à D16 (Publication figure 7B, panel β -catenin). En parallèle, j'ai également transfecté des cellules avec le siARN ciblé contre la β -caténine pour observer son effet sur le phénotype des nodules tumoraux (Supplementary figure S8). L'extinction de l'expression de la β -caténine par le siARN provoque également une diminution de la taille et de 35% du poids des nodules tumoraux comparés aux nodules contrôles. Le miR-624-5p a donc un effet aussi fort sur la formation des tumeurs que le siARN inhibant la β -caténine.

Ainsi, j'ai montré que la réintroduction de miR-624-5p était capable d'inhiber la progression tumorale dans ce modèle *in vivo* de xénogreffe de cellules Huh6 sur la CAM. Comme *in vitro*, ce miARN induit un arrêt de la prolifération cellulaire, et une diminution de la croissance des tumeurs. Cela montre que miR-624-5p a un fort potentiel en tant qu'agent thérapeutique dans l'HBL.

- **MiR-34a-5p, un candidat inadéquat pour le traitement de l'HBL**

En parallèle de l'identification de nouveaux miARNs candidats régulant la β -caténine, je me suis intéressée à miR-34a-5p. Ce miARN a été le premier miARNs synthétiques à entrer en essai clinique de phase-I dans les tumeurs solides et particulièrement les CHC (voir section IV.3.2 ; Bouchie, 2013 ; référence ClinicalTrials.gov : NCT01829971). MiR-34a est un des premiers miARNs décrits pour réguler la β -caténine (voir section IV.4.2 ; Kim et al., 2011). Il pourrait donc être intéressant pour une thérapie de remplacement dans l'HBL. Cependant, il n'a pas été sélectionné lors de notre crible réalisé avec le rapporteur EF1 α -5'NT β cat-GFP-3'NT β cat (FCR = -0.265, inhibition de 17%).

J'ai néanmoins analysé son effet sur l'expression de la β -caténine et son influence sur le phénotype tumoral des cellules d'HBL. Comme dans le crible et contrairement aux données de la littérature, miR-34a-5p n'est pas capable d'inhiber l'expression de la β -caténine dans les deux lignées d'HBL analysées (Publication figure 2). De plus, ce miARN a une expression similaire dans les HBL comparé aux foies normaux (Publication figure 3A), et lorsque les échantillons sont appariés, miR-34a-5p a une expression légèrement plus élevée dans les HBL par rapport aux foies normaux adjacents (Supplementary figure S3A).

Concernant l'inhibition des processus oncogéniques dans l'HBL, la transfection des cellules par miR-34a-5p induit une légère baisse de la prolifération cellulaire (Figure 68A) due à une augmentation du pourcentage de cellules en phase G0/G1 (Figure 68B) et à une diminution modérée de l'activité transcriptionnelle de la voie Wnt/ β -caténine (Figure 68C). Comme pour miR-449b-3p notamment, l'effet du miR-34a-5p est variable selon la lignée cellulaire étudiée, montrant encore que ces deux lignées sont différentes et que leur transcriptome est ne subit pas les mêmes régulations. MiR-34a-5p, n'active pas de processus apoptotique dans les cellules Huh6 (Figure 68D), cependant il a un impact important sur la sénescence des cellules, qui passe de 7,5% de cellules sénescents avec le contrôle (Ctrl) à presque 35% avec miR-34a-5p (Figure 68E).

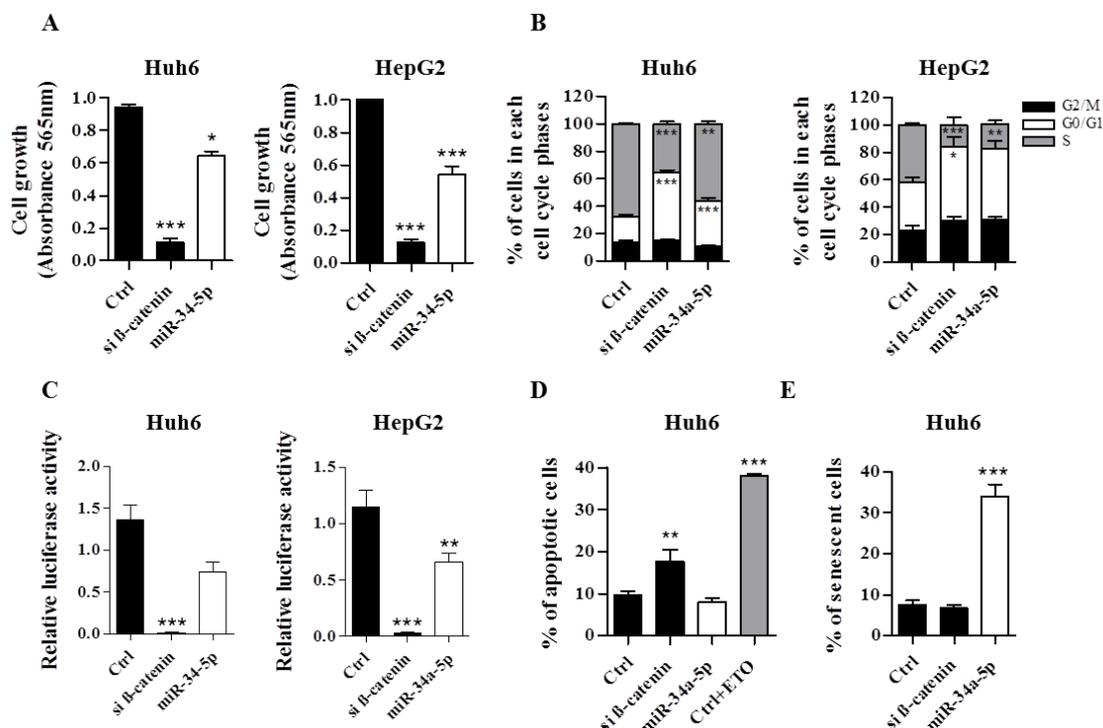


Figure 68 : Effet du miR-34a-5p sur les processus oncogéniques

Les cellules Huh6 ou HepG2 ont été transfectées avec les petits ARNs indiqués et plusieurs processus ont été analysés trois ou six jours après transfection. Voir Matériels et Méthodes de la Publication.

(A) Mesure de la croissance cellulaire entre le premier et le sixième jour après transfection par analyse de l'absorbance de la sulforhodamine B (565nm) dans les cellules Huh6 (panel de gauche) et HepG2 (panel de droite) (n=3, ANOVA $p < 0.0001$). (B) Mesure de chaque phase du cycle cellulaire trois jours après transfection dans les cellules Huh6 (panel de gauche) et HepG2 (panel de droite) par un double marquage BrdU/7-AAD (n=3, ANOVA $p < 0.0001$). (C) Mesure de l'activité transcriptionnelle de la voie Wnt/ β -caténine, trois jours après la transfection dans les cellules Huh6 (panel de gauche) et les cellules HepG2 (panel de droite) par la mesure de l'activité luciférase dans le système TOP Flash (n=3, ANOVA $p < 0.0001$). (D) Analyse du pourcentage de cellules en apoptose par marquage au TMRM, trois jours après transfection par les petits ARNs ou un jour après traitement à l'étoposide à $200\mu\text{g}/\mu\text{L}$ (n=3, ANOVA $p < 0.0001$). (E) Analyse du pourcentage de cellules en sénescence par mesure de l'activité β -galactosidase (n=4, ANOVA $p < 0.0001$). Les barres représentent les moyennes \pm SE. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Ces données suggèrent que miR-34a-5p interagit avec d'autres cibles que la β -caténine, dont les fonctions semblent en partie liées à celle de la voie Wnt/ β -caténine. Cependant, ce miARN n'est pas un bon candidat à l'inhibition directe de la β -caténine, d'autant que son expression est augmentée chez les patients de notre cohorte. Nous n'avons pas étudié l'effet d'une inhibition de l'expression de miR-34a dans l'HBL, mais une équipe française a récemment montré que miR-34 est sur-exprimé dans les CHC mutés pour la β -caténine et que l'inhibition de miR-34a conduit à l'inhibition de la progression tumorale dans un modèle de souris (Gougelet et al., 2016). Ces résultats suggèrent que miR-34a (MRX34) n'est pas un candidat adéquat pour une thérapie de remplacement de miARN dans le traitement des patients atteints d'HBL.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Les travaux que j'ai effectués au cours de ma thèse ont permis le développement d'un nouveau modèle d'étude *in vivo* de l'HBL et l'identification de miARNs au potentiel thérapeutique dans le traitement de l'HBL.

Le succès du développement du modèle *in vivo* de xénogreffe de cellules dérivées d'HBL sur la CAM permet d'envisager l'implantation d'autres lignées d'HBL ainsi que de cellules tumorales issues de pièces opératoires fraîches. De telles études permettront de mieux comprendre l'organisation subcellulaire de ces tumeurs, leur composition, ainsi que leur cinétique de développement, et ce de manière rapide, peu contraignante et à coûts modérés. De plus, c'est un très bon modèle pour le développement d'outils thérapeutiques. Il permet d'analyser rapidement et assez facilement l'impact d'un miARN ou d'autres molécules sur le développement tumoral chez l'animal, permettant d'envisager de tester ces molécules sur d'autres modèles pré-cliniques.

L'identification de miARNs capables d'inhiber spécifiquement la β -caténine a permis de mettre en évidence plusieurs miARNs au potentiel thérapeutique intéressant dans l'HBL. J'ai identifié trois nouveaux miARNs dérégulés dans les HBL, et confirmé la sous-expression de miR-885-5p. La mesure de l'expression de ces miARNs chez les patients pourrait contribuer au diagnostic de l'HBL et/ou à classifier le grade de la tumeur, fournissant des données pronostiques. J'ai identifié des miARNs capables de bloquer la voie de signalisation Wnt/ β -caténine qui conduit à la tumorigenèse dans l'HBL. Ces miARNs ont un fort effet inhibiteur sur la prolifération des cellules tumorales et sont tous de potentiels agents thérapeutiques par leur action individuelle ou en association avec d'autres molécules (miARN, siARN, agent chimiothérapeutique...). Je me suis intéressée spécifiquement à l'HBL, mais ces miARNs pourraient être intéressants dans d'autres cancers dans lesquels la voie Wnt est dérégulée et la β -caténine sur-exprimée. Enfin, j'ai identifié un miARN, miR-624-5p, dont l'activité antitumorale est la plus forte. Sa réintroduction a un effet inhibiteur sur les deux lignées dérivées d'HBL étudiées et il est capable d'inhiber la progression tumorale de l'HBL *in vivo*.

Les perspectives de ce travail sont multiples.

Une première perspective est l'extension du modèle CAM à d'autres cellules dérivées d'HBL. Leur xélogreffe sur la CAM de l'embryon de poulet permettra peut-être de mieux comprendre les mécanismes participant à la formation de la masse tumorale dans ces cellules, voire dans les différents sous-types d'HBL. De plus, cela permettra également d'analyser l'effet de molécules thérapeutiques sur un éventail plus large de cellules représentant l'hétérogénéité des HBL.

Une deuxième perspective est d'identifier les autres cibles, directes ou indirectes, des miARN que nous avons identifiés, et en particulier de miR-624-5p. Cette étude permettra de mieux comprendre leur rôle en tant que miARNs suppresseurs de tumeur dans l'HBL. Une analyse comparative du transcriptome et/ou du protéome des cellules transfectées avec miR-624-5p ou un ARN contrôle permettra d'étudier de manière globale les dérégulations engendrées dans la cellule cancéreuse par la réintroduction de ce miARN et d'identifier ses autres cibles directes ou indirectes. Cela pourrait mettre en évidence l'implication de miR-624-5p dans la modulation d'autres voies de signalisation que celle de Wnt, qui sont aussi fréquemment dérégulées dans les cancers. Notamment, miR-624-5p est prédit pour cibler plusieurs protéines de la voie TGF β , telles que Smad2 et Smad3, ainsi que le récepteur 1 au TGF β . La voie de signalisation TGF β régule la prolifération cellulaire et la différenciation. Un lien entre les voies Wnt et TGF β a déjà été mis en évidence dans certains sous-groupes de CHC non mutés pour la β -caténine (Hoshida et al., 2009). Les protéines Smad dirigent l'activation de l'apoptose et sont également des activateurs de transcription. La dérégulation de cette voie peut avoir des conséquences importantes sur le devenir de la cellule ; d'où l'intérêt d'étudier l'impact potentiel de miR-624-5p sur les différentes voies de signalisation.

De manière globale, identifier d'autres cibles directes et indirectes de miR-624-5p permettra de mieux comprendre les mécanismes conduisant à l'inhibition de la prolifération et de la progression tumorale, à l'activation de la sénescence des cellules, ainsi que d'anticiper des effets indésirables éventuels sur les cellules non tumorales.

Une autre perspective sera d'étudier l'impact de ces miARNs dans d'autres cancers où la β -caténine échappe à la régulation par le complexe de dégradation. En effet, les miARNs identifiés sont capables d'inhiber l'expression de la β -caténine. Ce phénomène passe en majorité par l'inhibition de la β -caténine sauvage, mais on peut voir que cela est parfois suffisant pour inhiber très fortement l'activité transcriptionnelle de la β -caténine, ainsi que la croissance cellulaire. Une inhibition synergique de la β -caténine et des autres cibles de ces miARNs pourrait contribuer à l'inhibition de la tumorigenèse dans d'autres cancers. Il sera intéressant d'étudier l'impact du miR-624-5p dans des cancers où la β -caténine est sur-exprimée, par exemple dans les CHC mutés pour la β -caténine. En effet, des données préliminaires obtenues dans le cadre d'un autre projet de l'équipe suggèrent que miR-624-5p serait sous-exprimé dans les tumeurs de CHC.

Enfin, malgré son fort intérêt dans la mise en place des traitements, la xéno greffe de cellules sur la CAM ne peut pas remplacer un modèle mammifère tel que le modèle murin pour des analyses précliniques avant d'envisager son enrôlement dans des essais cliniques. Cependant, les données obtenues grâce à ce modèle permettent de déterminer si l'agent thérapeutique a un effet dans un contexte *in vivo*, en dehors d'une boîte de culture. L'étape suivante sera bien sûr de tester son efficacité dans un modèle murin. En effet, ce dernier modèle permettra de choisir le vecteur (AAV, liposomes, nanoparticules par exemple) et le mode d'administration du miARN (péritumoral, systémique...). Une administration par la circulation sanguine est souvent préférable pour envisager un traitement chez le patient car c'est le moins invasif et cela permet également le traitement des métastases. Dans l'idéal, il faudra identifier un vecteur stable dans le sang, qui puisse délivrer spécifiquement le miARN dans le foie, aux cellules cancéreuses. Les effets toxiques et les doses requises de vecteurs et de miARNs pourront être appréhendés chez la souris. De plus, l'administration dans le modèle murin permettra également d'observer l'action du traitement sur le long terme, l'effet sur la progression tumorale et peut-être une potentielle activation de l'apoptose.

ANNEXE 1

Manuscript

β -CATENIN-REGULATING MICRORNAS INHIBIT HEPATOBLASTOMA CELL GROWTH THROUGH WNT SIGNALING INACTIVATION

Supplementary Table S2 Primary screening data of DF-FunREG system.

Calculated mean and standard deviation are shown. The 26 selected miRNAs are highlighted.

Annexe 1: Supplementary Table S2 Primary screening data of DF-FunREG system.

miRNA	GFP/tomato ratio Fold change			Mean	Standard Deviation
	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3		
hsa-miR-4649-5p	-1,701	-1,655	-1,867	-1,741	0,112
hsa-miR-4474-3p	-1,407	-1,457	-1,477	-1,447	0,036
hsa-miR-196a*	-1,495	-1,156	-1,466	-1,372	0,188
hsa-miR-548z	-1,720	-1,957	-0,295	-1,324	0,899
hsa-miR-449b*	-1,531	-1,165	-1,236	-1,311	0,194
hsa-miR-1205	-1,303	-1,255	-1,375	-1,311	0,060
hsa-miR-3922-5p	-1,018	-1,115	-1,170	-1,101	0,077
hsa-miR-483-3p	-1,296	-0,988	-0,964	-1,083	0,185
hsa-miR-600	-1,088	-1,033	-1,011	-1,044	0,040
hsa-miR-5095	-1,114	-0,956	-1,043	-1,038	0,079
hsa-miR-3688-5p	-1,273	-0,632	-1,043	-0,983	0,325
hsa-let-7i*	-0,941	-1,036	-0,954	-0,977	0,052
hsa-miR-548u	-1,011	-0,765	-1,144	-0,973	0,192
hsa-miR-3924	-1,228	-0,830	-0,849	-0,969	0,224
hsa-miR-4650-3p	-0,979	-1,007	-0,884	-0,957	0,064
hsa-miR-3682-5p	-1,003	-0,840	-0,873	-0,905	0,086
hsa-miR-3144-3p	-1,209	-0,393	-1,109	-0,903	0,445
hsa-miR-4285	-0,902	-0,769	-1,033	-0,901	0,132
hsa-miR-624*	-0,887	-0,722	-1,025	-0,878	0,151
hsa-miR-492	-1,023	-0,948	-0,663	-0,878	0,190
hsa-miR-126	-1,003	-0,804	-0,752	-0,853	0,132
hsa-miR-640	-0,597	-1,051	-0,851	-0,833	0,227
hsa-miR-548e	-1,209	-0,500	-0,778	-0,829	0,357
hsa-miR-3140-3p	-0,995	-0,768	-0,685	-0,816	0,161
hsa-miR-581	-0,812	-0,668	-0,917	-0,799	0,125
hsa-miR-885-5p	-0,891	-0,752	-0,700	-0,781	0,099
hsa-miR-548ad	-0,914	-0,846	-0,550	-0,770	0,193
hsa-miR-3177-3p	-0,870	-0,438	-0,991	-0,766	0,291
hsa-miR-3130-3p	-1,154	-0,283	-0,856	-0,765	0,443
hsa-miR-4761-5p	-0,776	-0,814	-0,634	-0,741	0,095
hsa-miR-140-5p	-0,700	-0,690	-0,739	-0,710	0,026
hsa-miR-4718	-0,673	-0,608	-0,835	-0,705	0,117
hsa-miR-3200-5p	-0,853	-0,622	-0,615	-0,697	0,135
hsa-miR-1245b-3p	-0,583	-0,558	-0,944	-0,695	0,216
hsa-miR-378g	-0,579	-0,823	-0,665	-0,689	0,124
hsa-miR-4765	-0,855	-0,576	-0,618	-0,683	0,150
hsa-miR-4708-3p	-0,479	-1,065	-0,501	-0,682	0,332
hsa-miR-648	-0,762	-0,934	-0,340	-0,679	0,305
hsa-miR-3157-5p	-0,735	-0,528	-0,749	-0,671	0,124
hsa-miR-3139	-0,819	-0,793	-0,370	-0,661	0,252
hsa-miR-4687-5p	-0,826	-0,369	-0,782	-0,659	0,252
hsa-miR-3591-5p	-0,910	-0,696	-0,370	-0,659	0,272
hsa-miR-363*	-0,690	-0,590	-0,681	-0,654	0,055
hsa-miR-4759	-0,607	-0,578	-0,766	-0,650	0,101
hsa-miR-4269	-0,711	-0,504	-0,736	-0,650	0,127
hsa-miR-4650-5p	-0,809	-0,567	-0,562	-0,646	0,141
hsa-miR-3921	-0,723	-0,560	-0,647	-0,643	0,082
hsa-miR-4635	-0,862	-0,688	-0,373	-0,641	0,248
hsa-miR-4453	-0,585	-0,648	-0,688	-0,640	0,052
hsa-miR-1245	-0,731	-0,509	-0,595	-0,612	0,112
hsa-miR-573	-0,629	-0,569	-0,631	-0,610	0,035
hsa-miR-671-3p	-0,343	-0,599	-0,858	-0,600	0,258
hsa-miR-4709-3p	-0,829	-0,574	-0,392	-0,598	0,220
hsa-miR-657	-1,007	-0,226	-0,485	-0,573	0,398
hsa-miR-125b	-0,676	-0,511	-0,526	-0,571	0,091
hsa-miR-761	-0,669	-0,524	-0,451	-0,548	0,111
hsa-miR-4684-3p	-0,298	-0,808	-0,519	-0,542	0,256
hsa-miR-203	-0,306	-0,706	-0,602	-0,538	0,208
hsa-miR-4470	-0,606	-0,633	-0,346	-0,528	0,158
hsa-miR-4643	-0,433	-0,694	-0,453	-0,526	0,145
hsa-miR-582-3p	-0,640	-0,583	-0,350	-0,525	0,154
hsa-miR-1254	-0,983	-0,051	-0,534	-0,523	0,466
hsa-miR-409-5p	-0,374	-0,578	-0,612	-0,521	0,129
hsa-miR-3120-3p	-0,165	-0,712	-0,668	-0,515	0,304
hsa-miR-1972	-0,395	-0,566	-0,560	-0,507	0,097
hsa-miR-876-3p	-1,290	0,062	-0,258	-0,495	0,707

Annexe 1: Supplementary Table S2 Primary screening data of DF-FunREG system.

hsa-miR-1301	-0,537	-0,532	-0,400	-0,490	0,078
hsa-miR-214*	-0,460	-0,385	-0,601	-0,482	0,110
hsa-miR-4796-3p	-0,710	-0,352	-0,372	-0,478	0,201
hsa-miR-4688	-0,745	-0,543	-0,143	-0,477	0,306
hsa-miR-4693-5p	-0,658	-0,148	-0,620	-0,475	0,284
hsa-miR-4503	-0,495	-0,364	-0,562	-0,474	0,101
hsa-miR-4498	-0,649	-0,261	-0,501	-0,470	0,196
hsa-miR-15a*	-0,422	-0,287	-0,700	-0,470	0,211
hsa-miR-193b	-0,549	-0,460	-0,398	-0,469	0,076
hsa-miR-4752	-0,711	-0,254	-0,439	-0,468	0,230
hsa-miR-892b	-0,463	-0,500	-0,438	-0,467	0,031
hsa-miR-19b-2*	-0,467	-0,346	-0,553	-0,455	0,104
hsa-miR-1269	-0,490	-0,249	-0,617	-0,452	0,187
hsa-miR-3166	-0,242	-0,628	-0,483	-0,451	0,195
hsa-miR-4518	-0,771	-0,209	-0,364	-0,448	0,290
hsa-miR-4755-3p	-0,546	-0,294	-0,491	-0,444	0,132
hsa-miR-664*	-0,474	-0,313	-0,537	-0,441	0,115
hsa-miR-4646-3p	-0,518	-0,452	-0,337	-0,436	0,091
hsa-miR-520d-5p	-0,718	-0,220	-0,366	-0,435	0,256
hsa-miR-1273	-0,611	-0,280	-0,409	-0,433	0,167
hsa-miR-3941	-0,465	-0,381	-0,437	-0,428	0,043
hsa-miR-532-3p	-0,293	-0,693	-0,291	-0,426	0,232
hsa-miR-3142	-0,275	-0,376	-0,626	-0,425	0,181
hsa-miR-4780	-0,189	-0,446	-0,614	-0,416	0,214
hsa-miR-506	-0,495	-0,494	-0,255	-0,415	0,138
hsa-miR-4700-3p	-0,486	-0,390	-0,340	-0,405	0,074
hsa-miR-4796-5p	-0,233	-0,485	-0,474	-0,398	0,142
hsa-miR-148b	-0,525	-0,346	-0,313	-0,395	0,114
hsa-miR-3617	-0,449	-0,484	-0,249	-0,394	0,127
hsa-miR-1262	-0,394	-0,334	-0,448	-0,392	0,057
hsa-miR-3545-5p	-0,487	-0,233	-0,450	-0,390	0,137
hsa-miR-451	-0,552	-0,398	-0,219	-0,390	0,167
hsa-miR-4330	-0,441	-0,119	-0,608	-0,389	0,249
hsa-miR-3190	-0,343	-0,359	-0,447	-0,383	0,056
hsa-let-7f	-0,354	-0,348	-0,440	-0,381	0,052
hsa-miR-4690-5p	-0,367	-0,267	-0,500	-0,378	0,117
hsa-miR-1237	-0,421	-0,296	-0,406	-0,375	0,068
hsa-miR-3929	-0,354	-0,292	-0,474	-0,373	0,092
hsa-miR-4433	-0,394	-0,206	-0,512	-0,371	0,154
hsa-miR-3186-3p	-0,425	-0,378	-0,309	-0,371	0,058
hsa-miR-676*	-0,467	-0,316	-0,325	-0,369	0,085
hsa-miR-378d	-0,444	-0,400	-0,256	-0,367	0,098
hsa-miR-1469	-0,388	-0,354	-0,356	-0,366	0,019
hsa-miR-449c	-0,398	-0,345	-0,352	-0,365	0,029
hsa-miR-2467-5p	-0,360	-0,256	-0,478	-0,365	0,111
hsa-miR-1261	-0,398	-0,302	-0,393	-0,364	0,054
hsa-miR-4425	-0,024	-0,486	-0,570	-0,360	0,294
hsa-miR-4640-5p	-0,397	-0,370	-0,300	-0,356	0,050
hsa-miR-4683	-0,412	-0,303	-0,342	-0,353	0,056
hsa-miR-323-3p	-0,228	-0,404	-0,426	-0,352	0,109
hsa-miR-1288	-0,215	-0,344	-0,497	-0,352	0,141
hsa-miR-3973	-0,516	-0,470	-0,069	-0,352	0,246
hsa-let-7c	-0,240	-0,421	-0,387	-0,350	0,096
hsa-miR-3146	-0,395	-0,335	-0,291	-0,340	0,052
hsa-miR-4654	-0,027	-0,450	-0,534	-0,337	0,272
hsa-miR-3119	-0,363	-0,288	-0,357	-0,336	0,041
hsa-miR-4692	-0,309	-0,326	-0,345	-0,327	0,018
hsa-miR-675	-0,383	-0,090	-0,505	-0,326	0,213
hsa-miR-4474-5p	-0,301	-0,230	-0,447	-0,326	0,111
hsa-miR-3916	-0,396	-0,207	-0,373	-0,325	0,103
hsa-miR-1253	-0,304	-0,348	-0,323	-0,325	0,022
hsa-miR-608	-0,384	-0,339	-0,248	-0,324	0,069
hsa-miR-193a-5p	-0,399	-0,207	-0,365	-0,323	0,102
hsa-miR-4664-3p	-0,334	-0,328	-0,306	-0,323	0,015
hsa-let-7a	-0,324	-0,309	-0,336	-0,323	0,014
hsa-miR-510	-0,388	-0,220	-0,361	-0,323	0,090
hsa-let-7e	-0,266	-0,354	-0,343	-0,321	0,048
hsa-miR-634	-0,382	-0,266	-0,314	-0,321	0,059
hsa-miR-1269b	-0,341	-0,221	-0,386	-0,316	0,085
hsa-miR-95	-0,296	-0,443	-0,204	-0,314	0,121

Annexe 1: Supplementary Table S2 Primary screening data of DF-FunREG system.

hsa-let-7b	-0,258	-0,247	-0,420	-0,308	0,097
hsa-miR-326	-0,331	-0,427	-0,163	-0,307	0,134
hsa-miR-449a	-0,362	-0,308	-0,250	-0,307	0,056
hsa-miR-1243	-0,397	0,086	-0,607	-0,306	0,355
hsa-miR-194	-0,479	-0,216	-0,218	-0,304	0,151
hsa-miR-4698	-0,339	-0,262	-0,312	-0,304	0,039
hsa-miR-29a	-0,456	-0,194	-0,262	-0,304	0,136
hsa-miR-4763-3p	-0,462	-0,117	-0,332	-0,304	0,175
hsa-miR-518a-5p // hsa-miR-527	-0,424	-0,199	-0,283	-0,302	0,114
hsa-miR-4712-5p	-0,491	-0,477	0,064	-0,301	0,316
hsa-miR-1233	-0,344	-0,298	-0,255	-0,299	0,044
hsa-miR-4520a-5p // hsa-miR-4520b-5p	-0,170	-0,139	-0,585	-0,298	0,249
hsa-miR-3064-5p	-0,356	-0,113	-0,423	-0,297	0,163
hsa-miR-513a-5p	-0,347	-0,361	-0,173	-0,294	0,104
hsa-miR-4788	-0,311	-0,334	-0,225	-0,290	0,057
hsa-miR-221*	-0,374	-0,177	-0,313	-0,288	0,101
hsa-miR-943	-0,313	-0,298	-0,247	-0,286	0,034
hsa-miR-424	-0,344	-0,080	-0,428	-0,284	0,182
hsa-miR-337-5p	-0,103	-0,342	-0,399	-0,281	0,157
hsa-miR-764	-0,325	-0,223	-0,285	-0,278	0,052
hsa-miR-3647-5p	-0,317	-0,254	-0,261	-0,277	0,034
hsa-miR-1911	-0,210	-0,269	-0,351	-0,277	0,070
hsa-miR-4736	-0,195	-0,264	-0,370	-0,276	0,088
hsa-miR-3665	-0,394	-0,250	-0,185	-0,276	0,107
hsa-miR-3611	-0,325	-0,349	-0,154	-0,276	0,106
hsa-miR-33b	-0,511	-0,048	-0,266	-0,275	0,232
hsa-miR-2113	-0,192	-0,241	-0,386	-0,273	0,101
hsa-miR-4460	-0,328	-0,129	-0,361	-0,273	0,126
hsa-miR-28-5p	-0,272	-0,357	-0,187	-0,272	0,085
hsa-miR-34b	-0,360	-0,206	-0,248	-0,271	0,080
hsa-miR-4738-3p	-0,394	-0,241	-0,175	-0,270	0,112
hsa-miR-124*	-0,388	-0,134	-0,285	-0,269	0,128
hsa-miR-508-5p	-0,293	-0,313	-0,200	-0,269	0,060
hsa-miR-3670	-0,257	-0,299	-0,248	-0,268	0,027
hsa-miR-3127-5p	-0,267	-0,228	-0,307	-0,267	0,039
hsa-miR-4515	-0,198	-0,240	-0,359	-0,266	0,083
hsa-miR-193a-3p	-0,318	-0,306	-0,172	-0,265	0,081
hsa-miR-34a	-0,346	-0,343	-0,105	-0,265	0,138
hsa-miR-3671	-0,280	-0,160	-0,350	-0,263	0,096
hsa-miR-4776-5p	-0,162	-0,284	-0,343	-0,263	0,092
hsa-miR-643	-0,457	-0,168	-0,140	-0,255	0,176
hsa-miR-4493	-0,444	-0,244	-0,074	-0,254	0,185
hsa-miR-410	-0,332	-0,328	-0,102	-0,254	0,132
hsa-miR-3163	-0,343	-0,206	-0,209	-0,253	0,078
hsa-miR-135b	-0,141	-0,313	-0,294	-0,249	0,094
hsa-miR-192	-0,209	-0,313	-0,226	-0,249	0,056
hsa-miR-3616-5p	-0,086	-0,309	-0,349	-0,248	0,142
hsa-miR-4790-3p	-0,191	-0,310	-0,238	-0,246	0,060
hsa-let-7i	-0,152	-0,301	-0,282	-0,245	0,081
hsa-miR-23b	-0,234	-0,265	-0,234	-0,245	0,018
hsa-miR-4794	-0,272	-0,150	-0,303	-0,242	0,081
hsa-miR-29c	-0,155	-0,409	-0,159	-0,241	0,145
hsa-miR-3936	-0,283	-0,194	-0,243	-0,240	0,044
hsa-miR-152	-0,221	-0,283	-0,210	-0,238	0,039
hsa-miR-4771	-0,563	0,119	-0,265	-0,236	0,342
hsa-miR-4639-3p	-0,344	-0,239	-0,125	-0,236	0,109
hsa-miR-4696	-0,273	-0,209	-0,215	-0,232	0,036
hsa-miR-647	-0,178	-0,217	-0,299	-0,231	0,062
hsa-miR-4679	-0,226	-0,299	-0,166	-0,230	0,066
hsa-miR-758	-0,189	-0,250	-0,249	-0,230	0,035
hsa-miR-585	-0,121	-0,198	-0,368	-0,229	0,126
hsa-miR-122	-0,221	-0,289	-0,176	-0,229	0,057
hsa-miR-612	-0,182	-0,264	-0,240	-0,229	0,042
hsa-miR-4660	-0,353	-0,276	-0,056	-0,228	0,154
hsa-miR-548am	-0,402	-0,189	-0,094	-0,228	0,158
hsa-miR-661	-0,136	-0,231	-0,315	-0,227	0,089
hsa-miR-4733-3p	-0,331	-0,189	-0,161	-0,227	0,091
hsa-miR-342-5p	-0,071	-0,181	-0,428	-0,226	0,183

Annexe 1: Supplementary Table S2 Primary screening data of DF-FunREG system.

hsa-miR-3169	-0,249	-0,200	-0,230	-0,226	0,025
hsa-miR-4750	-0,210	-0,287	-0,179	-0,225	0,055
hsa-miR-3675-3p	-0,345	-0,195	-0,136	-0,225	0,107
hsa-miR-4730	-0,357	-0,257	-0,060	-0,225	0,151
hsa-miR-525-5p	-0,280	-0,216	-0,177	-0,224	0,052
hsa-miR-4727-5p	-0,240	-0,166	-0,265	-0,224	0,051
hsa-miR-4684-5p	-0,166	-0,125	-0,379	-0,223	0,136
hsa-miR-4512	-0,081	-0,268	-0,313	-0,221	0,123
hsa-miR-196a	-0,222	-0,225	-0,215	-0,221	0,005
hsa-miR-4804-3p	-0,300	-0,129	-0,227	-0,219	0,086
hsa-miR-1227	0,003	-0,428	-0,227	-0,217	0,216
hsa-miR-2682	-0,171	-0,252	-0,228	-0,217	0,042
hsa-miR-2681	-0,163	-0,284	-0,200	-0,216	0,062
hsa-miR-4723-5p	-0,315	-0,128	-0,203	-0,215	0,095
hsa-miR-4774-5p	-0,251	-0,149	-0,242	-0,214	0,057
hsa-miR-597	-0,309	0,006	-0,340	-0,214	0,191
hsa-miR-154*	-0,314	-0,068	-0,261	-0,214	0,129
hsa-miR-3161	-0,420	0,062	-0,281	-0,213	0,248
hsa-miR-423-5p	-0,229	-0,119	-0,290	-0,213	0,087
hsa-miR-3661	-0,146	-0,216	-0,263	-0,208	0,059
hsa-miR-99b	-0,064	-0,296	-0,263	-0,208	0,126
hsa-miR-376a*	-0,261	-0,056	-0,303	-0,207	0,132
hsa-miR-3912	-0,213	-0,163	-0,241	-0,206	0,040
hsa-miR-323b-3p	-0,071	-0,215	-0,327	-0,204	0,128
hsa-miR-520h	-0,226	-0,186	-0,200	-0,204	0,021
hsa-miR-513b	-0,273	-0,051	-0,288	-0,204	0,133
hsa-miR-4323	0,035	-0,468	-0,177	-0,203	0,253
hsa-miR-148a	-0,200	-0,220	-0,190	-0,203	0,015
hsa-miR-3126-5p	-0,323	-0,103	-0,181	-0,202	0,112
hsa-miR-34a*	-0,256	-0,098	-0,251	-0,202	0,090
hsa-miR-98	-0,332	0,118	-0,390	-0,201	0,278
hsa-miR-940	-0,053	-0,276	-0,271	-0,200	0,128
hsa-miR-1305	-0,250	-0,167	-0,181	-0,199	0,045
hsa-miR-2110	-0,421	0,139	-0,314	-0,199	0,297
hsa-miR-210	-0,136	-0,233	-0,227	-0,198	0,054
hsa-miR-196b	-0,254	-0,165	-0,176	-0,198	0,048
hsa-miR-4326	-0,237	-0,377	0,021	-0,198	0,202
hsa-miR-218	-0,050	-0,262	-0,281	-0,197	0,128
hsa-miR-4639-5p	-0,400	-0,264	0,077	-0,196	0,246
hsa-miR-3137	-0,378	0,039	-0,245	-0,195	0,213
hsa-miR-596	-0,238	-0,077	-0,265	-0,193	0,102
hsa-let-7g*	-0,305	-0,075	-0,199	-0,193	0,115
hsa-miR-3591-3p	-0,412	-0,231	0,067	-0,192	0,242
hsa-miR-644	-0,224	-0,199	-0,150	-0,191	0,038
hsa-miR-1976	-0,221	-0,077	-0,270	-0,189	0,100
hsa-miR-3180	-0,231	-0,259	-0,077	-0,189	0,098
hsa-miR-935	-0,003	-0,278	-0,286	-0,189	0,161
hsa-miR-7	-0,279	-0,163	-0,124	-0,189	0,081
hsa-miR-4511	-0,313	-0,101	-0,150	-0,188	0,111
hsa-miR-4527	-0,450	-0,359	0,247	-0,187	0,379
hsa-miR-379	-0,296	-0,200	-0,062	-0,186	0,118
hsa-miR-4784	-0,168	-0,245	-0,143	-0,185	0,053
hsa-miR-205	-0,094	-0,253	-0,208	-0,185	0,082
hsa-miR-146b-5p	-0,037	-0,231	-0,284	-0,184	0,130
hsa-miR-4638-5p	-0,171	-0,184	-0,197	-0,184	0,013
hsa-miR-4742-3p	-0,128	-0,154	-0,269	-0,184	0,075
hsa-miR-147b	-0,165	-0,134	-0,249	-0,183	0,060
hsa-miR-1178	-0,117	-0,038	-0,389	-0,181	0,184
hsa-miR-3194-5p	-0,244	-0,167	-0,133	-0,181	0,057
hsa-miR-103a	-0,397	-0,088	-0,052	-0,179	0,190
hsa-miR-3689a-5p // hsa-miR-3689b // hsa- miR-3689a	-0,110	-0,286	-0,139	-0,178	0,094
hsa-miR-744	0,026	-0,253	-0,304	-0,177	0,177
hsa-miR-3160-3p	-0,040	-0,106	-0,379	-0,175	0,180
hsa-miR-4538	0,083	-0,256	-0,352	-0,175	0,228
hsa-miR-3074-3p	-0,317	-0,039	-0,168	-0,175	0,139
hsa-miR-1909*	-0,121	-0,133	-0,270	-0,175	0,083
hsa-miR-4430	-0,193	-0,064	-0,265	-0,174	0,102
hsa-miR-624	-0,125	-0,335	-0,058	-0,173	0,144

Annexe 1: Supplementary Table S2 Primary screening data of DF-FunREG system.

hsa-miR-100*	-0,277	-0,142	-0,098	-0,173	0,093
hsa-miR-4661-3p	0,050	-0,224	-0,344	-0,173	0,202
hsa-miR-200c*	-0,227	-0,118	-0,169	-0,171	0,055
hsa-miR-4464	-0,214	-0,153	-0,146	-0,171	0,038
hsa-miR-877	-0,166	-0,217	-0,131	-0,171	0,044
hsa-miR-548an	-0,233	-0,019	-0,254	-0,169	0,130
hsa-miR-4724-5p	-0,251	-0,123	-0,131	-0,168	0,072
hsa-miR-124	-0,107	-0,169	-0,228	-0,168	0,061
hsa-miR-125a-5p	-0,190	-0,113	-0,200	-0,168	0,048
hsa-miR-4756-3p	-0,078	-0,147	-0,277	-0,167	0,101
hsa-miR-4507	-0,192	-0,058	-0,252	-0,167	0,099
hsa-miR-668	-0,385	0,215	-0,330	-0,167	0,332
hsa-let-7d*	-0,203	-0,086	-0,211	-0,166	0,070
hsa-miR-3120-5p	0,086	-0,228	-0,356	-0,166	0,227
hsa-miR-1278	-0,153	-0,207	-0,137	-0,166	0,037
hsa-miR-214	-0,165	-0,095	-0,235	-0,165	0,070
hsa-miR-3926	-0,204	-0,039	-0,250	-0,164	0,111
hsa-miR-92a-1*	-0,073	-0,178	-0,242	-0,164	0,085
hsa-miR-4772-5p	0,180	-0,398	-0,272	-0,163	0,304
hsa-miR-4715-3p	-0,313	0,054	-0,224	-0,161	0,191
hsa-miR-1286	-0,258	-0,185	-0,040	-0,161	0,111
hsa-miR-200a*	-0,381	-0,286	0,186	-0,161	0,304
hsa-miR-431	-0,144	-0,137	-0,200	-0,160	0,034
hsa-miR-4309	-0,129	-0,075	-0,277	-0,160	0,105
hsa-miR-4501	-0,231	-0,112	-0,136	-0,160	0,063
hsa-miR-891b	-0,137	-0,029	-0,311	-0,159	0,142
hsa-miR-502-5p	-0,185	-0,109	-0,184	-0,159	0,044
hsa-miR-1276	-0,010	-0,323	-0,144	-0,159	0,157
hsa-miR-382	-0,266	-0,154	-0,057	-0,159	0,104
hsa-miR-1908	-0,352	-0,035	-0,087	-0,158	0,170
hsa-miR-4762-3p	-0,205	-0,085	-0,184	-0,158	0,064
hsa-let-7d	-0,199	-0,113	-0,157	-0,156	0,043
hsa-miR-409-3p	0,060	-0,210	-0,316	-0,155	0,194
hsa-miR-3116	-0,124	-0,225	-0,116	-0,155	0,061
hsa-miR-635	-0,380	0,013	-0,097	-0,155	0,203
hsa-miR-1273g	-0,135	0,074	-0,401	-0,154	0,238
hsa-miR-302d*	-0,238	-0,032	-0,191	-0,154	0,108
hsa-miR-34b*	-0,184	-0,109	-0,165	-0,153	0,039
hsa-miR-3917	-0,237	-0,127	-0,094	-0,153	0,075
hsa-miR-4311	-0,198	-0,213	-0,045	-0,152	0,093
hsa-miR-3714	-0,112	-0,095	-0,247	-0,151	0,083
hsa-miR-548al	-0,108	-0,110	-0,236	-0,151	0,073
hsa-miR-550b	-0,161	0,001	-0,292	-0,151	0,147
hsa-miR-449b	-0,154	-0,142	-0,150	-0,149	0,006
hsa-miR-3126-3p	-0,220	-0,219	-0,004	-0,148	0,124
hsa-miR-4674	-0,238	-0,118	-0,084	-0,147	0,081
hsa-miR-4529-5p	-0,288	-0,219	0,066	-0,147	0,188
hsa-miR-676	-0,210	-0,125	-0,104	-0,147	0,056
hsa-miR-544b	-0,083	-0,209	-0,146	-0,146	0,063
hsa-miR-2392	-0,137	-0,162	-0,140	-0,146	0,014
hsa-miR-633	-0,183	-0,169	-0,085	-0,146	0,053
hsa-miR-4721	-0,068	-0,089	-0,280	-0,146	0,117
hsa-miR-639	-0,236	-0,122	-0,078	-0,145	0,081
hsa-miR-4529-3p	-0,127	-0,221	-0,087	-0,145	0,069
hsa-miR-16	-0,061	-0,118	-0,256	-0,145	0,100
hsa-miR-4704-3p	-0,193	-0,134	-0,106	-0,144	0,045
hsa-miR-4713-3p	-0,190	-0,023	-0,215	-0,143	0,105
hsa-miR-4670-3p	-0,140	-0,046	-0,231	-0,139	0,092
hsa-miR-4322	-0,006	-0,062	-0,348	-0,139	0,183
hsa-miR-20b	-0,043	-0,221	-0,151	-0,138	0,089
hsa-miR-548b-3p	-0,240	0,088	-0,261	-0,138	0,195
hsa-miR-554	-0,054	-0,216	-0,141	-0,137	0,081
hsa-miR-466	-0,122	-0,161	-0,129	-0,137	0,021
hsa-miR-708	0,055	-0,217	-0,248	-0,137	0,166
hsa-miR-625*	-0,110	-0,079	-0,220	-0,136	0,074
hsa-miR-3915	-0,218	-0,116	-0,070	-0,135	0,076
hsa-miR-4714-5p	-0,167	-0,096	-0,142	-0,135	0,036
hsa-miR-1255a	-0,039	-0,178	-0,186	-0,134	0,083
hsa-miR-4649-3p	-0,407	-0,389	0,406	-0,130	0,464
hsa-miR-378b	-0,248	0,184	-0,326	-0,130	0,275

Annexe 1: Supplementary Table S2 Primary screening data of DF-FunREG system.

hsa-miR-4800-3p	-0,221	-0,033	-0,134	-0,130	0,094
hsa-miR-205*	-0,234	0,043	-0,197	-0,129	0,151
hsa-miR-3173-5p	-0,142	-0,088	-0,157	-0,129	0,036
hsa-miR-548a-3p	-0,226	0,012	-0,169	-0,128	0,125
hsa-miR-425*	-0,272	0,036	-0,146	-0,128	0,155
hsa-miR-577	-0,086	-0,181	-0,113	-0,126	0,049
hsa-miR-875-5p	-0,207	-0,090	-0,082	-0,126	0,070
hsa-miR-619	-0,245	-0,086	-0,048	-0,126	0,104
hsa-miR-31*	-0,160	-0,087	-0,130	-0,125	0,037
hsa-miR-302a*	-0,272	0,039	-0,142	-0,125	0,156
hsa-miR-23b*	-0,183	-0,005	-0,188	-0,125	0,104
hsa-miR-3907	-0,096	-0,104	-0,172	-0,124	0,042
hsa-miR-4740-3p	-0,021	-0,288	-0,062	-0,124	0,144
hsa-miR-7-1*	-0,154	-0,063	-0,151	-0,123	0,052
hsa-miR-541*	-0,061	-0,050	-0,256	-0,122	0,116
hsa-miR-663b	-0,116	-0,142	-0,106	-0,122	0,019
hsa-miR-4695-5p	-0,120	-0,177	-0,064	-0,120	0,057
hsa-miR-105*	-0,197	-0,012	-0,150	-0,120	0,096
hsa-miR-4749-5p	0,097	-0,176	-0,279	-0,119	0,194
hsa-miR-338-5p	-0,380	0,191	-0,167	-0,119	0,288
hsa-miR-1260b	-0,117	-0,086	-0,151	-0,118	0,033
hsa-miR-3184	0,043	-0,128	-0,268	-0,118	0,156
hsa-miR-4772-3p	-0,110	-0,101	-0,141	-0,118	0,021
hsa-miR-548ab	-0,233	-0,083	-0,036	-0,117	0,103
hsa-miR-1913	-0,212	-0,137	-0,002	-0,117	0,107
hsa-miR-3689f	0,047	-0,216	-0,181	-0,117	0,143
hsa-miR-107	-0,155	-0,070	-0,126	-0,117	0,043
hsa-miR-4804-5p	-0,156	-0,002	-0,191	-0,116	0,101
hsa-miR-4799-3p	-0,286	-0,085	0,022	-0,116	0,156
hsa-miR-4763-5p	-0,134	-0,057	-0,157	-0,116	0,053
hsa-miR-744*	-0,288	-0,035	-0,025	-0,116	0,149
hsa-miR-2114	-0,188	-0,173	0,014	-0,116	0,113
hsa-miR-4672	-0,109	-0,014	-0,223	-0,115	0,105
hsa-miR-4673	-0,152	-0,016	-0,175	-0,114	0,086
hsa-miR-25*	-0,122	-0,009	-0,211	-0,114	0,101
hsa-miR-3918	-0,071	-0,119	-0,151	-0,114	0,040
hsa-miR-1298	-0,147	0,015	-0,207	-0,113	0,114
hsa-miR-503	-0,083	-0,139	-0,115	-0,112	0,028
hsa-miR-2909	-0,071	-0,073	-0,193	-0,112	0,070
hsa-miR-4727-3p	-0,109	-0,128	-0,099	-0,112	0,015
hsa-miR-4774-3p	0,004	-0,253	-0,086	-0,112	0,130
hsa-miR-484	0,012	-0,215	-0,131	-0,111	0,115
hsa-miR-192*	-0,164	-0,029	-0,141	-0,111	0,072
hsa-miR-660	-0,167	-0,132	-0,032	-0,110	0,070
hsa-miR-4790-5p	-0,194	-0,095	-0,042	-0,110	0,077
hsa-miR-450b-3p	0,255	-0,231	-0,354	-0,110	0,322
hsa-miR-4662a-5p	-0,175	0,025	-0,180	-0,110	0,117
hsa-miR-132	-0,078	-0,227	-0,024	-0,110	0,105
hsa-miR-378i	-0,192	0,044	-0,176	-0,108	0,132
hsa-miR-1285	-0,112	-0,160	-0,051	-0,107	0,055
hsa-miR-361-5p	-0,203	-0,183	0,066	-0,107	0,150
hsa-miR-637	-0,015	-0,097	-0,209	-0,107	0,097
hsa-miR-4773	-0,101	-0,066	-0,153	-0,107	0,044
hsa-miR-130a*	-0,116	-0,144	-0,059	-0,106	0,044
hsa-miR-93*	-0,141	-0,097	-0,079	-0,106	0,032
hsa-miR-1293	-0,132	-0,091	-0,095	-0,106	0,023
hsa-miR-135a	0,062	-0,251	-0,129	-0,106	0,158
hsa-miR-4670-5p	-0,160	-0,055	-0,101	-0,105	0,053
hsa-miR-496	0,082	-0,227	-0,170	-0,105	0,164
hsa-miR-4676-5p	-0,177	-0,083	-0,053	-0,105	0,065
hsa-miR-4705	0,019	-0,137	-0,195	-0,104	0,110
hsa-miR-4522	0,074	-0,217	-0,165	-0,103	0,155
hsa-miR-3919	-0,095	-0,141	-0,072	-0,103	0,035
hsa-miR-2467-3p	-0,025	-0,082	-0,201	-0,102	0,090
hsa-miR-578	-0,325	0,137	-0,119	-0,102	0,231
hsa-miR-4444	-0,094	-0,146	-0,066	-0,102	0,041
hsa-miR-1912	-0,171	-0,189	0,055	-0,101	0,136
hsa-miR-942	0,034	-0,122	-0,212	-0,100	0,124
hsa-miR-3659	0,005	-0,183	-0,122	-0,100	0,096
hsa-miR-665	-0,033	-0,123	-0,143	-0,100	0,058

Annexe 1: Supplementary Table S2 Primary screening data of DF-FunREG system.

hsa-miR-4722-3p	0,050	-0,285	-0,064	-0,100	0,171
hsa-miR-3164	-0,219	-0,007	-0,070	-0,099	0,109
hsa-miR-24	-0,159	-0,140	0,003	-0,098	0,088
hsa-miR-3180-3p	-0,170	-0,137	0,012	-0,098	0,097
hsa-miR-101*	-0,260	-0,015	-0,019	-0,098	0,140
hsa-miR-3155b	-0,075	-0,178	-0,042	-0,098	0,071
hsa-miR-3155	-0,082	-0,123	-0,089	-0,098	0,022
hsa-miR-491-5p	0,126	-0,143	-0,276	-0,098	0,205
hsa-miR-641	-0,087	-0,021	-0,184	-0,097	0,082
hsa-miR-627	-0,144	-0,119	-0,028	-0,097	0,061
hsa-miR-3529	-0,119	-0,089	-0,083	-0,097	0,019
hsa-let-7g	0,054	-0,083	-0,257	-0,095	0,156
hsa-miR-4665-5p	-0,054	-0,098	-0,132	-0,094	0,039
hsa-miR-16-1*	-0,076	0,054	-0,262	-0,094	0,159
hsa-miR-3605-3p	-0,096	-0,060	-0,127	-0,094	0,034
hsa-miR-4745-3p	-0,061	-0,045	-0,176	-0,094	0,072
hsa-miR-33a	0,012	-0,082	-0,212	-0,094	0,112
hsa-miR-548aa	0,354	-0,304	-0,332	-0,094	0,388
hsa-miR-378e	0,039	-0,155	-0,165	-0,094	0,115
hsa-miR-4423-5p	-0,138	-0,163	0,020	-0,094	0,099
hsa-miR-4461	-0,095	-0,093	-0,093	-0,093	0,001
hsa-miR-512-5p	-0,045	-0,140	-0,095	-0,093	0,048
hsa-miR-200a	-0,145	-0,170	0,036	-0,093	0,112
hsa-miR-4782-5p	-0,082	-0,158	-0,038	-0,093	0,061
hsa-miR-587	-0,146	0,039	-0,170	-0,092	0,115
hsa-miR-200b	0,353	-0,277	-0,353	-0,092	0,387
hsa-miR-3975	0,136	-0,181	-0,230	-0,092	0,198
hsa-miR-3198	-0,051	-0,137	-0,084	-0,091	0,044
hsa-miR-1296	-0,156	0,005	-0,121	-0,090	0,085
hsa-miR-490-5p	-0,110	-0,118	-0,043	-0,090	0,041
hsa-miR-212	-0,054	-0,065	-0,146	-0,088	0,050
hsa-miR-378f	0,016	-0,027	-0,253	-0,088	0,145
hsa-miR-550a*	-0,101	0,024	-0,186	-0,088	0,106
hsa-miR-486-3p	0,073	-0,199	-0,133	-0,086	0,142
hsa-miR-3940-5p	-0,064	-0,113	-0,082	-0,086	0,024
hsa-miR-548c-5p	-0,167	-0,081	-0,009	-0,086	0,079
hsa-miR-378h	-0,116	0,011	-0,151	-0,085	0,086
hsa-miR-4799-5p	-0,036	-0,205	-0,011	-0,084	0,106
hsa-miR-2052	-0,211	-0,220	0,178	-0,084	0,227
hsa-miR-181c*	-0,128	-0,017	-0,107	-0,084	0,059
hsa-miR-4664-5p	-0,134	-0,088	-0,029	-0,084	0,053
hsa-miR-27b	-0,077	0,000	-0,173	-0,083	0,087
hsa-miR-3128	-0,104	-0,020	-0,122	-0,082	0,054
hsa-miR-340	0,073	-0,207	-0,111	-0,082	0,142
hsa-miR-610	-0,086	-0,134	-0,024	-0,081	0,055
hsa-miR-4778-3p	-0,089	-0,133	-0,021	-0,081	0,056
hsa-miR-3158-5p	-0,077	-0,029	-0,137	-0,081	0,054
hsa-miR-4738-5p	-0,145	-0,125	0,028	-0,081	0,095
hsa-miR-4524*	-0,144	-0,016	-0,080	-0,080	0,064
hsa-miR-17	0,020	-0,073	-0,187	-0,080	0,103
hsa-miR-802	-0,064	-0,162	-0,014	-0,080	0,075
hsa-miR-566	0,434	-0,390	-0,282	-0,079	0,448
hsa-miR-1324	-0,119	-0,166	0,050	-0,079	0,114
hsa-miR-223*	-0,171	-0,001	-0,064	-0,079	0,086
hsa-miR-122*	-0,197	-0,014	-0,024	-0,079	0,103
hsa-miR-4756-5p	-0,072	-0,012	-0,151	-0,078	0,070
hsa-miR-18b	0,044	-0,071	-0,209	-0,078	0,127
hsa-miR-4737	-0,028	-0,092	-0,114	-0,078	0,045
hsa-miR-1307	-0,087	-0,071	-0,074	-0,078	0,009
hsa-miR-4801	-0,083	0,003	-0,152	-0,077	0,077
hsa-miR-518a-3p	-0,051	-0,043	-0,138	-0,077	0,053
hsa-miR-2681*	-0,091	-0,047	-0,092	-0,077	0,026
hsa-miR-21*	-0,116	-0,048	-0,065	-0,076	0,035
hsa-miR-3193	-0,084	-0,018	-0,124	-0,076	0,054
hsa-miR-9	-0,117	-0,115	0,006	-0,075	0,070
hsa-miR-1294	-0,207	0,015	-0,032	-0,075	0,117
hsa-miR-4652-5p	-0,162	-0,043	-0,019	-0,075	0,077
hsa-miR-4689	-0,131	-0,109	0,017	-0,074	0,080
hsa-miR-4656	-0,095	0,027	-0,151	-0,073	0,091
hsa-miR-4519	-0,066	-0,156	0,004	-0,073	0,080

Annexe 1: Supplementary Table S2 Primary screening data of DF-FunREG system.

hsa-miR-425	-0,021	-0,138	-0,056	-0,072	0,060
hsa-miR-199b-5p	-0,069	0,012	-0,158	-0,072	0,085
hsa-miR-548d-5p	-0,254	0,084	-0,044	-0,071	0,170
hsa-miR-487a	-0,164	-0,089	0,041	-0,071	0,104
hsa-miR-330-5p	0,406	-0,439	-0,179	-0,071	0,433
hsa-miR-4484	-0,231	-0,222	0,240	-0,071	0,269
hsa-miR-3545-3p	-0,052	-0,161	0,005	-0,070	0,084
hsa-miR-137	-0,062	-0,024	-0,121	-0,069	0,049
hsa-miR-507	-0,098	0,015	-0,122	-0,068	0,073
hsa-miR-339-3p	-0,345	0,091	0,054	-0,067	0,242
hsa-miR-875-3p	-0,241	0,309	-0,268	-0,067	0,325
hsa-miR-154	-0,088	-0,092	-0,021	-0,067	0,040
hsa-miR-615-3p	0,072	-0,071	-0,200	-0,066	0,136
hsa-miR-924	-0,114	-0,034	-0,048	-0,065	0,043
hsa-miR-4720-3p	-0,110	0,043	-0,123	-0,063	0,093
hsa-miR-20a	-0,150	-0,035	-0,005	-0,063	0,077
hsa-miR-4760-5p	-0,138	0,001	-0,053	-0,063	0,070
hsa-miR-3141	0,022	-0,130	-0,079	-0,062	0,077
hsa-miR-769-3p	-0,117	-0,133	0,062	-0,062	0,108
hsa-miR-548ac	-0,181	0,036	-0,042	-0,062	0,110
hsa-miR-374b*	-0,108	-0,053	-0,026	-0,062	0,042
hsa-miR-200b*	-0,066	0,064	-0,182	-0,062	0,123
hsa-miR-613	-0,062	-0,030	-0,092	-0,061	0,031
hsa-miR-526b	0,090	0,093	-0,362	-0,060	0,262
hsa-miR-3174	-0,039	0,006	-0,144	-0,059	0,077
hsa-miR-4652-3p	0,050	-0,151	-0,075	-0,059	0,102
hsa-miR-125b-2*	-0,225	0,087	-0,039	-0,059	0,157
hsa-miR-4429	-0,015	-0,012	-0,149	-0,059	0,078
hsa-miR-3165	0,012	-0,127	-0,060	-0,059	0,070
hsa-miR-4473	0,003	-0,109	-0,069	-0,058	0,056
hsa-miR-4708-5p	-0,147	0,115	-0,144	-0,058	0,150
hsa-miR-3648	0,020	-0,228	0,032	-0,058	0,147
hsa-miR-4648	0,222	-0,169	-0,227	-0,058	0,245
hsa-miR-1265	-0,175	-0,115	0,117	-0,058	0,154
hsa-miR-3688-3p	-0,045	-0,037	-0,091	-0,058	0,029
hsa-miR-3150a-3p	-0,024	0,038	-0,187	-0,058	0,116
hsa-miR-4450	-0,154	-0,053	0,035	-0,057	0,094
hsa-miR-2278	-0,139	-0,102	0,069	-0,057	0,111
hsa-miR-4766-3p	-0,130	-0,125	0,084	-0,057	0,122
hsa-miR-4458	-0,088	0,071	-0,152	-0,057	0,115
hsa-miR-3619-5p	-0,149	0,234	-0,254	-0,056	0,257
hsa-miR-1181	-0,137	0,001	-0,033	-0,056	0,072
hsa-miR-1226	-0,164	-0,137	0,133	-0,056	0,164
hsa-miR-576-3p	-0,271	0,006	0,097	-0,056	0,192
hsa-miR-2277-5p	0,010	0,076	-0,246	-0,053	0,170
hsa-miR-133b	0,097	-0,174	-0,081	-0,053	0,138
hsa-let-7b*	-0,111	-0,046	0,000	-0,052	0,056
hsa-miR-4277	-0,187	-0,086	0,116	-0,052	0,155
hsa-miR-654-5p	0,128	-0,088	-0,194	-0,051	0,165
hsa-miR-19b-1*	0,048	-0,001	-0,200	-0,051	0,131
hsa-miR-509-3p	-0,189	-0,110	0,148	-0,050	0,176
hsa-miR-138	-0,096	0,017	-0,071	-0,050	0,060
hsa-miR-151-5p	-0,329	0,035	0,144	-0,050	0,247
hsa-miR-4485	-0,020	-0,103	-0,026	-0,050	0,046
hsa-miR-564	-0,178	-0,066	0,096	-0,049	0,138
hsa-miR-936	-0,036	0,056	-0,168	-0,049	0,113
hsa-miR-302c*	-0,055	-0,036	-0,056	-0,049	0,011
hsa-miR-4259	0,183	-0,158	-0,170	-0,048	0,201
hsa-miR-4467	-0,084	0,022	-0,082	-0,048	0,060
hsa-miR-3613-5p	-0,101	0,057	-0,100	-0,048	0,091
hsa-miR-3121-3p	0,006	-0,007	-0,141	-0,048	0,081
hsa-miR-513a-3p	-0,174	-0,116	0,151	-0,046	0,173
hsa-miR-4734	-0,010	-0,063	-0,064	-0,046	0,031
hsa-miR-3925-5p	0,241	-0,144	-0,234	-0,046	0,252
hsa-miR-181c	-0,034	-0,074	-0,029	-0,046	0,025
hsa-miR-148b*	-0,017	-0,006	-0,114	-0,046	0,060
hsa-miR-488*	-0,111	-0,027	0,003	-0,045	0,059
hsa-miR-4476	0,022	-0,069	-0,087	-0,044	0,058
hsa-miR-23c	0,110	-0,147	-0,097	-0,044	0,136
hsa-miR-548ae	-0,141	0,071	-0,064	-0,044	0,107

Annexe 1: Supplementary Table S2 Primary screening data of DF-FunREG system.

hsa-miR-885-3p	0,015	-0,185	0,038	-0,044	0,123
hsa-miR-4746-3p	-0,064	-0,024	-0,042	-0,043	0,020
hsa-miR-1257	-0,084	-0,071	0,025	-0,043	0,060
hsa-miR-323-5p	-0,076	-0,103	0,049	-0,043	0,081
hsa-miR-133a	0,114	-0,199	-0,044	-0,043	0,156
hsa-miR-129-3p	0,084	-0,152	-0,061	-0,043	0,119
hsa-miR-4491	0,129	-0,115	-0,143	-0,043	0,150
hsa-miR-605	-0,008	-0,076	-0,043	-0,042	0,034
hsa-miR-143	-0,030	-0,030	-0,065	-0,042	0,020
hsa-miR-455-5p	-0,104	0,014	-0,035	-0,041	0,059
hsa-miR-150	0,039	-0,257	0,095	-0,041	0,189
hsa-miR-4658	-0,007	-0,041	-0,073	-0,040	0,033
hsa-miR-541	0,250	-0,180	-0,190	-0,040	0,251
hsa-miR-1226*	-0,066	-0,003	-0,048	-0,039	0,032
hsa-miR-1180	0,023	0,031	-0,169	-0,038	0,113
hsa-miR-4641	0,041	-0,018	-0,137	-0,038	0,091
hsa-miR-4700-5p	-0,212	-0,030	0,128	-0,038	0,170
hsa-miR-4454	-0,074	-0,072	0,034	-0,037	0,062
hsa-miR-499a-5p	-0,022	-0,140	0,052	-0,037	0,097
hsa-miR-369-5p	-0,068	-0,172	0,132	-0,036	0,155
hsa-miR-4725-3p	0,064	-0,050	-0,122	-0,036	0,094
hsa-miR-423-3p	-0,048	-0,098	0,037	-0,036	0,068
hsa-miR-552	-0,133	0,150	-0,125	-0,036	0,161
hsa-miR-3150b-5p	0,152	-0,136	-0,123	-0,036	0,162
hsa-miR-3133	-0,024	-0,059	-0,024	-0,035	0,020
hsa-miR-1179	-0,042	-0,005	-0,057	-0,035	0,027
hsa-miR-4742-5p	0,035	-0,161	0,021	-0,035	0,110
hsa-miR-4789-5p	-0,027	0,021	-0,097	-0,035	0,059
hsa-miR-195	-0,093	-0,115	0,105	-0,035	0,121
hsa-miR-888*	-0,133	0,119	-0,089	-0,034	0,135
hsa-miR-3934	0,124	-0,091	-0,135	-0,034	0,138
hsa-miR-27a*	-0,096	0,061	-0,066	-0,034	0,084
hsa-miR-579	-0,164	0,013	0,051	-0,033	0,115
hsa-miR-1270	-0,026	0,080	-0,152	-0,033	0,116
hsa-miR-625	-0,030	-0,086	0,022	-0,031	0,054
hsa-miR-548i	0,005	-0,040	-0,057	-0,031	0,032
hsa-miR-4419a	0,102	-0,061	-0,133	-0,031	0,120
hsa-miR-3622a-3p	-0,127	-0,077	0,113	-0,030	0,126
hsa-miR-424*	0,071	0,008	-0,169	-0,030	0,125
hsa-miR-4480	-0,158	0,026	0,042	-0,030	0,111
hsa-miR-16-2*	-0,073	0,056	-0,072	-0,030	0,074
hsa-miR-4685-5p	-0,041	-0,010	-0,037	-0,029	0,017
hsa-miR-3152-5p	0,061	-0,059	-0,086	-0,028	0,078
hsa-miR-4797-3p	-0,052	-0,071	0,038	-0,028	0,058
hsa-miR-548k	-0,092	0,074	-0,065	-0,028	0,089
hsa-miR-92a	-0,049	-0,001	-0,032	-0,028	0,024
hsa-miR-4766-5p	-0,131	-0,048	0,097	-0,028	0,115
hsa-miR-96*	-0,158	0,081	-0,006	-0,027	0,121
hsa-miR-1245b-5p	0,094	-0,098	-0,078	-0,027	0,106
hsa-miR-532-5p	0,080	-0,031	-0,130	-0,027	0,105
hsa-miR-3125	-0,013	-0,056	-0,012	-0,027	0,025
hsa-miR-519b-3p	-0,059	-0,114	0,094	-0,026	0,107
hsa-miR-4690-3p	0,277	-0,284	-0,072	-0,026	0,283
hsa-miR-4751	-0,057	-0,081	0,059	-0,026	0,075
hsa-miR-296-5p	0,039	-0,119	0,002	-0,026	0,082
hsa-miR-3179	-0,175	-0,097	0,196	-0,025	0,196
hsa-miR-454	-0,017	-0,061	0,002	-0,025	0,032
hsa-miR-3065-3p	-0,057	-0,127	0,108	-0,025	0,121
hsa-miR-4659a-3p	-0,101	0,059	-0,032	-0,025	0,080
hsa-miR-4290	0,012	0,012	-0,097	-0,025	0,063
hsa-miR-4712-3p	-0,093	0,050	-0,030	-0,024	0,072
hsa-miR-4500	0,173	-0,090	-0,156	-0,024	0,174
hsa-miR-3145-5p	-0,087	0,085	-0,069	-0,024	0,095
hsa-miR-3159	-0,099	0,093	-0,064	-0,023	0,102
hsa-miR-1289	-0,107	0,020	0,018	-0,023	0,073
hsa-miR-3187-5p	-0,047	-0,076	0,054	-0,023	0,068
hsa-miR-4653-5p	-0,084	-0,006	0,023	-0,022	0,055
hsa-miR-626	-0,075	0,030	-0,022	-0,022	0,052
hsa-miR-371-3p	-0,032	-0,016	-0,018	-0,022	0,009
hsa-miR-4697-5p	0,054	-0,103	-0,016	-0,022	0,079

Annexe 1: Supplementary Table S2 Primary screening data of DF-FunREG system.

hsa-miR-3200-3p	0,008	-0,021	-0,051	-0,021	0,029
hsa-miR-4524	-0,003	0,085	-0,146	-0,021	0,116
hsa-miR-376a	-0,044	0,018	-0,034	-0,020	0,033
hsa-miR-4783-3p	-0,081	0,087	-0,066	-0,020	0,093
hsa-miR-766	-0,130	0,063	0,009	-0,019	0,100
hsa-miR-4284	-0,229	0,173	-0,001	-0,019	0,201
hsa-miR-28-3p	-0,020	-0,050	0,012	-0,019	0,031
hsa-miR-652	0,014	-0,085	0,013	-0,019	0,057
hsa-miR-7-2*	-0,095	0,001	0,037	-0,019	0,068
hsa-miR-1267	-0,057	0,120	-0,121	-0,019	0,125
hsa-miR-1273c	0,061	-0,125	0,007	-0,019	0,096
hsa-miR-3117-5p	-0,040	-0,114	0,098	-0,019	0,108
hsa-miR-3614-3p	-0,055	-0,074	0,073	-0,019	0,080
hsa-miR-483-5p	-0,008	0,008	-0,056	-0,019	0,033
hsa-miR-4746-5p	0,364	-0,305	-0,114	-0,019	0,345
hsa-miR-636	-0,082	-0,158	0,188	-0,018	0,182
hsa-miR-3189-5p	0,049	-0,065	-0,034	-0,017	0,059
hsa-miR-1208	-0,066	0,021	-0,005	-0,017	0,045
hsa-miR-4659b-3p	-0,013	0,066	-0,102	-0,017	0,084
hsa-miR-509-5p	0,094	-0,058	-0,084	-0,016	0,096
hsa-miR-136*	-0,089	0,129	-0,087	-0,016	0,125
hsa-miR-3131	-0,067	-0,047	0,067	-0,016	0,072
hsa-miR-181d	-0,055	-0,008	0,017	-0,015	0,037
hsa-miR-759	-0,213	0,061	0,107	-0,015	0,173
hsa-miR-4682	-0,109	-0,015	0,081	-0,014	0,095
hsa-miR-4726-3p	0,026	-0,099	0,030	-0,014	0,073
hsa-miR-1295	0,293	-0,169	-0,166	-0,014	0,266
hsa-miR-4536	-0,111	0,055	0,015	-0,014	0,087
hsa-miR-4703-5p	-0,049	0,117	-0,108	-0,013	0,116
hsa-miR-92b	-0,135	0,093	0,002	-0,013	0,115
hsa-miR-380*	-0,030	0,067	-0,074	-0,012	0,072
hsa-miR-339-5p	0,001	0,026	-0,063	-0,012	0,046
hsa-miR-4520b-3p	-0,030	0,103	-0,109	-0,012	0,107
hsa-miR-224	0,007	-0,170	0,128	-0,012	0,150
hsa-miR-1302	0,158	-0,074	-0,119	-0,011	0,149
hsa-miR-5047	-0,037	0,073	-0,070	-0,011	0,075
hsa-miR-146a	0,027	-0,007	-0,053	-0,011	0,040
hsa-miR-664	0,167	-0,012	-0,187	-0,011	0,177
hsa-miR-93	0,053	-0,020	-0,066	-0,011	0,060
hsa-miR-4457	-0,112	0,088	-0,007	-0,011	0,100
hsa-miR-4445*	-0,030	0,006	-0,007	-0,011	0,018
hsa-miR-3683	-0,009	0,000	-0,021	-0,010	0,010
hsa-miR-583	-0,097	0,033	0,035	-0,010	0,075
hsa-miR-4709-5p	-0,043	0,067	-0,053	-0,010	0,067
hsa-miR-518c	-0,021	-0,130	0,122	-0,010	0,127
hsa-miR-4781-5p	0,072	0,066	-0,166	-0,009	0,135
hsa-miR-4305	-0,050	-0,052	0,074	-0,009	0,072
hsa-miR-654-3p	0,122	-0,004	-0,144	-0,009	0,133
hsa-miR-1203	-0,030	0,051	-0,048	-0,009	0,053
hsa-miR-3145-3p	-0,138	0,018	0,095	-0,008	0,119
hsa-miR-3605-5p	0,047	-0,079	0,008	-0,008	0,064
hsa-miR-3662	-0,061	0,070	-0,033	-0,008	0,069
hsa-miR-222	-0,041	0,077	-0,059	-0,008	0,074
hsa-miR-378c	0,006	-0,008	-0,020	-0,007	0,013
hsa-miR-3922-3p	-0,074	-0,066	0,119	-0,007	0,109
hsa-miR-3117-3p	-0,059	0,020	0,020	-0,006	0,046
hsa-miR-1234	-0,056	0,044	-0,007	-0,006	0,050
hsa-miR-548w	-0,073	-0,008	0,062	-0,006	0,068
hsa-miR-331-3p	0,011	-0,094	0,064	-0,006	0,080
hsa-miR-4764-5p	-0,021	-0,067	0,070	-0,006	0,070
hsa-miR-147	-0,030	0,035	-0,023	-0,006	0,036
hsa-miR-548h	-0,079	0,053	0,009	-0,006	0,068
hsa-miR-491-3p	0,084	0,022	-0,122	-0,006	0,106
hsa-miR-556-3p	0,057	-0,049	-0,024	-0,005	0,055
hsa-miR-1207-3p	0,067	-0,019	-0,063	-0,005	0,066
hsa-miR-548s	-0,065	-0,094	0,144	-0,005	0,130
hsa-miR-4663	-0,054	0,095	-0,055	-0,005	0,086
hsa-miR-452*	-0,105	0,008	0,083	-0,005	0,094
hsa-miR-155*	0,131	0,013	-0,157	-0,004	0,145
hsa-miR-4758-3p	0,014	0,012	-0,038	-0,004	0,030

Annexe 1: Supplementary Table S2 Primary screening data of DF-FunREG system.

hsa-miR-1910	0,083	0,063	-0,158	-0,004	0,134
hsa-miR-548y	-0,099	0,151	-0,064	-0,004	0,136
hsa-miR-2115*	-0,044	0,102	-0,069	-0,004	0,092
hsa-let-7f-1*	-0,040	-0,011	0,040	-0,004	0,041
hsa-miR-520g	-0,175	0,146	0,021	-0,003	0,161
hsa-miR-149	-0,005	0,048	-0,051	-0,003	0,050
hsa-miR-3972	-0,018	0,042	-0,030	-0,002	0,039
hsa-miR-1539	-0,026	0,028	-0,005	-0,001	0,027
hsa-miR-4662a-3p	0,031	-0,044	0,010	-0,001	0,038
hsa-miR-378	0,173	-0,150	-0,024	0,000	0,163
hsa-miR-4776-3p	0,041	0,112	-0,153	0,000	0,137
hsa-miR-3920	-0,032	-0,003	0,036	0,000	0,034
hsa-miR-718	-0,165	0,176	-0,009	0,001	0,171
hsa-miR-601	0,036	0,035	-0,068	0,001	0,059
hsa-miR-3148	-0,114	0,096	0,022	0,001	0,107
hsa-miR-4487	-0,139	0,129	0,014	0,001	0,134
hsa-miR-190b	-0,030	0,042	-0,008	0,001	0,037
hsa-miR-873	-0,024	-0,030	0,061	0,002	0,051
hsa-miR-4803	-0,025	-0,056	0,088	0,002	0,076
hsa-miR-383	-0,057	0,036	0,027	0,002	0,051
hsa-miR-493*	-0,092	0,059	0,040	0,002	0,082
hsa-miR-3977	0,006	0,030	-0,029	0,002	0,030
hsa-miR-4462	-0,095	-0,059	0,160	0,002	0,138
hsa-miR-4767	-0,029	0,209	-0,172	0,002	0,193
hsa-miR-380	0,040	0,009	-0,040	0,003	0,040
hsa-miR-4502	0,010	-0,037	0,038	0,004	0,038
hsa-miR-26a-1*	-0,032	-0,003	0,046	0,004	0,039
hsa-miR-4754	0,017	0,055	-0,060	0,004	0,059
hsa-miR-363	0,026	-0,029	0,015	0,004	0,029
hsa-miR-33a*	-0,067	-0,019	0,099	0,004	0,085
hsa-miR-514	0,025	-0,039	0,030	0,005	0,038
hsa-miR-1256	0,036	-0,038	0,019	0,005	0,039
hsa-miR-509-3-5p	0,139	-0,093	-0,029	0,006	0,119
hsa-miR-4733-5p	-0,044	0,066	-0,003	0,007	0,056
hsa-miR-4729	0,000	0,008	0,011	0,007	0,006
hsa-miR-4426	0,165	0,015	-0,159	0,007	0,162
hsa-miR-3619-3p	-0,020	0,048	-0,007	0,007	0,036
hsa-miR-1322	-0,038	0,011	0,049	0,007	0,044
hsa-miR-3651	0,007	-0,033	0,049	0,007	0,041
hsa-miR-3689d	-0,073	-0,055	0,154	0,009	0,126
hsa-miR-127-3p	-0,056	0,014	0,069	0,009	0,062
hsa-miR-770-5p	0,022	-0,110	0,117	0,010	0,114
hsa-miR-1271	-0,019	-0,022	0,072	0,010	0,053
hsa-miR-555	0,079	-0,032	-0,015	0,010	0,060
hsa-miR-3684	0,045	0,062	-0,074	0,011	0,074
hsa-miR-1224-3p	0,062	0,046	-0,073	0,012	0,074
hsa-miR-3176	0,026	-0,053	0,064	0,012	0,059
hsa-miR-548c-3p	-0,255	0,113	0,179	0,012	0,234
hsa-miR-346	-0,005	0,107	-0,065	0,012	0,087
hsa-miR-26b	-0,027	0,003	0,062	0,013	0,045
hsa-miR-518f*	-0,054	0,066	0,026	0,013	0,061
hsa-miR-4745-5p	-0,024	-0,034	0,097	0,013	0,073
hsa-miR-3944-3p	0,420	-0,180	-0,200	0,013	0,353
hsa-miR-3692*	0,007	0,009	0,025	0,014	0,010
hsa-miR-4278	0,309	-0,165	-0,103	0,014	0,257
hsa-miR-32	-0,094	0,099	0,037	0,014	0,099
hsa-miR-497	0,013	0,102	-0,071	0,014	0,087
hsa-miR-3667-3p	-0,042	0,133	-0,047	0,014	0,103
hsa-miR-324-3p	0,038	0,065	-0,059	0,015	0,065
hsa-miR-3612	-0,098	0,109	0,036	0,016	0,105
hsa-miR-1260	0,089	0,095	-0,137	0,016	0,132
hsa-miR-548q	-0,022	0,082	-0,012	0,016	0,057
hsa-miR-4509	0,095	-0,127	0,081	0,016	0,124
hsa-miR-3202	-0,102	0,034	0,120	0,017	0,112
hsa-miR-4653-3p	-0,072	-0,012	0,137	0,017	0,108
hsa-miR-525-3p	0,063	0,044	-0,052	0,018	0,062
hsa-miR-3173-3p	-0,185	-0,021	0,261	0,019	0,226
hsa-miR-514b-5p	0,067	-0,125	0,113	0,019	0,126
hsa-miR-215	-0,008	0,047	0,019	0,019	0,027
hsa-miR-3681	0,000	-0,036	0,092	0,019	0,066

Annexe 1: Supplementary Table S2 Primary screening data of DF-FunREG system.

hsa-miR-182	-0,028	0,140	-0,054	0,019	0,105
hsa-miR-4677-3p	-0,046	0,058	0,047	0,020	0,057
hsa-miR-187	-0,040	-0,050	0,150	0,020	0,113
hsa-miR-1273e	-0,015	0,175	-0,101	0,020	0,141
hsa-miR-518e	-0,069	0,014	0,115	0,020	0,092
hsa-miR-3192	0,046	-0,047	0,064	0,021	0,060
hsa-miR-4787-3p	-0,069	0,048	0,084	0,021	0,080
hsa-miR-500a*	-0,022	0,081	0,004	0,021	0,054
hsa-miR-3199	0,094	0,023	-0,052	0,022	0,073
hsa-miR-4494	-0,084	0,169	-0,019	0,022	0,131
hsa-miR-1915*	-0,068	0,068	0,066	0,022	0,078
hsa-miR-4739	-0,084	-0,069	0,220	0,022	0,171
hsa-miR-1197	0,183	-0,118	0,002	0,022	0,152
hsa-miR-3944-5p	-0,022	0,085	0,005	0,023	0,056
hsa-miR-548g	-0,105	0,144	0,029	0,023	0,125
hsa-miR-217	-0,119	0,143	0,046	0,023	0,132
hsa-miR-645	0,045	0,102	-0,077	0,023	0,092
hsa-miR-671-5p	0,155	-0,084	0,000	0,024	0,121
hsa-miR-3132	-0,232	0,158	0,145	0,024	0,221
hsa-miR-4715-5p	0,125	0,038	-0,091	0,024	0,109
hsa-miR-485-5p	0,036	-0,066	0,103	0,024	0,085
hsa-miR-132*	-0,008	0,080	0,001	0,024	0,048
hsa-miR-1183	0,041	0,014	0,018	0,025	0,014
hsa-miR-3064-3p	0,083	0,224	-0,233	0,025	0,234
hsa-miR-4743	0,006	0,064	0,004	0,025	0,034
hsa-miR-4768-3p	0,025	0,173	-0,123	0,025	0,148
hsa-miR-15b	0,052	0,000	0,024	0,025	0,026
hsa-miR-3978	0,132	-0,046	-0,011	0,025	0,094
hsa-miR-421	0,110	-0,061	0,027	0,025	0,086
hsa-miR-558	0,006	0,034	0,037	0,025	0,017
hsa-miR-3194-3p	-0,090	-0,060	0,227	0,026	0,175
hsa-miR-548v	0,186	0,067	-0,174	0,026	0,183
hsa-miR-2053	-0,098	0,034	0,145	0,027	0,122
hsa-miR-3686	0,007	0,067	0,007	0,027	0,034
hsa-miR-140-3p	0,017	0,015	0,050	0,027	0,020
hsa-miR-320d	-0,009	0,082	0,009	0,027	0,048
hsa-miR-3673	0,046	-0,036	0,072	0,027	0,056
hsa-miR-127-5p	0,361	0,016	-0,294	0,028	0,327
hsa-miR-211	-0,030	-0,103	0,217	0,028	0,168
hsa-miR-24-2*	0,004	0,259	-0,178	0,028	0,219
hsa-miR-3158-3p	0,048	0,083	-0,046	0,028	0,067
hsa-miR-659	-0,026	0,008	0,104	0,029	0,067
hsa-miR-365*	0,082	0,069	-0,063	0,029	0,080
hsa-miR-3682-3p	0,235	-0,058	-0,090	0,029	0,179
hsa-miR-519a	0,079	0,041	-0,032	0,029	0,056
hsa-miR-135b*	-0,142	-0,038	0,269	0,029	0,213
hsa-miR-3660	-0,015	0,053	0,051	0,030	0,039
hsa-miR-219-5p	-0,102	0,016	0,175	0,030	0,139
hsa-miR-371b-5p	0,059	0,052	-0,020	0,030	0,044
hsa-miR-4666-5p	0,003	0,079	0,010	0,031	0,042
hsa-miR-3152-3p	0,058	0,179	-0,144	0,031	0,163
hsa-miR-374a*	0,101	0,008	-0,015	0,031	0,061
hsa-miR-377	0,037	0,071	-0,013	0,032	0,042
hsa-miR-486-5p	0,018	-0,009	0,088	0,032	0,050
hsa-miR-105	0,059	0,042	-0,005	0,032	0,033
hsa-miR-371b-3p	0,054	0,026	0,016	0,032	0,020
hsa-miR-490-3p	0,018	0,044	0,036	0,033	0,013
hsa-miR-4435	0,028	0,100	-0,029	0,033	0,065
hsa-miR-3175	0,125	-0,073	0,046	0,033	0,100
hsa-miR-3654	0,144	-0,018	-0,026	0,033	0,095
hsa-miR-592	0,223	-0,097	-0,026	0,033	0,168
hsa-miR-3687	-0,013	0,145	-0,030	0,034	0,097
hsa-miR-216a	-0,045	0,028	0,121	0,035	0,083
hsa-miR-4724-3p	0,064	-0,024	0,065	0,035	0,051
hsa-miR-4713-5p	0,197	-0,078	-0,014	0,035	0,144
hsa-miR-4306	-0,027	0,038	0,095	0,035	0,061
hsa-miR-130b*	0,010	0,073	0,025	0,036	0,033
hsa-miR-125b-1*	0,001	0,051	0,056	0,036	0,031
hsa-miR-3162-5p	0,078	0,013	0,018	0,036	0,036
hsa-miR-655	-0,010	0,092	0,028	0,037	0,052

Annexe 1: Supplementary Table S2 Primary screening data of DF-FunREG system.

hsa-miR-182*	-0,001	0,082	0,029	0,037	0,042
hsa-miR-3149	0,009	0,094	0,007	0,037	0,050
hsa-miR-514b-3p	0,026	0,023	0,062	0,037	0,022
hsa-miR-199a-5p	0,089	0,002	0,021	0,037	0,046
hsa-miR-4726-5p	0,089	0,108	-0,081	0,039	0,104
hsa-miR-3156-3p	-0,036	0,034	0,118	0,039	0,077
hsa-miR-194*	-0,029	0,136	0,012	0,040	0,086
hsa-miR-891a	-0,139	0,243	0,014	0,040	0,192
hsa-miR-1303	0,108	-0,054	0,066	0,040	0,084
hsa-miR-595	0,070	0,021	0,029	0,040	0,026
hsa-miR-4644	0,047	0,077	-0,004	0,040	0,041
hsa-miR-3121-5p	-0,075	0,191	0,006	0,041	0,136
hsa-miR-4525	0,159	-0,016	-0,019	0,041	0,102
hsa-miR-3692	0,057	0,007	0,060	0,041	0,030
hsa-miR-373	-0,002	0,075	0,053	0,042	0,039
hsa-miR-4438	-0,082	0,024	0,186	0,042	0,135
hsa-miR-134	0,020	-0,005	0,113	0,043	0,062
hsa-miR-3691-5p	0,125	-0,169	0,173	0,043	0,186
hsa-miR-3657	-0,097	0,164	0,063	0,043	0,132
hsa-miR-1321	0,143	0,164	-0,177	0,043	0,191
hsa-miR-4274	0,035	-0,086	0,182	0,044	0,134
hsa-miR-3622b-3p	-0,068	0,080	0,119	0,044	0,098
hsa-miR-4720-5p	-0,037	0,002	0,166	0,044	0,108
hsa-miR-4707-3p	-0,025	-0,001	0,158	0,044	0,100
hsa-miR-4789-3p	0,157	-0,135	0,110	0,044	0,157
hsa-miR-628-3p	0,016	-0,072	0,188	0,044	0,132
hsa-miR-219-2-3p	-0,063	0,033	0,162	0,044	0,113
hsa-miR-301a	-0,034	0,054	0,112	0,044	0,074
hsa-miR-29c*	-0,036	0,086	0,085	0,045	0,070
hsa-miR-1248	0,116	0,066	-0,048	0,045	0,084
hsa-miR-646	0,086	0,018	0,032	0,045	0,036
hsa-miR-129*	-0,107	0,148	0,095	0,045	0,134
hsa-miR-4659b-5p	-0,060	0,132	0,063	0,045	0,097
hsa-miR-4496	0,099	0,075	-0,037	0,046	0,072
hsa-miR-299-3p	-0,207	0,309	0,035	0,046	0,258
hsa-miR-1283	0,038	0,063	0,036	0,046	0,015
hsa-miR-4795-5p	-0,070	0,053	0,155	0,046	0,113
hsa-miR-1292	-0,042	0,190	-0,010	0,046	0,126
hsa-miR-494	0,032	0,118	-0,010	0,046	0,065
hsa-miR-4452	0,014	0,053	0,074	0,047	0,030
hsa-miR-890	-0,071	0,148	0,064	0,047	0,110
hsa-miR-10b	0,107	0,017	0,018	0,048	0,052
hsa-miR-508-3p	0,097	-0,027	0,074	0,048	0,066
hsa-miR-3150b-3p	0,051	0,069	0,025	0,048	0,022
hsa-miR-611	0,154	0,023	-0,030	0,049	0,095
hsa-miR-181b	0,051	0,037	0,059	0,049	0,011
hsa-miR-3666	-0,152	0,008	0,292	0,049	0,225
hsa-miR-4418	0,370	-0,170	-0,049	0,050	0,284
hsa-miR-944	-0,042	0,010	0,184	0,051	0,118
hsa-miR-153	0,065	0,011	0,076	0,051	0,035
hsa-miR-4520a-3p	0,253	-0,026	-0,075	0,051	0,177
hsa-miR-767-3p	0,063	-0,005	0,094	0,051	0,050
hsa-miR-4636	-0,053	0,056	0,150	0,051	0,102
hsa-miR-20b*	-0,017	0,077	0,094	0,051	0,060
hsa-miR-3655	-0,056	0,170	0,040	0,051	0,113
hsa-miR-4257	0,038	-0,059	0,175	0,051	0,117
hsa-miR-548ak	-0,009	0,098	0,065	0,051	0,055
hsa-miR-450b-5p	0,008	0,098	0,049	0,051	0,045
hsa-miR-4289	0,218	-0,189	0,126	0,052	0,213
hsa-miR-151-3p	-0,024	0,079	0,100	0,052	0,066
hsa-miR-4646-5p	0,242	-0,063	-0,022	0,052	0,166
hsa-miR-1323	0,193	-0,040	0,003	0,052	0,124
hsa-miR-219-1-3p	0,107	0,051	0,000	0,052	0,054
hsa-miR-3151	0,123	0,003	0,033	0,053	0,063
hsa-miR-4758-5p	-0,004	0,153	0,013	0,054	0,086
hsa-miR-675*	0,023	0,042	0,098	0,054	0,039
hsa-miR-1290	0,235	-0,313	0,241	0,054	0,318
hsa-miR-4716-5p	0,214	0,043	-0,093	0,055	0,154
hsa-miR-517b	-0,029	0,066	0,127	0,055	0,079
hsa-miR-656	0,175	-0,085	0,075	0,055	0,131

Annexe 1: Supplementary Table S2 Primary screening data of DF-FunREG system.

hsa-miR-568	0,213	-0,042	-0,004	0,055	0,137
hsa-miR-3127-3p	-0,027	0,195	-0,001	0,056	0,121
hsa-miR-4539	0,122	-0,006	0,052	0,056	0,064
hsa-miR-4449	-0,006	-0,001	0,174	0,056	0,103
hsa-miR-921	0,028	-0,030	0,170	0,056	0,103
hsa-miR-3147	0,095	-0,006	0,079	0,056	0,054
hsa-miR-92a-2*	0,054	0,084	0,034	0,057	0,025
hsa-miR-651	-0,018	0,160	0,030	0,057	0,092
hsa-miR-4769-5p	-0,021	0,121	0,072	0,057	0,072
hsa-miR-593*	0,021	0,084	0,068	0,058	0,033
hsa-miR-4711-5p	0,658	-0,326	-0,159	0,058	0,527
hsa-miR-4647	0,101	0,017	0,055	0,058	0,042
hsa-miR-4667-3p	0,048	0,083	0,042	0,058	0,022
hsa-miR-1184	-0,005	0,092	0,087	0,058	0,055
hsa-miR-138-2*	0,045	0,150	-0,018	0,059	0,085
hsa-miR-520a-5p	0,102	0,077	-0,002	0,059	0,054
hsa-miR-670	0,021	0,114	0,042	0,059	0,048
hsa-miR-30b	0,121	0,075	-0,018	0,059	0,071
hsa-miR-582-5p	-0,002	0,064	0,116	0,059	0,059
hsa-miR-4757-3p	0,073	0,142	-0,037	0,059	0,090
hsa-miR-1275	0,060	0,166	-0,046	0,060	0,106
hsa-miR-4778-5p	0,088	-0,086	0,179	0,060	0,135
hsa-miR-3667-5p	0,031	0,077	0,072	0,060	0,025
hsa-miR-3927	-0,128	0,222	0,087	0,060	0,176
hsa-miR-367*	0,235	0,041	-0,095	0,060	0,166
hsa-miR-31	0,085	0,028	0,069	0,060	0,030
hsa-miR-1287	0,009	0,003	0,170	0,060	0,095
hsa-miR-3191	0,126	0,146	-0,087	0,061	0,129
hsa-miR-1272	0,085	0,142	-0,042	0,062	0,094
hsa-miR-4723-3p	0,049	0,090	0,046	0,062	0,025
hsa-miR-4704-5p	0,028	0,187	-0,030	0,062	0,113
hsa-miR-4482	0,006	0,147	0,033	0,062	0,075
hsa-miR-1973	0,025	0,002	0,160	0,063	0,086
hsa-miR-632	0,111	0,129	-0,052	0,063	0,100
hsa-miR-4680-3p	0,101	0,153	-0,065	0,063	0,114
hsa-miR-202	0,035	0,164	-0,008	0,063	0,089
hsa-miR-320c	0,089	0,040	0,062	0,064	0,025
hsa-miR-299-5p	0,036	0,082	0,075	0,064	0,025
hsa-miR-181a*	-0,064	0,060	0,198	0,065	0,131
hsa-miR-539	-0,055	0,072	0,176	0,065	0,116
hsa-miR-26a	0,077	0,076	0,044	0,066	0,019
hsa-miR-128	0,038	0,014	0,144	0,066	0,069
hsa-miR-130b	0,042	0,067	0,088	0,066	0,023
hsa-miR-545	0,015	0,119	0,062	0,066	0,052
hsa-miR-4526	0,112	0,095	-0,009	0,066	0,066
hsa-miR-34c-3p	0,128	-0,079	0,149	0,066	0,126
hsa-miR-1228	0,048	0,098	0,052	0,066	0,027
hsa-miR-4477a	0,013	0,128	0,058	0,066	0,058
hsa-miR-516b	0,118	0,063	0,018	0,066	0,050
hsa-miR-1273f	0,136	0,045	0,018	0,066	0,061
hsa-miR-519c-5p // hsa-miR-519b-5p // hsa-miR-523* // hsa-miR-518e* // hsa-miR-522* // hsa-miR-519a*	0,027	0,056	0,116	0,066	0,045
hsa-miR-188-3p	0,158	0,007	0,036	0,067	0,080
hsa-miR-3620	0,249	0,027	-0,075	0,067	0,165
hsa-miR-4327	0,039	0,134	0,029	0,067	0,058
hsa-miR-101	0,162	0,114	-0,073	0,068	0,124
hsa-miR-4655-5p	0,046	0,122	0,034	0,068	0,048
hsa-miR-1202	0,107	0,154	-0,058	0,068	0,111
hsa-miR-1909	0,075	0,003	0,125	0,068	0,061
hsa-miR-548aj	-0,092	0,275	0,022	0,068	0,188
hsa-miR-589	-0,007	0,025	0,187	0,068	0,104
hsa-miR-337-3p	-0,040	0,146	0,100	0,069	0,097
hsa-miR-181a	0,055	0,077	0,073	0,069	0,012
hsa-miR-1200	0,137	0,050	0,020	0,069	0,061
hsa-miR-196b*	0,072	0,080	0,057	0,070	0,012
hsa-miR-141*	0,177	0,100	-0,067	0,070	0,125
hsa-miR-3679-5p	0,095	0,100	0,016	0,070	0,047

Annexe 1: Supplementary Table S2 Primary screening data of DF-FunREG system.

hsa-miR-4439	0,110	0,059	0,043	0,071	0,035
hsa-miR-96	0,212	0,009	-0,009	0,071	0,123
hsa-miR-4701-3p	0,065	0,082	0,065	0,071	0,010
hsa-miR-620	0,058	0,076	0,079	0,071	0,012
hsa-miR-198	-0,038	0,048	0,205	0,071	0,123
hsa-miR-4537	0,233	0,050	-0,068	0,071	0,152
hsa-miR-876-5p	0,125	0,068	0,022	0,071	0,052
hsa-miR-19a	-0,085	0,094	0,205	0,072	0,146
hsa-miR-4731-5p	0,121	-0,015	0,108	0,072	0,075
hsa-miR-499-3p	0,083	-0,063	0,196	0,072	0,130
hsa-miR-526a // hsa-miR-520c-5p // hsa-miR-518d-5p	0,145	0,089	-0,017	0,072	0,082
hsa-miR-331-5p	0,131	0,054	0,035	0,073	0,051
hsa-miR-135a*	-0,053	0,137	0,138	0,074	0,110
hsa-miR-548o	-0,011	0,103	0,131	0,074	0,075
hsa-miR-4749-3p	0,116	0,019	0,088	0,074	0,050
hsa-miR-4645-5p	0,085	0,115	0,024	0,074	0,047
hsa-miR-3646	0,307	0,098	-0,181	0,075	0,245
hsa-miR-614	0,157	0,020	0,047	0,075	0,072
hsa-miR-542-3p	0,261	0,034	-0,070	0,075	0,170
hsa-miR-3130-5p	0,130	0,076	0,019	0,075	0,056
hsa-miR-3913-5p	-0,023	-0,088	0,337	0,075	0,229
hsa-miR-4638-3p	0,063	-0,036	0,199	0,075	0,118
hsa-miR-371-5p	0,027	-0,026	0,225	0,076	0,132
hsa-miR-125a-3p	0,111	-0,055	0,172	0,076	0,117
hsa-miR-375	0,136	0,028	0,064	0,076	0,055
hsa-miR-4432	0,045	-0,003	0,187	0,076	0,099
hsa-miR-4665-3p	0,165	0,074	-0,010	0,077	0,087
hsa-miR-2114*	0,058	0,183	-0,011	0,077	0,098
hsa-miR-4256	-0,004	-0,050	0,286	0,077	0,182
hsa-miR-4514	0,109	0,127	-0,004	0,077	0,071
hsa-miR-548p	-0,024	0,233	0,024	0,078	0,137
hsa-miR-4445	0,086	0,024	0,122	0,078	0,049
hsa-miR-3189-3p	0,174	-0,016	0,076	0,078	0,095
hsa-miR-4645-3p	0,186	0,031	0,017	0,078	0,093
hsa-miR-4521	0,034	0,000	0,201	0,078	0,108
hsa-miR-3677-5p	-0,022	0,153	0,104	0,078	0,090
hsa-miR-607	0,027	0,093	0,116	0,078	0,046
hsa-miR-544	0,198	0,048	-0,011	0,078	0,108
hsa-miR-3183	0,145	0,179	-0,086	0,080	0,144
hsa-miR-3606	0,086	0,014	0,140	0,080	0,063
hsa-miR-548j	-0,002	0,227	0,015	0,080	0,128
hsa-miR-4760-3p	0,043	0,080	0,118	0,080	0,037
hsa-miR-146a*	0,105	0,103	0,033	0,081	0,041
hsa-miR-629*	0,095	0,127	0,020	0,081	0,055
hsa-miR-200c	0,089	0,066	0,087	0,081	0,013
hsa-miR-4321	0,165	0,052	0,026	0,081	0,074
hsa-miR-3170	0,304	-0,021	-0,041	0,081	0,193
hsa-miR-551b	0,174	-0,012	0,084	0,082	0,093
hsa-miR-2964a-3p	0,032	-0,018	0,234	0,083	0,134
hsa-miR-4798-3p	0,055	-0,026	0,222	0,083	0,127
hsa-miR-370	0,117	0,104	0,029	0,084	0,048
hsa-miR-422a	0,218	0,019	0,014	0,084	0,116
hsa-miR-3910	0,088	0,086	0,076	0,084	0,006
hsa-miR-301b	0,108	0,000	0,144	0,084	0,075
hsa-miR-4748	0,091	0,117	0,046	0,084	0,036
hsa-miR-519e	0,068	0,111	0,074	0,084	0,023
hsa-miR-543	0,061	-0,006	0,200	0,085	0,105
hsa-miR-4313	0,037	0,181	0,038	0,085	0,083
hsa-miR-3945	0,083	0,020	0,153	0,085	0,067
hsa-miR-208a	0,150	0,056	0,050	0,085	0,056
hsa-miR-4329	-0,020	0,131	0,147	0,086	0,092
hsa-miR-1263	0,066	0,176	0,016	0,086	0,082
hsa-miR-99a*	0,017	0,170	0,073	0,086	0,077
hsa-miR-30a*	-0,052	0,170	0,141	0,086	0,121
hsa-miR-631	0,092	0,217	-0,048	0,087	0,133
hsa-miR-188-5p	-0,104	0,145	0,221	0,087	0,170
hsa-miR-2861	0,001	0,063	0,200	0,088	0,102
hsa-miR-3621	0,256	-0,025	0,034	0,088	0,148

Annexe 1: Supplementary Table S2 Primary screening data of DF-FunREG system.

hsa-miR-4697-3p	-0,013	0,035	0,244	0,089	0,136
hsa-miR-4667-5p	-0,029	0,129	0,167	0,089	0,104
hsa-miR-1246	0,079	0,050	0,137	0,089	0,044
hsa-miR-3680*	0,141	0,090	0,037	0,089	0,052
hsa-miR-92b*	0,060	0,129	0,079	0,089	0,035
hsa-miR-3914	0,018	0,050	0,201	0,090	0,098
hsa-miR-186	0,006	0,072	0,191	0,090	0,094
hsa-miR-345	-0,033	0,041	0,262	0,090	0,153
hsa-miR-338-3p	0,162	-0,021	0,131	0,091	0,098
hsa-miR-4798-5p	0,073	0,159	0,040	0,091	0,061
hsa-miR-502-3p	0,160	0,166	-0,054	0,091	0,125
hsa-let-7a*	0,046	0,182	0,046	0,091	0,079
hsa-miR-4701-5p	0,145	0,020	0,108	0,091	0,064
hsa-miR-1250	0,116	0,071	0,087	0,091	0,023
hsa-miR-1244	-0,016	0,128	0,163	0,092	0,095
hsa-miR-4642	0,070	0,169	0,036	0,092	0,069
hsa-miR-4268	0,031	0,135	0,108	0,092	0,054
hsa-miR-197	0,086	0,107	0,083	0,092	0,013
hsa-miR-3676	0,250	0,029	-0,003	0,092	0,138
hsa-miR-4691-3p	0,156	0,140	-0,020	0,092	0,097
hsa-miR-3074-5p	0,110	0,046	0,122	0,092	0,041
hsa-miR-524-5p	0,145	0,127	0,006	0,092	0,076
hsa-miR-4770	0,103	0,153	0,022	0,093	0,066
hsa-miR-3649	0,158	0,120	0,001	0,093	0,082
hsa-miR-4717-5p	0,173	0,041	0,064	0,093	0,070
hsa-miR-22*	0,110	0,150	0,019	0,093	0,067
hsa-miR-4637	0,006	0,104	0,171	0,093	0,083
hsa-miR-2276	0,027	0,188	0,066	0,094	0,084
hsa-miR-216b	-0,005	0,116	0,172	0,094	0,090
hsa-miR-18a*	0,092	0,094	0,099	0,095	0,004
hsa-miR-653	0,220	0,060	0,004	0,095	0,112
hsa-miR-499-5p	0,028	0,047	0,211	0,095	0,100
hsa-miR-4668-3p	0,038	-0,024	0,273	0,096	0,157
hsa-miR-342-3p	0,149	0,043	0,095	0,096	0,053
hsa-miR-520a-3p	0,102	0,131	0,054	0,096	0,039
hsa-miR-3124-5p	0,051	0,117	0,120	0,096	0,039
hsa-miR-4270	0,259	0,040	-0,010	0,096	0,143
hsa-miR-4761-3p	0,003	0,157	0,128	0,096	0,082
hsa-miR-4753-5p	0,009	0,150	0,131	0,097	0,076
hsa-miR-378*	0,074	0,100	0,116	0,097	0,022
hsa-miR-4662b	-0,003	0,114	0,181	0,097	0,093
hsa-miR-155	0,026	0,009	0,256	0,097	0,138
hsa-miR-3943	0,119	0,124	0,049	0,097	0,042
hsa-miR-618	0,071	-0,069	0,292	0,098	0,182
hsa-miR-3691-3p	0,119	0,050	0,126	0,098	0,042
hsa-miR-599	0,102	0,013	0,180	0,098	0,083
hsa-miR-518d-3p	0,045	0,148	0,101	0,098	0,052
hsa-miR-4686	0,116	0,063	0,116	0,099	0,030
hsa-miR-374a	0,147	0,061	0,088	0,099	0,044
hsa-miR-504	0,169	0,062	0,066	0,099	0,060
hsa-miR-3976	0,033	0,145	0,120	0,099	0,059
hsa-miR-4255	0,127	0,057	0,114	0,099	0,037
hsa-miR-586	0,096	0,088	0,114	0,099	0,013
hsa-miR-329	0,017	0,174	0,108	0,100	0,079
hsa-miR-4691-5p	0,105	0,088	0,106	0,100	0,010
hsa-miR-19b	0,055	0,089	0,156	0,100	0,052
hsa-miR-4753-3p	0,104	0,136	0,061	0,100	0,037
hsa-miR-3678-3p	0,109	0,060	0,132	0,100	0,037
hsa-miR-609	0,058	-0,055	0,299	0,101	0,181
hsa-miR-874	0,101	0,033	0,168	0,101	0,068
hsa-miR-1468	0,068	0,097	0,137	0,101	0,035
hsa-miR-4471	0,057	0,011	0,236	0,101	0,119
hsa-miR-892a	0,155	0,010	0,139	0,101	0,080
hsa-miR-3664-3p	0,231	0,003	0,070	0,101	0,117
hsa-miR-4802-3p	0,296	0,013	-0,005	0,101	0,168
hsa-miR-4312	0,262	0,069	-0,026	0,102	0,147
hsa-miR-4795-3p	0,113	0,215	-0,023	0,102	0,119
hsa-miR-3668	0,239	0,041	0,025	0,102	0,119
hsa-miR-493	0,354	0,071	-0,119	0,102	0,238
hsa-miR-103a-2*	0,106	0,176	0,024	0,102	0,076

Annexe 1: Supplementary Table S2 Primary screening data of DF-FunREG system.

hsa-miR-4437	0,079	0,231	-0,003	0,102	0,118
hsa-miR-548b-5p	0,108	0,030	0,169	0,102	0,070
hsa-miR-938	0,077	0,141	0,089	0,102	0,034
hsa-miR-518b	0,086	0,074	0,148	0,103	0,039
hsa-miR-933	0,112	0,029	0,167	0,103	0,069
hsa-miR-550a	0,142	0,139	0,030	0,103	0,064
hsa-miR-4706	0,204	-0,064	0,170	0,104	0,146
hsa-miR-4517	0,153	0,101	0,057	0,104	0,048
hsa-miR-3136-3p	0,102	0,117	0,093	0,104	0,012
hsa-miR-4528	0,056	0,075	0,183	0,104	0,069
hsa-miR-148a*	0,026	0,144	0,144	0,105	0,068
hsa-miR-4703-3p	0,082	0,162	0,070	0,105	0,050
hsa-miR-25	0,064	0,078	0,173	0,105	0,059
hsa-miR-451b	0,217	0,028	0,073	0,106	0,098
hsa-miR-4448	0,036	0,110	0,173	0,106	0,069
hsa-miR-3157-3p	0,226	-0,036	0,129	0,106	0,133
hsa-miR-130a	0,096	0,056	0,167	0,106	0,056
hsa-miR-183	0,198	-0,011	0,133	0,106	0,107
hsa-miR-1914	0,060	0,099	0,162	0,107	0,051
hsa-miR-143*	0,290	0,048	-0,018	0,107	0,162
hsa-miR-4777-3p	0,400	0,147	-0,226	0,107	0,315
hsa-miR-4441	0,147	0,140	0,034	0,107	0,063
hsa-miR-4423-3p	-0,010	-0,085	0,416	0,107	0,270
hsa-miR-302b*	0,097	0,125	0,100	0,107	0,016
hsa-miR-151b	0,122	0,098	0,102	0,107	0,013
hsa-miR-515-5p	0,224	0,029	0,070	0,108	0,103
hsa-miR-557	0,076	0,163	0,085	0,108	0,048
hsa-miR-221	0,067	0,081	0,177	0,108	0,060
hsa-miR-4735-3p	0,113	0,027	0,185	0,109	0,079
hsa-miR-515-3p	0,122	0,000	0,205	0,109	0,103
hsa-miR-559	0,113	0,160	0,054	0,109	0,053
hsa-miR-191	0,209	-0,021	0,140	0,109	0,118
hsa-miR-300	0,077	0,113	0,141	0,111	0,032
hsa-miR-571	0,104	0,133	0,096	0,111	0,020
hsa-miR-3129-3p	0,075	0,146	0,111	0,111	0,035
hsa-miR-1291	0,156	0,095	0,082	0,111	0,039
hsa-miR-302b	0,079	0,105	0,149	0,111	0,036
hsa-miR-3672	-0,017	0,137	0,213	0,111	0,117
hsa-miR-4791	0,050	0,064	0,219	0,111	0,094
hsa-miR-4769-3p	0,105	0,118	0,112	0,112	0,006
hsa-miR-452	-0,009	0,198	0,147	0,112	0,108
hsa-miR-26b*	0,007	0,079	0,249	0,112	0,124
hsa-miR-4657	0,203	0,062	0,072	0,112	0,079
hsa-miR-4661-5p	0,159	0,119	0,062	0,113	0,048
hsa-miR-767-5p	0,173	0,116	0,051	0,113	0,061
hsa-miR-769-5p	0,142	0,013	0,185	0,113	0,090
hsa-miR-3675-5p	0,019	0,093	0,229	0,114	0,106
hsa-miR-4722-5p	0,083	0,094	0,165	0,114	0,044
hsa-miR-1224-5p	0,122	0,122	0,100	0,115	0,013
hsa-miR-142-5p	0,015	0,081	0,248	0,115	0,120
hsa-miR-4258	0,154	0,180	0,010	0,115	0,092
hsa-miR-663	0,032	0,173	0,140	0,115	0,074
hsa-miR-519c-3p	0,136	0,060	0,150	0,115	0,048
hsa-miR-29b	0,167	0,241	-0,062	0,115	0,158
hsa-miR-3180-5p	0,096	0,106	0,147	0,116	0,027
hsa-miR-106b*	0,098	0,054	0,197	0,116	0,073
hsa-miR-520b	0,123	0,051	0,176	0,117	0,063
hsa-miR-500a	0,168	0,119	0,064	0,117	0,052
hsa-miR-3197	0,197	0,061	0,093	0,117	0,071
hsa-miR-450a	0,171	0,153	0,027	0,117	0,078
hsa-miR-4744	0,101	0,076	0,175	0,117	0,051
hsa-miR-1185	0,161	0,077	0,115	0,118	0,042
hsa-miR-4478	0,117	0,085	0,152	0,118	0,033
hsa-miR-4677-5p	0,425	0,002	-0,073	0,118	0,268
hsa-miR-3690	0,101	0,108	0,145	0,118	0,024
hsa-miR-29b-1*	0,006	0,128	0,221	0,118	0,108
hsa-miR-218-1*	0,087	0,144	0,124	0,118	0,029
hsa-miR-362-3p	0,106	0,156	0,094	0,119	0,033
hsa-miR-432	0,124	0,124	0,110	0,119	0,008
hsa-miR-376b	0,072	0,147	0,141	0,120	0,041

Annexe 1: Supplementary Table S2 Primary screening data of DF-FunREG system.

hsa-miR-4633-3p	0,146	0,124	0,092	0,120	0,027
hsa-miR-512-3p	0,094	0,192	0,075	0,120	0,063
hsa-miR-934	-0,012	0,067	0,308	0,121	0,166
hsa-miR-939	0,054	0,039	0,270	0,121	0,129
hsa-miR-5481	0,038	0,141	0,185	0,122	0,075
hsa-miR-3154	0,086	0,087	0,193	0,122	0,062
hsa-miR-3652	0,168	0,095	0,105	0,122	0,040
hsa-miR-606	0,138	0,142	0,088	0,122	0,030
hsa-miR-708*	0,037	0,082	0,249	0,123	0,112
hsa-miR-3614-5p	0,206	0,227	-0,064	0,123	0,162
hsa-miR-3150a-5p	0,136	0,049	0,184	0,123	0,069
hsa-miR-4740-5p	0,162	0,117	0,091	0,123	0,036
hsa-miR-10a	0,163	0,106	0,103	0,124	0,034
hsa-miR-937	0,126	0,160	0,085	0,124	0,038
hsa-miR-181a-2*	0,142	0,165	0,065	0,124	0,053
hsa-miR-365	0,236	0,113	0,023	0,124	0,107
hsa-miR-3942-5p	0,087	0,060	0,226	0,124	0,089
hsa-miR-563	0,117	0,121	0,136	0,125	0,010
hsa-miR-548ai	0,058	0,150	0,166	0,125	0,059
hsa-miR-2355-5p	0,089	0,092	0,193	0,125	0,059
hsa-miR-302a	0,165	0,050	0,160	0,125	0,065
hsa-miR-4757-5p	0,154	0,160	0,061	0,125	0,056
hsa-miR-2277-3p	0,052	0,031	0,292	0,125	0,145
hsa-miR-4506	0,348	0,005	0,023	0,125	0,193
hsa-miR-551b*	0,087	0,123	0,167	0,126	0,040
hsa-miR-488	0,203	0,083	0,091	0,126	0,067
hsa-miR-1304	0,007	0,332	0,039	0,126	0,179
hsa-miR-4420	0,028	0,275	0,075	0,126	0,131
hsa-miR-548f	0,095	0,070	0,214	0,126	0,077
hsa-miR-4534	0,138	0,057	0,185	0,127	0,065
hsa-miR-4651	0,210	0,135	0,035	0,127	0,088
hsa-miR-561	0,082	0,267	0,031	0,127	0,124
hsa-miR-138-1*	0,171	0,156	0,055	0,127	0,063
hsa-miR-27b*	0,120	0,104	0,160	0,128	0,029
hsa-miR-2682*	0,090	0,212	0,081	0,128	0,073
hsa-miR-454*	0,022	0,163	0,200	0,128	0,094
hsa-miR-3613-3p	0,132	0,150	0,104	0,129	0,023
hsa-miR-302d	0,131	0,088	0,167	0,129	0,039
hsa-miR-4314	0,067	0,093	0,228	0,129	0,087
hsa-miR-604	0,038	0,175	0,176	0,129	0,080
hsa-miR-1306	0,248	0,018	0,123	0,130	0,115
hsa-miR-4762-5p	0,284	0,025	0,080	0,130	0,136
hsa-miR-4446-3p	0,123	0,181	0,087	0,130	0,048
hsa-miR-4633-5p	0,051	0,210	0,131	0,130	0,079
hsa-miR-1273d	0,028	0,199	0,164	0,130	0,090
hsa-miR-320a	0,160	0,168	0,064	0,130	0,058
hsa-miR-32*	0,037	0,187	0,168	0,130	0,081
hsa-miR-24-1*	0,176	0,200	0,016	0,131	0,100
hsa-miR-4693-3p	0,136	0,101	0,155	0,131	0,027
hsa-miR-4792	0,174	0,103	0,116	0,131	0,038
hsa-miR-4716-3p	0,145	0,042	0,206	0,131	0,083
hsa-miR-1255b	0,420	0,034	-0,059	0,132	0,254
hsa-miR-760	0,080	0,125	0,189	0,132	0,055
hsa-miR-3713	0,232	0,042	0,122	0,132	0,096
hsa-miR-431*	0,076	0,104	0,216	0,132	0,074
hsa-miR-1537	0,059	0,154	0,183	0,132	0,065
hsa-miR-1343	0,180	0,011	0,206	0,132	0,106
hsa-miR-4685-3p	0,192	0,005	0,202	0,133	0,111
hsa-miR-432*	0,266	0,119	0,014	0,133	0,126
hsa-miR-4440	-0,183	-0,137	0,720	0,133	0,509
hsa-miR-4523	0,129	0,182	0,089	0,134	0,047
hsa-miR-142-3p	0,108	0,041	0,252	0,134	0,108
hsa-miR-511	0,134	-0,004	0,271	0,134	0,138
hsa-miR-658	0,135	0,169	0,098	0,134	0,036
hsa-miR-4253	0,169	0,103	0,131	0,134	0,033
hsa-miR-4540	0,175	0,099	0,129	0,134	0,039
hsa-miR-204	-0,053	0,144	0,312	0,134	0,183
hsa-miR-522	0,043	0,168	0,192	0,134	0,080
hsa-miR-4676-3p	0,176	0,142	0,088	0,135	0,045
hsa-miR-4266	0,234	0,030	0,143	0,136	0,102

Annexe 1: Supplementary Table S2 Primary screening data of DF-FunREG system.

hsa-miR-4282	0,206	0,112	0,089	0,136	0,062
hsa-miR-524-3p	0,194	0,056	0,157	0,136	0,071
hsa-miR-616	0,246	0,092	0,072	0,137	0,095
hsa-miR-3607-5p	0,153	0,157	0,101	0,137	0,031
hsa-miR-3160-5p	0,125	0,103	0,183	0,137	0,041
hsa-miR-551a	0,150	0,147	0,114	0,137	0,020
hsa-miR-519a*	0,190	0,179	0,043	0,137	0,082
hsa-miR-4419b	0,302	0,122	-0,013	0,137	0,158
hsa-miR-4271	0,167	0,176	0,070	0,138	0,059
hsa-miR-141	0,179	0,070	0,164	0,138	0,059
hsa-miR-296-3p	0,184	0,095	0,135	0,138	0,045
hsa-miR-4786-5p	0,181	0,084	0,149	0,138	0,050
hsa-miR-1182	0,041	0,145	0,229	0,138	0,094
hsa-miR-99b*	0,061	0,124	0,230	0,138	0,086
hsa-miR-1284	0,137	0,173	0,104	0,138	0,034
hsa-miR-3140-5p	0,119	0,069	0,228	0,138	0,081
hsa-miR-4530	0,202	0,194	0,021	0,139	0,102
hsa-miR-372	0,134	0,116	0,166	0,139	0,026
hsa-miR-3153	0,173	0,146	0,099	0,139	0,038
hsa-miR-1827	0,195	0,099	0,124	0,140	0,050
hsa-miR-381	0,219	0,180	0,021	0,140	0,105
hsa-miR-4489	0,084	0,156	0,179	0,140	0,050
hsa-miR-4424	0,091	0,156	0,173	0,140	0,044
hsa-miR-298	0,075	0,211	0,134	0,140	0,069
hsa-miR-191*	0,275	0,150	-0,004	0,140	0,140
hsa-miR-30c	0,045	0,170	0,206	0,140	0,085
hsa-miR-4320	0,051	0,118	0,251	0,140	0,102
hsa-miR-4455	0,065	0,114	0,243	0,140	0,092
hsa-miR-4272	0,070	0,200	0,152	0,141	0,066
hsa-miR-139-3p	0,180	0,015	0,228	0,141	0,112
hsa-miR-615-5p	0,161	0,042	0,221	0,141	0,091
hsa-miR-3143	0,153	0,128	0,143	0,141	0,012
hsa-miR-3115	0,137	-0,003	0,291	0,142	0,147
hsa-miR-513c	0,097	0,182	0,146	0,142	0,043
hsa-miR-33b*	0,061	0,131	0,235	0,142	0,088
hsa-miR-1225-3p	0,145	0,106	0,176	0,142	0,035
hsa-miR-9*	0,032	0,125	0,270	0,143	0,120
hsa-let-7a*	0,061	0,201	0,166	0,143	0,073
hsa-miR-4422	0,267	0,165	-0,004	0,143	0,137
hsa-miR-185*	0,174	0,217	0,039	0,143	0,093
hsa-miR-27a	0,238	0,088	0,104	0,143	0,082
hsa-miR-3909	0,201	0,078	0,152	0,144	0,062
hsa-miR-4671-3p	0,125	0,198	0,108	0,144	0,048
hsa-miR-218-2*	0,113	0,201	0,117	0,144	0,049
hsa-miR-1238	0,169	0,037	0,227	0,144	0,097
hsa-miR-21	0,066	0,117	0,250	0,144	0,095
hsa-miR-4260	0,324	-0,008	0,118	0,145	0,168
hsa-miR-650	0,265	0,076	0,094	0,145	0,104
hsa-miR-548a-5p	0,176	0,127	0,133	0,145	0,027
hsa-miR-505	0,147	0,106	0,183	0,145	0,038
hsa-miR-603	0,113	0,142	0,181	0,145	0,034
hsa-miR-4466	0,179	0,082	0,177	0,146	0,055
hsa-miR-26a-2*	-0,018	0,263	0,194	0,146	0,146
hsa-miR-590-5p	0,367	0,100	-0,027	0,147	0,201
hsa-miR-3138	0,075	0,119	0,246	0,147	0,089
hsa-miR-139-5p	0,278	0,051	0,112	0,147	0,117
hsa-miR-4483	0,188	0,116	0,139	0,147	0,037
hsa-miR-548d-3p	-0,040	0,342	0,141	0,148	0,191
hsa-miR-1268	0,150	0,107	0,187	0,148	0,040
hsa-miR-3938	0,099	0,262	0,084	0,148	0,098
hsa-miR-4714-3p	0,038	0,183	0,224	0,149	0,098
hsa-miR-519d	0,205	0,136	0,105	0,149	0,051
hsa-miR-4669	0,127	0,232	0,087	0,149	0,075
hsa-miR-495	-0,129	0,261	0,316	0,149	0,243
hsa-miR-572	0,059	0,069	0,321	0,149	0,148
hsa-miR-1471	0,169	0,195	0,085	0,150	0,058
hsa-miR-335	-0,005	0,205	0,250	0,150	0,136
hsa-miR-4477b	0,230	0,144	0,076	0,150	0,077
hsa-miR-4699-3p	0,482	-0,056	0,025	0,150	0,290
hsa-miR-222*	0,156	0,222	0,075	0,151	0,074

Annexe 1: Supplementary Table S2 Primary screening data of DF-FunREG system.

hsa-miR-184	0,172	0,135	0,146	0,151	0,019
hsa-miR-2964a-5p	0,204	0,066	0,184	0,151	0,074
hsa-miR-4421	0,099	0,196	0,162	0,152	0,049
hsa-miR-1825	0,246	0,154	0,057	0,152	0,094
hsa-miR-367	0,162	0,188	0,107	0,152	0,041
hsa-miR-17*	0,160	0,128	0,171	0,153	0,022
hsa-miR-4764-3p	0,177	0,177	0,105	0,153	0,042
hsa-miR-4492	0,082	0,101	0,276	0,153	0,107
hsa-miR-3680	0,043	0,181	0,236	0,153	0,099
hsa-miR-2117	0,263	0,141	0,056	0,154	0,104
hsa-miR-23a*	0,218	0,124	0,119	0,154	0,056
hsa-miR-1264	0,254	0,126	0,082	0,154	0,089
hsa-miR-4535	0,093	0,156	0,215	0,154	0,061
hsa-miR-18b*	0,156	0,156	0,152	0,155	0,003
hsa-miR-4488	0,240	0,108	0,117	0,155	0,074
hsa-miR-150*	0,068	0,207	0,190	0,155	0,076
hsa-miR-4436a	0,096	0,108	0,261	0,155	0,092
hsa-miR-3618	0,123	0,140	0,205	0,156	0,043
hsa-miR-30d	0,065	0,124	0,279	0,156	0,111
hsa-miR-4755-5p	0,176	0,115	0,177	0,156	0,035
hsa-miR-136	0,126	0,201	0,141	0,156	0,040
hsa-miR-3669	0,144	0,080	0,245	0,156	0,083
hsa-miR-501-5p	0,244	0,072	0,155	0,157	0,086
hsa-miR-1280	0,154	0,110	0,207	0,157	0,048
hsa-miR-3937	0,138	0,110	0,223	0,157	0,059
hsa-miR-3124-3p	0,126	0,181	0,166	0,158	0,029
hsa-miR-553	0,118	0,175	0,180	0,158	0,034
hsa-miR-2355-3p	0,244	0,179	0,050	0,158	0,099
hsa-miR-4475	0,114	0,192	0,168	0,158	0,040
hsa-miR-4456	0,158	0,061	0,256	0,159	0,098
hsa-miR-3118	0,196	0,203	0,078	0,159	0,070
hsa-miR-448	0,209	0,154	0,116	0,160	0,047
hsa-miR-3122	0,139	0,158	0,182	0,160	0,021
hsa-miR-4288	0,127	0,064	0,289	0,160	0,116
hsa-miR-505*	0,149	0,183	0,148	0,160	0,020
hsa-miR-3156-5p	0,260	0,113	0,108	0,160	0,087
hsa-miR-3187-3p	0,306	0,130	0,046	0,161	0,133
hsa-miR-549	0,116	0,078	0,288	0,161	0,112
hsa-miR-34c-5p	0,168	0,232	0,083	0,161	0,075
hsa-miR-4417	0,099	0,213	0,172	0,161	0,058
hsa-miR-720	0,277	0,080	0,128	0,161	0,103
hsa-miR-145*	0,089	0,216	0,181	0,162	0,066
hsa-miR-711	0,225	0,196	0,067	0,163	0,084
hsa-miR-762	0,213	0,189	0,088	0,163	0,067
hsa-miR-4732-3p	0,079	0,077	0,334	0,163	0,148
hsa-miR-889	0,082	0,212	0,196	0,163	0,071
hsa-miR-3908	0,178	0,258	0,055	0,164	0,103
hsa-miR-328	0,167	0,154	0,172	0,164	0,010
hsa-miR-662	0,227	0,232	0,035	0,165	0,112
hsa-miR-193b*	0,124	0,162	0,209	0,165	0,043
hsa-miR-384	0,106	0,299	0,090	0,165	0,116
hsa-miR-630	0,148	0,170	0,177	0,165	0,015
hsa-miR-106b	0,181	0,161	0,153	0,165	0,014
hsa-miR-556-5p	0,284	0,142	0,072	0,166	0,108
hsa-let-7f-2*	0,314	0,173	0,010	0,166	0,152
hsa-miR-1236	0,232	0,114	0,152	0,166	0,060
hsa-miR-129-5p	0,158	0,090	0,251	0,166	0,081
hsa-miR-649	0,008	0,196	0,295	0,166	0,146
hsa-miR-29a*	0,057	0,277	0,166	0,167	0,110
hsa-miR-4532	0,191	0,126	0,184	0,167	0,035
hsa-miR-1251	0,316	0,059	0,125	0,167	0,133
hsa-miR-3663-3p	0,179	0,184	0,139	0,167	0,025
hsa-miR-4675	0,121	0,136	0,245	0,167	0,068
hsa-miR-4292	0,269	0,163	0,071	0,168	0,100
hsa-miR-4427	0,224	0,106	0,175	0,168	0,060
hsa-miR-4781-3p	0,137	0,158	0,209	0,168	0,037
hsa-miR-320b	0,154	0,290	0,061	0,168	0,115
hsa-miR-4505	0,130	0,251	0,125	0,169	0,071
hsa-miR-574-5p	0,235	0,168	0,104	0,169	0,066
hsa-miR-4264	0,099	0,131	0,278	0,169	0,096

Annexe 1: Supplementary Table S2 Primary screening data of DF-FunREG system.

hsa-miR-144*	0,088	0,198	0,223	0,170	0,072
hsa-miR-521	0,230	0,164	0,116	0,170	0,057
hsa-miR-1911*	0,207	0,214	0,090	0,170	0,070
hsa-miR-106a	0,125	0,236	0,150	0,170	0,058
hsa-miR-877*	0,141	0,177	0,194	0,171	0,027
hsa-miR-374b	0,157	0,131	0,224	0,171	0,048
hsa-miR-3135	0,187	0,258	0,068	0,171	0,096
hsa-miR-4735-5p	0,297	0,089	0,127	0,171	0,111
hsa-miR-20a*	0,177	0,145	0,192	0,171	0,024
hsa-miR-4800-5p	0,286	0,114	0,115	0,172	0,099
hsa-miR-548n	0,108	0,217	0,189	0,172	0,057
hsa-miR-379*	0,140	0,126	0,249	0,172	0,067
hsa-miR-340*	0,190	0,107	0,219	0,172	0,058
hsa-miR-1279	0,155	0,146	0,216	0,172	0,038
hsa-miR-4252	0,183	0,178	0,156	0,173	0,015
hsa-miR-3658	0,254	0,078	0,187	0,173	0,089
hsa-miR-126*	0,128	0,151	0,239	0,173	0,059
hsa-miR-5096	0,106	0,217	0,195	0,173	0,059
hsa-miR-1297	0,167	0,141	0,211	0,173	0,036
hsa-miR-3186-5p	0,200	0,187	0,133	0,173	0,036
hsa-miR-4681	0,189	0,084	0,247	0,173	0,083
hsa-miR-1268b	0,107	0,239	0,175	0,174	0,066
hsa-miR-4725-5p	0,205	0,158	0,160	0,174	0,027
hsa-miR-4533	0,253	0,185	0,086	0,174	0,084
hsa-miR-4782-3p	0,313	0,073	0,139	0,175	0,124
hsa-miR-377*	0,136	0,218	0,172	0,175	0,041
hsa-miR-4710	0,260	0,171	0,097	0,176	0,082
hsa-miR-325	0,161	0,149	0,219	0,176	0,037
hsa-miR-1281	0,163	0,254	0,112	0,176	0,072
hsa-miR-206	0,043	0,237	0,250	0,177	0,116
hsa-miR-589*	0,165	0,171	0,196	0,177	0,017
hsa-miR-4486	0,285	0,062	0,187	0,178	0,112
hsa-miR-4680-5p	0,204	0,116	0,214	0,178	0,054
hsa-miR-1282	0,313	0,058	0,165	0,179	0,128
hsa-miR-4304	0,158	0,217	0,163	0,180	0,033
hsa-miR-19a*	0,127	0,220	0,193	0,180	0,048
hsa-miR-628-5p	0,202	0,106	0,233	0,180	0,066
hsa-miR-411*	0,092	0,173	0,276	0,180	0,092
hsa-miR-4295	0,243	0,186	0,114	0,181	0,065
hsa-miR-576-5p	0,100	0,229	0,214	0,181	0,070
hsa-miR-3653	0,131	0,140	0,273	0,181	0,080
hsa-miR-3940-3p	0,060	0,067	0,416	0,181	0,203
hsa-miR-500b	0,190	0,196	0,158	0,182	0,021
hsa-miR-4279	0,196	0,175	0,174	0,182	0,012
hsa-miR-4434	0,239	0,197	0,109	0,182	0,066
hsa-miR-362-5p	0,279	0,157	0,112	0,182	0,087
hsa-miR-3928	0,241	0,134	0,172	0,182	0,054
hsa-miR-1470	0,156	0,134	0,258	0,183	0,066
hsa-miR-4459	0,243	0,254	0,051	0,183	0,114
hsa-miR-18a	0,150	0,231	0,170	0,184	0,042
hsa-miR-199a-3p // hsa- miR-199b-3p	0,177	0,065	0,309	0,184	0,122
hsa-miR-190	0,091	0,200	0,261	0,184	0,086
hsa-miR-4472	0,238	0,143	0,171	0,184	0,049
hsa-miR-4316	0,109	0,240	0,206	0,185	0,068
hsa-miR-1299	0,134	0,069	0,354	0,185	0,149
hsa-miR-3678-5p	0,231	0,128	0,197	0,185	0,053
hsa-miR-376c	0,218	0,103	0,236	0,186	0,073
hsa-miR-4468	0,121	0,111	0,326	0,186	0,121
hsa-miR-195*	0,181	0,086	0,292	0,186	0,103
hsa-miR-4262	0,149	0,204	0,205	0,186	0,032
hsa-miR-4741	0,134	0,252	0,172	0,186	0,060
hsa-miR-1914*	0,157	0,160	0,243	0,186	0,049
hsa-miR-208b	0,258	0,136	0,165	0,187	0,063
hsa-miR-4640-3p	0,209	0,289	0,062	0,187	0,115
hsa-miR-202*	0,080	0,288	0,193	0,187	0,104
hsa-miR-520e	0,197	0,235	0,129	0,187	0,054
hsa-miR-22	0,218	0,132	0,214	0,188	0,049
hsa-miR-3689b* // hsa- miR-3689c	0,225	0,182	0,157	0,188	0,034

Annexe 1: Supplementary Table S2 Primary screening data of DF-FunREG system.

hsa-miR-15a	0,724	-0,033	-0,126	0,189	0,466
hsa-miR-302c	0,159	0,179	0,228	0,189	0,036
hsa-miR-4318	0,388	0,036	0,141	0,189	0,181
hsa-miR-562	0,251	0,172	0,145	0,189	0,055
hsa-miR-570	0,135	0,229	0,206	0,190	0,049
hsa-miR-23a	0,273	0,101	0,197	0,190	0,086
hsa-miR-545*	0,126	0,262	0,185	0,191	0,068
hsa-miR-4286	0,062	0,225	0,286	0,191	0,116
hsa-miR-3609	0,168	0,147	0,258	0,191	0,059
hsa-miR-4510	0,581	-0,094	0,086	0,191	0,350
hsa-miR-498	0,433	0,172	-0,031	0,191	0,233
hsa-miR-591	0,152	0,186	0,236	0,191	0,042
hsa-miR-186*	0,107	0,236	0,233	0,192	0,074
hsa-miR-30a*	0,156	0,196	0,225	0,192	0,035
hsa-miR-4793-3p	0,239	0,176	0,162	0,192	0,041
hsa-miR-3196	0,356	0,164	0,057	0,192	0,152
hsa-miR-3974	0,278	0,209	0,094	0,194	0,093
hsa-miR-3925-3p	0,219	0,219	0,146	0,195	0,043
hsa-miR-3607-3p	0,166	0,151	0,268	0,195	0,064
hsa-miR-4301	0,118	0,118	0,351	0,196	0,135
hsa-miR-185	0,315	0,149	0,123	0,196	0,104
hsa-miR-1228*	0,160	0,231	0,196	0,196	0,036
hsa-miR-1915	0,100	0,300	0,189	0,196	0,100
hsa-miR-3065-5p	0,208	0,102	0,279	0,196	0,089
hsa-miR-433	0,140	0,191	0,259	0,197	0,060
hsa-miR-580	0,551	0,084	-0,043	0,197	0,312
hsa-miR-30c-2*	0,098	0,203	0,291	0,197	0,097
hsa-miR-4293	0,211	0,088	0,293	0,197	0,103
hsa-miR-4298	0,320	0,123	0,150	0,198	0,107
hsa-miR-3171	0,145	0,170	0,280	0,198	0,072
hsa-miR-4302	0,387	0,085	0,122	0,198	0,165
hsa-miR-598	0,115	0,118	0,364	0,199	0,143
hsa-miR-638	0,192	0,110	0,296	0,199	0,093
hsa-miR-4504	0,220	0,199	0,182	0,200	0,019
hsa-miR-642b	0,236	0,148	0,217	0,200	0,046
hsa-miR-588	0,148	0,170	0,284	0,201	0,073
hsa-miR-4446-5p	0,297	0,061	0,246	0,202	0,124
hsa-miR-3960	0,253	0,146	0,206	0,202	0,053
hsa-miR-4783-5p	0,114	0,120	0,373	0,202	0,148
hsa-miR-15b*	0,055	0,225	0,327	0,202	0,137
hsa-miR-3616-3p	-0,007	-0,046	0,660	0,203	0,397
hsa-miR-1258	0,110	0,190	0,309	0,203	0,100
hsa-miR-100	0,177	0,200	0,235	0,204	0,030
hsa-miR-149*	0,399	0,142	0,071	0,204	0,172
hsa-miR-4747-5p	0,268	0,168	0,177	0,205	0,055
hsa-miR-145	0,212	0,189	0,212	0,205	0,013
hsa-miR-4281	0,260	0,119	0,235	0,205	0,075
hsa-miR-4732-5p	0,315	0,231	0,070	0,206	0,125
hsa-miR-4499	0,111	0,233	0,272	0,206	0,084
hsa-miR-4324	0,226	0,073	0,318	0,206	0,124
hsa-miR-4775	0,190	0,226	0,207	0,207	0,018
hsa-miR-4731-3p	0,263	0,163	0,196	0,207	0,051
hsa-miR-2116*	0,216	0,232	0,175	0,208	0,029
hsa-miR-518f	0,196	0,213	0,214	0,208	0,010
hsa-miR-4280	0,232	0,256	0,136	0,208	0,064
hsa-miR-4276	0,318	0,123	0,185	0,209	0,099
hsa-miR-223	0,290	0,131	0,207	0,209	0,080
hsa-miR-765	0,602	0,086	-0,060	0,209	0,348
hsa-miR-1277	0,248	0,259	0,121	0,209	0,077
hsa-miR-449c*	0,181	0,230	0,217	0,210	0,026
hsa-miR-518c*	0,286	0,331	0,012	0,210	0,173
hsa-miR-517*	0,191	0,233	0,207	0,210	0,021
hsa-miR-4666-3p	0,282	0,168	0,181	0,210	0,062
hsa-miR-4490	0,286	0,242	0,106	0,211	0,094
hsa-miR-3664-5p	0,250	0,162	0,223	0,212	0,045
hsa-miR-103b	0,250	0,223	0,162	0,212	0,045
hsa-miR-3923	0,170	0,185	0,280	0,212	0,060
hsa-miR-574-3p	0,445	0,053	0,138	0,212	0,207
hsa-miR-548ag	0,294	0,234	0,110	0,213	0,093
hsa-miR-4291	0,248	0,220	0,172	0,213	0,039

Annexe 1: Supplementary Table S2 Primary screening data of DF-FunREG system.

hsa-miR-489	0,122	0,216	0,302	0,213	0,090
hsa-miR-4299	0,156	0,213	0,272	0,213	0,058
hsa-miR-1538	0,247	0,335	0,058	0,214	0,142
hsa-miR-3185	0,335	0,195	0,114	0,214	0,112
hsa-miR-4287	0,209	0,123	0,312	0,215	0,094
hsa-miR-569	0,126	0,294	0,225	0,215	0,084
hsa-miR-4254	0,262	0,129	0,256	0,215	0,075
hsa-miR-4294	0,274	0,183	0,191	0,216	0,050
hsa-miR-3622a-5p	0,152	0,327	0,170	0,217	0,096
hsa-miR-146b-3p	0,190	0,183	0,277	0,217	0,052
hsa-miR-3674	0,164	0,167	0,319	0,217	0,089
hsa-miR-4699-5p	0,279	0,181	0,194	0,218	0,053
hsa-miR-4251	0,174	0,239	0,240	0,218	0,038
hsa-miR-3677-3p	0,264	0,255	0,137	0,218	0,070
hsa-miR-373*	0,245	0,196	0,219	0,220	0,025
hsa-miR-548t	0,189	0,165	0,307	0,220	0,076
hsa-miR-4431	0,122	0,236	0,303	0,220	0,091
hsa-miR-335*	0,187	0,236	0,238	0,220	0,029
hsa-miR-4436b-3p	0,194	0,226	0,244	0,221	0,025
hsa-miR-4319	0,279	0,054	0,331	0,221	0,147
hsa-miR-4297	0,264	0,134	0,268	0,222	0,076
hsa-miR-497*	0,264	0,276	0,129	0,223	0,082
hsa-miR-3681*	0,322	0,227	0,122	0,224	0,100
hsa-miR-3911	0,312	0,112	0,247	0,224	0,102
hsa-miR-4317	0,255	0,180	0,237	0,224	0,039
hsa-miR-3135b	0,207	0,266	0,200	0,225	0,036
hsa-miR-922	0,241	0,191	0,245	0,226	0,030
hsa-miR-623	0,136	0,207	0,336	0,226	0,101
hsa-miR-302e	0,182	0,282	0,218	0,227	0,050
hsa-miR-4659a-5p	0,126	0,242	0,320	0,229	0,097
hsa-miR-455-3p	0,309	0,216	0,164	0,230	0,074
hsa-miR-323b-5p	0,284	0,349	0,065	0,233	0,149
hsa-miR-4273	0,238	0,234	0,227	0,233	0,005
hsa-miR-183*	0,287	0,244	0,168	0,233	0,060
hsa-miR-520c-3p	0,220	0,173	0,307	0,233	0,068
hsa-miR-4261	0,311	0,264	0,126	0,234	0,096
hsa-miR-4678	0,222	0,279	0,203	0,235	0,039
hsa-miR-106a*	0,253	0,269	0,182	0,235	0,046
hsa-miR-567	0,376	0,168	0,166	0,236	0,121
hsa-miR-548x	0,111	0,147	0,453	0,237	0,188
hsa-miR-4283	0,339	0,213	0,160	0,238	0,092
hsa-miR-590-3p	0,285	0,156	0,275	0,238	0,072
hsa-miR-616*	0,236	0,235	0,245	0,239	0,006
hsa-miR-920	0,414	0,150	0,151	0,239	0,152
hsa-miR-30c-1*	0,240	0,180	0,300	0,240	0,060
hsa-miR-3188	0,405	0,134	0,182	0,240	0,145
hsa-miR-501-3p	0,292	0,191	0,239	0,241	0,050
hsa-miR-4785	0,249	0,259	0,215	0,241	0,023
hsa-miR-369-3p	0,185	0,255	0,283	0,241	0,050
hsa-miR-4787-5p	0,203	0,150	0,371	0,241	0,115
hsa-miR-4728-5p	0,376	0,191	0,159	0,242	0,117
hsa-miR-1204	0,130	0,238	0,359	0,242	0,115
hsa-miR-3942-3p	0,339	0,102	0,287	0,243	0,124
hsa-miR-99a	0,133	0,301	0,295	0,243	0,096
hsa-let-7a-2*	0,214	0,209	0,309	0,244	0,057
hsa-miR-4497	0,283	0,093	0,356	0,244	0,135
hsa-miR-888	0,179	0,169	0,385	0,244	0,122
hsa-miR-4728-3p	0,260	0,247	0,227	0,245	0,017
hsa-miR-3181	0,319	0,020	0,396	0,245	0,199
hsa-miR-584	0,282	0,248	0,208	0,246	0,037
hsa-miR-575	0,398	0,002	0,342	0,248	0,214
hsa-miR-621	0,155	0,353	0,239	0,249	0,099
hsa-miR-4513	0,286	0,151	0,312	0,250	0,087
hsa-miR-3913-3p	0,041	0,359	0,349	0,250	0,180
hsa-miR-4469	0,210	0,238	0,306	0,252	0,050
hsa-miR-526b*	0,308	0,188	0,260	0,252	0,060
hsa-miR-4786-3p	0,739	0,048	-0,030	0,252	0,423
hsa-miR-4296	0,450	0,191	0,116	0,252	0,175
hsa-miR-4793-5p	0,115	0,679	-0,032	0,254	0,375
hsa-miR-4797-5p	0,296	0,254	0,211	0,254	0,043

Annexe 1: Supplementary Table S2 Primary screening data of DF-FunREG system.

hsa-miR-4303	0,168	0,194	0,400	0,254	0,127
hsa-miR-144	0,254	0,212	0,297	0,254	0,043
hsa-miR-3622b-5p	0,390	0,189	0,184	0,254	0,117
hsa-miR-412	0,290	0,200	0,280	0,257	0,050
hsa-miR-4768-5p	0,363	0,226	0,185	0,258	0,093
hsa-miR-4717-3p	0,374	0,266	0,137	0,259	0,119
hsa-miR-617	0,166	0,234	0,378	0,259	0,108
hsa-miR-1207-5p	0,439	0,040	0,301	0,260	0,203
hsa-miR-3177-5p	0,388	0,183	0,209	0,260	0,112
hsa-miR-3615	0,456	0,234	0,094	0,261	0,183
hsa-miR-3134	0,575	0,199	0,019	0,264	0,284
hsa-miR-487b	0,214	0,292	0,294	0,266	0,046
hsa-miR-4531	0,222	0,289	0,295	0,269	0,041
hsa-miR-622	0,236	0,333	0,238	0,269	0,056
hsa-miR-1193	0,366	0,247	0,197	0,270	0,086
hsa-miR-4711-3p	0,231	0,265	0,314	0,270	0,042
hsa-miR-1229	0,310	0,241	0,264	0,272	0,036
hsa-miR-4802-5p	0,284	0,255	0,276	0,272	0,015
hsa-miR-29b-2*	0,190	0,221	0,405	0,272	0,116
hsa-miR-4443	0,446	0,152	0,224	0,274	0,153
hsa-miR-3168	0,233	0,227	0,364	0,275	0,078
hsa-miR-2115	0,198	0,114	0,513	0,275	0,211
hsa-miR-30a	0,323	0,266	0,236	0,275	0,044
hsa-miR-4436b-5p	0,243	0,262	0,322	0,276	0,041
hsa-miR-1225-5p	0,299	0,181	0,348	0,276	0,086
hsa-miR-304*	0,218	0,252	0,361	0,277	0,074
hsa-miR-224*	0,331	0,322	0,187	0,280	0,081
hsa-miR-1252	0,300	0,191	0,350	0,280	0,081
hsa-miR-4267	0,369	0,203	0,272	0,281	0,083
hsa-miR-4263	0,322	0,233	0,290	0,281	0,045
hsa-miR-3129-5p	0,322	0,289	0,234	0,282	0,045
hsa-miR-2054	0,226	0,314	0,308	0,283	0,049
hsa-miR-3647-3p	0,262	0,370	0,217	0,283	0,079
hsa-miR-3144-5p	0,332	0,272	0,250	0,285	0,042
hsa-miR-4495	0,337	0,182	0,339	0,286	0,090
hsa-miR-485-3p	0,235	0,284	0,338	0,286	0,051
hsa-miR-30e	0,238	0,304	0,318	0,287	0,043
hsa-miR-4481	0,397	0,284	0,179	0,287	0,109
hsa-miR-4325	0,202	0,178	0,481	0,287	0,169
hsa-miR-1231	0,317	0,127	0,417	0,287	0,147
hsa-miR-320e	0,345	0,192	0,324	0,287	0,083
hsa-miR-4451	0,350	0,259	0,258	0,289	0,053
hsa-miR-4447	0,266	0,251	0,353	0,290	0,055
hsa-miR-1	0,239	0,353	0,290	0,294	0,057
hsa-miR-374c	0,293	0,368	0,225	0,295	0,071
hsa-miR-1266	0,480	0,350	0,057	0,296	0,217
hsa-miR-3178	0,375	0,170	0,346	0,297	0,111
hsa-miR-593	0,198	0,368	0,325	0,297	0,088
hsa-miR-4479	0,200	0,335	0,356	0,297	0,085
hsa-miR-517a	0,350	0,213	0,332	0,298	0,075
hsa-miR-4315	0,275	0,183	0,436	0,298	0,128
hsa-miR-3650	0,461	0,153	0,283	0,299	0,155
hsa-miR-187*	0,297	0,246	0,358	0,300	0,056
hsa-miR-520f	0,343	0,184	0,374	0,300	0,102
hsa-miR-4668-5p	0,374	0,188	0,342	0,301	0,100
hsa-miR-3123	0,324	0,286	0,294	0,301	0,020
hsa-miR-629	0,484	0,264	0,155	0,301	0,168
hsa-miR-3939	0,450	0,272	0,193	0,305	0,132
hsa-miR-3136-5p	0,267	0,408	0,244	0,306	0,089
hsa-miR-4328	0,355	0,220	0,345	0,307	0,075
hsa-miR-523	0,349	0,252	0,323	0,308	0,050
hsa-miR-4275	0,419	0,241	0,268	0,309	0,096
hsa-miR-3685	0,322	0,300	0,313	0,312	0,011
hsa-miR-324-5p	0,392	0,175	0,368	0,312	0,119
hsa-miR-1206	0,407	0,232	0,297	0,312	0,088
hsa-miR-4308	0,367	0,292	0,277	0,312	0,048
hsa-miR-4655-3p	0,360	0,261	0,322	0,314	0,050
hsa-miR-3656	0,287	0,270	0,388	0,315	0,064
hsa-miR-4694-3p	0,273	0,165	0,510	0,316	0,176
hsa-miR-4310	0,344	0,200	0,406	0,317	0,106

Annexe 1: Supplementary Table S2 Primary screening data of DF-FunREG system.

hsa-miR-517c	0,287	0,245	0,421	0,318	0,092
hsa-miR-642a	0,447	0,256	0,251	0,318	0,112
hsa-miR-3201	0,374	0,266	0,315	0,318	0,054
hsa-miR-887	0,284	0,257	0,415	0,319	0,085
hsa-miR-302f	0,359	0,193	0,411	0,321	0,114
hsa-miR-411	0,261	0,338	0,367	0,322	0,055
hsa-miR-516b* // hsa-miR-516a-3p	0,328	0,315	0,327	0,323	0,007
hsa-miR-361-3p	0,279	0,209	0,485	0,324	0,144
hsa-miR-4694-5p	0,380	0,274	0,319	0,325	0,053
hsa-miR-10a*	0,284	0,344	0,352	0,327	0,037
hsa-miR-3679-3p	0,485	0,290	0,216	0,330	0,139
hsa-miR-4465	0,292	0,386	0,316	0,331	0,049
hsa-miR-4671-5p	0,370	0,260	0,383	0,338	0,067
hsa-miR-4428	0,374	0,342	0,298	0,338	0,039
hsa-miR-429	0,372	0,328	0,331	0,344	0,025
hsa-miR-3610	0,309	0,329	0,401	0,346	0,048
hsa-miR-602	0,404	0,381	0,258	0,348	0,079
hsa-miR-4719	0,357	0,343	0,350	0,350	0,007
hsa-miR-3182	0,399	0,220	0,439	0,353	0,117
hsa-miR-10b*	0,365	0,256	0,437	0,353	0,091
hsa-miR-548ah	0,328	0,324	0,410	0,354	0,049
hsa-miR-30b*	0,370	0,475	0,259	0,368	0,108
hsa-miR-520d-3p	0,358	0,250	0,501	0,370	0,126
hsa-miR-548m	0,483	0,329	0,302	0,371	0,098
hsa-miR-4747-3p	0,352	0,462	0,300	0,372	0,083
hsa-miR-1249	0,426	0,397	0,297	0,373	0,068
hsa-miR-3663-5p	0,425	0,388	0,360	0,391	0,033
hsa-miR-4300	0,393	0,440	0,359	0,397	0,041
hsa-miR-3167	0,498	0,220	0,495	0,405	0,160
hsa-miR-2116	0,446	0,392	0,388	0,409	0,032
hsa-miR-4307	0,580	0,422	0,226	0,410	0,177
hsa-miR-3689a-3p	0,516	0,315	0,456	0,429	0,103
hsa-miR-4442	0,424	0,475	0,399	0,433	0,038
hsa-miR-3935	0,576	0,448	0,299	0,441	0,139
hsa-miR-516a-5p	0,545	0,412	0,403	0,453	0,080
hsa-miR-499a-3p	0,476	0,370	0,519	0,455	0,077
hsa-miR-330-3p	0,398	0,511	0,510	0,473	0,065
hsa-miR-542-5p	0,591	0,416	0,415	0,474	0,102
hsa-miR-4777-5p	0,546	0,402	0,476	0,475	0,072
hsa-miR-4632	0,508	0,405	0,513	0,475	0,061
hsa-miR-1247	0,485	0,543	0,426	0,485	0,058
hsa-miR-4265	1,612	-0,138	0,006	0,494	0,971
hsa-miR-297	0,639	0,494	0,352	0,495	0,144
hsa-miR-4634	0,535	0,664	0,595	0,598	0,065
hsa-miR-4779	1,140	0,066	1,068	0,758	0,600
hsa-miR-941	0,971	0,653	0,857	0,827	0,161
hsa-miR-3195	0,836	0,865	0,891	0,864	0,027
hsa-miR-4695-3p	0,927	1,219	1,120	1,088	0,148

ANNEXE 2

**DEPOT D'UNE DEMANDE INTERNATIONALE DE BREVET PCT/EP2016/065938
SOUS PRIORITE DE LA DEMANDE PRIORITAIRE EP15 306113.0 AUX NOMS DE
L'UNIVERSITE DE BORDEAUX / INSERM / UNIVERSITE PARIS SUD - PARIS XI**

**Inventeurs: Christophe GROSSET, Sarah LESJEAN, Francis SAGLIOCCO, Marie-Annick
BUENDIA, Emilie INDERSIE**

Use of catenin- beta 1-targeting microRNAs for treating liver cancer

Field of the Invention

The present invention relates to the field of oncology. In particular, it provides miRNAs useful for detecting and/or treating cancer.

Background of the Invention

Hepatoblastoma (HBL) is an uncommon malignant liver neoplasm occurring in infants and children (1% of pediatric cancers, 0.02% of all cancers and around 3,500 new cases by year worldwide) with a 10-year survival of 61% (Allan B et al, HPB 2013, 15:741-46).

Several therapeutic strategies are available, the most effective being the surgical resection of the tumor or liver transplantation. However, the surgical resection or liver transplantation is possible only in about 70% of HBL.

Therefore, new strategies are also under development. For instance, numerous teams around the world keep trying to identify miRNAs which could be used for treating liver cancers. At this time, only miR-34a (recently renamed miR-34a-5p in the last version of miRBase) is currently tested in phase I clinical trial for unresectable primary liver cancer or solid cancers with liver involvement (e.g. metastasis) in adults. miR-34a regulates several key oncogenic targets including CTNNB1, BCL2, E2F3, HDAC1, MET, MAK1, CDK4/6, PDGFR- α , WNT1/3 and NOTCH-1 (Bader, Front. Genet., **120**, 1-9, Li Z and Rana TM, Nat Rev Drug Disc 2014).

A therapeutic solution remains urgently needed for HBL, in particular for patients who are unable to benefit of treatment by surgery or by liver transplantation, fail to properly respond to the first line treatments, already have unresectable metastasis or in case of relapses.

Summary of the Invention

The inventors identified 5 new miRNAs (i.e., hsa-miR-548z, hsa-miR-624-5p, hsa-let-7i-3p, miR-885-5p, miR-449b-3p) decreasing the level of the oncoprotein catenin beta 1 (CTNNB1) in HBL cell lines. Hsa-miR-548z, hsa-miR-624-5p, hsa-let-7i-3p, miR-885-5p and miR-449b-3p are down-regulated in HBL tumors and inhibit *in vitro* HBL cell growth. Some of them have been demonstrated to be more

effective than miR-34a (the miRNA currently tested in phase-I clinical trial) or as effective as this microRNA for blocking the growth of HBL-derived HuH6 and/or HepG2 cells and/or Patient-Derived Xenograft (PDX) cells.

The present invention relates to a molecule selected from the group consisting of hsa-miR-624-5p, hsa-miR-548z, hsa-let-7i-3p, hsa-miR-885-5p, hsa-miR-449b-3p or any combination thereof or a DNA or RNA encoding for said miRNA for use for treating a hepatoblastoma cancer. The present invention also relates to the use of a molecule selected from the group consisting of hsa-miR-624-5p, hsa-miR-548z, hsa-let-7i-3p, hsa-miR-885-5p, hsa-miR-449b-3p or any combination thereof or a DNA or RNA encoding for said miRNA for the manufacture of a medicament for treating a liver cancer, particularly hepatoblastoma. It further relates to a method for treating a liver cancer in a subject, comprising administering a therapeutically effective amount of a molecule selected from the group consisting of hsa-miR-624-5p, hsa-miR-548z, hsa-let-7i-3p, hsa-miR-885-5p, hsa-miR-449b-3p or any combination thereof or a DNA or RNA encoding for said miRNA to said patient. Preferably, the molecule is selected from the group consisting of hsa-miR-624-5p, hsa-miR-548z, hsa-let-7i-3p, hsa-miR-449b-3p or any combination thereof or a DNA or RNA encoding for said miRNA.

Optionally, the molecule is to be used in combination with one or more therapeutic agents, preferably another antitumor therapy, and in particular with cisplatin, doxorubicin, 5-Fluoro-uracil, sorafenib, gemcitabine, oxaliplatin, mitomycin C, tamoxifen, MSC2156119J, foretinib, refametinib, cabozantinib and tivantinib, or any combination thereof, preferably with doxorubicin, cisplatin, gemcitabine, oxaliplatin, carboplatin, mitomycin C, tamoxifen, sorafenib or any combination thereof. In a preferred embodiment, the molecule is to be used in combination with cisplatin and/or doxorubicin for use in the treatment of HBL.

Optionally, the molecule is to be used in combination with another antitumor therapy and a drug lowering the toxicity and side effects of the antitumor therapy. For instance, drug lowering the toxicity and side effects of the antitumor therapy can be sodium thiosulfate or N-acetyl cysteine.

Alternatively, the therapeutic agent can be an immunotherapeutic agent such as drugs targeting immune system checkpoints such as PD-1 or PD-L1. More particularly, the molecule is to be used in combination with one or more immunotherapeutic agents, and in particular with monoclonal antibodies binding antigens on cancer cells or targeting immune system checkpoints (e.g. immune checkpoint inhibitors) and especially drugs targeting PD-1 or PD-L1 such as for example pembrolizumab, nivolumab, atezolizumab.

Optionally, the molecule is to be used in combination with resection, radiofrequency ablation and/or percutaneous ethanol injection. Optionally, the molecule is to be used after or before resection, radiofrequency ablation and/or percutaneous ethanol injection. Optionally, the molecule is for use as neo-adjuvant therapy or adjuvant therapy.

Optionally, the subject does not respond to the first line treatment and/or is not suitable for tumor resection or ablation and/or not suitable for liver transplantation. Optionally, the subject has a miRNA

selected from the group consisting of hsa-miR-624-5p, hsa-miR-548z, hsa-let-7i-3p, hsa-miR-885-5p, hsa-miR-449b-3p or any combination thereof, preferably selected from the group consisting of hsa-miR-624-5p, hsa-miR-548z, hsa-let-7i-3p, hsa-miR-449b-3p or any combination thereof, which is under-expressed in comparison with a healthy or non-tumoral control.

The present invention further relates to a method for selecting a subject suitable for a treatment by miRNA as disclosed herein comprising determining the level of a miRNA selected from the group consisting of hsa-miR-624-5p, hsa-miR-548z, hsa-let-7i-3p, hsa-miR-449b-3p or of a combination thereof in a biological sample from the subject, and selecting the subject if at least one of the miRNA is under-expressed in comparison with a healthy or non-tumoral control.

The present invention further relates to a method for selecting a subject suitable for a treatment by miRNA as disclosed herein comprising determining the level of CTNNB1 thereof in a biological sample from the subject, and selecting the subject if CTNNB1 is upper-expressed or overexpressed in comparison with a healthy or non-tumoral control.

The present invention also relates to the use of a miRNA selected from the group consisting of hsa-miR-624-5p, hsa-miR-548z, hsa-let-7i-3p, hsa-miR-449b-3p or of any combination thereof as a marker for detecting a hepatoblastoma cancer or a susceptibility to develop a hepatoblastoma cancer. Optionally, said miRNA can be used in combination with hsa-miR-885-5p.

The present invention relates to a method for detecting a hepatoblastoma cancer or a susceptibility to develop a hepatoblastoma cancer in a subject, comprising determining the level of a miRNA selected from the group consisting of hsa-miR-624-5p, hsa-miR-548z, hsa-let-7i-3p, hsa-miR-449b-3p or of any combination thereof in a biological sample from the subject, an under-expression of at least one of the miRNA in comparison with a healthy or non-tumoral control being indicative of a hepatoblastoma cancer or a susceptibility to develop a hepatoblastoma cancer. Optionally, said miRNA can be used in combination with hsa-miR-885-5p.

The present invention also relates to the use of a miRNA selected from the group consisting of hsa-miR-624-5p, hsa-miR-548z, hsa-let-7i-3p, hsa-miR-449b-3p or of any combination thereof as a marker for the prognosis in a subject having a hepatoblastoma cancer. The present invention also relates to a method for determining the prognosis in a subject having a hepatoblastoma cancer, comprising determining the level of a miRNA selected from the group consisting of hsa-miR-548z, hsa-miR-624-5p, hsa-let-7i-3p, hsa-miR-449b-3p or of a combination thereof in a biological sample from the subject, the level of expression of said at least one of the miRNA being correlated with the clinical prognosis. Optionally, said miRNA can be used in combination with hsa-miR-885-5p.

Finally, the present invention relates to a kit or analytical tool for detecting a hepatoblastoma cancer or a susceptibility to develop a hepatoblastoma cancer in a subject or for selecting a subject suitable for a treatment by a molecule as disclosed herein or for determining the prognosis in a subject having a hepatoblastoma cancer, the kit comprising detection means specific for at least one miRNA selected from the group consisting of hsa-miR-624-5p, hsa-miR-548z, hsa-let-7i-3p, hsa-miR-449b-3p or for

any combination thereof. It relates to the use of the kit for detecting a hepatoblastoma cancer or a susceptibility to develop a hepatoblastoma cancer in a subject or for selecting a subject suitable for a treatment by a miRNA as disclosed herein or for determining the prognosis in a subject having a hepatoblastoma cancer. Optionally, said kit further comprises detection means specific for hsa-miR-885-5p.

Brief Description of the Drawings

Figure 1. Nine miRNAs negatively control beta-catenin protein expression in HBL cells. HuH6 cells were transfected by the corresponding small RNA or miRNA (as shown) and beta-catenin protein expression was measured by western blotting 3 days later. 9 (bars in light grey) out of 26 selected miRNAs significantly decreased beta-catenin protein expression (ANOVA: $p < 0.0001$; $n = 3$ to 6). Previous beta-catenin-regulating miR-200a-3p and miR-34a-5p (middle grey bars on the right) were also tested as a comparison. In this figure and the following, siCtrl RNA and si β -cat (siRNA against β -catenin) were used as negative and positive controls, respectively. Bars represent means, error bars represent standard error of the mean (SEM). The ANOVA test was followed by a Bonferroni's multiple comparison post-test: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

Figure 2. Seven miRNAs inhibit and one induces beta-catenin mRNA expression in HBL cells. HuH6 cells were transfected by the corresponding small RNA or miRNA (as shown) and beta-catenin mRNA expression was measured by RT-qPCR 3 days later. 8 miRNAs significantly modulated beta-catenin protein expression (ANOVA: $p < 0.0001$; $n = 3$ to 6). Bars represent means, error bars represent standard error of the mean (SEM). Bonferroni's multiple comparison post-test: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

Figure 3. The nine miRNAs negatively control beta-catenin protein expression in a second HBL cell line. HepG2 cells were transfected by the corresponding small RNA or miRNA (as shown). Then wild-type (WT Exon 3; A) and exon-3 deleted (Δ Exon3; B) beta-catenin protein expression was measured by western blotting 3 days later. The 9 miRNAs significantly and strongly decreased wild-type beta-catenin protein (Panel A; ANOVA: $p < 0.001$; $n = 3$), while only 4 significantly decreased mutated beta-catenin protein (Panel B; ANOVA: $p < 0.001$; $n = 3$). Previous beta-catenin-regulating miR-200a-3p and miR-34a-5p (middle grey bars on the right) were also tested as a comparison. Bars represent means, error bars represent standard error of the mean (SEM). Bonferroni's multiple comparison post-test: ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

Figure 4. Effect of the nine miRNAs on the relative expression of wild-type (WT Exon 3; A) and exon 3-deleted (Δ Exon 3; B) beta-catenin proteins in a HBL patient-derived xenograft cell line. HBL-214-J cells were transfected by the corresponding small RNA or miRNA (as shown). 6 miRNAs significantly and strongly decrease wild-type beta-catenin protein, 1 increases it and one has no effect (Panel A; ANOVA: $p < 0.001$; $n = 3$). None of the 9 miRNAs modulate mutated beta-catenin protein

expression (Panel B; ANOVA: $p < 0.001$; $n=3$). Previous beta-catenin-regulating miR-200a-3p and miR-34a-5p (middle grey bars on the right) were also tested as a comparison and none had an effect on wild-type and mutated beta-catenin proteins. Bars represent means + SEM. Bonferroni's multiple comparison post-test: * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Figure 5. (A) Relative expression of miR-34a-5p and 6 beta-catenin-regulating miRNAs in 34 normal liver (NL) and 40 HBL tumors. Non-parametric two-tailed Mann-Whitney test for unpaired data: ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. **(B)** Relative expression of miR-34a-5p and 6 beta-catenin-regulating miRNAs in 33 normal liver (NL) and 36 HBL tumors. Non-parametric two-tailed Mann-Whitney test for unpaired data: ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Figure 6. Relative expression of miR-34a-5p and 6 beta-catenin-repressing miRNAs in 27 pairs of adjacent NL/HBL tumors. Non-parametric Wilcoxon matched-pairs signed rank test for paired data: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$.

Figure 7. Growth of HuH6 cells at Day 6 following transfection by the corresponding small RNA or miRNA (Sulforhodamine B cell growth assay). Bars represent means + SEM. See Figure 1 for controls. ANOVA test: $p < 0.001$ ($n=4$); Bonferroni's multiple comparisons test: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

Figure 8. Growth of HepG2 (left panel) or HBL-214-J (right panel) cells at Day 6 following transfection by the indicated small RNAs (Sulforhodamine B cell growth assay) Bars represent means + SEM. See Figure 1 for controls. ANOVA test: $p < 0.001$ ($n=3$). Bonferroni's multiple comparison post-test: ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

Figure 9. Cycling of HuH6 cells at Day 3 following transfection by the corresponding small RNA or miRNA (APC/BrdU Flow cell cycle assay). Bars represent means + SEM. See Figure 1 for controls. ANOVA test: $p < 0.001$ ($n=3$); Bonferroni's multiple comparisons test: * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

Figure 10. Apoptosis of HuH6 cells at Day 3 following transfection by the corresponding small RNA or miRNA (Tetramethylrhodamine, methyl ester – TMRM – assay). siCtrl RNA and etoposide (ETO) were used as negative and positive controls, respectively. si β -cat: siRNA against β -catenine. ANOVA test: $p < 0.001$ ($n=3$); Bonferroni's multiple comparisons test: ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

Figure 11. Percentage of HuH6 cells in senescence at Day 3 following transfection by the corresponding small RNA or miRNA (beta-galactosidase staining assay). siCtrl: negative control RNA. si β -cat: siRNA against β -catenine. ANOVA test: $p < 0.001$ ($n=4$); Bonferroni's multiple comparisons test: *** $p < 0.001$.

Figure 12. MiR-624-5p directly interacts with the 3' beta-catenin mRNA variants through the 3'-UTR. (A) Predicted interaction site between beta-catenin 3'-UTR and miR-624-5p. The two point mutations inserted in beta-catenin 3'-UTR are as shown. (B) Schematic representation of the three beta-catenin mRNA variants and localization of the predicted miR-624-5p site (thick line). (C) Huh6 cells expressing the GFP transgene bearing the wild-type (WT) or mutated (MUT) beta-catenin variant 3 3'-

UTR were transfected with a control RNA (Ctrl) or miR-624-5p. GFP expression was analyzed using the FunREG system (n=3, ANOVA p<0.001). (D) Relative expression of total beta-catenin mRNA and of each variant after Huh6 cells transfection with the indicated small RNAs (n=3, ANOVA p<0.001). Bars represent means \pm SEM. Bonferroni's multiple comparisons test: *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

Figure 13. MiR-624-5p inhibits several genes associated with the Wnt/beta-catenin signaling pathway. Huh6 cells were transfected with a control RNA (Ctrl), miR-624-5p or siRNA against β -catenine (si- β -catenin) and the relative expression of Wnt signaling-associated mRNA genes was measured. Genes down- (A, Top panel) or up- (B) regulated by miR-624-5p in Huh6 cells are as shown. Genes' variations in miR-624-5p-transfected Huh6 cells were compared to those observed in si- β -catenin-transfected Huh6 cells. Data are presented as Log2 fold-change ratio between miR-624-5p- or si- β -catenin- and Ctrl-transfected cells. Bars represented means \pm SEM (n=3, ANOVA p<0.001). Bonferroni's multiple comparisons test: *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

Figure 14. MiR-624-5p inhibits HBL tumor development *in vivo*. Huh6 cells were transfected with a control RNA (Ctrl) or miR-624-5p. 24 hours later, cells were collected and grafted on the chick CAM at day 10. The tumor growth was monitored from day 11 to day 16. (Figure 14A) Lanes 1 and 2: Representative pictures of tumors having grown on CAM (top panels; scale bars = 3mm) and after resection and formalin fixation (lane 2 panels; scale bars = 3mm) at days 13 and 16. Lane 3: Tumor sections stained by Hematoxylin eosin safran (HES, middle panels; scale bars = 100 μ m). Lanes 4 and 5: Ki67- (lane 4 panels) and beta-catenin- (bottom panels) immunostainings (scale bars = 100 μ m). (Figure 14B) One, 3 and 6 days after miR-624-5p- or Ctrl-transfected Huh6 cells implantation, tumors were resected and weighed. Bars represented means \pm SEM (n=3, ANOVA p<0.001). The total number of eggs analyzed in each group is indicated in brackets in graph bars. Bonferroni's multiple comparisons test: ***p<0.001.

Detailed Description of the Invention

The present invention relates to the identification of miRNAs repressing catenin-beta 1 (CTNNB1) expression and being useful for the treatment of pediatric liver cancer and/or for diagnosis of pediatric liver cancer and/or for prognosis of pediatric liver cancer.

Definition

Catenin-beta 1 (CTNNB1) is described in Uniprot under ID P35222 and has a Reference Sequence of mRNA NM_001098209 and a Reference Sequence of protein NP_001091679.

The term "identity" refers to a relationship between the sequences of two or more nucleic acid molecules, as determined by comparing the sequences. In the art, "identity" also means the degree of sequence relatedness between amino acid or nucleic acid molecule sequences, as the case may be, as

determined by the match between strings of nucleotide or amino acid sequences. “Identity” measures the percent of identical matches between two or more sequences with gap alignments addressed by a particular mathematical model or computer programs (i.e., “algorithms”).

Identity of related nucleic acid molecules can be readily calculated by known methods, including but not limited to those described in Computational Molecular Biology, Lesk, A. M., ed., Oxford University Press, New York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D. W., ed., Academic Press, New York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Part 1, Griffin, A. M., and Griffin, H. G., eds., Humana Press, New Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; and Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. and Devereux, J., eds., M. Stockton Press, New York, 1991; and Carillo, H., and Lipman, D., SIAM J. Applied Math., 48:1073 (1988).

Non-limiting methods for determining identity are designed to give the largest match between the sequences tested. Methods to determine identity are codified in publicly available computer programs. Preferred computer program methods to determine identity between two sequences include, but are not limited to, the GCG program package, including GAP (Devereux, et al., Nucleic Acids Research 12:387 [1984]; Genetics Computer Group, University of Wisconsin, Madison, Wis.), BLASTN, and FASTA (Atschul et al., J. Molec. Biol. 215:403-410 [1990]). The BLAST X program is publicly available from the National Center for Biotechnology Information (NCBI) and other sources (BLAST Manual, Altschul] et al., NCB NLM NIH Bethesda, Md. 20894; Altschul et al., J. Mol. Biol. 215:403-410 [1990]). The well-known Smith Waterman algorithm may also be used to determine identity.

Exemplary parameters for nucleic acid molecule sequence comparison include the following: Algorithm: Needleman and Wunsch, J. Mol Biol. 48:443-453 (1970); Comparison matrix: matches=+10, mismatch=0; Gap Penalty: 50; Gap Length Penalty: 3. The GAP program is also useful with the above parameters. The aforementioned parameters are the default parameters for nucleic acid molecule comparisons.

Other exemplary algorithms, gap opening penalties, gap extension penalties, comparison matrices, thresholds of similarity, etc. can be used by those of skill in the art, including those set forth in the Program Manual, Wisconsin Package, Version 9, September 1997. The particular choices to be made will depend on the specific comparison to be made, such as DNA to DNA or RNA to DNA; and additionally, whether the comparison is between given pairs of sequences (in which case GAP or BestFit are generally preferred) or between one sequence and a large database of sequences (in which case FASTA or BLASTA are preferred).

Identified miRNAs

hsa-miR-548z

The inventors identified miR-548z as a therapeutic agent against cancer, especially hepatoblastoma cancer.

Mature sequence of miR-548z: **CAAAAACCGCAAUUACUUUUGCA** (MIMAT0018446) (SEQ ID No 1)

Stem-loop pre-miRNA of miR-548z:

AAGUAUUAAGUUGGUGCAA**AAGUAAUUGAGAUUUUUGCUACUGAAAGUAAUGGCAAA**
AACCGCAAUUACUUUUGCACCAACCUAAUAGAUGCCAAUG (MI0016688) (SEQ ID No 2)

The seed sequence of miR-548z is encompassed in the sequence shown in bold highlighting. The mature miR-548z is underlined.

hsa-miR-624-5p

The inventors identified miR-624-5p as a therapeutic agent against cancer, especially hepatoblastoma cancer.

Mature sequence of miR-624-5p: **UAGUACCAGUACCUUGUGUUCA** (MIMAT0003293) (SEQ ID No 3)

Stem-loop pre-miRNA of miR-624-5p:

AAUGCUGUUUCAAGGU**UAGUACCAGUACCUUGUGUUCAGUGGAACCAAGGUA**AAACACA
AGGUAUUGGUAAU**ACCUUGAGAUAGCAUUACACC**UAAAGUG (MI0003638) (SEQ ID No 4)

The seed sequence of miR-624-5p is encompassed in the sequence shown in bold highlighting. The mature miR-624-5p is underlined.

hsa-let-7i-3p

The inventors identified let-7i-3p as a therapeutic agent against cancer, especially hepatoblastoma cancer.

Mature sequence of let-7i-3p: **CUGCGCAAGCUACUGCCUUGCU** (MIMAT0004585) (SEQ ID No 5)

Stem-loop pre-miRNA of let-7i-3p:

CUGGCUGAGGUAGUAGUUUGUGCUGUUGGUCGGGUUGUGACAUUGCCCGCUGUGGAG
AUAAC**CUGCGCAAGCUACUGCCUUGCU**A (MI0000434) (SEQ ID No 6)

The seed sequence of let-7i-3p is encompassed in the sequence shown in bold highlighting. The mature let-7i-3p is underlined.

hsa-miR-449b-3p

The inventors identified miR-449b-3p as a therapeutic agent against cancer, especially hepatoblastoma cancer.

Mature sequence of miR-449b-3p: **CAGCCACAACUACCCUGCCACU** (MIMAT0009203) (SEQ ID No 7)

Stem-loop pre-miRNA of miR-449b-3p:

UGACCUGAAUCAGGUAGGCAGUGUAUUGUUAGCUGGCUGCUUGGGUCAAGUCAG**CAG**
CCACAACUACCCUGCCACUUGCUUCUGGAUAAAUUCUUCU (MI0003673) (SEQ ID No 8)

The seed sequence of miR-449b-3p is encompassed in the sequence shown in bold highlighting. The mature miR-449b-3p is underlined.

hsa-miR-885-5p

The inventors identified miR-885-5p as a therapeutic agent against cancer, especially hepatoblastoma cancer.

Mature sequence of miR-885-5p: UCCAUU**ACACU**ACCCUGCCUCU (MIMAT0004947) (SEQ ID No 9)

Stem-loop pre-miRNA of miR-885-5p:

CCGCACUCUCU**UCCAUUACACU**ACCCUGCCUCUUCUCCAUGAGAGGCAGCGGGGUGUAG
UGGAUAGAGCACGGGU (MI0005560) (SEQ ID No 10)

The seed sequence of miR-885-5p is encompassed in the sequence shown in bold highlighting. The mature miR-885-5p is underlined.

The Accession numbers MI and MIMAT make reference to the miRBASE (www.mirbase.org/).

The microRNAs are well-known in the art and a person skilled in the art would understand that they include the conventional naturally occurring sequences (provided herein) but also any chemically modified versions and sequence homologues thereof. Chemically modified versions and sequence homologues of miRNAs are generally called miRNA mimic, analog or derivative. The miRNA mimic, analog or derivative has retained or enhanced activity of the original miRNA.

In one embodiment, the miRNA can be mature miRNA, precursor (pre)-miRNA, primary (pri)-miRNA, a miRNA mimic, analog or derivative thereof. As used herein, the prefix “hsa” indicates Homo sapiens or human. Even in its absence, all miRNA of the invention are human. Similarly, “miRNA” and “microRNA” can be identical and are substitutable.

The miRNA is a single-stranded nucleic acid molecule, especially a RNA molecule, of no more than 30 nucleotides in length, preferably no more than 25 bases in length, and generally about 21-23 nucleotides in length. It comprises a sequence which is identical or substantially identical to the seed sequence. By “substantially identical” is meant that at most 1 or 2 substitutions or deletions are allowed. In a preferred embodiment, it comprises a sequence identical to the seed sequence. The seed sequence usually corresponds to a sequence located between position 2 and position 9 of the mature miRNA. For instance, the seed sequence may consist in the sequence between position 2 and position 7, 8 or 9 of the mature miRNA. Preferably, the miRNA comprises, essentially consists in or consists in a sequence which is at least 80%, 85%, 90%, 95% or 99% identical to the respective full length sequence of the mature miRNA. In particular, the mature miRNA sequence is selected in the group consisting of SEQ ID Nos 1, 3, 5, 7 and 9, preferably selected in the group consisting of SEQ ID Nos 1, 3, 5, and 7. Optionally, the miRNA comprises, essentially consists in or consists in a sequence which is at least 80%, 85%, 90%, 95% or 99% identical to the respective full length sequence of the mature miRNA and comprises a sequence identical to the seed sequence.

The miRNAs as pre-miRNA, a precursor of mature miRNA, has a stem-loop sequence and comprises a guide strand comprising the mature miRNA, and more specifically the seed sequence, and a passenger strand which is complementary or substantially complementary to the seed sequence of the guide strand. Optionally, an alternative miRNA can be a double-stranded molecule comprising two separate strands as defined before instead of the stem-loop structure.

More particularly, the guide strand comprises a sequence which is identical or substantially identical to the seed sequence. By “substantially identical” is meant that at most 1 or 2 substitutions or deletions are allowed. Preferably, the guide strand comprises a sequence which is at least 80%, 85%, 90%, 95% or 99% identical to the respective full length sequence of the mature miRNA. In particular, the mature miRNA sequence is selected in the group consisting of SEQ ID Nos 1, 3, 5, 7 and 9, preferably selected in the group consisting of SEQ ID Nos 1, 3, 5, and 7. Optionally, the guide strand of the miRNA comprises a sequence which is at least 80%, 85%, 90%, 95% or 99% identical to the guide strand of pre-miRNA as disclosed in a sequence selected in the group consisting of SEQ ID Nos 2, 4, 6, 8 and 10, preferably selected in the group consisting of SEQ ID Nos 2, 4, 6, and 8. In a particular embodiment, the guide strand of the miRNA comprises, essentially consists in or consists in a sequence of the guide strand of pre-miRNA as disclosed in a sequence selected in the group consisting of SEQ ID Nos 2, 4, 6, 8 and 10, preferably selected in the group consisting of SEQ ID Nos 2, 4, 6, and 8.

By “substantially complementary” is intended that at most 1 or 2 mismatches and/or deletions are allowed. Preferably, the passenger strand comprises a sequence which is at least 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% or 95% identical to the complement of the respective full length sequence of the mature miRNA. In particular, the mature miRNA sequence is selected among the SEQ ID Nos 1, 3, 5, 7 and 9, preferably selected in the group consisting of SEQ ID Nos 1, 3, 5, and 7. Optionally, the passenger strand of the miRNA comprises a sequence which is at least 80%, 85%, 90%, 95% or 99% identical to the passenger strand of pre-miRNA as disclosed in a sequence selected in the group consisting of SEQ ID Nos 2, 4, 6, 8 and 10, preferably selected in the group consisting of SEQ ID Nos 2, 4, 6, and 8. In a particular embodiment, the passenger strand of the miRNA comprises, essentially consists in or consists in a sequence of the passenger strand of pre-miRNA as disclosed in a sequence selected in the group consisting of SEQ ID Nos 2, 4, 6, 8 and 10, preferably selected in the group consisting of SEQ ID Nos 2, 4, 6, and 8.

In some embodiments, the miRNA is between 17 and 30 nucleotides in length, preferably 22-23 nucleotides in length, and comprises (i) a microRNA region having a sequence from 5' to 3' that is at least 80 % identical to at least one of SEQ ID Nos 1, 3, 5, 7 and 9, preferably SEQ ID Nos 1, 3, 5, and 7; and (ii) a complementary region having a sequence from 5' to 3' that is 60-100 % complementary to the microRNA region. Preferably, the microRNA region has a sequence that is at least 80, 85, 90, 95 or 100 % identical to at least one of SEQ ID Nos 1, 3, 5, 7 and 9, preferably SEQ ID Nos 1, 3, 5, and 7. Preferably, the miRNA comprises a hairpin structure.

Alternatively, the miRNA is between 17 and 30 nucleotides in length, preferably 22-23 nucleotides in length, and comprises (i) a first polynucleotide having a sequence from 5' to 3' that is at least 80 % identical to at least one of SEQ ID Nos 1, 3, 5, 7 and 9, preferably SEQ ID Nos 1, 3, 5, and 7; and (ii) a second separate polynucleotide having a sequence that is 60-100 % complementary to the first polynucleotide. Preferably, the microRNA region has a sequence that is at least 80, 85, 90, 95 or 100 % identical to at least one of SEQ ID Nos 1, 3, 5, 7 and 9, preferably SEQ ID Nos 1, 3, 5, and 7.

The miRNA can include some chemical modifications, in particular for increasing its stability, resistance to degradation and/or its cellular uptake.

If desired, microRNA molecules may be modified to stabilize the miRNAs against degradation, to enhance half-life, or to otherwise improve efficacy. Desirable modifications are described, for example, in US20070213292, US20060287260, US20060035254, US20060008822, WO2015131115, US2016053264, WO2010144485 and US20050288244, each of which is hereby incorporated by reference in its entirety. For increased nuclease resistance and/or binding affinity to the target, the miRNA can include 5' cap, 3' cap, backbone modifications, ribose modifications, mismatch, as well as nucleobase modifications.

Ribose modifications include 2'-O-methyl, 2'-O-methoxy, 2'-O-fluorine, 2'-O-methoxyethyl, 2'-O-aminopropyl, 2'-amino.

Backbone modifications include phosphorothioate linkages or morpholinos.

The inclusion of pyranose sugars in the oligonucleotide backbone can also decrease endonucleolytic cleavage. In another alternative, the 3'-terminus can be blocked with an aminoalkyl group. Other 3' conjugates can inhibit 3'-5' exonucleolytic cleavage. While not being bound by theory, a 3' may inhibit exonucleolytic cleavage by sterically blocking the exonuclease from binding to the 3' end of the oligonucleotide. Even small alkyl chains, aryl groups, or heterocyclic conjugates or modified sugars (D-ribose, deoxyribose, glucose etc.) can block 3'-5'-exonucleases.

The 5' cap refers to at least one modified nucleotide that block 5'OH or 5' phosphate at the 5' terminus. Preferably, the modification can be selected among an amine group, biotin, a lower alkylamine group, NHCOCH_3 , an acetyl group, 2' oxygen-methyl (2'OMe), 4' thionucleotide, phosphorothioate linkage, abasic residue, inverted nucleotide or inverted abasic moiety, phosphorodithioate monophosphate and methylphosphonate moiety..

Modified bases include other synthetic and natural nucleobases such as 5-methylcytosine (5-me-C), 5-hydroxymethyl cytosine, xanthine, hypoxanthine, 2-aminoadenine, 6-methyl and other alkyl derivatives of adenine and guanine, 2-propyl and other alkyl derivatives of adenine and guanine, 2-thiouracil, 2-thiothymine and 2-thiocytosine, 5-halouracil and cytosine, 5-propynyl uracil and cytosine and other alkynyl derivatives of pyrimidine bases, 6-azo uracil, cytosine and thymine, 5-uracil (pseudouracil), 4-thiouracil, 8-halo, 8-amino, 8-thiol, 8-thioalkyl, 8-hydroxyl and other 8-substituted adenines and guanines, 5-halo (including 5-bromo, 5-trifluoromethyl and other 5-substituted uracils

and cytosines), 7-methylguanine and 7-methyladenine, 2-F-adenine, 2-amino-adenine, 8-azaguanine and 8-azaadenine, 7-deazaguanine and 7-deazaadenine and 3-deazaguanine and 3-deazaadenine.

More preferably, the guide strand of pre-miRNA or mature miRNA can include 2'-fluorine modifications while the passenger strand can include 2'-O-methyl modifications.

In some embodiments, the miRNA comprises one or more of the following (i) a replacement group for phosphate or hydroxyl of the nucleotide at the 5' terminus of the complementary strand or passenger strand (5' cap); (ii) one or more sugar modifications in the first or last 1-6 residues of the complementary strand or passenger strand; or (iii) non-complementarity between one or more nucleotides in the last 1-5 residues at the 3' end of the complementary strand or passenger strand and the corresponding nucleotides of the microRNA region or guide strand.

In some specific embodiments, the miRNA comprises a fully complementary passenger strand comprising (i) modified nucleotides in the first and last two nucleotides of the passenger strand, and/or (ii) a terminal modification of the nucleotide at the 5' end.

In some specific embodiments, the passenger strand comprises modified nucleotides and fewer than half of the total number of nucleotides in the passenger are modified nucleotides. For instance, 2-10, 4-8 or 5-7 nucleotides in the passenger are modified nucleotides. In a particular embodiment, the modified nucleotides are selected from the group consisting of the two-three first and the two last nucleotides of the passenger strand.

In some specific embodiments, the guide strand comprises at least one or two modified nucleotides. Preferably, the guide strand does not comprise modified nucleotides in the first two positions at the 5' end of the guide strand and/or in the last two positions at the 3' end of the guide strand.

In a particular embodiment of the present invention, the microRNA molecules may comprise alternate stretches or portions of nucleotides with 2'-O-methyl modifications and stretches or portions of nucleotides without the modification. By "alternate stretches or portions" it is meant that, when considering the double-stranded RNA molecule, for each pair of nucleotides, at least one nucleotide of the pair, preferably only one, has a 2'-O-methyl modification. The length of the stretches/portions can vary from 1 to 7 consecutive nucleotides. Accordingly, just for illustrating this aspect, the mature miRNA may present one of the following structures:

Sens 5' NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN 3'
 Antisense 3' NNNNNNNNNNNNNNNNNNNN 5'

or

Sens 5' NNNNNNNNNNNNNNNNNNNN 3'
 Antisense 3' NNNNNNNNNNNNNN 5'

or

Sens 5' NNNNNNNNNNNNNNNNNNNN 3'
 Antisense 3' NNNNNNNNNNNNNNNNNNNN 5'

wherein N refers to a nucleotide having 2'-O-methyl modification.

In an alternative embodiment of the present invention, the microRNA molecules may comprise stretches or portions of nucleotides with 2'-O-methyl modifications. In this embodiment, when considering the double-stranded RNA molecule, both nucleotide of the pair have 2'-O-methyl modifications. The length of the stretches/portions can vary from 1 to 7 consecutive nucleotides. Accordingly, just for illustrating this aspect, the mature miRNA may present one of the following structures:

Sens 5' NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN 3'
 Antisense 3' NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN 5'

or

Sens 5' NNNNNNNNNNNNNNNNNNNN 3'
 Antisense 3' NNNNNNNNNNNNNNNNNNNN 5'

or

Sens 5' NNNNNNNNNNNNNNNNNN 3'
 Antisense 3' NNNNNNNNNNNNNNNNNN 5'

wherein N refers to a nucleotide having 2'-O-methyl modification.

In addition, the miRNA can present a modification at one or both 3' ends, preferable a modified sugar.

A specific example of modified sugar is Triantennary N-acetyl galactosamine (GalNAC₃).

Preferably, when a molecule increasing the cellular uptake such as cholesterol or tocopherol is linked to the miRNA, the molecule is linked to the passenger strand of the pre-miRNA. In addition, the miRNA may be linked to a moiety allowing the targeting of the liver.

In another aspect, the disclosure provides a nucleic acid molecule or any modified molecule derivatives encoding or leading to a miRNA as disclosed above and a recombinant expression vector comprising a recombinant nucleic acid sequence operatively linked to an expression control sequence, wherein expression of the recombinant nucleic acid sequence provides a miRNA sequence, a precursor miRNA sequence, or a primary miRNA sequence as described herein. The resulting sequence (e.g., primary or precursor miRNAs) can optionally be further processed to provide the miRNA sequence. In embodiments, the recombinant expression vector comprises at least one sequence selected from the group consisting of SEQ ID Nos 1-10, preferably of SEQ ID Nos 1-8. Any suitable expression vector can be used such as, for example, a DNA vector (e.g., viral vector, plasmid, etc.). In some embodiments the expression vector is selected for expression in a eukaryotic cell such as, for example, a mammalian cell. One of skill in the art will be able to select an appropriate vector based on the particular application and/or expression system to be employed. In a further aspect, the expression cassette is comprised in a viral vector, or plasmid DNA vector or other therapeutic nucleic acid vector or delivery vehicle, including liposomes and the like.

miRNA therapeutic uses.

The miRNA miR-548z, miR-624-5p, let-7i-3p, miR-449b-3p, miR-885-5p and any combination thereof as disclosed above can be used for treating a hepatoblastoma. The present disclosure also relates a pharmaceutical composition comprising miR-548z, miR-624-5p, let-7i-3p, miR-449b-3p, miR-885-5p and any combination thereof.

For instance, the miRNA can be selected in the group consisting of miR-548z, miR-624-5p, let-7i-3p, miR-449b-3p, miR-885-5p and any combination of two, three, four or five miRNA. In a particular aspect, the miRNA can be selected in the group consisting of miR-548z, miR-624-5p, let-7i-3p, miR-449b-3p, and any combination of two, three, or four miRNA.

In particular, the combination may include at least miR-548z and 1-4 miRNA selected among miR-624-5p, let-7i-3p, miR-449b-3p, and miR-885-5p, e.g., miR-548z and miR-624-5p; miR-548z and let-7i-3p; miR-548z and miR-449b-3p; miR-548z and miR-885-5p; miR-548z, miR-624-5p, and let-7i-3p; miR-548z, miR-624-5p, and miR-449b-3p; miR-548z, miR-624-5p, and miR-885-5p; miR-548z, let-7i-3p, and miR-449b-3p; miR-548z, let-7i-3p, and miR-885-5p; miR-548z, miR-449b-3p and miR-885-5p; miR-548z, miR-624-5p, let-7i-3p and miR-449b-3p; miR-548z, miR-624-5p, let-7i-3p and miR-885-5p; miR-548z, let-7i-3p, miR-449b-3p and miR-885-5p; and miR-548z, miR-624-5p, let-7i-3p, miR-449b-3p and miR-885-5p. The combination can further comprise an additional miRNA, for instance miR-34a.

In another particular aspect, the combination may include at least miR-624-5p and 1-4 miRNA selected among miR-548z, let-7i-3p, miR-449b-3p, and miR-885-5p, e.g., miR-624-5p and let-7i-3p; miR-624-5p and miR-449b-3p; miR-624-5p and miR-885-5p; miR-624-5p, let-7i-3p and miR-449b-3p; miR-624-5p, let-7i-3p and miR-885-5p; miR-624-5p, miR-449b-3p and miR-885-5p; and miR-624-5p, let-7i-3p, miR-449b-3p and miR-885-5p. The combination can further comprise an additional miRNA, for instance miR-34a.

In an additional particular aspect, the combination may include at least let-7i-3p and 1-4 miRNA selected among miR-548z, miR-624-5p, miR-449b-3p, and miR-885-5p, e.g., let-7i-3p and miR-449b-3p; let-7i-3p and miR-885-5p; and let-7i-3p, miR-449b-3p and miR-885-5p.

In a further particular aspect, the combination may include at least miR-449b-3p and 1-4 miRNA selected among miR-548z, miR-624-5p, let-7i-3p, and miR-885-5p, e.g., miR-449b-3p and miR-885-5p. The combination can further comprise an additional miRNA, for instance miR-34a.

In a further particular aspect, the combination may include at least miR-885-5p and 1-4 miRNA selected among miR-548z, miR-624-5p, let-7i-3p, and miR-449b-3p. The combination can further comprise an additional miRNA, for instance miR-34a.

The miRNA and any combination thereof can be used for treating a hepatoblastoma. Their use for the treatment of other specific solid cancers with or without liver involvement can also be contemplated, in particular breast, colorectal, esophageal, lung, melanoma, pancreatic, stomach, ovaries, neuroendocrine, uterus, CNS (central nervous system) and brain cancer.

The subject can be a child. Preferably, the liver cancer is a hepatoblastoma and the subject is a child. In a particular aspect, the subject does not respond to the first line treatment and/or is not suitable for tumor resection or ablation.

Optionally, the miRNA or combination thereof can be used in combination with one or more therapeutic agents, especially any antitumor treatment. Optionally, the miRNA is to be used in combination with resection, radiofrequency ablation and/or percutaneous ethanol injection. Optionally, the molecule is to be used after or before resection, radiofrequency ablation and/or percutaneous ethanol injection. Optionally, the miRNA is to be used in combination with a chemotherapy. Accordingly, the present invention relates to a pharmaceutical composition comprising one or several miRNA selected from the group consisting of hsa-miR-548z, hsa-miR-624-5p, hsa-let-7i-3p, hsa-miR-449b-3p, hsa-miR-885-5p or any combination thereof and another drug, in particular an antitumor drug. It also relates to a product comprising one or several miRNA selected from the group consisting of hsa-miR-548z, hsa-miR-624-5p, hsa-let-7i-3p, hsa-miR-449b-3p, hsa-miR-885-5p or combination thereof and another drug, in particular an antitumor drug, as a combined preparation for simultaneous, separate or sequential use, preferably for treating a solid cancer, in particular a hepatoblastoma. In a particular aspect, the miRNA can be selected in the group consisting of miR-548z, miR-624-5p, let-7i-3p, miR-449b-3p, and any combination of two, three, or four miRNA.

The antitumor drug can be selected from the group consisting of an inhibitor of topoisomerases I or II, a DNA crosslinker, a DNA alkylating agent, an anti-metabolic agent and inhibitors of the mitotic spindles. It can also be an immunotherapy. It can be selected among doxorubicin, cisplatin, carboplatin, gemcitabine, oxaliplatin, mitomycin C, tamoxifen, paclitaxel, larotaxel, taxol, lapatinib, docetaxel, methotrexate, capecitabine, vinorelbine, cyclophosphamide, gemcitabine, amrubicin, cytarabine, etoposide, camptothecin, dexamethasone, dasatinib, tipifarnib, bevacizumab, sirolimus, temsirolimus, everolimus, lonafarnib, cetuximab, erlotinib, gefitinib, imatinib mesylate, rituximab, trastuzumab, nocodazole, sorafenib, sunitinib, bortezomib, MSC2156119J, alemtuzumab, gemtuzumab, tositumomab or ibritumomab or any combination thereof. In a preferred embodiment, the antitumor drug is cisplatin or doxorubicin, in particular for use in the treatment of a hepatoblastoma.

Optionally, the molecule is to be used in combination with another antitumor therapy and a drug lowering/decreasing the toxicity and side effects of the antitumor therapy. For instance, the drug lowering the toxicity and side effects of the antitumor therapy can be sodium thiosulfate or N-acetyl cysteine. In a specific aspect, the molecule is to be used in combination with cisplatin and, sodium thiosulfate or N-acetyl cysteine. In a specific aspect, the molecule is to be used in combination with doxorubicin and, sodium thiosulfate or N-acetyl cysteine.

Inhibitors of topoisomerases I and/or II include, but are not limited to, etoposide, topotecan, camptothecin, irinotecan, amsacrine, intoplicin and anthracyclines such as doxorubicin, epirubicin,

daunorubicin, idarubicin and mitoxantrone. Inhibitors of Topoisomerase I and II include, but are not limited to, intoplicin.

DNA crosslinkers include, but are not limited to, cisplatin, carboplatin and oxaliplatin. In a preferred embodiment, the DNA crosslinker is cisplatin.

Anti-metabolic agents block the enzymes responsible for nucleic acid synthesis or become incorporated into DNA, which produces an incorrect genetic code and leads to apoptosis. Non-exhaustive examples thereof include, without limitation, folic acid antagonists, pyrimidine analogs, purine analogs and adenosine deaminase inhibitors, and more particularly Methotrexate, Floxuridine, Cytarabine, 6-Mercaptopurine, 6- Thioguanine, Fludarabine phosphate, Pentostatine, 5-fluorouracil, gemcitabine and capecitabine.

The DNA-damaging anti-tumoral agent can be alkylating agents including, without limitation, nitrogen mustards, ethylenimine derivatives, alkyl sulfonates, nitrosoureas, metal salts and triazenes. Non-exhaustive examples thereof include Uracil mustard, Chlormethine, Cyclophosphamide (CYTOXAN(R)), Ifosfamide, Melphalan, Chlorambucil, Pipobroman, Triethylenemelamine, Triethylenethiophosphoramine, Busulfan, Carmustine, Lomustine, cisplatin, carboplatin, oxaliplatin, thiotepa, Streptozocin, Dacarbazine, and Temozolomide.

The therapeutic agent can also be an immunotherapeutic drug. The term “immunotherapy” or “immunotherapeutic drug” refers to a cancer therapeutic treatment with therapeutic antibodies. In particular, antibodies are directed against specific antigens such as the unusual antigens that are presented on the surface of tumors or targeting immune system checkpoints (e.g. immune checkpoint inhibitors). Preferably, therapeutic antibodies functions to deplete tumor cells in a patient. In particular, therapeutic antibodies specifically bind to antigens present on the surface of the tumor cells, e.g. tumor specific antigens present predominantly or exclusively on tumor cells. Alternatively, therapeutic antibodies may also prevent tumor growth by blocking specific cell receptors.

The immunotherapeutic drug may target multiple elements of the immune pathway: a therapy that enhances tumor antigen presentation; a therapy that inhibits negative immune regulation e.g., by inhibiting CTLA-4 and/or PD1/PD-L1/PD-L2 pathway and/or depleting or blocking Tregs or other immune suppressing cells; a therapy that stimulates positive immune regulation, e.g., with agonists that stimulate the CD- 137, OX-40, and/or GITR pathway and/or stimulate T cell effector function; a therapy that increases systemically the frequency of anti-tumor T cells; a therapy that depletes or inhibits Tregs, such as Tregs in the tumor, e.g., using an antagonist of CD25 (e.g., daclizumab) or by ex vivo anti-CD25 bead depletion; a therapy that impacts the function of suppressor myeloid cells in the tumor; a therapy that enhances immunogenicity of tumor cells (e.g., anthracyclines); adoptive T cell or NK cell transfer including genetically modified cells, e.g., cells modified by chimeric antigen receptors (CAR-T therapy); a therapy that inhibits a metabolic enzyme such as indoleamine dioxigenase (IDO), dioxigenase, arginase, or nitric oxide synthetase; a therapy that reverses/prevents T cell anergy or exhaustion; a therapy that triggers an innate immune activation and/or inflammation at a

tumor site; administration of immune stimulatory cytokines; or blocking of immunorepressive cytokines.

In a preferred embodiment, the immunotherapeutic drug is a drug targeting PD-1 or PD-L1. The PD-1/PD-L1 agent is preferably selected from the group consisting of Nivolumab (Opdivo, Bristol-Myers Squibb), Pembrolizumab (Keytruda, MK-3475, Merck), Pidilizumab (CT-011, Cure Tech), BMS 936559 (Bristol Myers Squibb), atezolizumab or MPDL3280A (Roche), and a combination thereof.

In a particular aspect of the present invention, the combined association of one or several miRNA as disclosed herein with another antitumor drug can allow the use of a lower/decreased amount of the other antitumor drug that could result in a reduction of the adverse effects and toxicity. In particular, the amount of the other antitumor drug can be a sub-therapeutic amount. More specifically, the other antitumor drug is used at lower dosage than the conventional dosage used in chemotherapy for the same indication and the same administration route when it is used alone (i.e., an amount equal to or preferably lower than the one used in conventional chemotherapy), also called herein a sub-therapeutic amount. More particularly, the amount can be for instance 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 20 or 10 % of the conventional therapeutic dosage (in particular for the same indication and the same administration route). The conventional therapeutic dosages are those acknowledged by the drug approvals agencies (e.g., FDA or EMEA) and can be found in reference Manuals such as Merck Manuals (www.merck.com/mmpe/lexicomp/). Alternatively, instead of lowering the amount or dosage of the other antitumor drug, the administration frequency of the other antitumor drug or its treatment period can be reduced. For instance, the treatment period may be reduced, for instance by 90, 80, 70, 60 or 50%. Alternatively, the interval between treatments with the other antitumor drug can be increased, for instance by 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 or 100% or by 1.5, 2, 2.5 or 3 fold.

The present invention relates to a method of treating a patient with a hepatoblastoma cancer comprising (a) administering to the patient a therapeutically effective amount of a molecule selected from the group consisting of hsa-miR-548z, hsa-miR-624-5p, hsa-let-7i-3p, hsa-miR-449b-3p, hsa-miR-885-5p or any combination thereof or a DNA or RNA encoding for said miRNA; and (b) administering a second therapy, wherein the molecule sensitizes the patient to the second therapy. Preferably, the second therapy is another antitumor drug. Preferably, the other antitumor drug is cisplatin or doxorubicin. Optionally, the other antitumor drug is administered in a sub-therapeutic amount. Optionally, the miRNA can be selected in the group consisting of miR-548z, miR-624-5p, let-7i-3p, miR-449b-3p, and any combination of two, three, or four miRNA.

miRNAs, pharmaceutical compositions, or products of the invention can be used in humans with existing cancer or tumour, including at early or late stages of progression of the cancer. The miRNAs, pharmaceutical compositions, or products of the invention will not necessarily cure the patient who has the cancer but will delay or slow the progression or prevent further progression of the disease, ameliorating thereby the patients' condition or survival. In particular, the miRNAs, pharmaceutical compositions, or products of the invention reduce the development of tumors, reduce tumor burden,

produce tumor regression in a mammalian host and/or prevent metastasis occurrence and cancer relapse. In treating the cancer, the pharmaceutical composition of the invention is administered in a therapeutically effective amount. Accordingly, as used herein, the term “treatment”, “treat” or “treating” refers to any act intended to ameliorate the health status of patients such as therapy, prevention, prophylaxis and retardation of the disease. In certain embodiments, such term refers to the amelioration or eradication of a disease or symptoms associated with a disease. In other embodiments, this term refers to minimizing the spread or worsening of the disease resulting from the administration of one or more therapeutic agents to a subject with such a disease. More particularly, the treatment may reduce the development of tumors, reduce tumor burden, produce tumor regression in a mammalian host and/or prevent metastasis occurrence and cancer relapse.

By "effective amount" or “therapeutically effective” it is meant the quantity of the pharmaceutical composition of the invention which prevents, removes or reduces the deleterious effects of the treated disease in mammals, including humans. It is understood that the administered dose may be adapted by those skilled in the art according to the patient, the pathology, the mode of administration, etc. For instance, the effective amount can be the amount necessary for decreasing or repressing the expression of CTNNB1 gene, e.g., by at least 10, 20, 30, 40 or 50 % in comparison to the expression in a normal tissue. Alternatively, the effective amount can be the amount necessary for decreasing the tumour growth, inducing tumour regression, decreasing, slowing or preventing the occurrence of metastasis and/or cancer relapse, and/or reducing the development of tumors. For example, a miRNA may be administered in dosages between about 0.01 and 100 mg/kg of body weight (e.g., 1, 5, 10, 20, 25, 50, 75, and 100 mg/kg). In other embodiments, the dosage ranges from between about 10 and 500 mg/m²/day. The miRNA can be administered 1, 2, 3, 4, 5, 6, or 7 times by week.

The pharmaceutical composition of the invention can comprise a pharmaceutically acceptable carrier. Pharmaceutically acceptable carriers are covalently or non-covalently bound, admixed, encapsulated, conjugated, operably-linked, or otherwise associated with the miRNA such that the pharmaceutically acceptable carrier increases the cellular uptake, stability, solubility, half-life, binding efficacy, specificity, targeting, distribution, absorption, or renal clearance of the miRNA. Pharmaceutically acceptable carriers of the invention are viral and non-viral miRNA delivery systems/mechanisms that increase uptake of the miRNA by targeted cells. For example, pharmaceutically acceptable carriers of the invention are liposomes, lipids, for example cationic lipids, anionic lipids, amphoteric lipids or uncharged lipids, cationic polymers, polymers, hydrogels, micro- or nano-capsules (biodegradable), microspheres (optionally bioadhesive), cyclodextrins, proteinaceous vectors, or any combination of the preceding elements. Moreover, pharmaceutically acceptable carriers that increase cellular uptake can be modified with cell-specific proteins or other elements such as receptors, ligands, antibodies to specifically target cellular uptake to a chosen cell type. The person skilled in the art has several delivery means available as shown for instance by Zhang et al (2013, J Control Release, **172**, 962-974), Garzon et al (2010, Nat Rev Drg Discov, **9**, 775-789), and Zhao et al (2009, Exp. Opin. Drug

Deliv. 6:673–686). More preferably, the delivery system can be selected among the lipid-based delivery system, the PEI (polyethylenimine)-based delivery system, dendrimers, PLGA (poly(lactide-co-glycolide)) particles, WO15023775, and the like.

In one aspect, the pharmaceutically acceptable carriers will protect the miRNA against rapid elimination from the body, such as a controlled release formulation, including implants and microencapsulated delivery systems. Biodegradable, biocompatible polymers can be used, such as ethylene vinyl acetate, polyanhydrides, polyglycolic acid, collagen, polyorthoesters, and polylactic acid. Methods for preparation of such formulations will be apparent to those skilled in the art. The materials can also be obtained commercially from Alza Corporation and Nova Pharmaceuticals, Inc. Examples of materials which can form hydrogels include polylactic acid, polyglycolic acid, PLGA polymers, alginates and alginate derivatives, gelatin, collagen, agarose, natural and synthetic polysaccharides, polyamino acids such as polypeptides particularly poly(lysine), polyesters such as polyhydroxybutyrate and poly-epsilon.-caprolactone, polyanhydrides; polyphosphazines, poly(vinyl alcohols), poly(alkylene oxides) particularly poly(ethylene oxides), poly(allylamines)(PAM), poly(acrylates), modified styrene polymers such as poly(4-aminomethylstyrene), pluronic polyols, polyoxamers, poly(uronic acids), poly(vinylpyrrolidone) and copolymers of the above, including graft copolymers.

Liposomal suspensions (including liposomes targeted to infected cells with monoclonal antibodies to viral antigens) can also be used as pharmaceutically acceptable carriers. These can be prepared according to methods known to those skilled in the art, for example, as described in U.S. Pat. No. 4,522,811.

Pharmaceutically acceptable carriers are cationic lipids that are bound or associated with miRNA. Alternatively, or in addition, miRNAs are encapsulated or surrounded in cationic lipids, e.g. liposomes, for in vivo delivery. Exemplary cationic lipids include, but are not limited to, N-[1-(2,3-dioleoyloxy)propyl]-N,N,N-trimethylammonium chloride (DOTMA); 1,2-bis(oleoyloxy)-3-(3-(trimethylammonium)propane) (DOTAP), 1,2-bis(dimyristoyloxy)-3-(3-(trimethylammonium)propane) (DMTAP); 1,2-dimyristoyloxypropyl-3-dimethylhydroxyethylammonium bromide (DMRIE); dimethyldioctadecylammonium bromide (DDAB); 3-(N-(N',N'-dimethylaminoethane)carbamoyl)cholesterol (DC-Choi); 3 beta-[N',N'-diguanyldiethylaminoethane)carbamoyl]cholesterol (BGTC); 2-(2-(3-(bis(3-aminopropyl)amino)propylamino)acetamido)-N,N-ditetradecylacetamide (RPR209120); pharmaceutically acceptable salts thereof, and mixtures thereof. Further exemplary cationic lipids include, but are not limited to, 1-dialkenoyl-sn-glycero-3-ethylphosphocholines (EPCs), such as 1-dioleoyl-sn-glycero-3-ethylphosphocholine, 1,2-distearoyl-sn-glycero-3-ethylphosphocholine, 1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-ethylphosphocholine, pharmaceutically acceptable salts thereof, and mixtures thereof.

Exemplary polycationic lipids include, but are not limited to, tetramethyltetrapalmitoyl spermine (TMTPS), tetramethyltetraoleyl spermine (TMTOS), tetramethyltetralauryl spermine (TMTLS), tetramethyltetramyristyl spermine (TMTMS), tetramethyldioleyl spermine (TMDOS), pharmaceutically acceptable salts thereof, and mixtures thereof. Further exemplary polycationic lipids include, but are not limited to, 2,5-bis(3-aminopropylamino)-N-(2-(dioctadecylamino)-2-oxoethyl)pentanamide (DOGS); 2,5-bis(3-aminopropylamino)-N-(2-(di(Z)-octadeca-9-dienylamino)-2-oxoethyl) pentanamide (DOGS-9-en); 2,5-bis(3-aminopropylamino)-N-(2-(di(9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienylamino)-2-oxoethyl)pentanamide (DLinGS); 3-beta-(N4-(N 1, Nd-dicarbobenoxyspermidine)arabamoychole-sterol (GL-67); 1,3-dioleoyloxy-2-(6-carboxyspermyl)-propyl amide (DOSPER); N-(2-([N(2),N(5)-bis(3-aminopropyl)ornithyl]amino)ethyl)-N,N-dimethyl-2,3-bis[(9Z)-octadec-9-en-1-yloxy]propan-1-aminium trifluoroacetate (DOSPA); pharmaceutically acceptable salts thereof, and mixtures thereof. Examples of cationic lipids are described in U.S. Pat. Nos. 4,897,355; 5,279,833; 6,733,777; 6,376,248; 5,736,392; 5,334,761; 5,459,127; 2005/0064595; U.S. Pat. Nos. 5,208,036; 5,264,618; 5,279,833; 5,283,185; 5,753,613; and 5,785,992.

Pharmaceutically acceptable carriers of the invention also include non-cationic lipids, such as neutral, zwitterionic, and anionic lipids. Exemplary non-cationic lipids include, but are not limited to, 1,2-Dilauroyl-sn-glycerol (DLG); 1,2-Dimyristoyl-snglycerol (DMG); 1,2- Dipalmitoyl-sn-glycerol (DPG); 1,2-Distearoyl-sn-glycerol (DSG); 1,2-Dilauroyl-sn-glycero-3- phosphatidic acid (sodium salt; DLPA); 1,2-Dimyristoyl-snglycero-3-phosphatidic acid (sodium salt; DMPA); 1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3- phosphatidic acid (sodium salt; DPPA); 1,2-Distearoyl-sn-glycero-3-phosphatidic acid (sodium salt; DSPA); 1,2-Diarachidoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DAPC); 1,2-Dilauroyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DLPC); 1,2-Dimyristoyl- sn-glycero-3- phosphocholine (DMPC); 1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-0-ethyl-3- phosphocholine (chloride or triflate; DPePC); 1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DPPC); 1,2-Distearoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (DSPC); 1,2-Dilauroyl-sn-glycero-3- phosphoethanolamine (DLPE); 1,2-Dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine (DMPE); 1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine (DPPE); 1,2-Distearoyl-sn-glycero-3- phosphoethanolamine (DSPE); 1,2-Dilauroyl-sn-glycero-3-phosphoglycerol (sodium salt; DLPG); 1,2-Dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphoglycerol (sodium salt; DMPG); 1,2-Dimyristoyl-sn- glycero-3-phospho-sn-1-glycerol (ammonium salt; DMP-snl -G); 1,2-Dipalmitoyl-sn-glycero- 3-phosphoglycerol (sodium salt; DPPG); 1,2- Distearoyl-sn-glycero-S-phosphoglycerol (sodium salt; DSPG); 1,2-Distearoyl-snglycero-3-phospho-sn-1-glycerol (sodium salt; DSP- sn-1-G); 1,2-Dipalmitoyl-snglycero-3-phospho-L-serine (sodium salt; DPP S); 1-Palmitoyl-2-linoleoyl-sn-glycero-3-phosphocholine (PLinoPC); 1-Palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3- phosphocholine (POPC); 1-Palmitoyl-2-oleoyl-sn-glycero-3-phosphoglycerol (sodium salt; POPG); 1-Palmitoyl-2- oleoyl-sn-glycero-3-phosphoglycerol (sodium salt; POPG); 1-Palmitoyl-2-oleoyl- snglycero-3-phosphoglycerol (ammonium salt; POPG); 1-Palmitoyl-2-4o-sn-glycero-3- phosphocholine (P-lyso-PC); 1-Stearoyl-2-lyso-sn-glycero-3-phosphocholine (S-lysoPC); and mixtures thereof. Further exemplary non-cationic

lipids include, but are not limited to, polymeric compounds and polymer-lipid conjugates or polymeric lipids, such as pegylated lipids, including polyethyleneglycols, N-(Carbonylmethoxypolyethyleneglycol-2000)-1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine (sodium salt; DMPE-MPEG-2000); N-(Carbonyl-methoxypolyethyleneglycol-5000)-1,2-dimyristoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine (sodium salt; DMPE-MPEG-5000); N-(Carbonyl-methoxypolyethyleneglycol 2000)-1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine (sodium salt; DPPE-MPEG-2000); N-(Carbonyl-methoxypolyethyleneglycol 5000)-1,2-dipalmitoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine (sodium salt; DPPE-MPEG-5000); N-(Carbonyl-methoxypolyethyleneglycol 750)-1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine (sodium salt; DSPE-MPEG-750); N-(Carbonyl-methoxypolyethyleneglycol 2000)-1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine (sodium salt; DSPE-MPEG-2000); N-(Carbonylmethoxypolyethyleneglycol 5000)-1,2-distearoyl-sn-glycero-3-phosphoethanolamine (sodium salt; DSPE-MPEG-5000); sodium cholesteryl sulfate (SCS); pharmaceutically acceptable salts thereof, and mixtures thereof. Examples of non-cationic lipids include, but are not limited to, dioleoylphosphatidylethanolamine (DOPE), diphytanoylphosphatidylethanolamine (DPhPE), 1,2-Dioleoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholine (DOPC), 1,2-Diphytanoyl-sn-Glycero-3-Phosphocholine (DPhPC), cholesterol, and mixtures thereof.

Pharmaceutically-acceptable carriers of the invention further include anionic lipids. Exemplary anionic lipids include, but are not limited to, phosphatidylserine, phosphatidic acid, phosphatidylcholine, platelet-activation factor (PAF), phosphatidylethanolamine, phosphatidyl-DL-glycerol, phosphatidylinositol, phosphatidylinositol (pi(4)p, pi(4,5)p2), cardiolipin (sodium salt), lysophosphatides, hydrogenated phospholipids, sphingolipids, gangliosides, phytosphingosine, sphinganine, pharmaceutically acceptable salts thereof, and mixtures thereof. [107] Supplemental or complementary methods for delivery of nucleic acid molecules for use herein are described, e.g., in Akhtar, et al., Trends Cell Bio. 2:139, 1992; Delivery Strategies for Antisense Oligonucleotide Therapeutics, ed. Akhtar, 1995; Maurer, et al., Mol. Membr. Biol. 16: 129-140, 1999; Hofland and Huang, Handb. Exp. Pharmacol. 137:165-192, 1999; and Lee, et al., ACS Symp. Ser. 752:184-192, 2000. Sullivan, et al., International PCT Publication No. WO 94/02595, further describes general methods for delivery of enzymatic nucleic acid molecules.

Amphoteric liposomes can also be used as pharmaceutically acceptable carriers such as those disclosed in US 8,580,297 (the disclosure thereof being incorporated herein by reference). The materials can also be obtained commercially from Marina Biotech (Smarticles®).

The miRNA and pharmaceutical composition can be administered by local or systemic routes. The miRNA and pharmaceutical composition can be administered or suitable for being administered by enteral routes, parenteral routes (including subcutaneous, intravenous, intramuscular, intratumoral, or intraperitoneal), or by rectal, topical, transdermal, or oral routes.

The nucleic acid molecules of the present invention may be alternatively delivered into a target cell using a viral vector. The viral vector may be any virus which can serve as a viral vector. Suitable

viruses are those which infect the target cells, can be propagated *in vitro*, and can be modified by recombinant nucleotide technology known in the art. Viral vectors expressing nucleic acids of the invention can be constructed based on viral backbones including, but not limited to, a retrovirus, lentivirus, adenovirus, adeno-associated virus, pox virus or alphavirus. Adenovirus-associated vectors (AAV) are an appealing method since they have acceptable toxicity profiles and have been successfully used to restore miRNA expression. Different AAV serotypes can successfully target different neuronal tissue. In a preferred embodiment, the viral vector is a non-replicating viral vector. In a preferred embodiment, the viral vector is a non-integrative viral vector, in particular for preventing any oncogenic effect associated with the knock-down of tumor suppressor gene by insertional mutation. In a most preferred embodiment, the viral vector is a non-replicating non-integrative viral vector. In one embodiment, the non-replicating poxvirus vector is selected from: a Modified Vaccinia virus Ankara (MVA) vector, a NYVAC vaccinia virus vector, a canarypox (ALVAC) vector, and a fowlpox (FPV) vector. MVA and NYVAC are both attenuated derivatives of vaccinia virus. In another embodiment, the adenovirus vector is a non-replicating adenovirus vector (wherein non-replicating is defined as above). Adenoviruses can be rendered non-replicating by deletion of the E1 or both the E1 and E3 gene regions. Alternatively, an adenovirus may be rendered non-replicating by alteration of the E1 or of the E1 and E3 gene regions such that said gene regions are rendered non-functional. For example, a non-replicating adenovirus may lack a functional E1 region or may lack functional E1 and E3 gene regions. In this way the adenoviruses are rendered replication incompetent in most mammalian cell lines and do not replicate in immunized mammals. Most preferably, both E1 and E3 gene region deletions are present in the adenovirus, thus allowing a greater size of transgene to be inserted. This is particularly important to allow larger antigens to be expressed, or when multiple antigens are to be expressed in a single vector, or when a large promoter sequence, such as the CMV promoter, is used. Deletion of the E3 as well as the E1 region is particularly favored for recombinant Ad5 vectors. Optionally, the E4 region can also be engineered. In one embodiment, the adenovirus vector is selected from: a human adenovirus vector, a simian adenovirus vector, a group B adenovirus vector, a group C adenovirus vector, a group E adenovirus vector, an adenovirus 6 vector, a PanAd3 vector, an adenovirus C3 vector, a ChAdY25 vector, an AdC68 vector, and an Ad5 vector.

Diagnostic and/or prognostic uses of miRNA.

One or several miRNA selected from the group consisting of miR-548z, miR-624-5p, let-7i-3p, miR-449b-3p, can be used as a biomarker. More specifically, they can be used as a biomarker of a hepatoblastoma. In addition, they can be used as a biomarker of the outcome of a hepatoblastoma. Their expression can be correlated with the good or bad prognosis. Therefore, they can be used for detecting a hepatoblastoma cancer or a predisposal or susceptibility to develop a hepatoblastoma cancer or for predicting clinical prognosis of a hepatoblastoma cancer. They can also be used for

selecting patient suitable for a treatment by one of these miRNA or any combination thereof. More generally, the present invention relates to kits and methods for providing information useful for detecting a hepatoblastoma cancer or a predisposal or susceptibility to develop a hepatoblastoma cancer, or for predicting clinical prognosis or outcome of a hepatoblastoma cancer or for selecting a subject suitable for a treatment by a miRNA as disclosed above.

The present invention also relates to a kit for detecting a hepatoblastoma cancer or a susceptibility to develop a hepatoblastoma cancer in a subject or for selecting a subject suitable for a treatment by a miRNA as disclosed above or for determining the prognosis of a subject having a hepatoblastoma cancer, the kit comprising detection means for at least one miRNA selected from the group consisting of miR-548z, miR-624-5p, let-7i-3p, miR-449b-3p or for any combination thereof. Preferably, the kit comprises detection means specific for at least 2, 3, 4 or 5 of miR-548z, miR-624-5p, let-7i-3p, miR-449b-3p and miR-885-5p. Optionally, the kit does not comprise detection means specific for more than 10 miRNAs.

Detection means are preferably primers or probes specific for miR-548z, miR-624-5p, let-7i-3p, miR-449b-3p or miR-885-5p. Preferably the one or several miRNA are selected from the group consisting of miR-548z, miR-624-5p, let-7i-3p, and miR-449b-3p. The kit may comprises detection means specific for one of the following combination: miR-624-5p, let-7i-3p, miR-449b-3p, and miR-885-5p, e.g., miR-548z and miR-624-5p; miR-548z and let-7i-3p; miR-548z and miR-449b-3p; miR-548z and miR-885-5p; miR-548z, miR-624-5p, and let-7i-3p; miR-548z, miR-624-5p, and miR-449b-3p; miR-548z, miR-624-5p, and miR-885-5p; miR-548z, let-7i-3p, and miR-449b-3p; miR-548z, let-7i-3p, and miR-885-5p; miR-548z, miR-449b-3p and miR-885-5p; miR-548z, miR-624-5p, let-7i-3p and miR-449b-3p; miR-548z, miR-624-5p, let-7i-3p and miR-885-5p; miR-548z, let-7i-3p, miR-449b-3p and miR-885-5p; miR-548z, miR-624-5p, let-7i-3p, miR-449b-3p and miR-885-5p; miR-548z, let-7i-3p, miR-449b-3p, and miR-885-5p, e.g., miR-624-5p and let-7i-3p; miR-624-5p and miR-449b-3p; miR-624-5p and miR-885-5p; miR-624-5p, let-7i-3p and miR-449b-3p; miR-624-5p, let-7i-3p and miR-885-5p; miR-624-5p, miR-449b-3p and miR-885-5p; miR-624-5p, let-7i-3p, miR-449b-3p and miR-885-5p; miR-548z, miR-624-5p, miR-449b-3p, and miR-885-5p, e.g., let-7i-3p and miR-449b-3p; let-7i-3p and miR-885-5p; let-7i-3p, miR-449b-3p and miR-885-5p; miR-548z, miR-624-5p, let-7i-3p, and miR-885-5p, e.g., miR-449b-3p and miR-885-5p.

The present invention also relates to the use of the kit for detecting a hepatoblastoma cancer or a susceptibility to develop a hepatoblastoma cancer in a subject or for selecting a subject suitable for a treatment by a miRNA as disclosed above or for determining the prognosis or clinical outcome in a subject having a hepatoblastoma cancer.

An under-expression of the miRNA as disclosed herein is indicative of a hepatoblastoma cancer, a predisposition to develop a hepatoblastoma cancer or a suitability to be treated with the miRNA as disclosed herein. In a preferred embodiment, the under-expression of the miRNAs as disclosed herein is indicative of a hepatoblastoma. The present invention relates to a method for determining if a

subject has or is predisposed to a hepatoblastoma cancer, comprising determining the level of one or several miRNA selected from the group consisting of miR-548z, miR-624-5p, let-7i-3p, and miR-449b-3p in the biological sample from the subject, and wherein the subject has or is predisposed to a hepatoblastoma cancer if the level of one of said one or several miRNA is decreased when compared to a non-tumoral control or healthy subject. Optionally, the method may comprise an initial step of providing a biological sample from the subject. Optionally, the method may further comprise determining the level of miR-885-5p. Optionally, the method may further comprise determining the expression level of catenin-beta 1, an increased level of expression when compared to a healthy or non-tumoral control being indicative of a hepatoblastoma, a predisposition to develop a hepatoblastoma. The present invention also relates to a method for selecting a subject suitable for a treatment by a miRNA selected from the group consisting of miR-548z, miR-624-5p, let-7i-3p, miR-449b-3p and miR-885-5p or any combination thereof, comprising determining the level of one or several miRNA selected from the group consisting of miR-548z, miR-624-5p, let-7i-3p, miR-449b-3p and miR-885-5p in the biological sample from the subject, and selecting the subject if at least one of said miRNA is under-expressed in comparison with a healthy or non-tumoral control. Optionally, the method may comprise an initial step of providing a biological sample from the subject. Preferably, the biological sample from the subject is a tumor sample.

Alternatively or in combination with the previous method, the present invention also relates to a method for selecting a subject suitable for a treatment by a miRNA selected from the group consisting of miR-548z, miR-624-5p, let-7i-3p and miR-449b-3p or any combination thereof, determining the level of catenin-beta 1 thereof in a biological sample from the subject, and selecting the subject if catenin-beta 1 is upper-expressed or overexpressed in comparison with a healthy or non-tumoral control. Preferably, the biological sample from the subject is a tumor sample.

The method may further comprise administering an effective amount of a miRNA selected from the group consisting of miR-548z, miR-624-5p, let-7i-3p, miR-449b-3p and miR-885-5p or any combination thereof to said subject.

The present invention further relates to a method for determining a clinical prognosis or outcome in a subject having a hepatoblastoma. The method comprises determining the level of one or several miRNA selected from the group consisting of miR-624-5p miR-548z, , let-7i-3p and miR-449b-3p in the biological sample from the subject. The clinical prognosis is correlated with the level of expression of the miRNA. More particularly, when compared with a non-tumoral control or a healthy subject, an under-expression of one of several of these miRNA is associated with a poor prognosis. A patient may be considered to have a "poor prognosis" or "bad prognosis" where, for example, the survival rate associated with the cancer subtype is less than the survival rate associated with other related cancer subtypes. Optionally, the method may further comprise determining the level of miR-885-5p.

The level of miRNA can be determined by any method available to the one skilled in the art such as Northern blot analysis, RT-PCR, quantitative RT-PCR, microarray, in situ hybridization, RNA

sequencing. miRNA expression can be quantified in a two-step polymerase chain reaction process of modified RT-PCR followed by quantitative PCR. miRNA expression can be quantified by hybridization on a microarray, RNA sequencing, slides or chips. For instance, probes or primers may be coupled to a support. Such supports are well known to those of ordinary skill in the art and include, but are not limited to glass, plastic, metal, or latex. The support can be planar or in the form of a bead or other geometric shapes or configurations known in the art.

For instance, the determination of the expression level can be carried out by forming a preparation comprising nucleic acid from said biological samples, an oligonucleotide probe or probes adapted to anneal to one or several miRNA selected from the group consisting of miR-548z, miR-624-5p, let-7i-3p, miR-449b-3p or miR-885-5p, a thermostable DNA polymerase, deoxynucleotide triphosphates and co-factors; providing polymerase chain reaction conditions sufficient to amplify all or part of said nucleic acid molecule; analyzing the amplified products of said polymerase chain reaction for the presence of miRNA; and optionally comparing the amplified product with a normal matched control. Alternatively, the method can further comprise one or more of the steps including: (a) obtaining a sample from the patient, (b) isolating nucleic acids from the sample, (c) labeling the nucleic acids isolated from the sample, and (d) hybridizing the labeled nucleic acids to one or more probes.

The levels of miRNA are considered as under-expressed when decreased by at least 1.5 or 2 fold when compared to a normal control. More particularly, the levels are decreased by 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 or at least 10-fold compared to a normal control level.

The biological sample from the subject can be a sample from blood, blood plasma or serum, lymph fluid, spinal or cerebrospinal fluid, saliva, sputum, lavage, urine, feces, bronchoalveolar lavage, or human tissue biopsy, especially a tumor sample. Preferably, the sample is a blood sample, a liver sample or a liver tumor sample.

A normal, non-tumoral or healthy control is the miRNA in a sample from a histologically matched sample, for instance a subject which has no cancer or the miRNA in a normal or non-tumoral or healthy tissue taken at a reasonable distance of the tumor in a patient with a cancer.

Further aspects and advantages of the present invention will be disclosed in the following experimental section, which should be regarded as illustrative and not limiting the scope of the present application. A number of references are cited in the present specification; each of these cited references is incorporated herein by reference.

Examples

The inventors have focused their study on beta-catenin (*CTNNB1*), a Wnt signaling pathway-associated gene. Beta-catenin is an oncogene, especially in liver, and actively participates in HBL (hepatoblastoma) by sustaining tumoral cell proliferation, dedifferentiation and stemness (Armengol et al, 2011, Int J Biochem Cell Biol, **43**, 265-270; Cairo et al, 2008, Cancer Cell, **14**, 471-484). The

inventors' project aims at identifying miRNAs negatively regulating beta-catenin in HBL cells and blocking its oncogenic effect.

Results

To exhaustively identify miRNAs targeting beta-catenin, the inventors used a screening approach, named Dual Fluorescence-FunREG (DF-FunREG) (Maurel et al, 2013, *Hepatology*, **57**, 1, 195-204). Using a HBL HuH6 cell line expressing an eGFP transgene carrying beta-catenin 5'+3' untranslated regions (UTRs) and the Tomato transgene as a reference, they screened a library of 1712 miRNA mimics (Qiagen, miRBase V17.0). 26 miRNAs decreasing the eGFP/Tomato ratio equal to or below an arbitrary threshold fold change value of -0.78 were pre-selected as candidates.

Amongst the 26 selected candidates, the inventors found miR-483-3p, a miRNA already known to target beta-catenin (Veronese et al, 2011, **108**, 4840-4845) and miR-885-5p, which is down-regulated in HBL tumors compared to normal liver (NL) (Magrelli et al, 2009, **2**, 157-163). A secondary screen using HuH6 cells expressing an eGFP transgene lacking beta-catenin 5'+3'-UTRs and the Tomato was performed with the 26 miRNA candidates. Following this step, no false positive hit was found. Therefore the 26 miRNA candidates were retained for further analyses. The inventors then assessed the ability of these miRNAs to repress beta-catenin expression in HuH6 cells. Results from western blot experiments showed that 9 out of 26 miRNAs significantly down-regulate beta-catenin expression (Figure 1). In the same condition two previously described beta-catenin-regulating miRNAs [miR-200a-3p (Saydam et al, 2009, *Mol Cell Biol*, **29**, 5923-5940) and miR-34a-5p (Kim et al, 2011, *Sci Signal*, **4**, ra71)] had no effect (Figure 1; middle grey bars on the right side). None of these 9 miRNAs have been shown to regulate beta-catenin before. The inventors then studied if these 9 beta-catenin-repressing miRNAs regulate mRNA level. As shown in Figure 2, 7 out of 9 beta-catenin-repressing miRNAs also decreased the amount of mRNA. miR-1205 had no effect and unexpectedly, miR-492 slightly induced beta-catenin mRNA expression by a mechanism that remains to be determined.

To further support the relevance of these data, the inventors tested the potential of these 9 miRNAs to repress beta-catenin in a second HBL cell line using HepG2 cells, which carry *CTNNB1* deletion in exon 3 in one allele. As shown in Figure 3A, all miRNAs significantly decreased wild-type beta-catenin expression in these cells after 3 days, while its expression only tended to decrease in presence of miR-34a-5p and miR-200a-3p. However in agreement with previous data (Veronese A et al, *PNAS* 2011), mutated beta-catenin was more resistant to miRNA-mediated silencing, with only 4 out of the 9 miRNAs inducing a significant decrease of its expression in HepG2 cells and 3 (miR-548z, miR-5095 and miR-1205) having a tendency to repress mutated beta-catenin expression. Altogether the inventors identified and validated 9 new beta-catenin-inhibiting miRNAs in HBL-derived HuH6 and HepG2 cells.

The inventors also tested another childhood liver cancer cell line derived from a patient xenograft cell line, named HB-214-J, which also carry *CTNNB1* deletion in exon 3 in one allele. In this cell line, all miRNAs had a negative effect on wild-type beta-catenin, except miR-885-5p and miR-449b-3p

(Figure 4). However, none was efficient in inhibiting exon 3-deleted beta-catenin protein in HB-214-J cells (Figure 4, lower panel). Such miRNA-silencing resistance of deleted beta-catenin was described for miR-483-3p without providing any explanation for this phenomenon (Veronese et al, 2011, **108**, 4840-4845). The inventors speculate that a much longer protein half-life could be a reason for a lesser inhibitory effect, since exon 3 deletion allows beta-catenin to escape from proteosomal degradation and increases its stability. Altogether these data lead to the identification of nine miRNAs regulating beta-catenin in HBL cells. However, the efficacy of miRNA-based beta-catenin silencing seems decreased in HBL cells harboring the *CTNNB1* exon 3 deletion.

To evaluate the pathophysiological relevance of these 9 miRNAs in beta-catenin-associated HBL carcinogenesis, the inventors measured their expression in tumors and NL by RT-qPCR (40 and 36 tumors in figure 5A and 5B, respectively; 34 and 33 NL in figure 5A and 5B, respectively). Three out of 9 beta-catenin-regulating miRNAs were not detected in liver tissues (miR-581, miR-1205 and miR-492), miR-5095 was not deregulated in tumors compared to NL (figures 5A and 5B), and 5 were significantly decreased (Figures 5A and 5B). However, miR-548z was not found significantly deregulated in a second analysis with a lower number of sample (figure 5B). miR-34a-5p, the miRNA currently tested in clinic for the treatment of patients with liver cancer (see www.mirnatherapeutics.com) (Bader et al, 2012, *Front Genet*, **3**, 120), was not deregulated in HBL tumors compared to NL (Figure 5). By focusing on adjacent tumor/NL samples (n=27; Figure 6), the inventors found fairly similar results, with the exception of miR-548z, which was now unchanged in tumors compared to NL, and of miR-34a-5p, which was now significantly increased in HBL. Altogether these data clearly demonstrated that beta-catenin overexpression in HBL is directly associated with a decrease of 5 miRNAs (miR-548z, miR-624-5p, Let-7i-3p, miR-885-5p, miR-449b-3p) negatively controlling its expression.

Using small synthetic RNAs and cell transfection, the inventors next tested the capacity of these 5 beta-catenin-regulating miRNAs to block HBL cell growth and induce apoptotic death *in vitro*. Results show that the 5 beta-catenin-regulating miRNAs significantly inhibited HuH6 cell growth at Day 6 (Figure 7). miR-548z, miR-624-5p and let-7i-3p were the most potent (> 70% inhibition) and miR-200a-3p had no effect on the growth of HuH6 cells. While these miRNAs were less active than a small interfering (si)RNA against beta-catenin, they were clearly more active than miR-34a-5p (Figure 7) demonstrating their relevance as inhibitors of HBL cell growth.

The inventors also tested two other childhood liver cancer cell lines, HepG2 and HB-214-J. In HepG2 and HB-214-J cells, the four miRNAs showed similar cell growth inhibition pattern (Figure 8) despite some differences in the inhibition of wild-type or exon 3-deleted beta-catenin protein. Noticeably, let-7i-3p modestly inhibited the growth of these cells while it was particularly efficient in Huh6 cells (Figure 7). Inversely, miR-449b-3p efficiently inhibited the growth of HepG2 and HB-214-J cells, while it had a modest effect on Huh6 cell growth (Figure 7). Moreover, it did not affect the expression of exon 3-deleted beta-catenin although it is the main form of the protein in these two cell lines

suggesting it likely targets other unknown oncogenic factors in HBL cells. Finally, miR-885-5p and miR-624-5p were very potent in inhibiting the growth of the three HBL cell lines independently of *CTNNB1* gene status (Figures 7 and 8) further suggesting the regulation of other oncogenes by these miRNAs.

To explain the negative effect of the 5 miRNAs on HuH6 cell growth, the inventors first measured the number of cells in the different phases of the cell cycle. As shown in Figure 9, the 5 miRNAs reduced HuH6 cell cycling by lengthening G0/G1 phase and shortening S phase. Here again miR-548z, miR-624-5p and let-7i-3p were the most potent, thereby explaining the strong inhibitory effect previously observed with these 3 miRNAs on HBL cell growth in Figures 7 and 8. These 3 miRNAs blocked HuH6 cell cycling as effectively as a specific siRNA targeting beta-catenin, but much more efficiently than miR-34a-5p. The inventors then measured the rate of cell death after miRNA transfection. While the specific knock-down of beta-catenin had a slight apoptotic effect, none of the beta-catenin-regulating miRNAs, including miR-34a and miR-200a-3p, had an apoptotic effect (Figure 10). As a positive control, etoposide, an inhibitor of topo-isomerase II, induced HuH6 apoptosis (Figure 10). Similar results were obtained by measuring the caspase 3/7 activity (not shown). Finally, the inventors tested the ability of these miRNAs to induce cell senescence. As shown in Figure 11, only miR-624-5p significantly induced the senescence of HuH6 cells; the other miRNAs being ineffective. Unexpectedly miR-34a-5p also induced HuH6 cell senescence, thereby partly explaining its negative impact on HBL cell growth *in vitro* (Figures 7 and 9).

In conclusion, the inventors identified 9 new miRNAs that down-regulate beta-catenin expression in the two HBL-derived cell lines Huh6 and HepG2 (Table 1). Five of them (miR-548z, miR-624-5p and let-7i-3p, miR-885-5p and miR-449b-3p) were significantly less expressed in tumors compared to NL suggesting their involvement in the up-regulation of beta-catenin and its role in HBL.

Table 1: Main results summary

	Regulation of beta-catenin in HBL cells
miRNAs selected through the DF-FunREG screening pipeline	26
miRNAs validated as regulators of beta-catenin in HuH6, HepG2 or HBL-214-J cells	9 (Figures 1 to 4)
miRNAs significantly down-regulated in patients' tumors	5 (miR-624-5p, miR-548z, Let-7i-3p, miR-885-5p and miR-449b-3p; Figures 5 and 6)
miRNAs inhibiting cell growth in vitro in HuH6, HepG2 or HBL-214-J cells	5 (miR-624-5p, miR-548z and Let-7i-3p being the most effective; Figures 7 and 8)
miRNAs blocking HuH6 cell cycling in vitro	5 (miR-624-5p, miR-548z and Let-7i-3p being the

	most effective; Figure 9)
miRNAs inducing apoptosis	None (Figure 10)
miRNAs inducing cell senescence	miR-624-5p (miR-34a-5p also; Figure 11)
miRNAs blocking HuH6 cell proliferation more effectively than miR-34a-5p in vitro	3 (miR-624-5p, miR-548z and Let-7i-3p; Figure 7)

By testing their effect on HuH6 cell *in vitro*, the inventors found that miR-624-5p, miR-548z, Let-7i-3p, miR-885-5p and miR-449b-3p inhibit HBL cell growth (Figure 7) by blocking cell proliferation and S phase progression, as well as by arresting HBL cell in G0/G1 phase (Figure 9). Amongst the 5 miRNAs miR-624-5p, miR-548z, and let-7i-3p were the most potent and reduced HuH6 cell proliferation by more than 70%. With few exceptions (see miR-449b-3p and miR-885-5p in figure 4B), all these nine miRNAs efficiently reduced wild-type beta-catenin expression in the three pediatric liver cancer cell lines we tested. However, exon 3 deletion in HepG2 and HB-214-J cells made beta-catenin partially resistant to most of these miRNAs confirming previous data with miR-483-3p (Veronese et al, 2011, **108**, 4840-4845). This resistant phenotype is likely due to an increased half-life of the deleted beta-catenin protein following the loss of casein kinase 1 α /glycogen synthase kinase 3 β phosphorylation sites, which tag beta-catenin for proteosomal degradation. Indeed, several of these miRNAs inhibited total beta-catenin mRNA in HepG2 cells (data not shown). Unexpectedly none of these miRNAs induced HuH6 cell apoptosis and only miR-624-5p induced HBL cell senescence suggesting that these miRNAs act mainly by inducing cell proliferation arrest and quiescence. More interestingly miR-548z, miR-624-5p and Let-7i-3p inhibited HBL cell growth as efficiently as the specific depletion of beta-catenin, and all were more potent than miR-34a-5p (Figures 7 and 9), the miRNA currently tested in clinic for the treatment of adult patients with liver cancer (www.mirnatherapeutics.com).

Altogether these data show that miR-548z, miR-624-5p, Let-7i-3p, miR-885-5p and miR-449b-3p are potent tumor suppressors in HBL (miR-548z, miR-624-5p being more effective than Let-7i-3p, miR-34a-5p, miR-885-5p and miR-449b-3p) and mediate their antitumor effect through the down-regulation of beta-catenin and likely of other (onco)genes that remain to be identified. In conclusion, the present data strongly support the finding that *in vitro* miR-624-5p, miR-548z, and Let-7i-3p, miR-885-5p and miR-449b-3p act as powerful tumor suppressors in HBL.

Table 2: *In vitro* and *in silico* data summary using Huh6 cells

	miR-548z	miR-624-5p	Let-7i-3p	miR-885-5p	miR-449b-3p	miR-34a-5p
Cell growth inhibition	+++	+++	+++	++	+	+
Cell cycle arrest	+++	+++	+++	+	+	+
Apoptosis	-	-	-	-	-	-
Cell senescence	-	+	-	-	-	++

miRNA/beta-catenin mRNA binding specificity	3' UTR	3' UTR	5'UTR/3' UTR	3' UTR	3' UTR	3'UTR
---	--------	--------	--------------	--------	--------	-------

Prognosis interest of miRNAs

Relating miRNAs expression to the clinical information the inventors noticed that Let-7i-3p expression was associated with an increase in serum AFP level after chemotherapy and low expression of miR-885-5p was correlated with the presence of multiple nodules and an advanced stage of the disease (see Table below) suggesting this miRNA expression could be a prognostic factor. Surprisingly, while miR-34a-5p was globally unchanged in HBL tumors, its expression was decreased in patients with high AFP levels. Moreover miR-34a-5p expression was inversely correlated with macrovascular tumor invasion, metastasis, advanced disease and class C2 tumors supporting its anti-tumoral and anti-metastatic role.

miRNA–trait relationships

miR-624-5p	-0.18 (0.3)	-0.052 (0.8)	-0.12 (0.5)	-0.17 (0.3)	-0.26 (0.1)	-0.2 (0.2)	0.061 (0.7)	-0.17 (0.3)	-0.3 (0.08)	-0.22 (0.2)	-0.22 (0.2)	-0.22 (0.2)	-0.25 (0.1)	-0.22 (0.2)	-0.092 (0.6)
Let-7i-3p	-0.22 (0.2)	0.028 (0.9)	-0.2 (0.2)	-0.23 (0.2)	-0.24 (0.2)	-0.29 (0.09)	0.22 (0.2)	0.066 (0.7)	-0.12 (0.5)	-0.13 (0.4)	-0.24 (0.2)	-0.1 (0.6)	-0.21 (0.2)	0.45 (0.006)	-0.087 (0.6)
miR-885-5p	0.082 (0.6)	-0.041 (0.8)	-0.22 (0.2)	-0.32 (0.06)	-0.41 (0.01)	-0.043 (0.8)	0.18 (0.3)	0.16 (0.4)	-0.022 (0.9)	-0.43 (0.01)	-0.15 (0.4)	-0.32 (0.06)	-0.014 (0.9)	-0.012 (0.9)	-0.1 (0.5)
miR-449b-3p	-0.038 (0.8)	0.039 (0.8)	-0.051 (0.8)	-0.049 (0.8)	-0.22 (0.2)	-0.15 (0.4)	-0.047 (0.8)	-0.26 (0.1)	-0.25 (0.1)	0.039 (0.8)	0.19 (0.3)	0.11 (0.5)	-0.15 (0.4)	-0.15 (0.4)	-0.11 (0.5)
miR-34a-5p	-0.42 (0.01)	0.18 (0.3)	-0.12 (0.5)	-0.42 (0.01)	-0.26 (0.1)	-0.33 (0.05)	-0.016 (0.9)	-0.27 (0.1)	-0.22 (0.2)	-0.34 (0.05)	-0.31 (0.07)	0.047 (0.8)	-0.46 (0.004)	-0.16 (0.3)	0.23 (0.2)
	Group	Gender	Age	Invasion	Nodules	Metastasis	Histology	Component	Small_cells	PRETEXT stage	Risk	Necrosis	AFPpre	AFPpost	CTNNB1

miRNA	Feature	Correlation	p-value
let-7i-3p	AFP_post	0.45	0.0065
miR-885-5p	Nodules	-0.41	0.0121
miR-885-5p	Stage	-0.43	0.0096
miR-34a-5p	Group	-0.42	0.0103
miR-34a-5p	Invasion	-0.42	0.0114
miR-34a-5p	Metastasis	-0.33	0.0479
miR-34a-5p	Stage	-0.34	0.0453
miR-34a-5p	AFP_pre	-0.46	0.0043

MiR-624-5p directly targets the 3'-UTR of the three beta-catenin mRNA variants

The inventors aimed at determining how miR-624-5p regulates beta-catenin through its 3'-UTR. Using various prediction algorithms (miRDB, RNA22-HSA, TargetMiner and Miranda) they localized

a miR-624-5p binding site at position 613-619 in the exon 16B of the 3'-UTR beta-catenin mRNA (Figures 12A). Noticeably, 16B sequence is common to the three beta-catenin mRNA variants (Figure 12B). To assess the relevance of this site, two point mutations (r.614G>C and r.618C>G) were inserted in the beta-catenin variant V3 3'-UTR (Figure 12B) and functional analyses were re-performed using a reporter system. The post-transcriptional regulation of beta-catenin by miR-624-5p was completely abrogated when the predicted site was mutated (Figure 12C). Moreover, the overexpression of miR-624-5p in Huh6 cells decreased the expression of all beta-catenin mRNA variants (Figure 12D). Altogether these data demonstrated that miR-624-5p directly binds beta-catenin 3'-UTR and decreases its expression by targeting the three mRNA variants.

MiR-624-5p inhibits the transcriptional activity of Wnt pathway oncogenes

Having showed that miR-624-5p inhibits Wnt/beta-catenin pathway activity the inventors investigated the consequence of this inhibition on the downstream targets and Wnt pathway-associated genes by measuring the expression of numerous Wnt/beta-catenin pathway-related genes in Huh6 cells transfected with miR-624-5p, si- β -catenin or a control RNA. The genes down-regulated by miR-624-5p (*NRP1*, *SIX1*, *BIRC5*, *ABCBI*, *CCND1* and *FGF9*) have a role in cell proliferation, cell cycle progression, cell survival, migration, tumor growth and/or drug resistance (Table 3 and Figure 13A). *AXIN2*, a direct target of beta-catenin/TCF4/LEF transcription complex and a member of the GSK-3/APC/AXIN2 beta-catenin degradation complex, was also highly inhibited by miR-624-5p. MiR-624-5p also caused the up-regulation of genes (Figure 13B). Some are known as tumor suppressors (*LRP1*, *EGR1*), modulators of tumor growth (*FNI*) and Wnt pathway (*AHR*) or safeguard against uncontrolled cellular proliferation (*FST*; Table 4). Others are oncogenes or known to be involved in cancer cell proliferation and invasion (*CDH1*, *EGFR*, *MMP7*, *CTGF*, *PLAUR*, *CCND2*; Table 4), transcription (*RUNX2*), immune reaction (*B2M*) or vitamin signaling (*CUBN*). Therefore, we can speculate that following miR-624-5p-induced Wnt pathway inactivation, Huh6 cells activate specific mechanisms in order to compensate for the loss of this key oncogenic pathway and survive. For instance, *CCND1* down-regulation was counterbalanced by *CCND2* increase (Figure 13B). When Huh6 cells were transfected by a si- β -catenin, 23 genes were up-regulated and 21 genes were down-regulated including the six genes significantly down-regulated by miR-624-5p (Figures 13A). These last data mean that miR-624-5p partly mimics siRNA-mediated beta-catenin silencing explaining the very similar cell phenotypes observed with this miRNA and the si- β -catenin *in vitro* (Figure 7-11). Altogether these data demonstrate that miR-624-5p counterbalances the oncogenic function of the Wnt/beta-catenin pathway and targets other genes involved in liver carcinogenesis leading to cell growth inhibition, cell division arrest and senescence.

Table 3: Down-regulated gene by at least 50 % by miR624-5p

Gene	Protein name	Effect
AXIN2	Axin-2	↑ β-catenin degradation
NRP1	Neuropilin-1	↑ vascularization and tumor progression, cell survival, migration and tumor invasion, angiogenesis; targeted for cancer therapy (↓ apoptosis?)
SIX1	Homeobox protein SIX1	↑ cell proliferation, ↓ apoptosis
ABCB1	P-glycoprotein 1 (permeability glycoprotein, abbreviated as P-gp or Pgp)	↓ angiogenesis ↑ drug resistance
CCND1	Cyclin D1	↑ cell cycle progression G1→S
FGF9	Fibroblast growth factor 9	↑ cell proliferation, malignancy, Cell growth, tumor growth, development, angiogenesis, invasion

Table 4: Up-regulated gene by at least 50 % by miR624-5p

Gene	Protein name	Effect
FST	Follistatin	Safeguard against uncontrolled cellular proliferation
CCND2	Cyclin D2	= cyclin D1

MiR-624-5p inhibits HBL tumor growth in vivo

Having clearly demonstrated the tumor suppressive role of miR-624-5p *in vitro*, the inventors investigated its effect *in vivo* using chicken embryos. The tumor CAM model is a simple and robust xenograft model that recapitulates major stages of tumor progression including cell proliferation, angiogenesis and tumor cell-host interactions and that has been previously used for testing small non-coding RNA-mediated gene knockdown on tumor growth. Since HuH6 tumors grow inside the CAM, no macroscopic difference was visible at day 13 and 16 (Figure 14A, row 1). However, after formalin-fixation we observed that grafted Huh6 cells formed a vascularized tissue mass, which was clearly smaller with miR-624-5p compared to control (Figure 14A, row 2). This observation was further confirmed by weighting resected tumors (Figure 14B). Indeed, while control tumor volume increased over time, miR-624-5p-derived tumors were significantly smaller and did not grow (Figure 14B). Comparable results were obtained with tumors deriving from Huh6 cells transfected with si-β-catenin (data not shown). At days 13 and 16 hemalun-eosine-safran (HES) staining (Figure 14A, row 3) and Ki67 immunostaining (Figure 14A, row 4) showed that tumor cells were less abundant and proliferated less in miR-624-5p tumors compared to control tumors, confirming the inhibitory effect of miR-624-5p on HBL development. The decrease of beta-catenin staining in miR-624-5p tumor compare to control (Ctrl) further validated the tumor suppressor activity of miR-624-5p in this animal model (Figure 14A, row 5). Altogether these results demonstrated the potent tumor suppressive function of the beta-catenin-targeting miR-624-5p *in vivo*.

Materials and Methods

Plasmids construction

The lentiviral pL-GFP and pL-Tomato plasmids were designed as previously described (Maurel, M., et al, 2013). The lentiviral pL-5'UTR-Bcat-GFP was obtained by inserting the full 5'UTR sequence of the beta-catenin mRNA in the BamH I site of the pL-GFP plasmid. The lentiviral pL-GFP-3'UTR-Bcat was obtained by inserting the full 3'UTR sequence, with the exception of the last 23nt, between the Nde I-Kpn I sites in the pL-GFP plasmid. The pL-5'UTR-Bcat-GFP-3'UTR-Bcat construct was obtained by inserting both 5' and 3'UTR in the pL-GFP as described. The 5'UTR-Bcat and 3'UTR-Bcat sequences used for these clonings are derived from the reference sequence NM_001904.3. All constructions were verified by sequencing.

Cells lines

The hepatoblastoma (HB)-derived HuH6 and HepG2 cell lines were grown in DMEM medium (Invitrogen) containing respectively 1 or 4.5 g/L of D-glucose supplemented with 10% FCS and 1% penicillin/streptomycin antibiotics at 37°C in a 5% CO₂-humidified atmosphere. HBL-214-J cell line were grown in Advanced DMEM/F-12 (Invitrogen) supplemented with 8% FCS, 1% penicillin/streptomycin antibiotics and 2mM L-Glutamine. Huh6 stable cell lines co-expressing the pL-Tomato and pL-GFP transgenes, as well as the pL-Tomato and pL-GFP transgenes bearing either the beta-catenin 3'UTR, 5'UTR or both were developed by lentiviral transduction [multiplicity(ies) of infection (m.o.i.) = 1] and cell sorting. During transfections, all cell lines were grown in complete medium without antibiotics.

Lentiviral production, Titration, Cell transduction and Cytometry analysis

Production and titration of infectious lentiviral particles, as well as biosafety considerations, procedures and policies have been described previously (Laloo, B., et al, 2009). Lentiviral particles were added to the target cells and incubated for 72 h. Then the cells were washed twice in PBS and grown in the presence of complete medium for a week before use. Cells were washed in PBS, detached with trypsin/EDTA, collected and analyzed by FACS using a BD LSRFortessa (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) and the BD FACSDiva software as described previously (Laloo, B., et al, 2009).

Small interfering RNAs, miRNA mimics, Cell transfection and Cisplatin treatment

The Human miScript miRNA Mimic 96 Set (miRBase V17.0), the miRNA mimics and the 1027281 negative siRNA control (si Ctrl) were from Qiagen. Hairpin inhibitors were from Dharmacon. The siRNA against beta-catenin (si β -catenin) was 5' ACCAGTTGTGGTAAAGCTCTT 3' (SEQ ID No 11). Small non-coding RNAs or hairpin inhibitors were transferred into the target cells by reverse transfection using Lipofectamine RNAi Max (Invitrogen) according to manufacturer's instructions at a final concentration of 15 nM. Then transfected cells were grown from 3 to 6 days before analysis.

DF-FunREG screening

DF-FunREG screening was performed as previously described (Maurel M. et al, Hepatology 2013) with few modifications. 15,000 Tomato/eGFP Huh6 cells were plated per well of 96-well microplates and reverse transfected by each miRNA mimic of the miScript set. Three days after transfection, cells were washed in PBS and fluorescence signals were measured using the Envision multiplate reader (Perkin Elmer). Finally the eGFP/Tomato ratios were calculated and compared to the ratio obtained by the transfection of 1027281 negative siRNA control.

Liver Samples and Clinical Data

All patients were recruited in accordance with European and French law and institutional ethical guidelines. A set of 69 liver samples (36 HBL and 33 normal liver [NL] samples including 27 pairs of tumor and adjacent NL) was collected from 42 patients treated at French University Hospitals or from the SIOPEL Liver Tumor and Tissue Banking (www.siopep.org). Samples were obtained with written informed consent and the study protocol was approved by the ethic committees of SIOPEL and of the French Government (HEPATOBIO project: N°ID-RCB-A00180-49; CPP N°CO-15-003; CNIL N°915640; CCTIRS N°15.700; MESR N° DC2009-939). Liver samples were clinically, histologically, and genetically characterized (Supplementary Table S1). Liver tissues were immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until used for molecular studies.

Biological and clinical features of HBL samples. The percentage of tumor samples displaying annotated features is indicated in brackets.

Annexe 2 : Use of catenin- beta 1-targeting microRNAs for treating liver cancer

Patient features	Features	Number of cases (%)
Gender	Male/Female	23/13 (63.89/36,11)
Age (month)	Mean (min, max)	2.76 (0.60, 15.97)
Invasion	Yes	14 (38.89)
Nodules	Single nodule	18 (50)
	Multiple nodules	17 (47.22)
Metastasis	Yes	7 (19.44)
Histology	Epithelial	14 (38.89)
	Mesenchymal	20 (55.56)
Component	Fœtal	25 (69.44)
	Fœtal-embryonal	3 (8.33)
	Embryonal-Fœtal atypic	3 (8.33)
	Mesenchymal	4 (11.11)
Small cells	Yes	15 (41.67)
PRETEXT stage	I	3 (8.33)
	II	14 (38.89)
	III	7 (19.44)
	III	5 (13.89)
Risk	Standard risk	18 (50)
	High risk	13 (36.11)
Group	C1	25 (69.44)
	C2	11 (30.56)
Necrosis (%)	Mean (min, max)	35 (10, 70)
AFP level pre-operative (ng/mL)	Mean (min, max)	478738 (300, 2355000)
AFP level post-operative (ng/mL)	Mean (min, max)	183201 (4, 347000)
CTNNB1	Non-mutated	5 (13.89)
	Mutated	10 (27.78)
	Deleted	14 (38.89)

miRNA quantification

Sybergreen microRNA assays (miScript PCR System, Qiagen) were used to quantify the absolute expression of mature miRNAs in liver samples or in cell lines.

Quantification of beta-catenin expression

Western blotting

2.10⁵ cells were transfected and seeded into 6-well plates in a volume of 2 mL. Three days later whole cell extracts were prepared by treating cells with RIPA buffer (Sigma) containing a protease inhibitor cocktail. Proteins were separated by SDS-PAGE and transferred onto nitrocellulose membrane (Protran, Whatman). Then membranes were saturated in PBS-BSA 2% and successively incubated with the indicated primary antibodies and adequate InfraRed-labeled secondary antibody (either IRDye-680 or -800 conjugated secondary antibodies) following manufacturer's instructions. Fluorescence signals were detected and quantified using the Odyssey infrared imaging system. Blocker and Odyssey infrared imaging system were from LI-COR Biosciences (ScienceTec, Les Ulis, France). Specific protein signal was normalized to the house-keeping protein GAPDH. The mouse monoclonal anti-beta-catenin (610154) antibody was from BD Biosciences and the rabbit polyclonal anti-GAPDH (FL-335) antibody was from Santa Cruz.

Real time quantitative PCR and RT-PCR

PCRs were done as described previously (Laloo B. et al, MCP 2009; Jalvy-Delville S. et al, NAR 2012) with the exception of cDNA synthesis which were done with the Maxima Reverse Transcriptase

(Thermo Scientific). Primers used in Real time quantitative PCR amplifications were: Forward beta-catenin: 5'- TCTTACACCCACCATCCCAC-3' (SEQ ID No 12); Reverse beta-catenin: 5'- GCACGAACAAGCAACTGAAC-3' (SEQ ID No 13) Forward RNA 18s: 5'- GGATCCATTGGAGGGCAAGT-3' (SEQ ID No 14); Reverse RNA 18s: 5'- CCGCTCCCAAGATCCAATA-3' (SEQ ID No 15).

Cell growth and proliferation assays

Cell growth was measured with the In vitro Toxicology assay kit (Sigma), which uses sulforhodamine B to measure the total cellular proteins, according to the manufacturer's instructions. Briefly 3,500 Huh6 cells, 4,500 HepG2 or 10,000 HB-214-J cells were transfected and seeded into 96-well microplates in a volume of 100 μ L. One day, three days and six days later, cell growth was stopped by the addition of cold trichloroacetic acid, then Sulforhodamine B staining was performed, staining was released by the addition of Tris (10mM) and absorbance was measured at 565 nm using the CLARIOstar multiplate reader (BMG Labtech).

Cell death assays

Cell apoptosis was analysed using tetramethylrhodamine methyl ester (TMRM; Invitrogen), which detects the loss of mitochondrial membrane potential, and using the Caspase-Glo® 3/7 Assay System (Promega), which measures caspase-3/7 activities. Prior to cell apoptosis detection with TMRM, 2.10⁵ cells were transfected and seeded into 6-well plates in a volume of 2 mL. Three days later, total cells were collected, washed twice in PBS, resuspended in 100 μ L of TMRM staining solution (150nM) and incubated 20 minutes at 37°C. After the addition of 500 μ L of PBS cell apoptosis was analysed by FACS using a BD FACSCanto II (BD Biosciences). Prior to cell apoptosis detection with Caspase-Glo Assay, 15,000 cells were transfected and seeded into 96-well plates in a total volume of 100 μ L. Three days later, the caspase-3/7 activities were measured according to the manufacturer's instructions and the luminescence was analyzed using the Envision multiplate reader (Perkin Elmer).

Cell cycle assay

Cell cycle was studied with the APC/BrdU flow kit from BD Pharmingen according to manufacturer's instructions. Briefly, 2.10⁵ cells were transfected and seeded into 6-well plates in a volume of 2 mL. Three days later, BrdU was added in each well 45 minutes before harvesting the cells and incorporated into newly synthesized DNA by cells entering and progressing through the S phase of the cell cycle. The incorporated BrdU was stained with an APC anti-BrdU fluorescent antibody and the levels of cell-associated BrdU were then measured by flow cytometry on the FACS CANTO II (BD Bioscience).

Cell senescence assay

Cell senescence was studied with the Senescence beta-Galactosidase Staining kit from Cell Signalling according to manufacturer's instructions. Briefly, 2.10⁵ cells were transfected and seeded into 6-well plates on coverslips in a volume of 2 mL. Three days later, cells were fixed and beta-galactosidase activity was revealed by the addition of X-gal and staining solution. Then cells were stained with

Eosin 0.5% and observed under microscope. Cells undergoing senescence showed a blue staining and were quantified.

In vivo Chick Chorioallantoic Membrane (CAM) assays and immunohistological studies

Eggs opening: All eggs are received at the stage of segmentation and then incubated at 37.4°C for recovery development. Three days after, eggs are opened on the top and a plaster is placed on the gap.

Huh6 cells transfection and eggs implantation: Six days after eggs opening, Huh6 cells are transfected with either 1027281 negative siRNA control or miR-624-5p from Qiagen at a final concentration of 15 nM by forward transfection using Lipofectamine RNAi Max (Invitrogen) according to manufacturer's instructions. One day later, cells are washed in PBS, detached with trypsin/EDTA and collected. Cells are mixed in 50% DMEM 50% Matrigel (Corning) at a concentration of 1 million Huh6 per 40µL, and 40µL-drop were formed and incubated at 37°C for polymerization. Then, the egg plaster is removed and each drop of Huh6 cells is placed on the CAM of one egg. Finally the plaster is put back on the gap and eggs are re-incubated.

Tumour growth monitoring, fixation and CAM collection: Pictures of the growth tumour are done every day until 6 days using the stereomicroscope (SMZ745T) and camera (DS-Fi2) from Nikon and then analysed with the NSI Element D software. Tumours are fixed with Neutral Buffered Formalin (Diapath) at 3 days and 6 days after implantation and included in paraffin.

Statistical analyses

Graphs and statistical analyses were done using GraphPad Prism 5.0 or 6.03 software. As the different groups of values did not followed a Gaussian distribution (data from D'Agostino & Pearson omnibus and Shapiro-Wilk normality tests), the non-parametric Mann-Whitney test was used for the comparison of two groups of unmatched values and the parametric Paired t test for the comparison of two groups of matched values. When experiment contained three groups of values or more, regular one-way analysis of variance (ANOVA) was used for the comparison of multiple means. For each experiment, the ANOVA P value is as indicated in brackets. As indicated in the Figure legends the ANOVA test was followed by a Bonferroni's or Holm-Sidak's multiple-comparison post-test and selected pairs of data were compared. The P value is indicated at the bottom of each Figure legend. Means were considered significantly different when $P < 0.05$. Significant variations were represented by asterisks above the corresponding bar when comparing the test with the control condition or above the line when comparing the two indicated conditions.

Claims

- 1- A molecule selected from the group consisting of hsa-miR-624-5p, hsa-miR-548z, hsa-let-7i-3p, hsa-miR-885-5p, hsa-miR-449b-3p or combination thereof or a DNA or RNA encoding for said miRNA for use for treating a hepatoblastoma cancer.
- 2- The miRNA for use according to claim 1, wherein the molecule is selected from the group consisting of hsa-miR-624-5p, hsa-miR-548z, hsa-let-7i-3p, hsa-miR-449b-3p or a combination thereof.
- 3- The miRNA for use according to any one of claims 1 to 2, wherein the molecule is to be used in combination with one or more therapeutic agents.
- 4- The miRNA for use according to claim 3, wherein the therapeutic agent is another antitumor therapy, in particular with doxorubicin, cisplatin, gemcitabine, oxaliplatin, carboplatin, mitomycin C, tamoxifen, sorafenib or any combination thereof, preferably cisplatin and/or doxorubicin.
- 5- The miRNA for use according to claim 3, wherein the therapeutic agent is an immunotherapeutic agent such as drugs targeting immune system checkpoints such as PD-1 or PD-L1.
- 6- The miRNA for use according to any one of claims 1 to 5, wherein the molecule is to be used before or after resection, radiofrequency ablation and/or percutaneous ethanol injection.
- 7- The miRNA for use according to any one of claims 1 to 6, wherein the molecule is for use as neo-adjuvant therapy or adjuvant therapy.
- 8- The miRNA for use according to any one of claims 1 to 7, wherein the subject does not respond to the first line treatment and/or is not suitable for tumor resection or ablation.
- 9- The miRNA for use according to any one of claims 1 to 8, wherein the subject has a miRNA selected from the group consisting of hsa-miR-548z, hsa-miR-624-5p, hsa-let-7i-3p, hsa-miR-449b-3p or combination thereof which is under-expressed in tumor in comparison with a healthy or non-tumoral control.
- 10- Use of a miRNA selected from the group consisting of hsa-miR-624-5p, hsa-miR-548z, hsa-let-7i-3p, hsa-miR-449b-3p or of a combination thereof as a marker for detecting a hepatoblastoma cancer or a susceptibility to develop a hepatoblastoma cancer.
- 11- The use according to claim 10, wherein the miRNA is used in combination with hsa-miR-885-5p.
- 12- A method for detecting a hepatoblastoma cancer or a susceptibility to develop a hepatoblastoma cancer in a subject, comprising determining the level of a miRNA selected from the group consisting of hsa-miR-548z, hsa-miR-624-5p, hsa-let-7i-3p, hsa-miR-449b-3p or of a combination thereof in a biological sample from the subject, an under-expression of at

least one of the miRNA in comparison with a healthy or non-tumoral control being indicative of a hepatoblastoma cancer or a susceptibility to develop a hepatoblastoma cancer.

- 13- A method for selecting a subject suitable for a treatment by a molecule as disclosed in claim 1 comprising determining the level of a miRNA selected from the group consisting of hsa-miR-624-5p, hsa-miR-548z, hsa-let-7i-3p, hsa-miR-449b-3p or of a combination thereof in a biological sample from the subject, and selecting the subject if at least one of the miRNA is under-expressed in comparison with a healthy or non-tumoral control.
- 14- A method for determining the prognosis in a subject having a hepatoblastoma cancer comprising determining the level of a miRNA selected from the group consisting of hsa-miR-624-5p, hsa-miR-548z, hsa-miR-624-5p, hsa-let-7i-3p, hsa-miR-449b-3p or of a combination thereof in a biological sample from the subject, the level of expression of said at least one of the miRNA being correlated with the clinical prognosis.
- 15- Use of a kit according to claim 14 for detecting a hepatoblastoma cancer or a susceptibility to develop a hepatoblastoma cancer in a subject or for selecting a subject suitable for a treatment by a molecule as disclosed in claim 1, or for determining the prognosis in a subject having a hepatoblastoma cancer, wherein the kit comprising a detection means for at least one miRNA selected from the group consisting of hsa-miR-624-5p, hsa-miR-548z, hsa-let-7i-3p, hsa-miR-449b-3p or for a combination thereof..

Use of catenin- beta 1-targeting microRNAs for treating liver cancer

Abstract

The present invention relates to miRNAs targeting catenin-beta 1 (CTNNB1) for use in the treatment of hepatoblastoma.

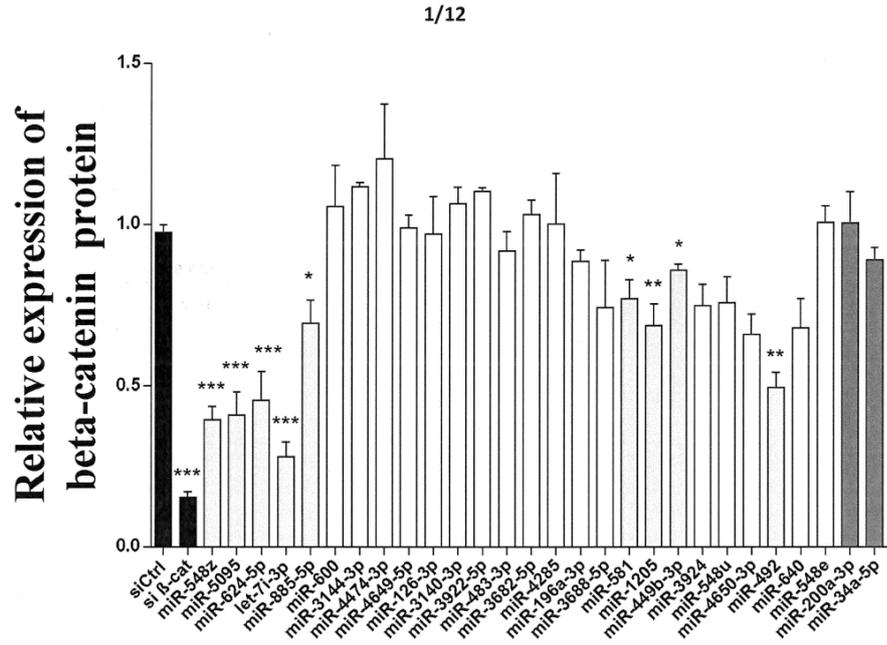


FIGURE 1

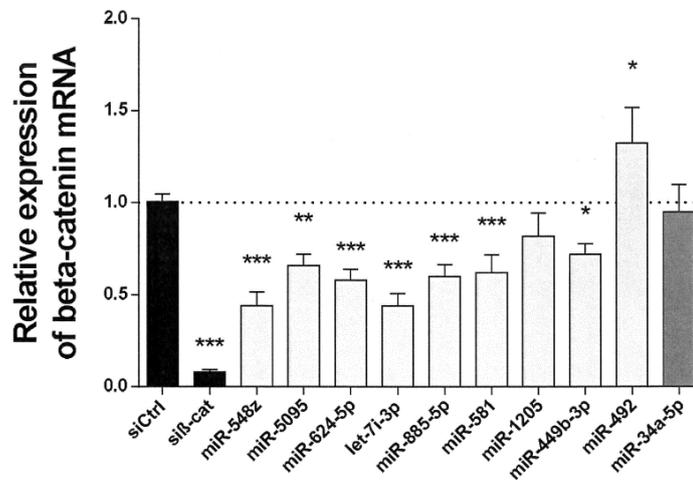


FIGURE 2

2/12

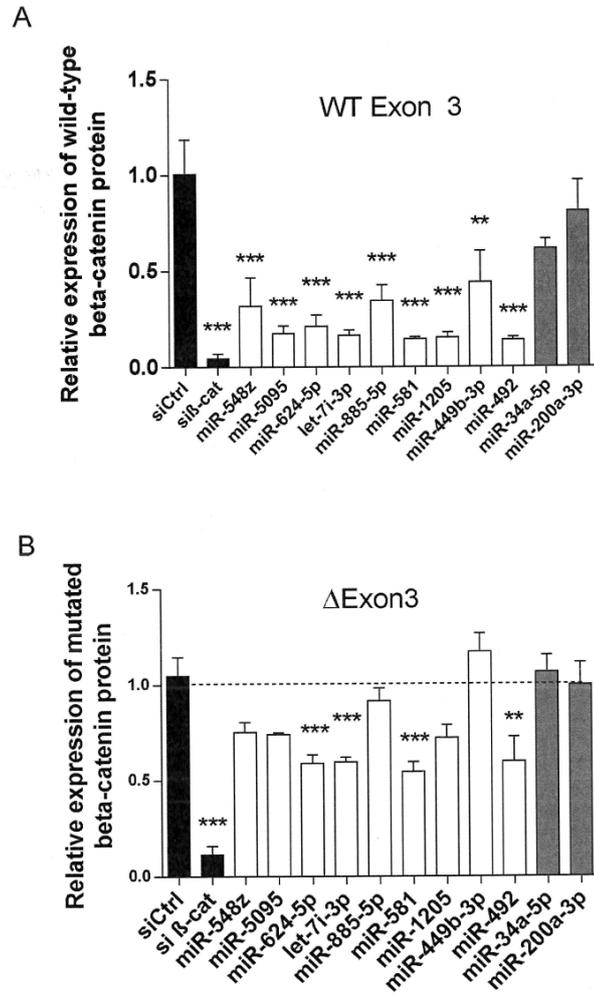


FIGURE 3

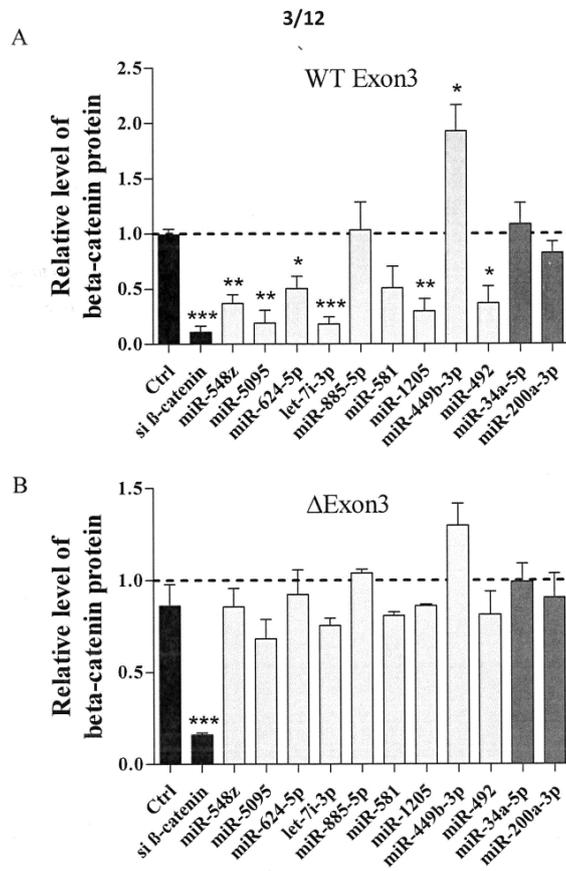


FIGURE 4

Fig 5A

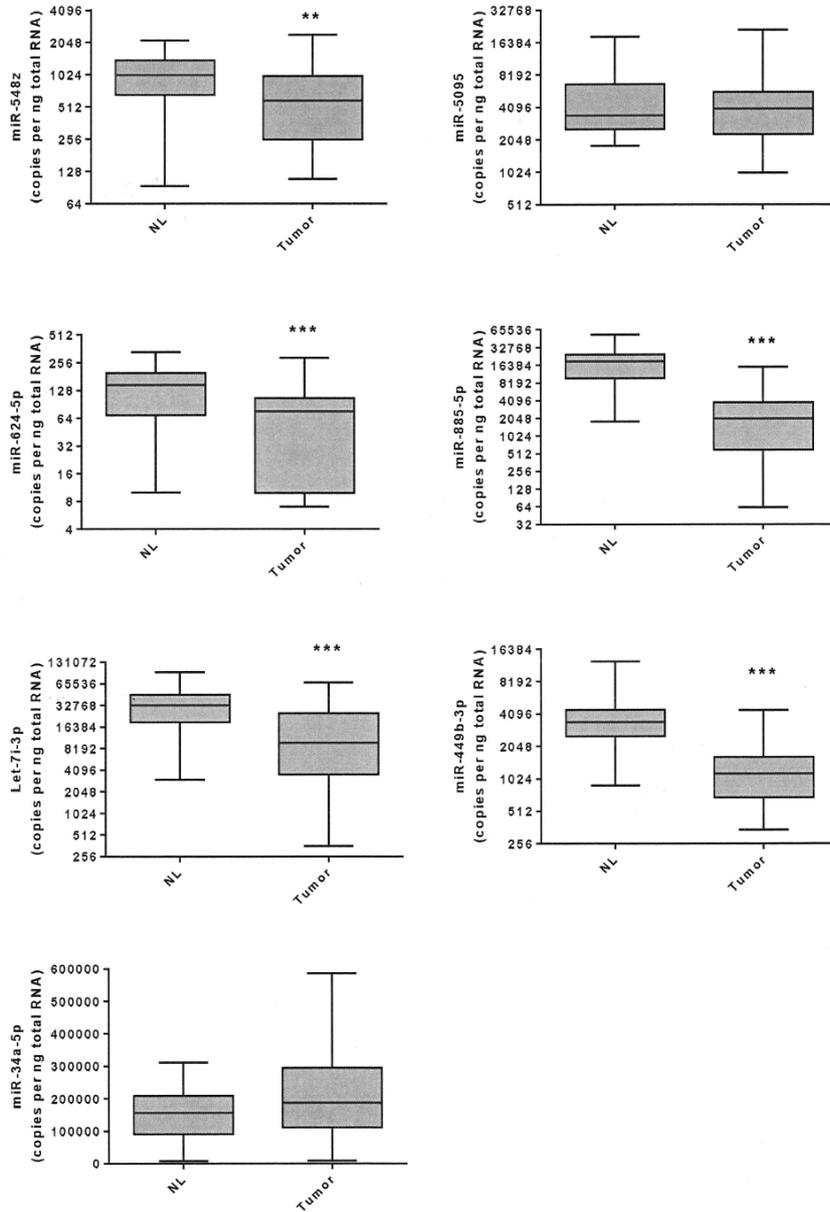


FIGURE 5

5/12

Fig 5B

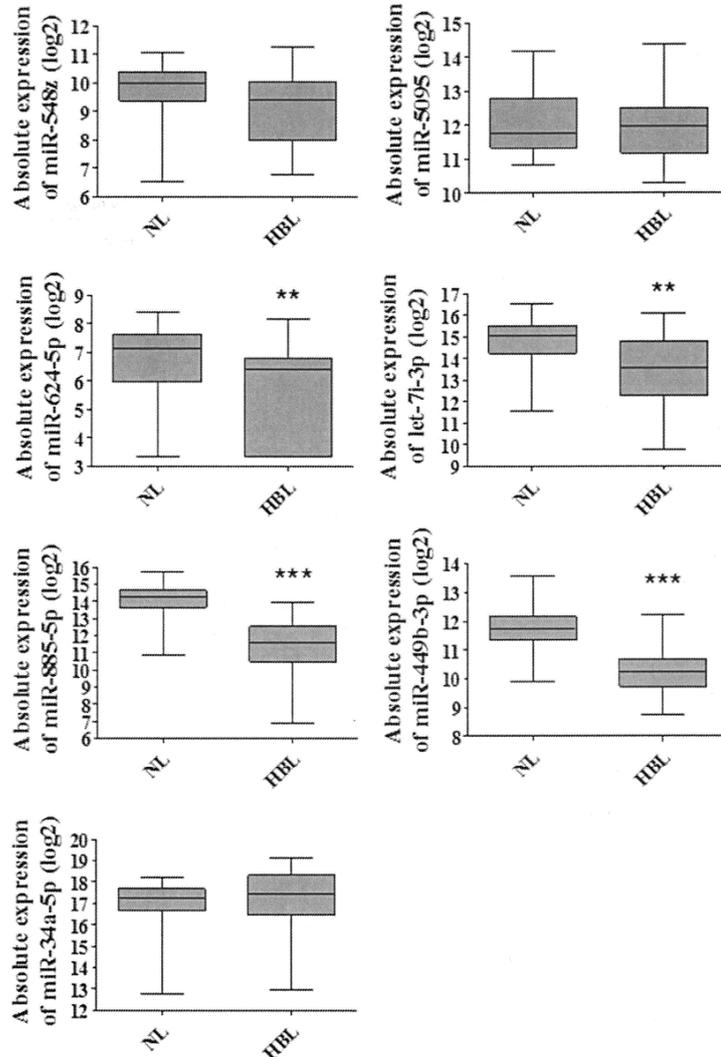


FIGURE 5 (following)

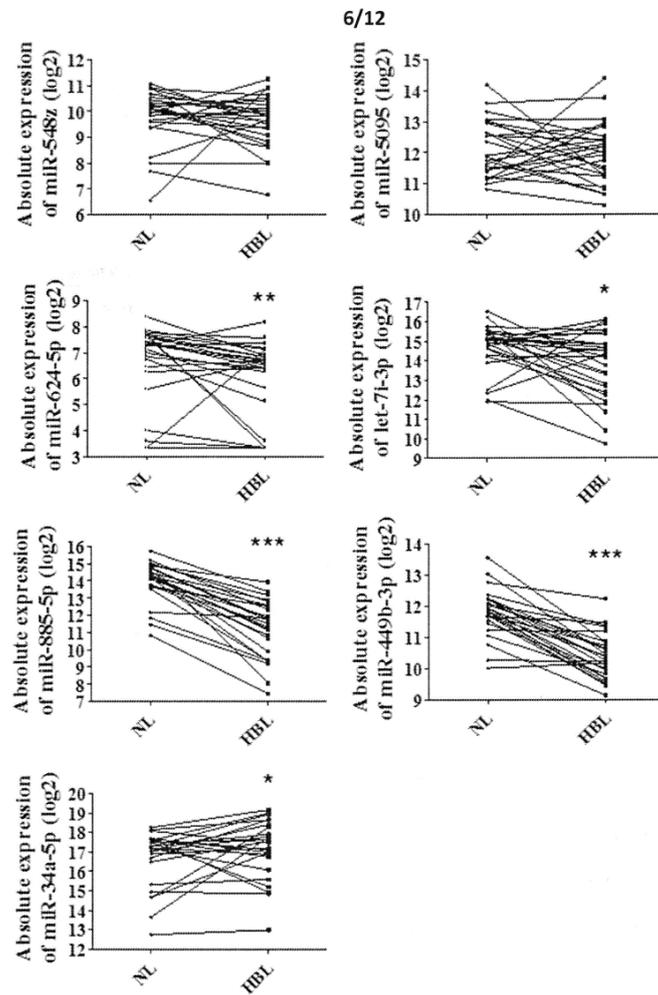


FIGURE 6

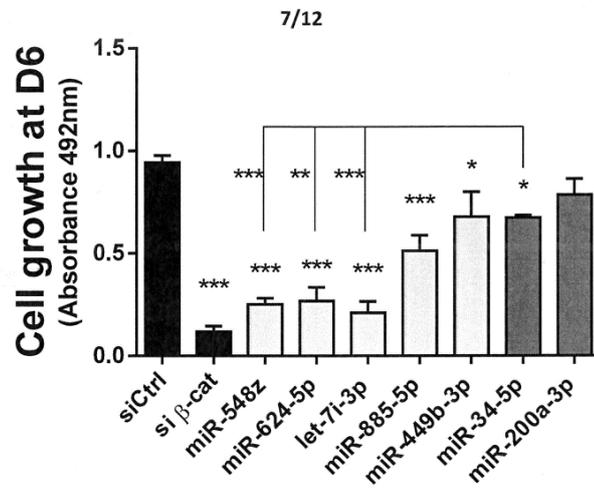


FIGURE 7

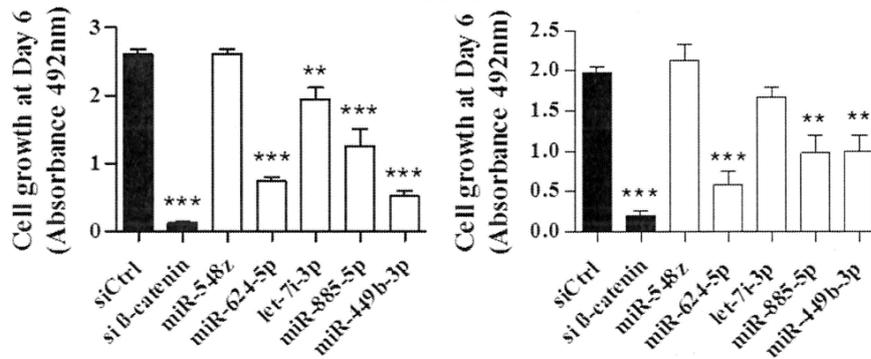


FIGURE 8

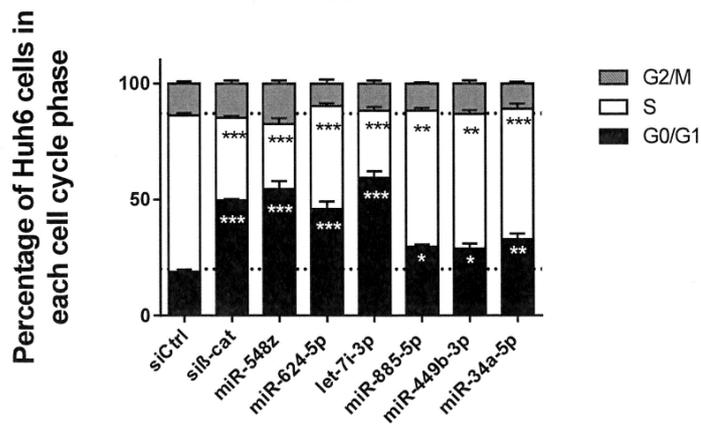


FIGURE 9

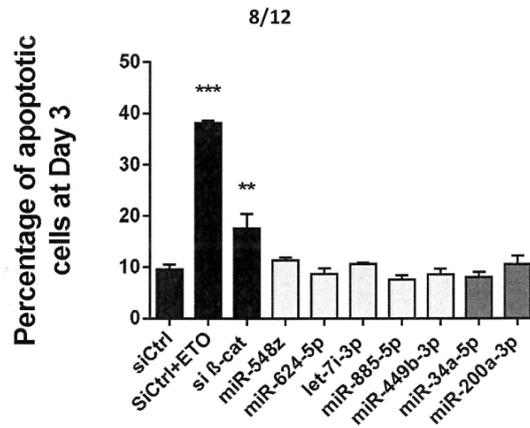


FIGURE 10

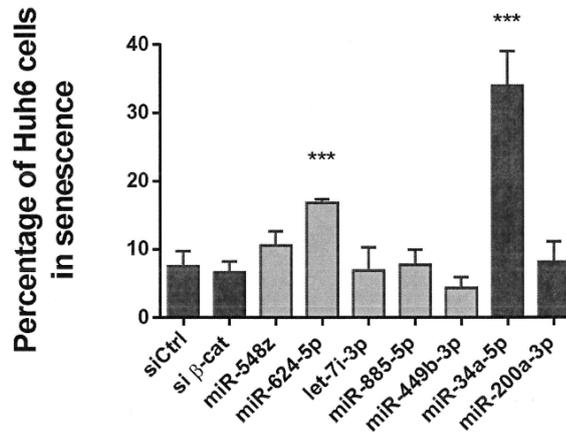


FIGURE 11

9/12

Fig 12A

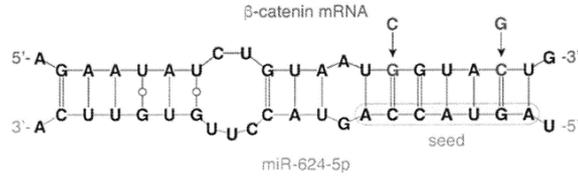


Fig 12B

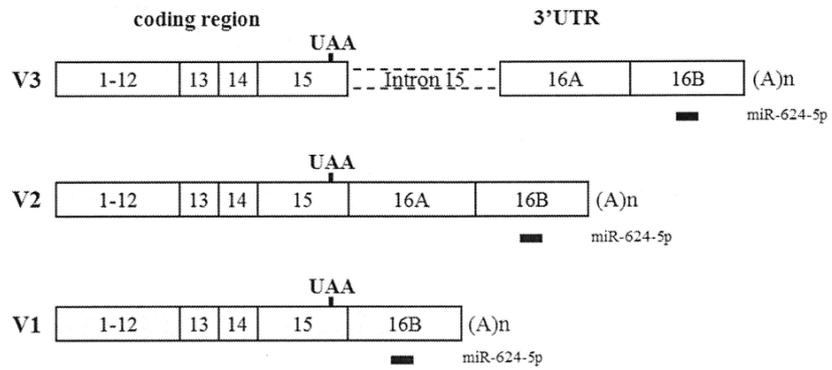


Fig 12C

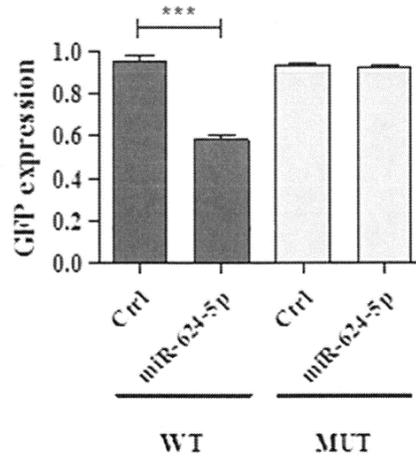


FIGURE 12

10/12

Fig 12D

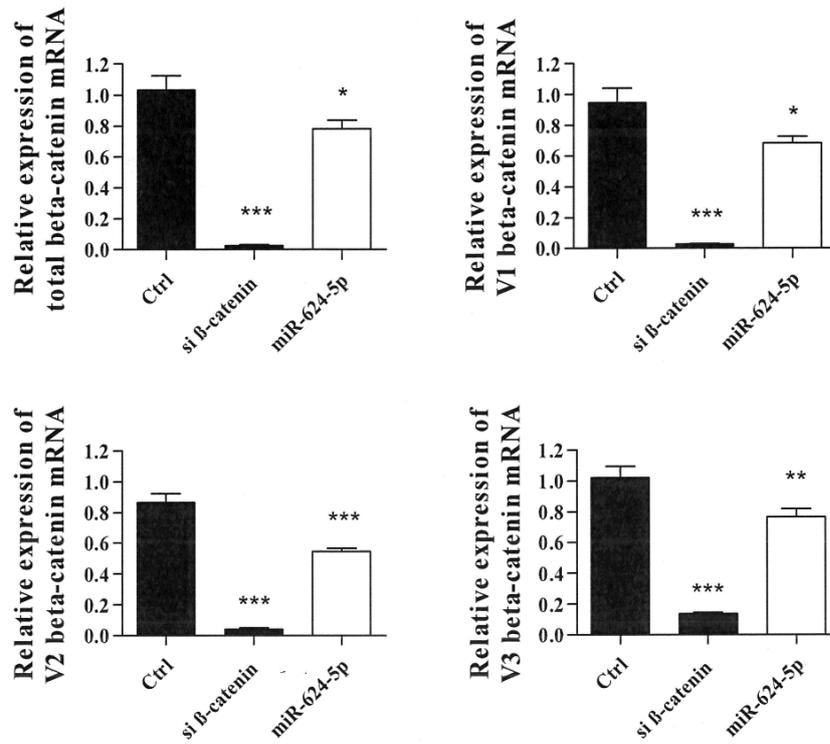


FIGURE 12 (following)

11/12

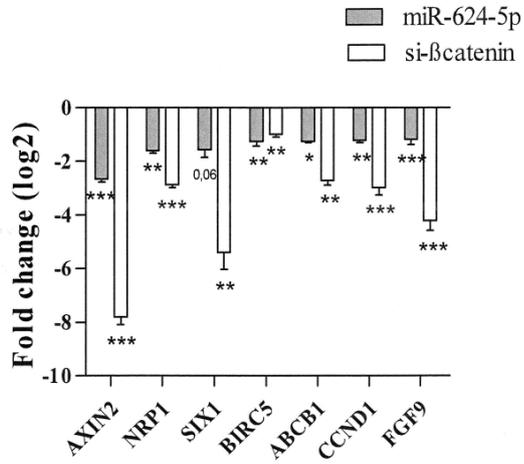


FIGURE 13A

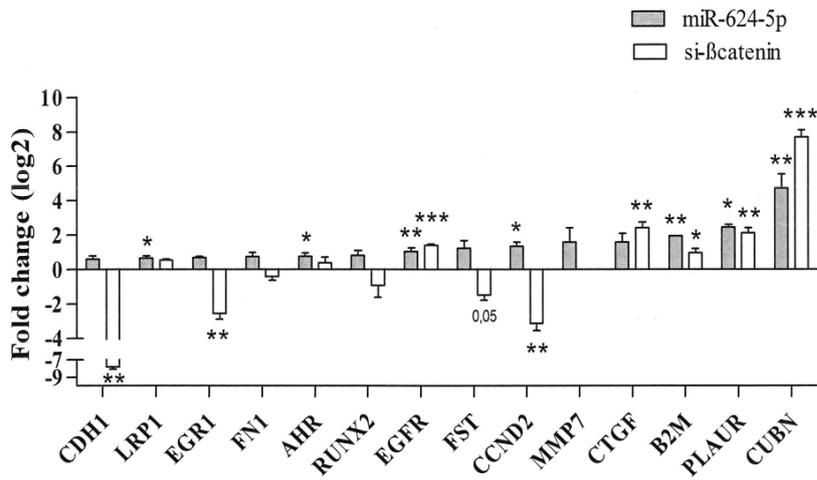


FIGURE 13B

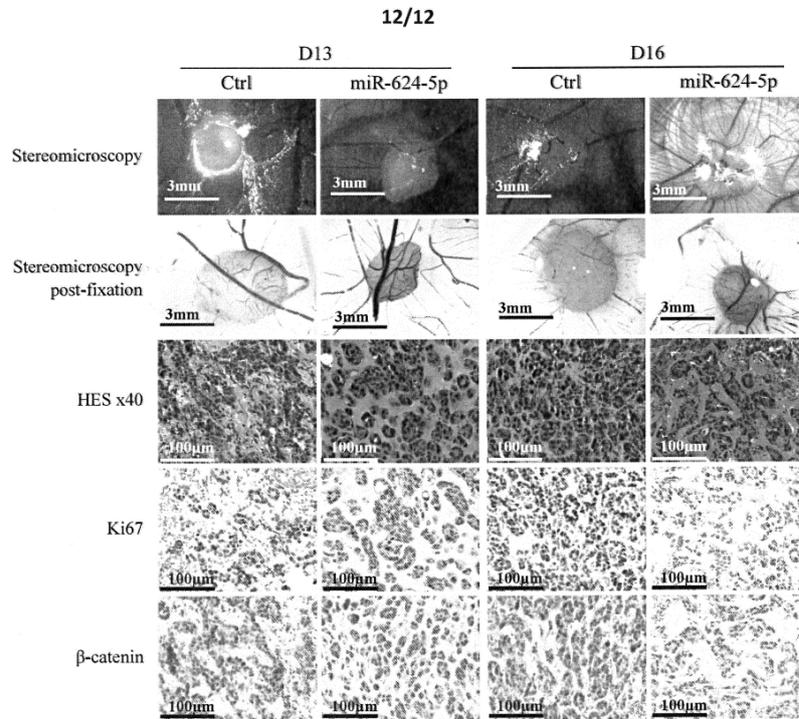


FIGURE 14A

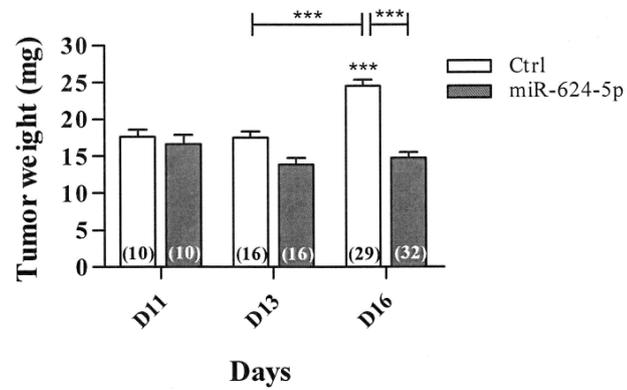


FIGURE 14B

ANNEXE 3

PARTICIPATION A LA PUBLICATION :

**NEW TUMOR SUPPRESSOR MICRORNAS TARGET GLYPICAN-3
IN HUMAN LIVER CANCER**

Flora Cartier^{1,2,3,4}, Emilie Indersie^{1,2,3,4}, Sarah Lesjean^{1,2,3,4}, Katarzyna B. Hooks^{1,2,3,4}, Angélique Desplat^{1,2,3,4}, Nathalie Dugot-Senant⁵, Véronique Trézéguet^{6,7}, Francis Sgaliocco^{1,2,3,4}, Martin Hagedorn^{1,2,3,4} and Christophe F. Grosset^{1,2,3,4}.

Affiliations

¹ University of Bordeaux, Physiopathologie du cancer du foie, U1053, F-33000 Bordeaux, France.

² University of Bordeaux, Biotherapy of Genetic, Inflammatory diseases and Cancer, U1035, F-33000 Bordeaux, France.

³ INSERM, Physiopathologie du cancer du foie, U1053, F-33000 Bordeaux, France.

⁴ INSERM, Biotherapy of Genetic, Inflammatory diseases and Cancer, U1035, F-33000 Bordeaux, France.

⁵ INSERM US005 -TBM Cor, Service for Experimental Histopathology, F-33000 Bordeaux, France.

⁶ University of Bordeaux, F-33000 Bordeaux, France.

⁷ CNRS, UMR5248, Chimie & Biologie des Membranes & des Nano-objets, CBMN, Allée Geoffroy Saint-Hilaire, Bât B14 33600 Pessac, France.

Contact information : Christophe François Grosset, U1035 INSERM, Biothérapie des Maladies Génétiques, Inflammatoires et du Cancer (BMGIC), University of Bordeaux, 146, rue Léo Saignat, Bordeaux, France ; E-mail : christophe.grosset@inserm.fr ; Tel : +33 557 574 630 ; Fax : +33 556 514 077.

Key words: liver, cancer, hepatocellular carcinoma, microRNA, Glypican-3.

ABSTRACT

Glypican-3 (GPC3) is an oncogene, frequently upregulated in liver malignancies such as hepatocellular carcinoma (HCC) and hepatoblastoma and constitutes a potential molecular target for therapy in liver cancer. Using a functional screening system, we identified 10 new microRNAs controlling *GPC3* expression in malignant liver cells, five of them e.g. miR-4510, miR-203a-3p, miR-548aa, miR-376b-3p and miR-548v reduce *GPC3* expression. These 5 microRNAs were significantly downregulated in tumoral compared to non-tumoral liver and inhibited tumor cell proliferation. Interestingly, miR-4510 strongly and inversely correlated with *GPC3* mRNA in HCC samples. This microRNA also induced apoptosis of hepatoma cells and blocked tumor growth *in vivo* in the chick chorioallantoic membrane model. We further show that the tumor suppressive effect of miR-4510 is mediated through direct targeting of *GPC3* mRNA and inactivation of Wnt/ β -catenin transcriptional activity and signaling pathway. Moreover, miR-4510 up-regulated the expression of several tumor suppressor genes while reducing the expression of other pro-oncogenes. In summary, we uncovered several new microRNAs targeting the oncogenic functions of GPC3. We provided strong molecular, cellular and *in vivo* evidences for the tumor suppressive activities of miR-4510 bringing to the fore the potential value of this microARN in HCC therapy.

INTRODUCTION

MicroRNAs (miRNAs) actively participate in gene regulation in hepatocellular carcinoma (HCC), a primary cancer of the liver affecting adults [1], and in hepatoblastoma (HBL), a rare childhood neoplasm of the liver [2]. HCC is the 5th most common cancer worldwide and the 2nd-leading cause of death from cancer, due to its aggressiveness [1]. HCC is a heterogeneous malignancy that usually develops silently on a pre-existing diseased liver with severe fibrosis or cirrhosis [1]. It is therefore often diagnosed at advanced stages resulting in an overall 5-year survival of 20% [3]. Consequently, only one-third of patients can benefit from middle-term curative regimens and Sorafenib is the only validated drug option in patients with more advanced disease [1]. In HBL the introduction of pre-operative chemotherapy and efficient surgical practices have improved disease outcome. However, the prognosis of patients suffering from high-risk tumors is still poor [2]. In this context new effective therapeutic options are urgently needed for the treatment of advanced liver tumors in adults and children.

Glypican-3 (*GPC3*) is one of the numerous oncogenes overexpressed in HCC and HBL. This extracellular co-receptor controls many signaling pathways (e.g. Wnt, Hedgehog, FGF), which are often abnormally activated in liver cancer [1]. For instance, GPC3 interacts with both Frizzled receptor and Wnt ligands and stimulates the canonical Wnt/ β -catenin pathway [4, 5]. Moreover the increased amount of cell surface GPC3 induced by the oncogenic human sulfatase 2 (SULF2) protein stimulates Wnt/ β -catenin and TGF- β signaling pathways in HCC cells [6-8]. Elevated *GPC3* expression is associated with undifferentiated and proliferative state of cancerous hepatic cells, aggressiveness of HCC tumors, poor prognosis and short overall survival of patients [9]. *GPC3* silencing by small interfering RNAs (siRNAs) or miRNAs inhibits hepatic cancer cell growth [10-12]. Thus *GPC3* clearly constitutes a relevant molecular target in HCC.

MiRNAs are small non-coding RNAs capable of modulating gene expression at the post-transcriptional level [13] by interacting with specific sites, usually located in the 3' untranslated region (UTR) [10, 14, 15]. As regulators of most cellular functions, miRNAs are intricately involved in human diseases including cancer [16, 17]. Although the effect mediated by some miRNA on any particular target is modest, the simultaneous regulation of a broad array of target genes by one miRNA can lead to a profound genetic reprogramming and cell-phenotypic changes [16, 17]. Due to their functional redundancy (e.g. multigene targeting) and regulatory properties miRNAs can be used as drugs with promising therapeutic

applications in cancer. For instance MRX34, a synthetic encapsulated form of miR-34a-5p, is currently tested for the treatment of primary adult liver cancer [16, 17]. Therefore, miRNA-based therapy might be a solution for the improvement of life expectancy in patients with advanced HCC or high-risk HBL.

Using a functional screening system, the Dual Fluorescence (DF)-FunREG system [10], we uncovered new miRNAs inhibiting *GPC3* expression in HCC cells. Then, we measured expression of these miRNAs in tumoral and non-tumoral liver samples and studied their propensity to act as tumor suppressors *in vitro* using cell-based methods. Finally, the tumor suppressive effect of the most promising *GPC3*-regulating miRNA was further investigated using molecular and functional tools, as well as the chick chorioallantoic membrane model.

RESULTS

Selection of fourteen *GPC3*-regulating miRNAs by functional screening

To identify novel miRNAs negatively regulating *GPC3* through its two UTRs, we performed a new *in vitro* functional screening of a library of 1712 individual miRNAs using the HCC-derived Huh7 cell line and an updated version of the DF-FunREG system [10]. Twenty out of 1712 miRNAs were retained according to a decrease of -0.5 or more of GFP/Tomato ratio fold change (Figure 1A and Supplementary Table S1). Such threshold is indicative of a significant decrease resulting from the specific action of these miRNA on the UTRs of *GPC3* bordering a gene reporter (GFP) in comparison to a reference gene (tomato). Three out of these 21 miRNAs e.g. MiR-96-5p, miR-1271-5p and miR-1973 were excluded from further analyses because they were subject of early investigations by our team [10, 12]. The remaining 17 candidate miRNAs were transfected into Tomato-positive Huh7 cells co-expressing the “GFP” transgene lacking the *GPC3* UTRs to eliminate false positive miRNAs or either the “GFP-5’UTR-*GPC3*” or the “GFP-*GPC3*-3’UTR” transgene to determine their UTR preference. These control experiments allowed us to exclude three false positive miRNAs and to keep only 14 miRNAs (Figure 1B-D). As expected, most of them act through the 3’-UTR (Figure 1B) but some exert a moderate effect either through *GPC3* 5’-UTR [15] or both UTRs [18] (Figure 1C). Contrarily to miRNA paralogs miR-96-5p and miR-1271-5p [10, 12], the previously described *GPC3*-regulating miRNAs, miR-219-5p and miR-520c-3p [19, 20] were below the cut-off (Supplementary Table S1) and thus not selected in our screening. The final outcome of selection by the DF-FunREG screening is a total of 14 new and potent *GPC3*-regulator miRNAs (Figure 1D).

Ten miRNAs regulate *GPC3* expression in HCC cells

The next step was to evaluate the regulatory effect of the 14 selected miRNAs on endogenous *GPC3* protein expression in Huh7 cells. A siRNA against *GPC3* and the miRNAs miR-96-5p and miR-219-5p were used as positive controls [10, 12, 20]. Among the 14 miRNAs, nine were able to control endogenous *GPC3* protein expression (seven negatively and two positively, Figure 2A). Since *GPC3* is anchored at the external side of the membrane, we also measured its levels at the membrane after miRNA transfection. The regulatory effect of miR-4510, miR-4460, miR-135b-3p, miR-4635, miR-4252, miR-376b-3p, miR-140-5p and miR-548aa on membrane *GPC3* levels was confirmed (Figure 2B). However, miR-203a-3p and the control miR-219-5p had no significant inhibitory effect (Figure 2B). Moreover, miR-

548v specifically decreased GPC3 membrane levels (Figure 2B) confirming the trend observed with the endogenous protein (Figure 2A). Together, these investigations validated ten miRNAs regulating GPC3 expression in Huh7 cells. Finally, we assessed the effect of these ten miRNAs on *GPC3* mRNA expression. MiR-4510, which exerted the strongest inhibitory effect on total GPC3 protein (Figure 2A-B), also decreased *GPC3* mRNA expression (Figure 2C). Altogether, we noticed few differences between the screening results (Figure 1) and GPC3 expression following miRNA transfection (Figure 2). Those differences may be due to the pleiotropic effects of miRNAs on multiple targets or the involvement of other post-transcriptional regulators [10, 13, 15]. To summarize, our investigations led to the validation of ten miRNAs regulating *GPC3* protein synthesis in HCC cells: miR-4510, miR-4460, miR-135b-3p, miR-548v, miR-4635, miR-4252, miR-376b-3p, miR-140-5p, miR-548aa and miR-203a-3p. *In silico* predictions indicate that some of them (e.g. miR-4510) may function through a direct miRNA:*GPC3* mRNA interaction (Supplementary Table S2).

Downregulation of five *GPC3*-regulating miRNAs in HCC

The expression of the 10 novel *GPC3*-regulating miRNAs was measured by RT-qPCR in a first cohort of 19 non-tumorous livers (NTL) and 98 HCC samples. In parallel, expression of these miRNAs was compared in a second cohort of 19 pairs of liver tumor/adjacent NTL from patients with HCC. MiR-4460 was not detected in liver, whereas miR-135b-3p, miR-4635, miR-4252 and miR-140-5p were not deregulated in tumors compared to NTL (Supplementary Figure S2B). Instead, miR-4510, miR-203a-3p, miR-548aa, miR-376b-3p and miR-548v were significantly decreased in HCC (Figure 3A-B). The expression of each miRNA was correlated to HCC patients' clinical parameters. While miR-548aa downregulation in HCC was associated with the presence of satellite nodules, miR-376b-3p downregulation was associated with tumors harboring p53 mutations (Supplementary Table S3). Altogether, our data showed that the five *GPC3*-regulating miRNAs miR-4510, miR-203a-3p, miR-548aa, miR-376b-3p and miR-548v are significantly downregulated in HCC compared to NTL.

The five HCC down-regulated miRNAs exert antitumor effects

We next investigated the effect of the five down-regulated miRNAs on tumor cells *in vitro*. All miRNAs significantly inhibited Huh7 cell growth and proliferation (Figure 4A-B). However, compared to miR-4510 alone, different combinations of the miRNAs did not further potentiate growth inhibition (data not shown). The inhibitory effect of each miRNA on

Huh7 cell proliferation could be abolished by the simultaneous use of corresponding anti-miRs (Supplementary Figure S3). The specific blocking of four out of five endogenous miRNAs led to a slight increase in Huh7 cell proliferation (Supplementary Figure S3). We further studied the effect of these five miRNAs on different phases of cell division. All five miRNAs increased the percentage of cells in G0/G1 phase and reduced the percentage of cells in S phase (Figure 4C). Finally, we investigated the ability of these miRNAs to induce apoptosis using two complementary assays. Annexin V/7AAD staining and caspase 3/7 activity revealed that only miR-4510 induced Huh7 apoptosis (Figure 4D and Supplementary Figure S4). Altogether these results demonstrate that miR-4510, miR-203a-3p, miR-548aa, miR-376b-3p and miR-548v are potent inhibitors of HCC cell proliferation.

MiR-4510 is a powerful antitumoral agent in liver cancer and acts through *GPC3* 3'-UTR targeting

We next investigated in more details expression of miR-4510 and *GPC3* mRNA in liver tumor samples. We noticed that miR-4510 was constantly decreased in HCC tumors (Figure 3B) and inversely correlated with *GPC3* mRNA in HCC samples (Figure 5A) making a strong and direct connection between the reduction of this miRNA and *GPC3* overexpression. Its decrease was independent of HCC subgroup clustering (Figure 5B) [21] and was also observed in HBL tumors (Figure 5C). Thus a decrease of this miRNA constitutes a good indicator of liver tumorigenesis. Because miR-4510 efficiently impaired cell proliferation and induced apoptosis of Huh7 cells (Figure 4), we compared its effects on hepatoma cells with that of miR-34a-5p, a miRNA currently tested in clinic (MRX34) [1, 17, 22]. MiR-4510 inhibited the growth of HCC-derived Huh7 and Hep3B cells and of HBL-derived Huh6 cells and it was significantly more effective than miR-34a-5p in Hep3B cells (Figure 6A). Moreover, it induced apoptosis of the three hepatoma cell lines tested while miR-34a-5p had no pro-apoptotic effect (Figure 6B). Finally, the proliferative capacity of miR-4510-transfected Huh7 cells was partly rescued by the ectopic expression of a *GPC3* transgene devoid of its 5'- and 3'-UTRs (pL-hGPC3, Figure 6C). Finally, according to the screening data (Figure 1B) and *in silico* predictions, a target site of miR-4510 was located in *GPC3* 3'-UTR at position 308-315 (Figure 7A). To assess the relevance of this site, two point mutations (r.311C>G and r.313C>G) were inserted in this 3'-UTR sequence. Then FunREG analysis was performed [23, 24]. As expected, miR-4510 decreased the fluorescence of GFP with a wild-type *GPC3* 3'-UTR (Figure 7B) demonstrating its ability to regulate *GPC3* at a post-transcriptional level. Interestingly, this decrease was partly abrogated when the 3'UTR

contained the mutated sequence (Figure 7B) showing that miR-4510 physically interacts with *GPC3* 3'-UTR at this position. Altogether these data demonstrate that miR-4510 is a powerful antitumoral agent in liver cancer and acts in part through *GPC3* downregulation.

MiR-4510 inhibits Wnt/ β -catenin signaling pathway

Because miR-4510 inhibits liver cancer cell proliferation through *GPC3*, which is involved in Wnt/ β -catenin pathway activation [4, 5], we investigated miR-4510 effect on this pathway. As shown in Figure 8A, miR-4510 inhibited the transcriptional activity of β -catenin in Huh7 cells without affecting β -catenin expression. The inhibition of Wnt pathway by miR-4510 was accompanied by the decrease of associated genes including two transcriptional cofactors of β -catenin, such as *LEF1* and *TCF7L1* [25, 26], and various genes associated with poor-prognosis HCC such as *BMP4*, *PDGFRA* and *SIX1* (Figure 8B). On the other hand, miR-4510 treatment led to an increase in several important regulators of β -catenin functions and tumor suppressors such as *AXIN2*, *Cadherin 1 (CDH1)*, *LRP1* and *WNT5A* (Figure 8B). The expression of several pro-oncogenic genes in liver (*GJA1*, *IRS1*, *PDGFRA* and *SIX1*) was also decreased in miR-4510-transfected Huh7 cells (Figure 8B). Surprisingly, we did not observe any effect of miR-4510 on *MYC* and Cyclin D1 in Huh7 but this might be due to the wild-type status of β -catenin or the possible influence of other signaling pathways such as p53 in these cells [1, 26]. Altogether these data showed that miR-4510 inhibits Wnt/ β -catenin pathway.

MiR-4510 inhibits tumor growth and induces apoptosis of HCC cells *in vivo*

We next evaluated the antitumor activity of miR-4510 *in vivo* using the CAM model. Critical biological features of human tumor progression such as cell proliferation, angiogenesis, normal tissue invasion, and tumor cell-host interactions have been previously successfully reproduced in this model [27, 28]. Moreover, the CAM model is useful for testing small non-coding RNA-mediated gene knockdown on tumor growth and angiogenesis [29]. We transfected Huh7 cells with miR-4510 or Ctrl and validated the inhibition of *GPC3* by miR-4510 (Supplementary Figure S5A-B). We deposited these Huh7 cells on the CAM and monitored tumor growth on days 3 and 6 (Figure 9A). At day 3 no obvious macroscopic differences were observed between Ctrl and miR-4510 in tumor appearance or size (Figure 9B, upper panels). Staining of tissue cross-sections with Hematoxylin and Eosin did not reveal any difference either (Figure 9B-C). However, there was a significantly lower number of tumors with bleeding in presence of miR-4510 indicating a reduction of Huh7 cells aggressiveness (Figure 9D, left panel). *GPC3* protein expression was also decreased in tumors

transfected with miR-4510 compared to control (Supplementary Figure S5C). At day 6, the growth of miR-4510 tumors was noticeably impeded compared to control tumors (Figure 9B-C, upper panels), as assessed by a disappearance of bloody and coagulation areas (Figure 9B, upper panels) and large vessels in tumoral tissue (Figure 9B, lower panels and 8C, upper panels). As shown in Figure 9D, right panel, 80% of Ctrl tumors and only 30 % of miR-4510 tumors were characterized by bleeding, further indicating a reduction of the aggressiveness of miR-4510-transfected HCC cells during tumor development. Next, we characterized the effects of miR-4510 on tumor cell proliferation and apoptosis, respectively by staining of Ki67 and cleaved Caspase 3. The decrease of the proliferative marker Ki67 in miR-4510 transfected-tumors was obvious both at day 3 and day 6 of tumor growth (Figure 9C, middle panels), indicating that miR-4510 was capable of inhibiting the proliferation of HCC. As for apoptosis analysis, cleaved Caspase-3 staining was not detectable at day 3 and 6 in control tumors. However, tumors transfected with miR-4510 were highly positive for cleaved Caspase-3 at day 6 suggesting that miR-4510 induces HCC cell apoptosis at later stages of tumor development (Figure 9C, lower panels). Altogether these results showed that miR-4510 induces apoptosis and inhibits the growth and angiogenesis of HCC tumors *in vivo*.

DISCUSSION

In this work we identified new miRNAs regulating *GPC3*. Among them, 5 (namely miR-203a-3p, miR-4510, miR-548aa, miR-376b-3p and miR-548v) inhibited *GPC3* expression in HCC cells and acted as tumor suppressors in liver by inhibiting HCC cell growth and proliferation. So far, only miR-203a-3p has been described as a mediator of liver carcinogenesis [30]. Therefore, miR-4510, miR-548aa, miR-376b-3p and miR-548v are new actors in liver cancer. Remarkably, these 5 miRNAs were significantly decreased in HCC tumors (Figure 3). These results suggest that the upregulation of *GPC3* in liver cancer originates in part from the simultaneous downregulation of multiple specific miRNAs as already described for other cancers [22, 31, 32]. Thus this might be a more general mechanism developed by cancer cells to maintain oncogenicity as summarized in recent reviews [31, 33, 34]. Other mechanisms responsible for the oncogenic overexpression of *GPC3* in HCC have been shown before including transcriptional activation by Myc [35] and increase in *GPC3* copy number [36]. Therefore, miRNA downregulation might be one of the molecular processes set up by HCC cells to maintain high level of *GPC3* and activate oncogenic downstream signaling including the Wnt pathway [1].

Several microRNAs negatively regulating *GPC3* have been described in liver cancer cells [10, 12, 15, 19, 20]. Surprisingly, while we confirmed the inhibition of *GPC3* by miR-219-5p (Figure 2A), this miRNA and miR-520c-3p [19, 20] were not retained in our screen using *GPC3* 5'- and 3'-UTRs as baits (Supplementary Table S1). These data suggest that those two miRNAs may target *GPC3* mRNA indirectly or through its coding region. Only miR-1271-5p and miR-219-5p are decreased in HCC samples [10, 20] and we previously reported that *GPC3* mRNA inversely correlates with miR-1271-5p in HBV-positive HCC subgroup [10]. Here, we report the decrease of 5 new *GPC3*-regulating miRNAs in two independent cohorts of liver cancer tissues. While we cannot exclude the possibility that different miRNAs (including miR-219-5p and miR-1271-5p) play a role in HCC-associated *GPC3* overexpression, our data suggest that miR-4510 is of particular importance in this cancer as it strongly and inversely correlated with *GPC3* mRNA levels in HCC tumors (Figure 4A). MiR-4510 may also play a tumor suppressive role in colorectal adenocarcinoma in which it is decreased [37]. Therefore, we speculate that miR-4510 plays a major role in the deregulation of *GPC3* in liver cancer.

Among the 10 new miRNAs identified, miR-4510 was the most potent inhibitor of *GPC3* expression. It induced proliferation arrest and apoptosis in all tested cell lines more

efficiently than miR-34a-5p, the first miRNA-mimic tested in clinic. Our data show that the tumor suppressor effect of miR-4510 is related to the reduction of GPC3 but also to Wnt signaling inactivation. Indeed, miR-4510 inactivates Wnt/ β -catenin pathway not only at its initiation step through GPC3 but also at a later stage by silencing LEF1 and TCF7L1 [26]. Moreover, it decreases expression of several pro-oncogenic genes under the control of Wnt/ β -catenin pathway including *GJA1*, *IRS1*, *PDGFRA* and *SIX1* [38-40]. We speculate that miR-4510-transfected cells reactivate the inhibited Wnt pathway by upregulating the pro-inflammatory factor IL6 and several Wnt cofactors such as CDH1/E-cadherin, LRP1 and WNT5A (Figure 8B). Thus, miR-4510 directly and indirectly inhibits several oncogenes in liver tissues and might constitute an important tumor suppressor in liver that antagonizes key tumoral processes (e.g. uncontrolled proliferation and cell survival) and inactivates signaling cascades (e.g. Wnt pathway). Further experiments aiming at identifying the other targets of miR-4510 in HCC cells should shed some light on its precise role in liver carcinogenesis.

There is a growing therapeutic interest in the use of miRNAs in clinical oncology because of their small size, easy manufacturing and pleiotropic effect [1, 17, 41]. MiR-34a-5p, which constitutes a miRNA mimic encapsulated in ionizable liposomes (MRX34), is being tested since spring 2013 in a multicentric clinical trial [22]. Another miRNA, miR-16, is in clinical trials since early 2015 for mesothelioma and lung cancer [41]. Given the progress of siRNA- and miRNA-replacement therapy in cancer [1, 17, 41], our data provides strong molecular, cellular and *in vivo* evidences supportive of miR-4510-based drugs as an option for the treatment of patients with HCC or HBL. The tumor growth inhibition mediated by miR-4510 *in vivo* further supports its relevance as a candidate for miRNA-replacement therapy for the treatment of patients with advanced liver cancer.

In conclusion, our report further demonstrates the active role of miRNA deregulations in oncogenic processes and brings new information about the complex miRNA:*GPC3* relationships occurring in liver tumors. We therefore expect that the data presented in this report will favor the development of new therapeutic solutions for the treatment of patient with HCC or HBL.

MATERIALS AND METHODS

Plasmids construction

The lentiviral plasmids pTRIP-0, pL-GFP, pL-Tomato and pL-GFP-GPC3 (bearing the *GPC3* 3'-UTR and renamed pL-GFP-GPC3-3'UTR) have been previously described [10, 12, 24]. The pL-GFP-5'+3'UTR-GPC3 and pL-GFP-5'UTR-GPC3 constructs were obtained by inserting the *GPC3* 5'-UTR in the pL-GFP-GPC3-3'UTR and pL-GFP plasmids, respectively. The pL-GFP-GPC3-3'UTR-Mut plasmid was constructed as follows: the mutated *GPC3* 3'-UTR sequence bearing the two-point mutations r.311C>G and r.313C>G was obtained by gene synthesis (MWG Biotech) and cloned in the pEX-A2 plasmid. Then the insert was subcloned into the XhoI-KpnI-digested pL-GFP-GPC3-3'UTR. To construct pGEM-T-hGPC3 plasmid, the *GPC3* Open Reading Frame (ORF) was amplified by PCR using the primers 5'-ATTCTCTAGAGAATTCGGATCCATGGCCGGGACCGTGCGC-3' and 5'-CTCACTCTAGAGCGGCCGCTCAGTGCACCAGGAAG-3' and the pEF-BOS plasmid containing the human *GPC3* cDNA as template, which was kindly provided by Jorge Filmus [42]. After adenylation, the PCR fragment was subcloned into the pGEM®-T vector (Promega). The sequences in all constructions were verified by DNA sequencing. The lentiviral pL-hGPC3 was constructed by subcloning the human *GPC3* ORF from the pGEM-T-hGPC3 plasmid into the BamHI-XbaI-digested pL-GFP plasmid.

Cell lines

The HCC-derived Huh7 and Hep3B cell lines were grown as described before [10, 12, 24]. The HBL-derived Huh6 cells were grown in DMEM 1g/L (Invitrogen, Carlsbad, California, USA) containing 10% fetal bovine serum (FBS) and penicillin/streptomycin (1000 units/mL). Cell lines were yearly identified using STR profiling (ATCC-LGC Standard) and regularly tested for mycoplasma-free infection. Stable Huh7 cell lines co-expressing Tomato and GFP transgenes (with the *GPC3* 5'-UTR, 3'-UTR, both or neither) were developed by lentiviral transduction using a multiplicity of infection of 1 and cell sorting. Production and titration of infectious lentiviral particles, cell transduction, as well as biosafety considerations and procedures have been described previously [10, 12, 24].

Liver Samples and clinical data

Liver tissues were treated and samples were clinically, histologically, and genetically characterized as previously described [10]. All samples were from patients recruited in

accordance with French law and institutional ethical guidelines. Two sets of liver samples (set 1: 98 HCC and 19 NTL samples, Supplementary Table S1; set 2: 19 HCC and their corresponding NTL samples [10]) were collected from patients surgically treated at French University Hospitals.

Small RNAs, miRNA mimic library and cell transfection

The *GPC3* small interfering RNA (5'-UUCUUGAGCAGCAUGUUGG-3', Eurofins Genomics, Belgium), miRNA mimics and hairpin inhibitors (Qiagen, Sigma-Aldrich, Exiqon, Thermo Scientific Products) were used for transfecting cells as described previously [10, 12, 24]. The Human miScript miRNA Mimic 96 Set miRBase V17.0 (Qiagen, Courtaboeuf, France) was used in the DF-FunREG screening.

DF-FunREG screening, FunREG analyses and real-time quantitative PCR and RT-PCR

FunREG and DF-FunREG analyses were performed three days after transfection as previously described [10, 12, 24] with few modifications including fluorescence measurements using the Envision multiplate reader (Perkin Elmer). Real-time quantitative PCR and RT-PCR procedures and *GPC3* primers were as described elsewhere [12]. Taqman microRNA assays (Applied Biosystems) were used to quantify the relative expression levels of mature miRNAs in the first set of 117 liver samples. MiScript Sybergreen assays (Qiagen) were used to quantify the absolute expression of mature miRNAs in the second set of 38 liver paired samples.

Antibodies, western blot analysis and flow cytometry

Western blot procedure has been described previously [12]. Specific protein signal was normalized to the amount of total proteins (SYPRO Ruby, Sigma-Aldrich, Lyon, France). The rabbit monoclonal anti-*GPC3* (EPR5547, 1:5000) antibody was purchased from Abcam. The mouse monoclonal anti-GAPDH (FL-335, 1:2000) and anti- β -Catenin (C-14, 1:4000) antibodies were from Santa Cruz and BD Biosciences, respectively. The anti-human *GPC3*-Allophycocyanin (APC) monoclonal antibody and IgG2a-APC isotype control were from R&D systems (Abingdon, UK). For flow cytometry analyses, Huh7 cells were washed in PBS, detached with PBS/EDTA, collected and incubated with the fluorescent anti-*GPC3* or control antibody. Expression of the membrane *GPC3* protein was analyzed by FACS. Cells incubated with the IgG2a-APC isotype control were used as negative control to gate the eGFP-positive cell populations and to measure the basal Mean Fluorescence Intensity of the whole cell population.

Cell growth and proliferation assays

Cell growth was measured with the In vitro Toxicology assay kit (Sigma) as described previously [10], except that absorbance at 492 nm was measured using the CLARIOstar multiplate reader (BMG labtech). For cell counting experiments, 200 000 cells were transfected and seeded into 6-well plates in a volume of 2.5 ml. Three days later total cells were counted using a Malassez cell. For the rescue experiments Huh7 cell lines ectopically expressing a *GPC3* transgene lacking the UTRs (pL-hGPC3) or a control empty transgene (pTRIP-0 plasmid) were established by lentiviral transduction. Then cells were transfected by miR-4510 or Ctrl. Three days later cells were counted and GPC3 protein expression was analyzed by Western blotting.

Cell cycle assay

Cell cycle was studied with the APC BrdU flow kit from BD Pharmingen according to manufacturer's instruction. Briefly, 200 000 cells were transfected and seeded into 6-well plates in a volume of 2.5 ml. Three days later BrdU was added in each well and incorporated into newly synthesized DNA by cells entering and progressing through the S phase of the cell cycle. The incorporated BrdU was detected using an APC anti-BrdU fluorescent antibody and the levels of cell-associated BrdU were then measured by FACS.

Cell death and caspase assays

Prior to apoptosis detection 200 000 cells were transfected and seeded into 6-well plates in a volume of 2.5 ml. Three days later total cells were collected and apoptosis was analyzed using the Annexin V-PE/7-Amino-Actinomycin (AAD) apoptosis detection kit (BD Pharmingen). Viable cells with intact membranes exclude 7-ADD and are PE Annexin V negative. Fluorescence generated by the cell-bound Annexin V-PE, which measures the percentage of early apoptotic cells, and the 7AAD, which measures the percentage of late apoptotic cells, were analyzed by FACS. Total apoptosis was calculated by adding the percentage of late apoptotic cells (Annexin V-PE^{High} / 7ADD^{High}) and the percentage of early apoptotic cells (Annexin V-PE^{High} / 7ADD^{Low}). Activities of Caspases 3 and 7 were measured using the Luminescent Caspase-Glo 3/7 assay from Promega as described previously [10], except that luminescence was measured using the CLARIOstar multiplate reader (BMG labtech).

Wnt transcriptional activity and associated reagents

Wnt transcriptional activity was assessed using the TOPflash/FOPflash assay. Firstly 200 000 Huh7 cells were transfected with Ctrl or miR-4510 and seeded into 6-well plates in a volume of 2.5 ml. Cells were collected two days later, 10 000 cells were seeded into 96-well plates in a volume of 100 μ L and transfected with the control plasmid pRL-TK-Renilla (Promega) and either the TOPflash or FOPflash plasmids kindly provided by Hans Clevers [43]. Cells were lysed 24 hours later and luciferase activity was measured using the Dual-Luciferase[®] Reporter Assay System (Promega) according to manufacturer's instructions. The expression of 84 genes related to WNT-mediated signal transduction was estimated using Human Wnt Signaling Targets RT² Profiler PCR Array (Qiagen) in Huh7 cells 72hr after transfection.

Chick CAM assays

Animal procedures were carried out in agreement with the European (directive 2010/63/UE) and French (decree 2013-118) guidelines. Embryos were received at the stage of segmentation and then incubated at 37.4°C at 70% humidity. At day three of development the eggshell was opened on the top and the opening sealed with medical-grade Durapore tape. When embryos were at day 9 of development, Huh7 cells were transfected with either control or miR-4510 as described above. The next day cells were washed in PBS and 2 million Huh7 cells were deposited on the CAM, in the center of a Thermanox plastic ring. Photographs of the tumor growth were taken every day (until sixth day) using a stereomicroscope (SMZ745T) and a camera (DS-Fi2, Nikon) and then analyzed with the NSI Element D software. Three and 6 days after deposition of tumor cells CAMs were fixed and processed for histology. Tumor-containing CAM were cut in 4 μ m-thick sections and stained with Eosin-hematoxylin or rabbit polyclonal anti-cleaved Caspase-3 antibody (AF835; 1:200) (R&D systems), mouse monoclonal anti-GPC3 (C-1G12; 1:50) antibody (Zytomed) or a mouse monoclonal anti-Ki-67 (MIB-1; 1:75) antibody (Dako). Finally, tumor-CAM sections were scanned using a Hamamatsu Nanozoomer 2.0HT (Bordeaux Imaging Center, Bordeaux University).

Bioinformatic tools

Different algorithms of prediction were used to investigate target:miRNA interactions including TargetScan, miRDB, TargetMiner, miRanda, RNA Hybrid, PICTAR5, DIANAmt and Diana lab. The list of miR-4510-target genes generated from miRDB was imported to

Ingenuity Pathways Analysis (IPA) to investigate the cellular functions and molecular pathways of miR-4510 target genes.

Statistical analyses

Statistical analyses were performed using GraphPad Prism 6.0 software. Analyses with the Mann-Whitney and ANOVA tests were done as described elsewhere [10, 12]. When experiment contained two paired groups, the two-tailed Wilcoxon matched-pairs signed ranked test was used. When experiment contained two groups of categorical variable (e.g. bleeding versus no bleeding), the two-sided Fisher's exact test was used. The p-value is indicated at the bottom of each figure legend. The ANOVA test was followed by the Dunnett's multiple-comparison post-test when all data were compared to control or by the Tukey's multiple-comparison post-test when all data were compared. In each figure the number of independent experiments (n) and the ANOVA p-value is indicated in brackets. Results were considered significant when $p < 0.05$. For all data in figures, *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$

ABBREVIATIONS

miRNA, microRNA; HCC, hepatocellular carcinoma; HBL, hepatoblastoma; GPC3, Glypican-3; siRNA, small interfering RNA; UTR, untranslated region; DF-FunREG, Dual Fluorescence-FunREG; NTL: non-tumorous liver; CAM, chick chorioallantoic membrane; Ctrl, control RNA; FACS, Fluorescence-activated cell sorting; SD: standard deviation; SEM, standard error of the mean.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

FS and VT constructed plasmids. FC, EI, SL, GL, FS and EG performed the cellular and molecular analyses. FC, AD and NDS performed *in vivo* and histological analyses. FC, KBH and GC performed bioinformatic and biostatistic analyses. MH and CFG supervised the work. FC, EI, KBH, MH and CFG wrote the manuscript. CFG obtained the different grants supporting this work.

ACKNOWLEDGEMENTS

The scanning and microscopy of tissue sections were done in the Bordeaux Imaging Center, a service unit of the CNRS-INSERM and Bordeaux University, member of the national infrastructure France BioImaging. The flow cytometry and lentivirus production were done in the Cytometry and Vectorology platforms, two service units of the FR TransBiomed, INSERM and/or Bordeaux University. We thank Marie-Annick Buendia, Hans Clevers, Jorge Filmus, for providing materials, Gabrielle Couchy and Emilie Gelabale for their technical and analytical support, and Aksam Merched for his critical reading of the manuscript.

CONFLICTS OF INTEREST

The authors disclose no potential conflict of interest.

FUNDING

This work was supported by grants from the French National Cancer Institute (grants INCa_5828/INCa_PLBIO_2012_110 and INCa_TRANSLA_2013_209) to CFG, the French Ministry of Health (grant n°DGOS/PF4/0013/105) to CFG, the Fondation pour la Recherche Médicale (FRM; grant n°DBI20131228566) to CFG, the Ligue Nationale contre le Cancer (LNCC) to CFG and VT, the Cancéropôle Grand Sud-Ouest to CFG and VT, the French State in the frame of the "Investments for the future" Programme IdEx Bordeaux (grant ANR-10-IDEX-03-02) to KBH and the charity associations Eva Pour La Vie, Aïdons Marina, Fondation Flavien and E.S.CA.PE to MH and CFG.

REFERENCES

1. Llovet JM, Villanueva A, Lachenmayer A and Finn RS. Advances in targeted therapies for hepatocellular carcinoma in the genomic era. *Nat Rev Clin Oncol*. 2015.
2. von Schweinitz D. Hepatoblastoma: recent developments in research and treatment. *Semin Pediatr Surg*. 2012; 21(1):21-30.
3. Grandhi MS, Kim AK, Ronnekleiv-Kelly SM, Kamel IR, Ghasebeh MA and Pawlik TM. Hepatocellular carcinoma: From diagnosis to treatment. *Surg Oncol*. 2016; 25(2):74-85.
4. Capurro MI, Xiang YY, Lobe C and Filmus J. Glypican-3 promotes the growth of hepatocellular carcinoma by stimulating canonical Wnt signaling. *Cancer Res*. 2005; 65(14):6245-6254.
5. Capurro M, Martin T, Shi W and Filmus J. Glypican-3 binds to Frizzled and plays a direct role in the stimulation of canonical Wnt signaling. *Journal of cell science*. 2014; 127(Pt 7):1565-1575.
6. Lai JP, Sandhu DS, Yu C, Han T, Moser CD, Jackson KK, Guerrero RB, Aderca I, Isomoto H, Garrity-Park MM, Zou H, Shire AM, Nagorney DM, Sanderson SO, Adjei AA, Lee JS, et al. Sulfatase 2 up-regulates glypican 3, promotes fibroblast growth factor signaling, and decreases survival in hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 2008; 47(4):1211-1222.
7. Lai JP, Oseini AM, Moser CD, Yu C, Elswa SF, Hu C, Nakamura I, Han T, Aderca I, Isomoto H, Garrity-Park MM, Shire AM, Li J, Sanderson SO, Adjei AA, Fernandez-Zapico ME, et al. The oncogenic effect of sulfatase 2 in human hepatocellular carcinoma is mediated in part by glypican 3-dependent Wnt activation. *Hepatology*. 2010; 52(5):1680-1689.
8. Zheng X, Gai X, Han S, Moser CD, Hu C, Shire AM, Floyd RA and Roberts LR. The human sulfatase 2 inhibitor 2,4-disulfonylphenyl-tert-butyl nitron (OKN-007) has an antitumor effect in hepatocellular carcinoma mediated via suppression of TGF β 1/SMAD2 and Hedgehog/GLI1 signaling. *Genes Chromosomes Cancer*. 2013; 52(3):225-236.
9. Hoshida Y, Nijman SM, Kobayashi M, Chan JA, Brunet JP, Chiang DY, Villanueva A, Newell P, Ikeda K, Hashimoto M, Watanabe G, Gabriel S, Friedman SL, Kumada H, Llovet JM and Golub TR. Integrative transcriptome analysis reveals common molecular subclasses of human hepatocellular carcinoma. *Cancer Res*. 2009; 69(18):7385-7392.
10. Maurel M, Jalvy S, Ladeiro Y, Combe C, Vachet L, Saggiocco F, Bioulac-Sage P, Pitard V, Jacquemin-Sablon H, Zucman-Rossi J, Laloo B and Grosset CF. A functional screening identifies five microRNAs controlling glypican-3: role of mir-1271 down-regulation in hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 2013; 57(1):195-204.
11. Miao HL, Pan ZJ, Lei CJ, Wen JY, Li MY, Liu ZK, Qiu ZD, Lin MZ, Chen NP and Chen M. Knockdown of GPC3 inhibits the proliferation of Huh7 hepatocellular carcinoma cells through down-regulation of YAP. *Journal of cellular biochemistry*. 2013; 114(3):625-631.
12. Jalvy-Delvaile S, Maurel M, Majo V, Pierre N, Chabas S, Combe C, Rosenbaum J, Saggiocco F and Grosset CF. Molecular basis of differential target regulation by miR-96 and miR-182: the Glypican-3 as a model. *Nucleic Acids Res*. 2012; 40(3):1356-1365.
13. Jonas S and Izaurralde E. Towards a molecular understanding of microRNA-mediated gene silencing. *Nat Rev Genet*. 2015; 16(7):421-433.
14. Helwak A, Kudla G, Dudnakova T and Tollervey D. Mapping the human miRNA interactome by CLASH reveals frequent noncanonical binding. *Cell*. 2013; 153(3):654-665.
15. Maurel M, Dejeans N, Taouji S, Chevet E and Grosset CF. MicroRNA-1291-mediated silencing of IRE1 α enhances Glypican-3 expression. *RNA*. 2013; 19(6):778-788.
16. Hayes J, Peruzzi PP and Lawler S. MicroRNAs in cancer: biomarkers, functions and therapy. *Trends Mol Med*. 2014; 20(8):460-469.
17. Li Z and Rana TM. Therapeutic targeting of microRNAs: current status and future challenges. *Nat Rev Drug Discov*. 2014; 13(8):622-638.
18. Lee I, Ajay SS, Yook JI, Kim HS, Hong SH, Kim NH, Dhanasekaran SM, Chinnaiyan AM and Athey BD. New class of microRNA targets containing simultaneous 5'-UTR and 3'-UTR interaction sites. *Genome Res*. 2009; 19(7):1175-1183.
19. Miao HL, Lei CJ, Qiu ZD, Liu ZK, Li R, Bao ST and Li MY. MicroRNA-520c-3p inhibits hepatocellular carcinoma cell proliferation and invasion through induction of cell apoptosis by

- targeting glypican-3. *Hepatology research : the official journal of the Japan Society of Hepatology*. 2014; 44(3):338-348.
20. Huang N, Lin J, Ruan J, Su N, Qing R, Liu F, He B, Lv C, Zheng D and Luo R. MiR-219-5p inhibits hepatocellular carcinoma cell proliferation by targeting glypican-3. *FEBS letters*. 2012; 586(6):884-891.
 21. Boyault S, Rickman DS, de Reynies A, Balabaud C, Rebouissou S, Jeannot E, Herault A, Saric J, Belghiti J, Franco D, Bioulac-Sage P, Laurent-Puig P and Zucman-Rossi J. Transcriptome classification of HCC is related to gene alterations and to new therapeutic targets. *Hepatology*. 2007; 45(1):42-52.
 22. Bader AG. miR-34 - a microRNA replacement therapy is headed to the clinic. *Frontiers in genetics*. 2012; 3:120.
 23. Laloo B, Maurel M, Jalvy-Delvaile S, Sagliocco F and Grosset CF. Analysis of post-transcriptional regulation using the FunREG method. *Biochem Soc Trans*. 2010; 38(6):1608-1614.
 24. Laloo B, Simon D, Veilla V, Lauzel D, Guyonnet-Duperat V, Moreau-Gaudry F, Sagliocco F and Grosset C. Analysis of post-transcriptional regulations by a functional, integrated, and quantitative method. *Mol Cell Proteomics*. 2009; 8(8):1777-1788.
 25. Labbe E, Letamendia A and Attisano L. Association of Smads with lymphoid enhancer binding factor 1/T cell-specific factor mediates cooperative signaling by the transforming growth factor-beta and wnt pathways. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000; 97(15):8358-8363.
 26. Monga SP. beta-Catenin Signaling and Roles in Liver Homeostasis, Injury, and Tumorigenesis. *Gastroenterology*. 2015; 148(7):1294-1310.
 27. Hagedorn M, Javerzat S, Gilges D, Meyre A, de Lafarge B, Eichmann A and Bikfalvi A. Accessing key steps of human tumor progression in vivo by using an avian embryo model. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2005; 102(5):1643-1648.
 28. Dumartin L, Quemener C, Laklai H, Herbert J, Bicknell R, Bousquet C, Pyronnet S, Castronovo V, Schilling MK, Bikfalvi A and Hagedorn M. Netrin-1 mediates early events in pancreatic adenocarcinoma progression, acting on tumor and endothelial cells. *Gastroenterology*. 2010; 138(4):1595-1606, 1606 e1591-1598.
 29. Asangani IA, Ateeq B, Cao Q, Dodson L, Pandhi M, Kunju LP, Mehra R, Lonigro RJ, Siddiqui J, Palanisamy N, Wu YM, Cao X, Kim JH, Zhao M, Qin ZS, Iyer MK, et al. Characterization of the EZH2-MMSET histone methyltransferase regulatory axis in cancer. *Mol Cell*. 2013; 49(1):80-93.
 30. Wei W, Wanjuan L, Hui S, Dongyue C, Xinjun Y and Jisheng Z. miR-203 inhibits proliferation of HCC cells by targeting survivin. *Cell Biochem Funct*. 2013; 31(1):82-85.
 31. Callegari E, Gramantieri L, Domenicali M, D'Abundo L, Sabbioni S and Negrini M. MicroRNAs in liver cancer: a model for investigating pathogenesis and novel therapeutic approaches. *Cell Death Differ*. 2015; 22(1):46-57.
 32. Fang YX and Gao WQ. Roles of microRNAs during prostatic tumorigenesis and tumor progression. *Oncogene*. 2014; 33(2):135-147.
 33. Kohlhapp FJ, Mitra AK, Lengyel E and Peter ME. MicroRNAs as mediators and communicators between cancer cells and the tumor microenvironment. *Oncogene*. 2015; 34(48):5857-5868.
 34. Ibrahim SA, Hassan H and Gotte M. MicroRNA-dependent targeting of the extracellular matrix as a mechanism of regulating cell behavior. *Biochimica et biophysica acta*. 2014; 1840(8):2609-2620.
 35. Zhou J, Lv R, Song X, Li D, Hu X, Ying B, Wei Y and Wang L. Association between two genetic variants in miRNA and primary liver cancer risk in the Chinese population. *DNA Cell Biol*. 2012; 31(4):524-530.
 36. Luo JH, Ren B, Keryanov S, Tseng GC, Rao UN, Monga SP, Strom S, Demetris AJ, Nalesnik M, Yu YP, Ranganathan S and Michalopoulos GK. Transcriptomic and genomic analysis of human hepatocellular carcinomas and hepatoblastomas. *Hepatology*. 2006; 44(4):1012-1024.
 37. Wu X, Xu X, Li S, Wu S, Chen R, Jiang Q, Liu H, Sun Y, Li Y and Xu Y. Identification and validation of potential biomarkers for the detection of dysregulated microRNA by qPCR in patients with colorectal adenocarcinoma. *PLoS One*. 2015; 10(3):e0120024.

38. Zhang D, Kaneda M, Nakahama K, Arai S and Morita I. Connexin 43 expression promotes malignancy of HuH7 hepatocellular carcinoma cells via the inhibition of cell-cell communication. *Cancer Lett.* 2007; 252(2):208-215.
39. Kong J, Zhou X, Liu S, Jin T, Piao Y, Liu C and Lin Z. Overexpression of sine oculis homeobox homolog 1 predicts poor prognosis of hepatocellular carcinoma. *Int J Clin Exp Pathol.* 2014; 7(6):3018-3027.
40. Wei T, Zhang LN, Lv Y, Ma XY, Zhi L, Liu C, Ma F and Zhang XF. Overexpression of platelet-derived growth factor receptor alpha promotes tumor progression and indicates poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *Oncotarget.* 2014; 5(21):10307-10317.
41. Lam JK, Chow MY, Zhang Y and Leung SW. siRNA Versus miRNA as Therapeutics for Gene Silencing. *Mol Ther Nucleic Acids.* 2015; 4:e252.
42. Gonzalez AD, Kaya M, Shi W, Song H, Testa JR, Penn LZ and Filmus J. OCI-5/GPC3, a glypican encoded by a gene that is mutated in the Simpson-Golabi-Behmel overgrowth syndrome, induces apoptosis in a cell line-specific manner. *J Cell Biol.* 1998; 141(6):1407-1414.
43. Korinek V, Barker N, Morin PJ, van Wichen D, de Weger R, Kinzler KW, Vogelstein B and Clevers H. Constitutive transcriptional activation by a beta-catenin-Tcf complex in APC^{-/-} colon carcinoma. *Science.* 1997; 275(5307):1784-1787.

Figure 1. The DF-FunREG screening identifies fourteen potential GPC3-regulating miRNAs.

Huh7 cells co-expressing the Tomato and GFP-5' + 3'UTR-GPC3 transgenes were transfected by each miRNA mimic of a library comprising 1712 human miRNAs or by control RNA (Ctrl). MiRNAs decreasing the GFP/Tomato ratio compared to Ctrl were selected as candidates. **A.** First step of DF-FunREG screening. The graph shows GFP/Tomato ratio fold change variations for the 1712 tested miRNAs. Dots represent means +/- standard deviation (SD) (n=3). **B-C.** Second step of DF-FunREG screening. Fourteen miRNAs down-regulate the GFP/Tomato ratio fold change through *GPC3* 3'-UTR (B), 5'-UTR or both (C). Bars represent means + SD (n=3, ANOVA p<0.01). **D.** The fourteen miRNAs retained following the DF-FunREG screening are shown with their names in the V17.0 and V21.0 versions of miRBase. In this Figure and the following, the ANOVA test was followed by a multiple comparison post-test (see Statistical analyses section for details), *: p < 0.05, **: p < 0.01, ***: p < 0.001.

Cartier F et al, Figure 1

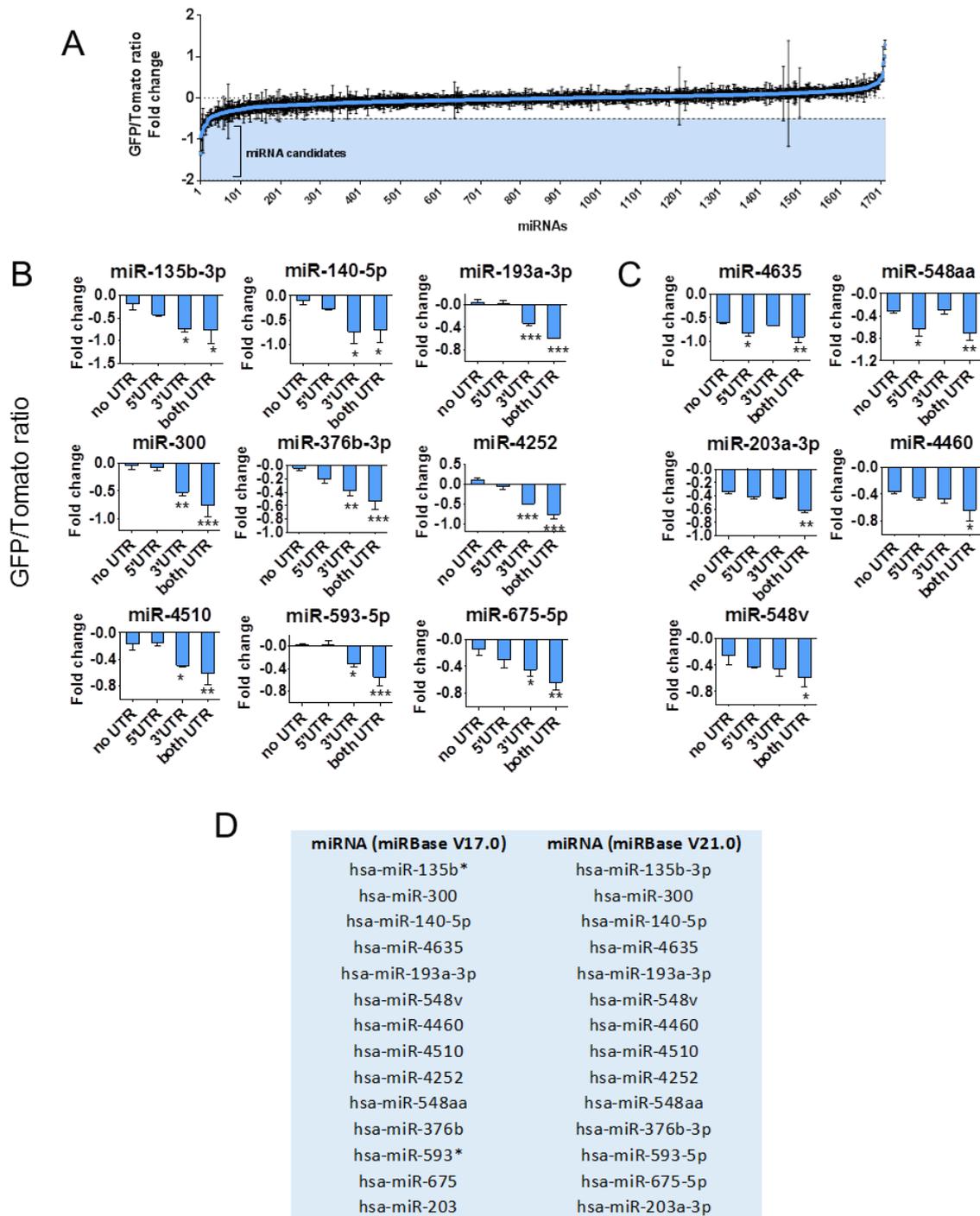


Figure 2. Ten miRNAs regulate GPC3 expression.

A. The relative expression of total GPC3 protein was measured by western blot in Huh7 cells following transfection with small RNAs (left panel). The amount of GPC3 protein was normalized to the total amount of loaded proteins (see Materials and Methods section). Bars represent means + standard error of the mean (SEM) (n=5, ANOVA p<0.0001). The negative control is shown as a black bar. The si-GPC3 and previously reported *GPC3*-regulating miRNAs are shown as white bars and the fourteen retained miRNAs as blue bars. Representative western blots of 5 independent experiments are shown on the right panel. The top blots show results obtained with control RNAs (left) and ineffective miRNAs (right). The bottom blots show miRNAs inhibiting (left) or increasing (right) the amount of GPC3. Protein size is shown in brackets on the left of the blot. All cropped blots retained at least 6 bandwidths above and below the bands. SYPRO Ruby-labeled proteins cropped blots correspond to the middle part of the labeled membrane. **B.** The relative expression of membrane-anchored GPC3 protein was measured by FACS in Huh7 cells transfected with the indicated small RNAs using the anti-human GPC3-Allophycocyanin (APC) monoclonal antibody. Results are shown as Mean Fluorescence Intensity ratios. Bars represent means + SEM (n=4, ANOVA p<0.0001). See panel A for legend of colored bars. **C.** The relative expression of *GPC3* mRNA was measured by real-time quantitative RT-PCR in Huh7 cells following small RNA transfection. Bars represent means + SEM (n=3, ANOVA p<0.0001). See panel A for legend of colored bars. *: p < 0.05, **: p < 0.01, ***: p < 0.001.

Cartier F et al, Figure 2

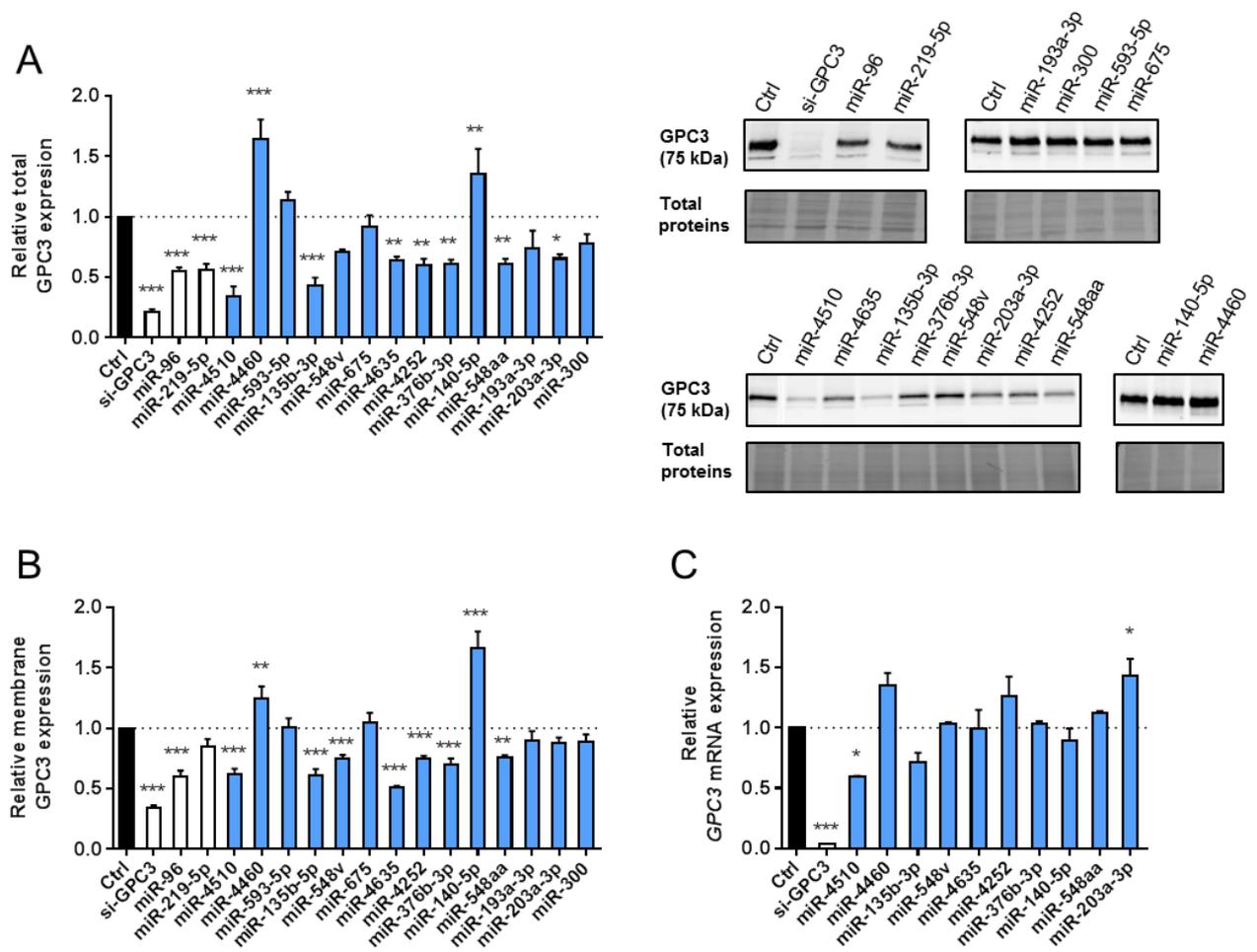


Figure 3. Five GPC3-regulating miRNAs are downregulated in HCC.

A. The relative expression of miR-4510, miR-203a-3p, miR-548aa, miR-376b-3p and miR-548v was measured by real-time quantitative RT-PCR in 19 NTL and 98 HCC. Data are presented as box and whiskers with minimal and maximal values (two-tailed unpaired *t* test).

B. The relative expression of miR-4510, miR-203a-3p, miR-548aa, miR-376b-3p and miR-548v was measured by real-time quantitative RT-PCR in 19 pairs of HCC and adjacent NTL. Results are presented as HCC/NTL expression ratios. The median is shown as a full line and the reference ratio value “1” is shown as a dotted line. The statistical analyses were done with the two-tailed Wilcoxon matched-pairs signed ranked test. *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$.

Cartier F et al, Figure 3

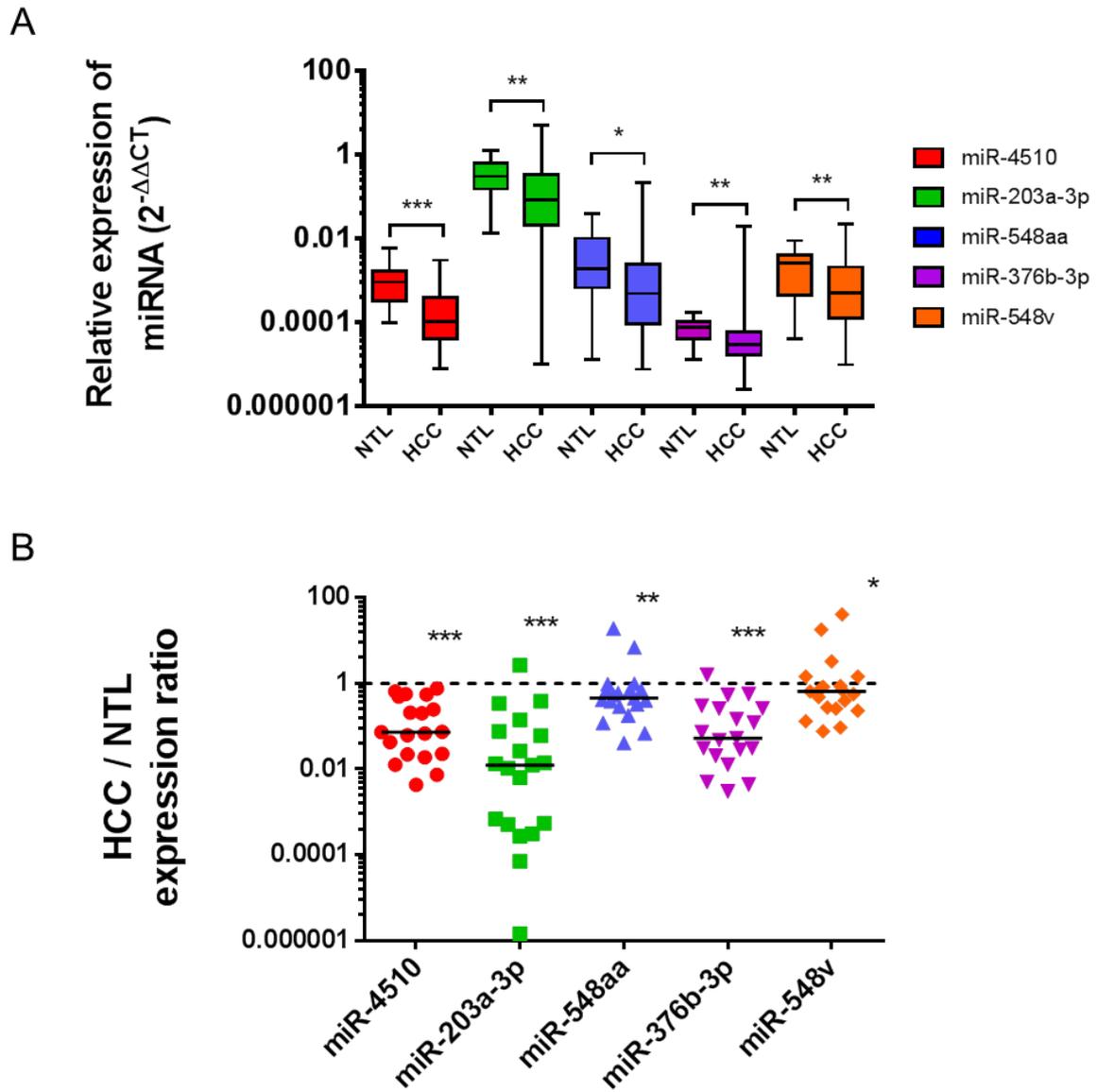


Figure 4. MiR-4510, miR-203a-3p, miR-548aa, miR-376b-3p and miR-548v exert an antitumor effect on HCC cells.

A-D. Huh7 cells were transfected with miRNAs (A, blue lines + symbols; B-D, blue bars), si-GPC3 (A, grey lines + symbols; B-D, white bars) or controls (Ctrl RNA; A, black lines + symbols; B-D, black bars) and different cell-based assays were performed. **A.** Cell growth was measured at the indicated time points using the Sulforhodamine B colorimetric assay (Abs 492). Results are presented as mean +/- SEM (n=5, ANOVA p<0.0001). **B-C.** Three days after transfection, cell proliferation was determined by cell counting (B) and cell cycle was measured by APC/BrdU staining (percentages of cells in S, G0/G1 and G2/M phases, C). **D.** In parallel, the percentage of apoptotic cells was determined by annexin/7-ADD staining (left panel) and caspase 3/7 activity was measured by a luminescent assay (right panel). **B-D.** Bars represent means + SEM (n=3, ANOVA p<0.01). *: p < 0.05, **: p < 0.01, ***: p < 0.001.

Cartier F et al, Figure 4

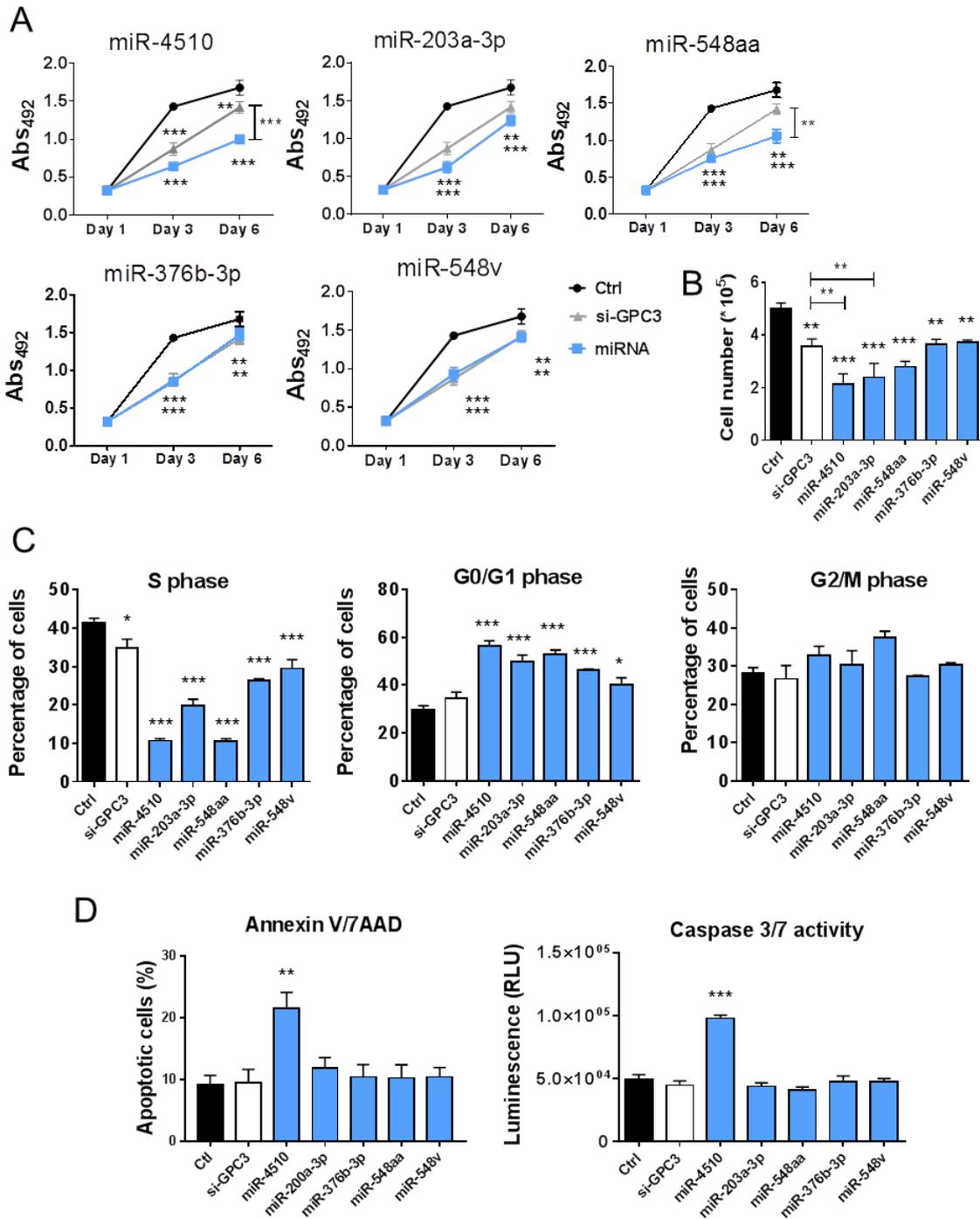


Figure 5. Expression of miR-4510 in HCC and HBL and correlation with GPC3 mRNA expression.

A. Inverse correlation between *GPC3* mRNA and miR-4510 expressions measured by real-time quantitative RT-PCR in 98 HCC. Spearman r correlation = -0.3243, *** $p < 0.001$. **B.** Relative expression of miR-4510 in HCC subgroups [1]. Data are presented as box and whiskers with minimal and maximal values (ANOVA $p < 0.0001$). Dunnett's multiple comparisons test. **C.** Relative expression of miR-4510 in 24 pairs of HBL and adjacent normal liver samples. Results are presented as HBL/NTL expression ratios. The median is shown as a full line and the reference ratio value "1" is shown as a dotted line. Two-tailed Wilcoxon matched-pairs signed ranked test. **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$.

1. Boyault S, Rickman DS, de Reynies A, Balabaud C, Rebouissou S, Jeannot E, Herault A, Saric J, Belghiti J, Franco D, Bioulac-Sage P, Laurent-Puig P and Zucman-Rossi J. Transcriptome classification of HCC is related to gene alterations and to new therapeutic targets. *Hepatology*. 2007; 45(1):42-52.

Cartier F et al, Figure 5

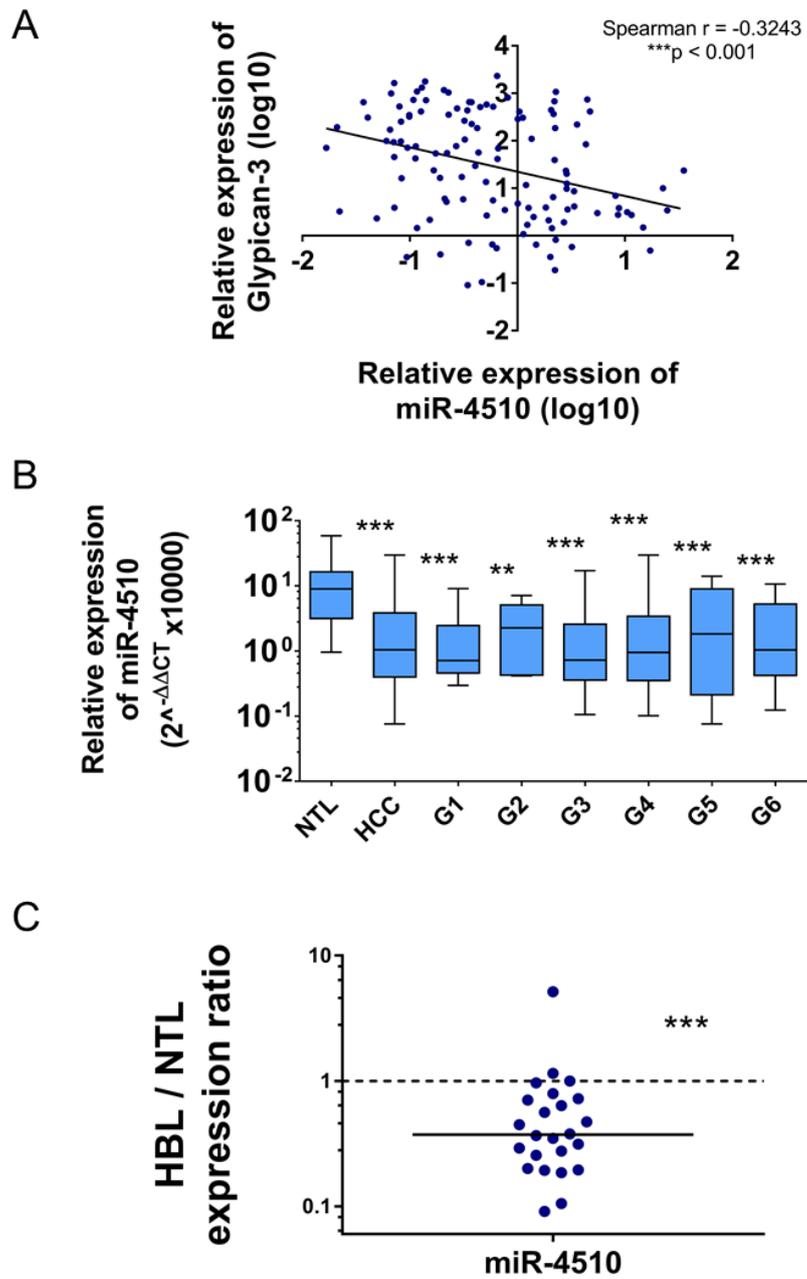


Figure 6. MiR-4510 acts as a tumor suppressor *in vitro*.

A. Six days after transfection, the effect of miR-4510 and miR-34a-5p on the growth of Huh7, Hep3B and Huh6 cells was compared using the Sulforhodamine B colorimetric assay (Abs 492nm). Bars represent means + SEM (n=4, ANOVA p<0.01). **B.** Three days after transfection, the effects of miR-4510 and miR-34a-5p on the apoptosis of Huh7, Hep3B and Huh6 cells were compared by annexin/7-ADD staining. Bars represent means + SEM (n=3, ANOVA p<0.05). **C.** Huh7 cells were transduced with lentiviruses containing the *GPC3* transgene lacking the 5'- and 3'UTR (pL-hGPC3) or an empty transgene (Empty). Three days later, cells were transfected with miR-4510 or Ctrl. Finally, cell number was measured by cell counting and the amount of GPC3 protein was assessed by western blotting three days later. Top panel: bars represent means + SEM (n=3, ANOVA p<0.0001). Bottom panel: one representative immunoblot of 3 independent experiments is shown. *: p < 0.05, **: p < 0.01, ***: p < 0.001.

Cartier F et al, Figure 6

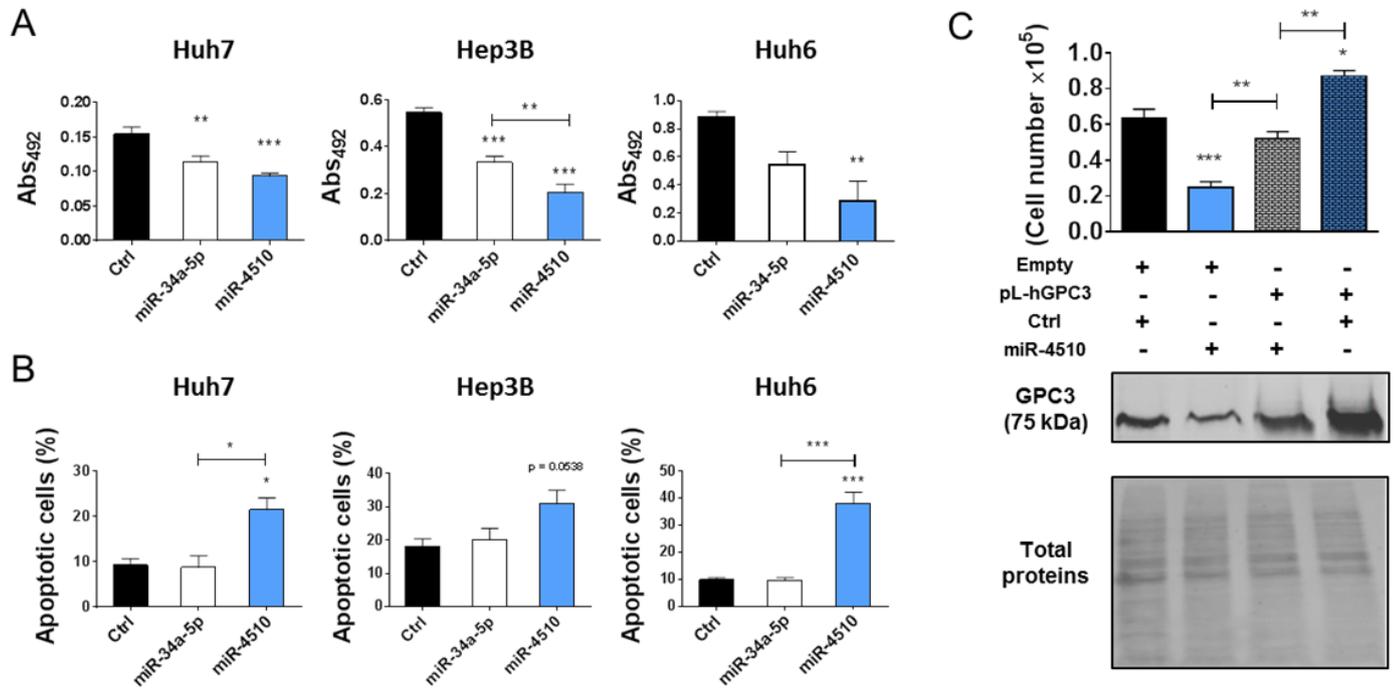


Figure 7. Molecular mechanism of GPC3 regulation by miR-4510.

A. Schematic representation of miR-4510:*GPC3* mRNA interactions predicted by RNAhybrid. Through its seed sequence, miR-4510 (green sequence) interacts with *GPC3* 3'-UTR (red sequence) at position 308-315. Blue arrows correspond to the 2 mutated nucleotides (r.311C>G and r.313C>G). **B.** Huh7 cells expressing the GFP and wild type *GPC3*-3'UTR transgene (WT cells) or the mutated *GPC3*-3'UTR transgene (Mut cells) were transfected with miR-4510 or Ctrl. The Mean Fluorescence Intensity (MFI) ratio was measured in each cell population using the FunREG method. Bars represent means + SEM (n=3, ANOVA p<0.0001). Bars represent means + SEM (n=3, ANOVA p<0.0001), ***: p < 0.001.

Cartier F et al, Figure 7

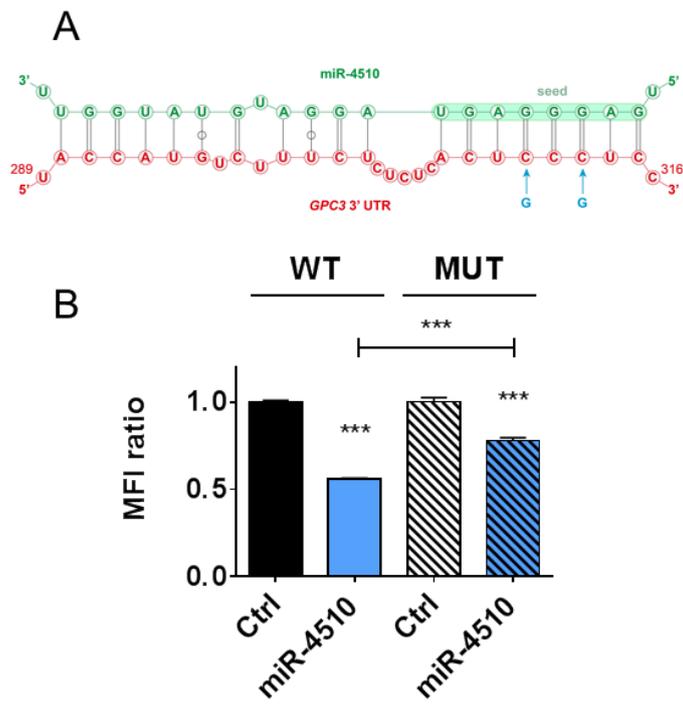
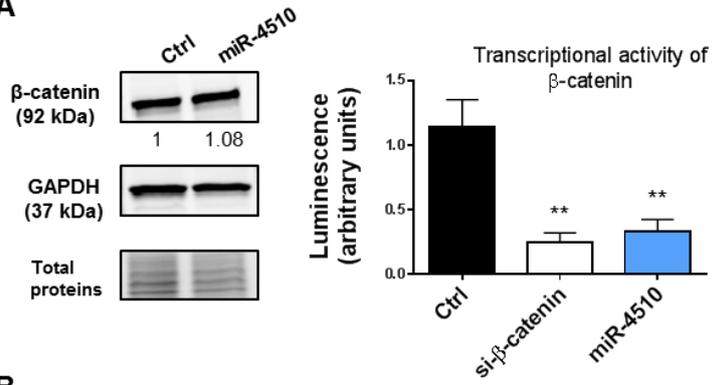


Figure 8. MiR-4510 inhibits Wnt/ β -catenin signaling pathway.

A. Effect of miR-4510 on Wnt/ β -catenin pathway. The expression of β -catenin and GAPDH was assessed by Western blotting in Huh7 cells 24hr after transfection (left panel; one representative blot of 3 independent experiments is shown). Protein size is shown in brackets on the left of the blot. All cropped blots retained at least 6 bandwidths above and below the bands. SYPRO Ruby-labeled proteins cropped blots correspond to the middle part of the labeled membrane. The transcriptional activity of β -catenin was measured by TOPflash/FOPflash assay 72hr after transfection (right panel). Bars represent means + SEM (n=3, ANOVA p<0.0001). **B.** miR-4510 induces the up- or down-regulation of Wnt/ β -catenin pathway-associated genes mRNA. Data are presented as Log₂ fold-change ratio between miR-4510- and Ctrl-transfected Huh7 cells. Bars represent means + or - SEM (n=2). **: p < 0.01.

Cartier F et al, Figure 8

A



B

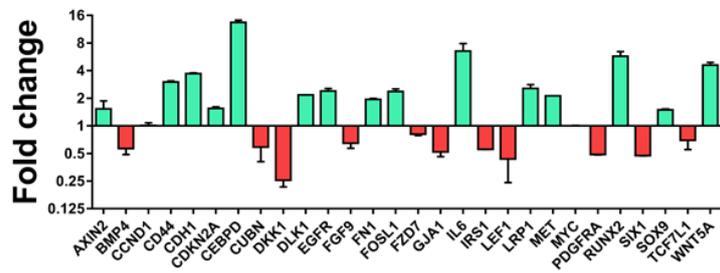
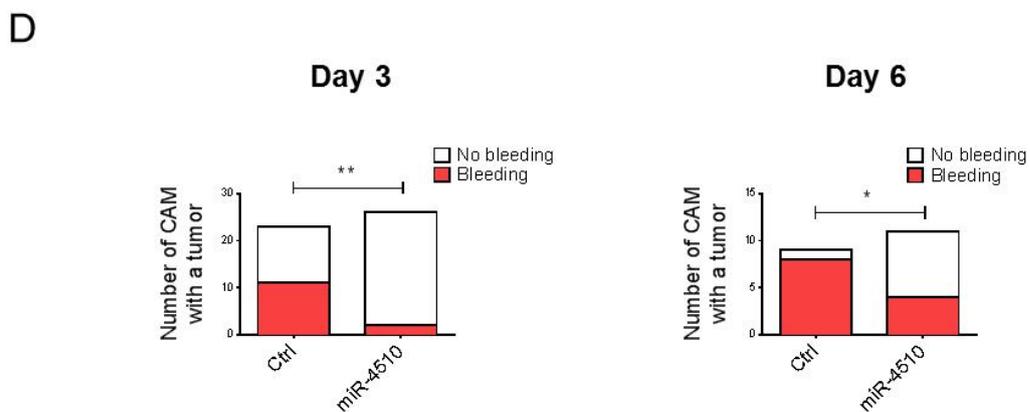
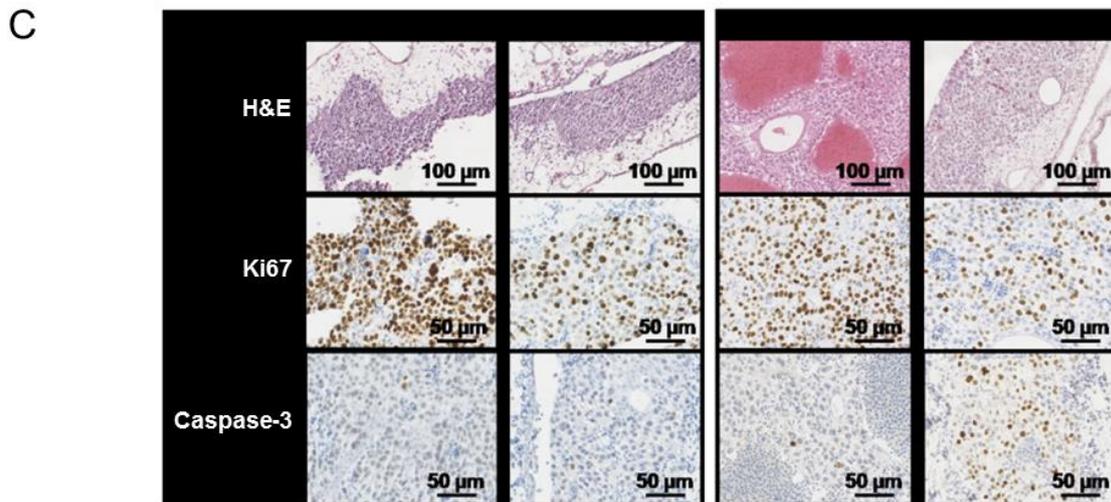
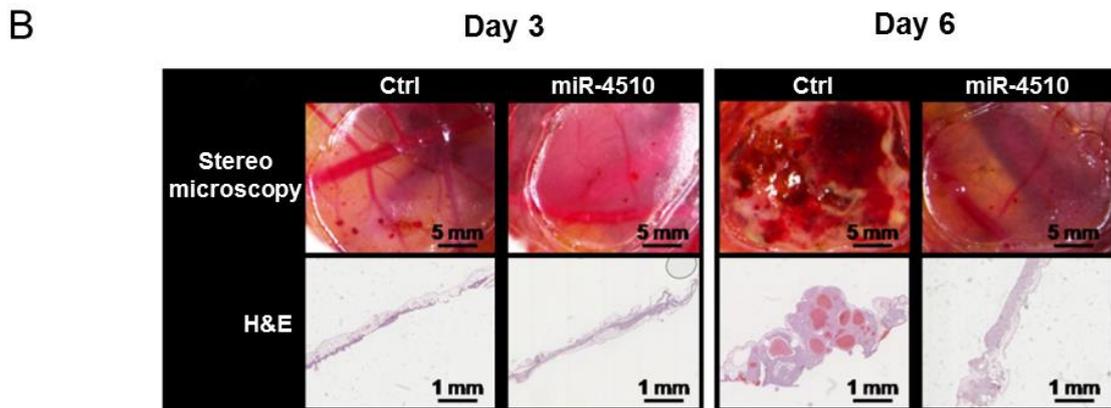
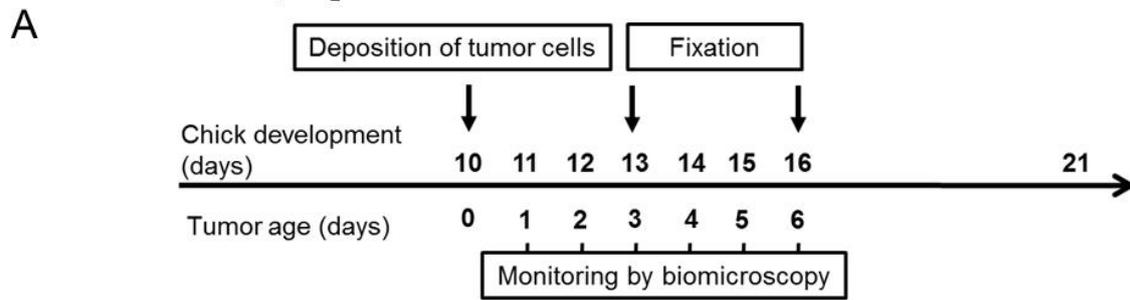


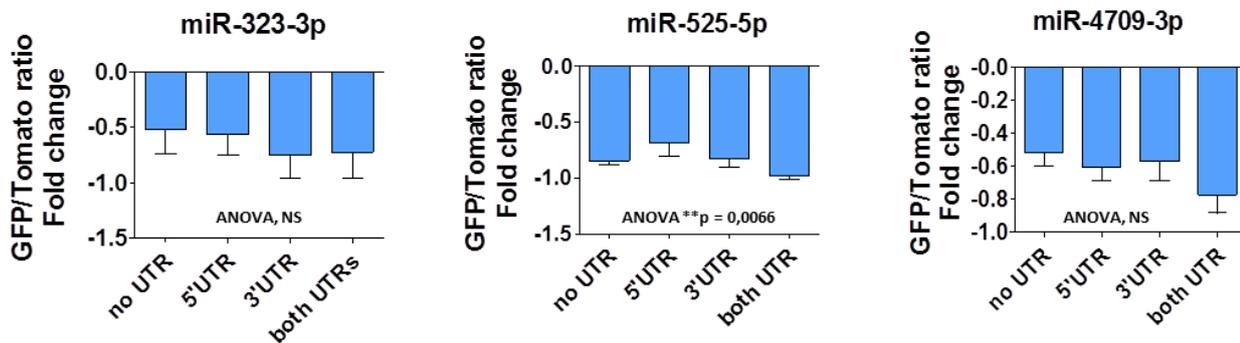
Figure 9. MiR-4510 inhibits HCC tumor development *in vivo*.

A. Twenty-four hours after transfection with miR-4510 or Ctrl miRNA, Huh7 cells were collected and grafted on the chicken CAM. Tumor growth was monitored from day 1 to day 6. Tissue fixation was done at day 3 and day 6. **B.** Photographs of tumors (top panels) and hematoxylin and eosin (H&E) staining (bottom panels) were performed 3 and 6 days after cells implantation. **C.** Hematoxylin and eosin (H&E), Ki67 and cleaved Caspase-3-staining was performed on sections of tumors treated with miR-4510 or Ctrl. Magnification scale bars are as indicated on each microscopic image. **D.** The number of CAMs with tumor presenting or not bleeding in Ctrl *versus* miR-4510 at Day 3 (left panel) and Day 6 (right panel) is shown as bars. Two-sided Fisher's exact test, *: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$.

Cartier F et al, Figure 9



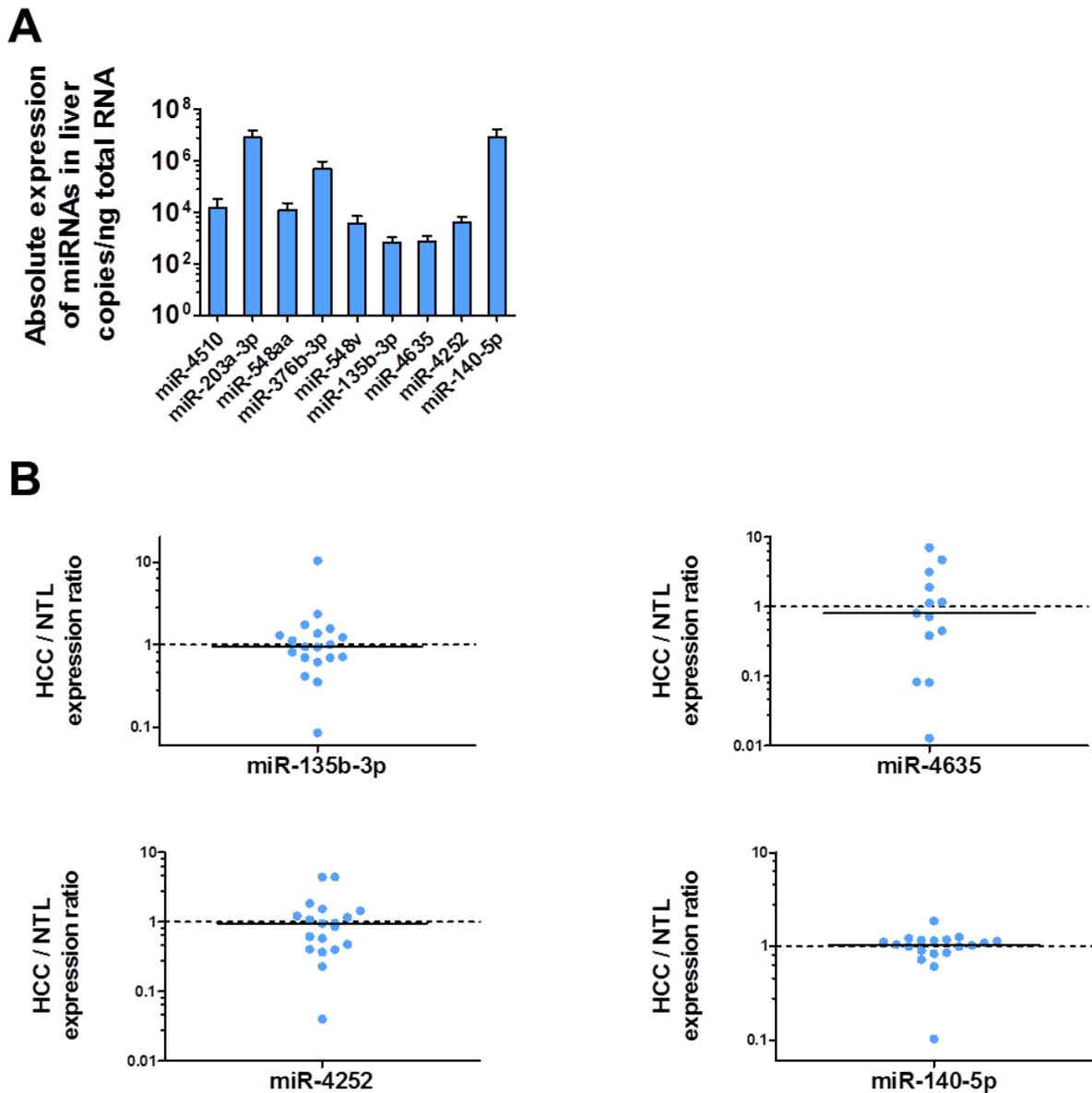
Cartier F et al, Supplementary figure S1



Supplementary figure S1. The secondary step of the DF-FunREG screening eliminates three false-positive miRNAs.

According to the DF-FunREG screening, three miRNAs, which decreased the GFP/Tomato ratio fold change independently of GPC3 UTRs, were eliminated as false positive candidates. Bars represent mean + SD (n=3). Otherwise stated, for all data in this figure and the following, the ANOVA test was followed by a Tukey's multiple comparison posttest. When significant, ANOVA p value is as shown on the corresponding graph. NS, not significant.

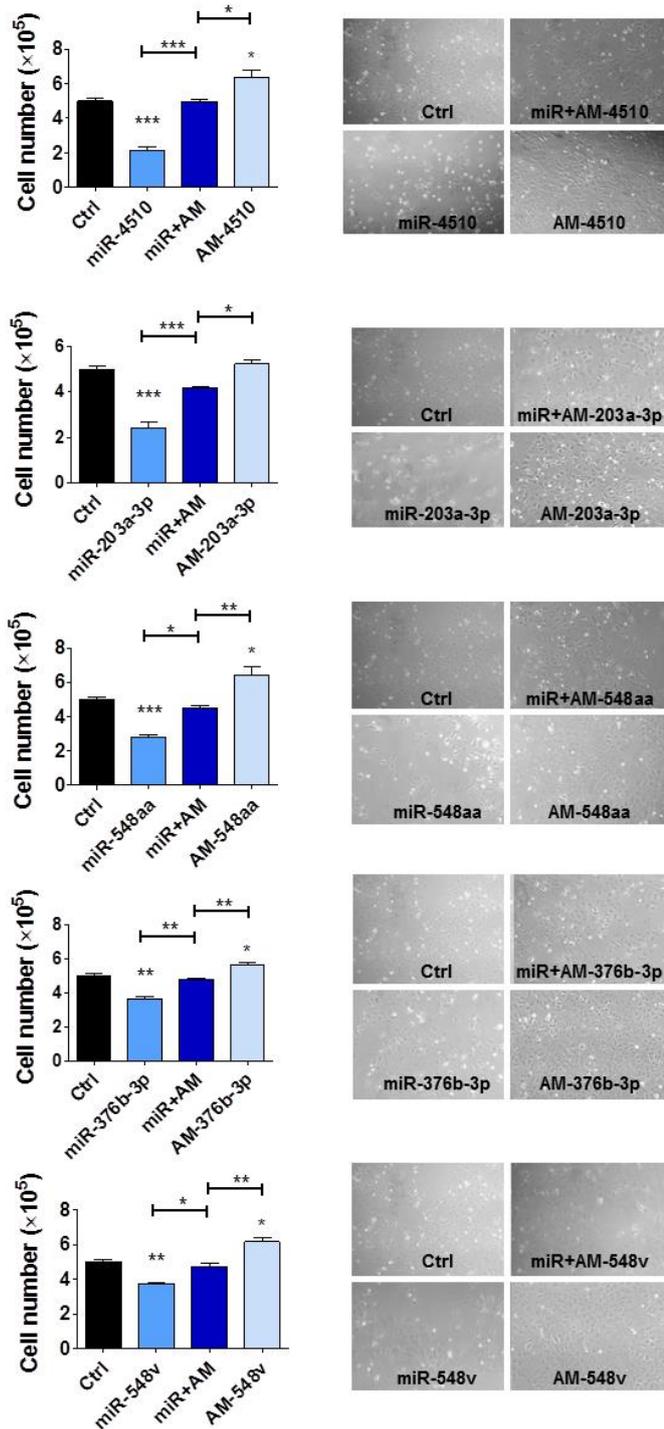
Cartier F et al, Supplementary figure S2



Supplementary figure S2. Expression of GPC3-regulating miRNAs in normal and tumoral livers.

A. Expression of GPC3-regulating miRNAs in NTL. Results are expressed as copies per μg of total RNA. Bars represent means + SEM. MiR-4460 was not detected. **B.** Relative expression of the corresponding miRNAs in 19 pairs of HCC and adjacent NTL samples. Results are presented as HCC/NTL expression ratios. The median is shown as a full line and the reference ratio value “1” is shown as a dotted line. Two-tailed Wilcoxon matched-pairs signed ranked test.

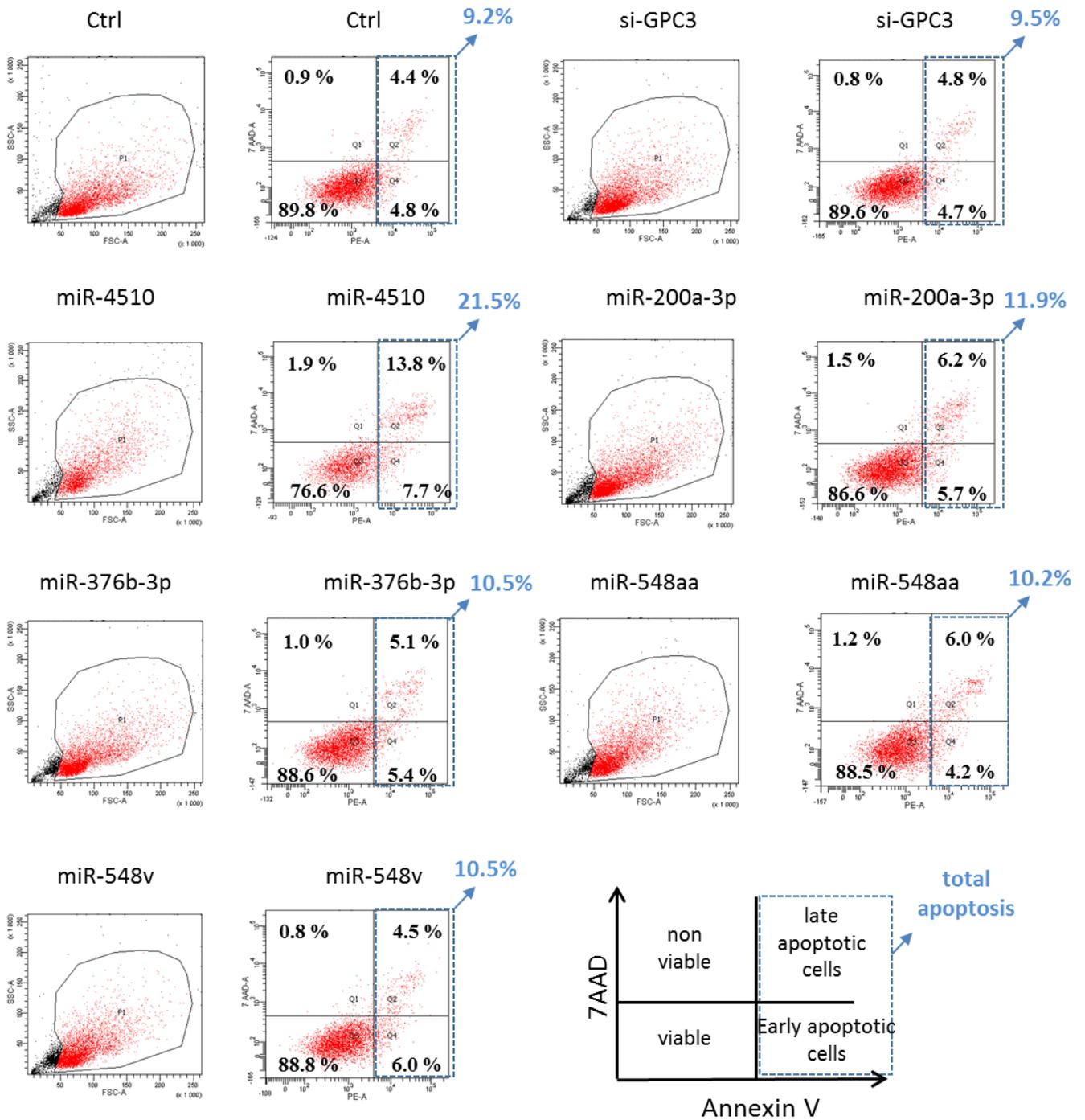
Cartier F et al, Supplementary figure S3



Supplementary figure S3. Functional specificity of GPC3-regulating miRNAs on Huh7 cell proliferation.

Three days after transfection with Ctrl, the indicated miRNA and/or a specific anti-miR (AM), Huh7 cells were counted (left graph). Bars represent means + SEM (n=3, ANOVA p<0.0001). Pictures of cultured cells three days after transfection are shown on the right panel (Representative of 3 independent experiments). *p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001.

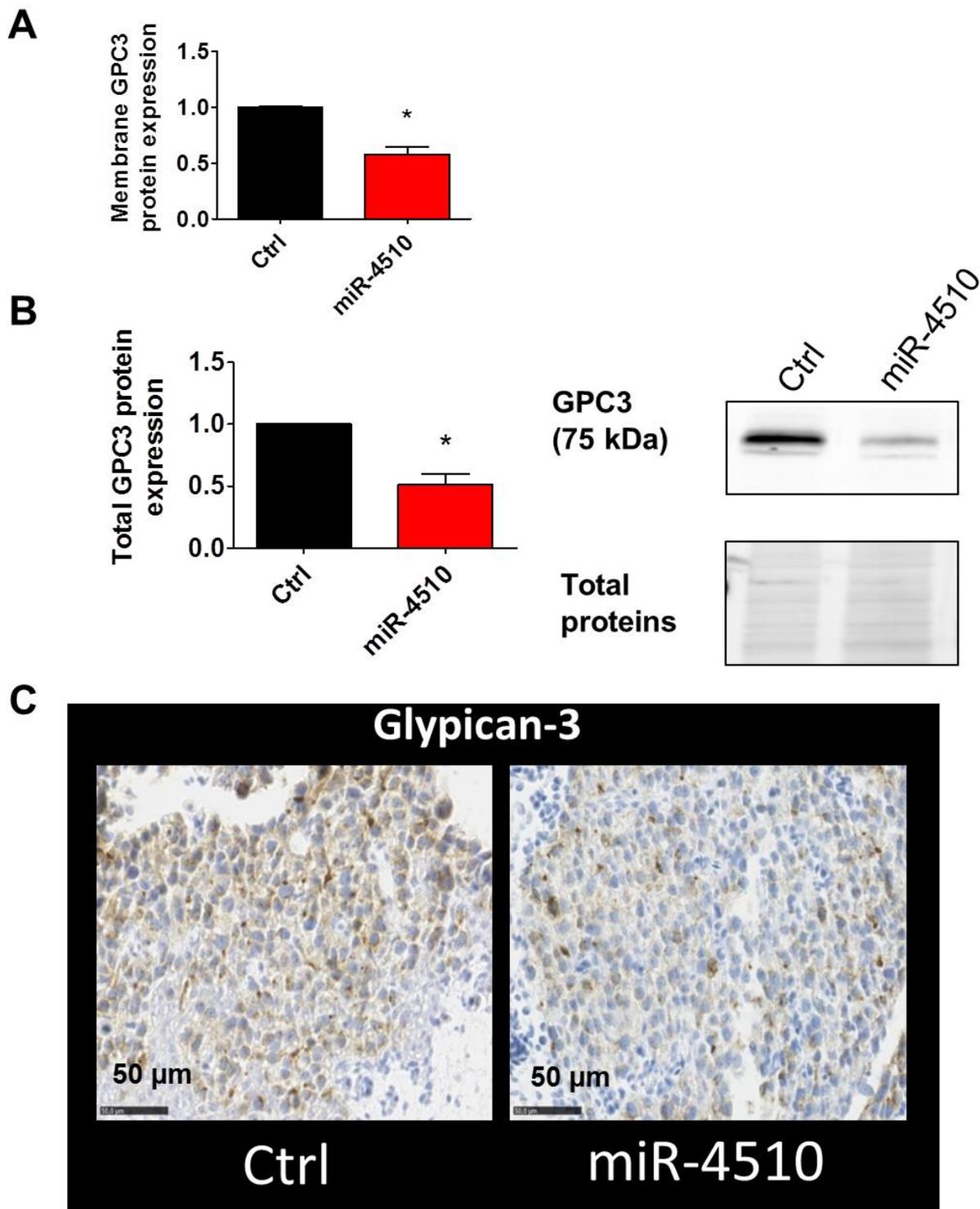
Cartier F et al, Supplementary figure S4



Supplementary figure S4. Only miR-4510 induces apoptosis of Huh7 cells.

Representative data of Annexin V/7AAD staining measured by flow cytometry in Huh7 cells transfected with the indicated small RNAs. As shown in the bottom right panel, total apoptosis was calculated by adding the percentage of late apoptotic cells (Annexin V-PE High / 7ADDHigh) and the percentage of early apoptotic cells (Annexin V-PE High / 7ADDLow). For each small RNA, the left graph represent the cell population selected to analyze apoptosis in the right graph. Q1, non-viable cells; Q2, late apoptotic cells; Q3: viable cells; Q4: early apoptotic cells.

Cartier F et al, Supplementary figure S5



Supplementary figure S5. MiR-4510 inhibits GPC3 expression *in vivo*.

A-B. Before implantation on CAM, GPC3 expression was measured in cultured Huh7 cells by flow cytometry (**A**) and Western blotting (**B**) 24 hours after transfection. Bars represent means + SEM (n=3). **C.** GPC3 expression was measured in CAM-engrafted Huh7 cells by immunohistochemistry 3 days after implantation. One representative GPC3-stained section is shown (n=9). Scale bars, 50µm. Mann-Whitney test, *p<0.05.

Supplementary Table S1. Primary step data of DF-FunREG screening.

Standardized GFP/TOM ratio fold change mediated by each miRNA of the Human miRBase V17.0 miScript miRNA Mimic 96 Set (Qiagen) (three independent experiments are shown). The twenty miRNAs retained in the primary screen are shown in grey box.

Annexe 3: New MicroRNAs inhibit Glypican-3 and act as tumor suppressors in Human Liver Cancer

miRNA (miRBase V17.0)	GFP/Tomato ratio Fold Change			Mean	Standard Deviation
	Exp. 1	Exp. 2	Exp. 3		
hsa-miR-96	-1,303	-1,389	-1,328	-1,340	0,044
hsa-miR-1271	-0,933	-0,897	-0,949	-0,927	0,026
hsa-miR-1973	-0,759	-0,848	-1,042	-0,883	0,145
hsa-miR-135b*	-1,045	-1,109	-0,323	-0,826	0,436
hsa-miR-300	-0,846	-0,813	-0,801	-0,820	0,023
hsa-miR-323-3p	-0,659	-0,680	-0,807	-0,715	0,080
hsa-miR-140-5p	-0,832	-0,797	-0,487	-0,705	0,190
hsa-miR-4635	-0,719	-0,585	-0,795	-0,700	0,106
hsa-miR-193a-3p	-0,666	-0,580	-0,775	-0,674	0,097
hsa-miR-525-5p	-0,544	-0,623	-0,812	-0,660	0,138
hsa-miR-548v	-0,751	-0,568	-0,223	-0,659	0,129
hsa-miR-4460	-0,376	-0,761	-0,823	-0,653	0,243
hsa-miR-4510	-0,600	-0,631	-0,705	-0,645	0,054
hsa-miR-4252	-0,652	-0,563	-0,719	-0,645	0,078
hsa-miR-548aa	-0,572	-0,620	-0,696	-0,630	0,063
hsa-miR-376b	-0,427	-0,699	-0,581	-0,569	0,136
hsa-miR-593*	-0,606	0,098	-0,459	-0,533	0,104
hsa-miR-4709-3p	-0,336	-0,558	-0,689	-0,527	0,178
hsa-miR-675	-0,462	-0,449	-0,651	-0,521	0,113
hsa-miR-203	-0,580	-0,461	-0,501	-0,514	0,061
hsa-miR-432*	-0,533	-0,134	-0,463	-0,498	0,050
hsa-miR-1909*	-0,148	-0,602	-0,358	-0,480	0,172
hsa-miR-4698	-0,494	-0,397	-0,537	-0,476	0,072
hsa-miR-218-1*	-0,457	-0,202	-0,486	-0,471	0,020
hsa-miR-488*	-0,493	-0,264	-0,649	-0,469	0,194
hsa-miR-93*	-0,301	-0,707	-0,388	-0,465	0,214
hsa-miR-4802-5p	-0,504	-0,518	-0,362	-0,462	0,086
hsa-miR-744	-0,540	-0,466	-0,341	-0,449	0,100
hsa-miR-4425	-0,518	-0,442	-0,368	-0,443	0,075
hsa-miR-23a	-0,388	-0,468	-0,471	-0,442	0,047
hsa-miR-943	-0,340	-0,526	-0,457	-0,441	0,094
hsa-miR-4266	-0,478	-0,421	-0,398	-0,432	0,041
hsa-miR-1245b-3p	-0,344	-0,444	-0,496	-0,428	0,078
hsa-miR-4765	-0,400	0,790	-0,453	-0,426	0,037
hsa-miR-585	-0,582	-0,269	0,008	-0,426	0,221
hsa-miR-3121-5p	-0,336	-0,518	-0,422	-0,425	0,091
hsa-miR-609	-0,326	-0,527	-0,397	-0,416	0,102
hsa-miR-4764-5p	-0,335	-0,387	-0,519	-0,414	0,095
hsa-miR-548ad	-0,323	-0,359	-0,548	-0,410	0,121
hsa-miR-548z	-0,263	-0,331	-0,637	-0,410	0,199
hsa-miR-518f*	-0,265	-1,176	-0,554	-0,409	0,204
hsa-miR-4640-5p	-0,426	-0,522	-0,278	-0,408	0,123
hsa-miR-26b*	-0,340	-0,524	-0,357	-0,407	0,102
hsa-miR-4445*	-0,614	1,562	-0,172	-0,393	0,313
hsa-miR-3675-3p	-0,367	-0,455	-0,335	-0,386	0,062
hsa-miR-526a // hsa-miR-520c-5p // hsa-miR-518d-5p	-0,430	-0,204	-0,521	-0,385	0,163
hsa-miR-3929	-0,343	0,790	-0,427	-0,385	0,059
hsa-miR-4802-3p	-0,264	-0,477	-0,392	-0,378	0,108
hsa-miR-3545-5p	-0,422	-0,268	-0,432	-0,374	0,092
hsa-miR-182	-0,405	-0,375	-0,333	-0,371	0,036
hsa-miR-4649-5p	-0,367	-0,249	-0,491	-0,369	0,121
hsa-miR-2277-5p	-0,280	-0,482	-0,336	-0,366	0,104
hsa-miR-524-5p	-0,251	-0,528	-0,314	-0,364	0,145
hsa-miR-449c	-0,368	-0,328	-0,391	-0,362	0,032
hsa-miR-196a	-0,380	-0,293	-0,412	-0,362	0,061
hsa-miR-31*	-0,002	-0,790	-0,281	-0,358	0,399
hsa-miR-3120-5p	-0,286	-0,310	-0,477	-0,358	0,104
hsa-miR-4524	-0,274	-0,401	-0,371	-0,349	0,067
hsa-miR-4540	-0,303	-0,285	-0,458	-0,349	#REF!
hsa-miR-154*	-0,366	-0,653	-0,018	-0,346	0,318
hsa-miR-2115	-0,555	-0,194	-0,284	-0,344	0,188
hsa-miR-4687-5p	-0,304	-0,066	-0,384	-0,344	0,057
hsa-miR-16	-0,359	-0,184	-0,482	-0,342	0,150
hsa-miR-4498	-0,388	-0,414	-0,223	-0,342	0,104

Annexe 3: New MicroRNAs inhibit Glypican-3 and act as tumor suppressors in Human Liver Cancer

hsa-miR-99b*	-0,156	-0,478	-0,383	-0,339	0,165
hsa-miR-34b*	-0,290	-2,166	-0,382	-0,336	0,065
hsa-miR-3117-3p	-0,351	-0,568	-0,076	-0,332	0,247
hsa-miR-888*	0,145	-0,791		-0,323	0,662
hsa-miR-613	-0,230	-0,327	-0,410	-0,322	0,090
hsa-miR-3915	-0,197	-0,447	0,245	-0,322	0,177
hsa-miR-449b*	-0,163	-0,601	-0,194	-0,319	0,244
hsa-miR-431*	-0,262	-0,315	-0,380	-0,319	0,059
hsa-miR-4660	-0,214	-0,281	-0,459	-0,318	0,127
hsa-miR-451b	-0,598	-0,212	-0,136	-0,315	0,248
hsa-miR-129*	-0,201	-0,298	-0,441	-0,313	0,121
hsa-miR-4474-3p	-0,314	-0,202	-0,422	-0,313	0,110
hsa-miR-129-3p	-0,341	-0,203	-0,393	-0,312	0,098
hsa-miR-17*	-0,139	-0,608	-0,189	-0,312	0,257
hsa-miR-876-3p	-0,314	-0,162	-0,460	-0,312	0,149
hsa-miR-146a	-0,285	-0,256	-0,384	-0,308	0,067
hsa-let-7f-1*	-0,158	-0,385	-0,380	-0,308	0,130
hsa-miR-548u	-0,281	-0,353	-0,285	-0,306	0,040
hsa-miR-7-2*	-0,238	-1,987	-0,371	-0,305	0,094
hsa-miR-506	-0,076	-0,434	-0,396	-0,302	0,196
hsa-miR-4781-3p	-0,207	-0,285	-0,412	-0,301	0,104
hsa-miR-125b	-0,334	-0,347	-0,214	-0,298	0,073
hsa-miR-122	-0,374	-0,312	-0,198	-0,295	0,089
hsa-miR-619	-0,214	-0,352	-0,308	-0,291	0,070
hsa-miR-1231	-0,241	-0,286	-0,343	-0,290	0,051
hsa-miR-19b-1*	-0,294	-0,479	-0,096	-0,290	0,192
hsa-miR-3918	-0,158	-0,405	-0,304	-0,289	0,124
hsa-miR-3126-5p	-0,218	-0,447	-0,199	-0,288	0,138
hsa-miR-4419a	-0,156	-0,193	-0,507	-0,285	0,193
hsa-miR-548e	-0,159	-0,180	-0,513	-0,284	0,199
hsa-miR-502-5p	-0,180	-0,238	-0,424	-0,281	0,128
hsa-miR-3692*	-0,074	-0,533	-0,227	-0,278	0,234
hsa-miR-744*	-0,226	-0,362	-0,244	-0,277	0,074
hsa-miR-4751	-0,207	-0,300	-0,324	-0,277	0,062
hsa-miR-3130-3p	-0,275	-0,177	-0,374	-0,275	0,098
hsa-miR-3613-5p	-0,268	-0,195	-0,361	-0,275	0,083
hsa-miR-508-5p	-0,171	-0,321	-0,332	-0,274	0,090
hsa-miR-19b-2*	-0,157	-0,469	-0,194	-0,273	0,171
hsa-miR-4441	-0,172	-0,398	-0,245	-0,272	0,115
hsa-miR-4418	-0,403	-0,238	-0,173	-0,272	0,118
hsa-miR-3925-5p	-0,301	-0,284	-0,229	-0,271	0,038
hsa-miR-654-5p	-0,333	-0,372	-0,103	-0,269	0,146
hsa-let-7a*	-0,260	-0,685	-0,277	-0,268	0,012
hsa-miR-132*	-0,037	-0,639	-0,123	-0,266	0,325
hsa-miR-1285	-0,232	-0,237	-0,320	-0,263	0,049
hsa-miR-4734	-0,133	-0,352	-0,301	-0,262	0,114
hsa-miR-4269	-0,198	-0,196	-0,391	-0,262	0,112
hsa-miR-4665-5p	-0,117	-0,470	-0,194	-0,260	0,186
hsa-miR-4679	-0,183	-0,336	-0,239	-0,253	0,077
hsa-miR-589*	-0,231	0,417	-0,269	-0,250	0,027
hsa-miR-192*	-0,202	-0,231	-0,314	-0,249	0,058
hsa-miR-4712-5p	-0,256	-0,153	-0,337	-0,249	0,092
hsa-miR-3161	-0,166	-0,203	-0,366	-0,245	0,106
hsa-miR-323-5p	-0,215	-0,157	-0,356	-0,243	0,102
hsa-miR-4530	-0,120	-0,395	-0,212	-0,242	0,140
hsa-miR-449a	-0,243	-0,431	-0,050	-0,241	0,191
hsa-miR-3128	-0,078	-0,230	-0,413	-0,240	0,168
hsa-miR-4644	-0,119	-0,324	-0,276	-0,240	0,107
hsa-miR-107	-0,272	-0,307	-0,132	-0,237	0,093
hsa-miR-4524*	0,007	-1,922	-0,480	-0,237	0,345
hsa-miR-1185	-0,104	-0,268	-0,321	-0,231	0,113
hsa-miR-4677-5p	-0,352	-0,116	-0,225	-0,231	0,118
hsa-miR-379*	-0,143	-0,196	-0,344	-0,228	0,104
hsa-miR-1304	-0,381	-0,208	-0,092	-0,227	0,145
hsa-miR-1307	-0,162	-0,159	-0,359	-0,227	0,114
hsa-miR-577	-0,059	-0,279	-0,341	-0,226	0,148
hsa-miR-518a-5p // hsa-miR-527	-0,146	-0,227	-0,301	-0,225	0,078
hsa-miR-510	-0,171	-0,185	-0,315	-0,224	0,080
hsa-miR-147b	-0,174	-0,236	-0,260	-0,223	0,044

Annexe 3: New MicroRNAs inhibit Glypican-3 and act as tumor suppressors in Human Liver Cancer

hsa-miR-411*	-0,134	-0,363	-0,171	-0,223	0,123
hsa-miR-218	-0,302	-0,131	-0,235	-0,223	0,086
hsa-miR-96*	-0,174	-1,279	-0,271	-0,222	0,068
hsa-let-7b*	-0,051	-0,287	-0,327	-0,222	0,149
hsa-miR-3150a-3p	-0,134	-0,306	-0,226	-0,222	0,086
hsa-miR-500a*	0,035	-0,531	-0,167	-0,221	0,287
hsa-miR-4440	-0,100	-0,277	-0,282	-0,219	0,103
hsa-miR-425*	-0,071	-0,334	-0,250	-0,218	0,134
hsa-miR-130b*	-0,125	0,496	-0,305	-0,215	0,128
hsa-miR-196a*	-0,102	-0,255	-0,284	-0,214	0,098
hsa-miR-181c*	-0,016	-0,411		-0,213	0,280
hsa-miR-4701-3p	-0,050	-0,299	-0,288	-0,212	0,141
hsa-miR-4739	-0,094	-0,245	-0,294	-0,211	0,104
hsa-miR-3187-5p	-0,188	0,900	-0,233	-0,210	0,032
hsa-miR-93	-0,270	-0,157	-0,204	-0,210	0,057
hsa-miR-4437	-0,025	-0,293	-0,311	-0,209	0,160
hsa-miR-3186-3p	-0,055	-0,236	-0,336	-0,209	0,143
hsa-miR-145*	-0,071	-0,324	-0,233	-0,209	0,129
hsa-miR-151-5p	-0,207	-0,148	-0,268	-0,208	0,060
hsa-miR-1914*	0,105	-0,591	-0,134	-0,207	0,354
hsa-let-7b	-0,219	-0,193	-0,205	-0,206	0,013
hsa-miR-3165	-0,144	-0,301	-0,171	-0,205	0,084
hsa-miR-580	-0,125	-0,140	-0,350	-0,205	0,126
hsa-miR-3682-5p	-0,124	-0,209	-0,277	-0,204	0,077
hsa-miR-125b-2*	-0,062	-0,342	-0,204	-0,203	0,140
hsa-miR-4434	-0,299	-0,127	-0,178	-0,201	0,088
hsa-let-7i	-0,159	-0,116	-0,328	-0,201	0,112
hsa-miR-4779	-0,100	-0,143	-0,359	-0,201	0,139
hsa-miR-196b	-0,298	-0,224	-0,080	-0,200	0,111
hsa-miR-29b-1*	0,107	-0,647	-0,060	-0,200	0,396
hsa-miR-4784	-0,086	-0,263	-0,250	-0,200	0,099
hsa-miR-4700-3p	-0,134	-0,181	-0,283	-0,199	0,076
hsa-miR-27b*	-0,313	0,569	-0,084	-0,199	0,162
hsa-miR-92a-2*	-0,156	-0,241		-0,199	0,059
hsa-miR-193a-5p	-0,184	-0,218	-0,192	-0,198	0,018
hsa-let-7e	-0,128	-0,259	-0,204	-0,197	0,066
hsa-miR-4728-5p	-0,089	-0,406	-0,094	-0,196	0,181
hsa-miR-4284	-0,198	-0,032	-0,358	-0,196	0,163
hsa-miR-640	-0,127	-0,253	-0,206	-0,195	0,063
hsa-miR-23a*	0,080	-0,414	-0,248	-0,194	0,251
hsa-miR-551b*	-0,111	-1,376	-0,277	-0,194	0,117
hsa-miR-103a-2*	-0,186	-0,138	-0,257	-0,194	0,060
hsa-miR-1249	-0,342	-0,126	-0,112	-0,193	0,129
hsa-miR-664*	-0,041	-0,343		-0,192	0,213
hsa-miR-138	-0,247	-0,194	-0,131	-0,191	0,058
hsa-miR-3134	-0,182	-0,145	-0,244	-0,190	0,050
hsa-miR-4277	-0,205	-0,119	-0,247	-0,190	0,065
hsa-miR-4522	-0,282	-0,085	-0,203	-0,190	0,099
hsa-miR-1228*	-0,017	-0,389	-0,161	-0,189	0,188
hsa-miR-1266	-0,464	-0,073	-0,030	-0,189	0,239
hsa-miR-1288	-0,179	-0,147	-0,240	-0,189	0,047
hsa-miR-4423-5p	-0,059	-0,314	-0,193	-0,189	0,128
hsa-miR-3612	-0,092	-0,341	-0,130	-0,188	0,134
hsa-miR-190	-0,164	-0,168	-0,231	-0,188	0,037
hsa-miR-7-1*	-0,096	-0,180	-0,287	-0,188	0,096
hsa-miR-1293	-0,298	0,016	-0,278	-0,187	0,176
hsa-miR-18a*	-0,160	-1,210	-0,214	-0,187	0,038
hsa-miR-3684	-0,018	-0,168	-0,374	-0,187	0,178
hsa-miR-4674	0,084	-0,061	-0,583	-0,187	0,351
hsa-miR-345	-0,121	-0,156	-0,279	-0,186	0,083
hsa-miR-4736	-0,119	-0,187	-0,248	-0,185	0,065
hsa-miR-1260b	-0,143	-0,152	-0,259	-0,184	0,065
hsa-miR-3180	-0,078	-0,207	-0,268	-0,184	0,097
hsa-miR-20b*	-0,273	0,239	-0,517	-0,184	0,386
hsa-miR-4732-5p	-0,079	-0,233	-0,237	-0,183	0,090
hsa-miR-195	-0,142	-0,384	-0,021	-0,182	0,185
hsa-miR-564	-0,094	-0,141	-0,312	-0,182	0,115
hsa-let-7c	-0,240	-0,268	-0,038	-0,182	0,126
hsa-miR-608	-0,143	-0,106	-0,298	-0,182	0,102
hsa-miR-9*	-0,050	-0,299	-0,196	-0,182	0,125

Annexe 3: New MicroRNAs inhibit Glypican-3 and act as tumor suppressors in Human Liver Cancer

hsa-miR-629*	-0,094	-0,267		-0,181	0,122
hsa-miR-1911*	-0,338	-0,023		-0,180	0,223
hsa-miR-4515	-0,029	-0,232	-0,278	-0,180	0,133
hsa-miR-192	-0,203	-0,328	-0,008	-0,180	0,161
hsa-miR-379	-0,409	-0,201	0,072	-0,179	0,242
hsa-miR-1205	-0,233	-0,254	-0,050	-0,179	0,113
hsa-miR-493	-0,128	-0,206	-0,201	-0,178	0,043
hsa-miR-4670-5p	-0,393	-0,129	-0,010	-0,177	0,196
hsa-miR-517*	0,026	-0,406	-0,151	-0,177	0,217
hsa-miR-3646	-0,178	-0,013	-0,339	-0,177	0,163
hsa-miR-4738-3p	-0,145	-0,064	-0,322	-0,177	0,132
hsa-miR-3690	-0,196	-0,335	0,000	-0,177	0,168
hsa-miR-493*	-0,199	-0,888	-0,153	-0,176	0,033
hsa-miR-422a	-0,029	-0,417	-0,081	-0,176	0,210
hsa-miR-1287	-0,091	-0,213	-0,220	-0,174	0,073
hsa-miR-4703-3p	-0,174	-0,299	-0,049	-0,174	0,125
hsa-miR-105*	-0,072	-0,813	-0,275	-0,174	0,143
hsa-miR-376a*	-0,140	-0,033	-0,344	-0,172	0,158
hsa-miR-4678	-0,119	-0,286	-0,112	-0,172	0,099
hsa-miR-4756-5p	-0,120	-0,330	-0,065	-0,172	0,140
hsa-miR-376a	-0,139	-0,266	-0,109	-0,171	0,084
hsa-miR-140-3p	-0,171	-0,109	-0,233	-0,171	0,062
hsa-miR-26a-2*	0,094	-0,427	-0,180	-0,171	0,261
hsa-miR-665	-0,086	-0,245	-0,180	-0,170	0,080
hsa-miR-182*	-0,166	-1,061	-0,174	-0,170	0,006
hsa-miR-190b	-0,238	-0,003	-0,270	-0,170	0,146
hsa-miR-4536	0,035	-0,347	-0,197	-0,170	0,193
hsa-miR-4712-3p	-0,164	-0,293	-0,052	-0,170	0,120
hsa-miR-518c*	-0,154	-0,185		-0,170	0,022
hsa-miR-4529-3p	-0,016	-0,220	-0,272	-0,169	0,135
hsa-miR-4733-3p	-0,099	-0,156	-0,251	-0,169	0,077
hsa-miR-27a*	-0,075	-0,200	-0,232	-0,169	0,083
hsa-miR-4675	-0,143	-0,111	-0,249	-0,168	0,072
hsa-miR-4780	-0,061	-0,324	-0,118	-0,168	0,138
hsa-miR-4684-3p	-0,396	-0,040	-0,066	-0,167	0,198
hsa-miR-4789-5p	-0,083	-0,324	-0,093	-0,167	0,136
hsa-let-7i*	-0,108	-0,491	0,099	-0,166	0,299
hsa-miR-34a	-0,223	-0,159	-0,115	-0,166	0,055
hsa-miR-365*	-0,332	0,001		-0,166	0,235
hsa-miR-1255b	-0,101	-0,163	-0,230	-0,165	0,065
hsa-let-7d	-0,139	-0,181	-0,172	-0,164	0,022
hsa-miR-342-3p	-0,195	-0,161	-0,136	-0,164	0,030
hsa-miR-4688	-0,085	-0,145	-0,261	-0,164	0,089
hsa-miR-15a*	-0,305	-0,021		-0,163	0,201
hsa-miR-3125	-0,052	-0,202	-0,235	-0,163	0,097
hsa-miR-4735-5p	-0,283	-0,021	-0,185	-0,163	0,132
hsa-miR-4670-3p	-0,183	-0,105	-0,199	-0,162	0,050
hsa-miR-224	-0,004	-0,091	-0,392	-0,162	0,204
hsa-let-7f	-0,157	-0,126	-0,203	-0,162	0,039
hsa-miR-5095	-0,165		-0,158	-0,162	0,005
hsa-miR-4473	-0,121	-0,041	-0,322	-0,161	0,145
hsa-miR-4664-5p	-0,094	-0,176	-0,212	-0,161	0,060
hsa-miR-2278	-0,009	-0,219	-0,253	-0,160	0,132
hsa-miR-764	-0,105	-0,101	-0,275	-0,160	0,099
hsa-miR-3607-5p	-0,194	-0,121	-0,166	-0,160	0,037
hsa-miR-451	-0,114	-0,364	-0,002	-0,160	0,185
hsa-miR-378b	-0,125	-0,550	0,195	-0,160	0,374
hsa-miR-4723-3p	-0,047	-0,335	-0,098	-0,160	0,154
hsa-miR-3611	-0,105	-0,207	-0,167	-0,159	0,051
hsa-miR-4326	-0,053	-0,254	-0,167	-0,158	0,101
hsa-miR-4645-3p	0,024	0,940	-0,340	-0,158	0,257
hsa-miR-15b	-0,117	-0,053	-0,303	-0,158	0,130
hsa-miR-4633-5p	-0,102	-0,196	-0,175	-0,158	0,050
hsa-miR-4539	-0,149	-0,163	-0,160	-0,157	0,008
hsa-miR-2116*	0,039	-0,445	-0,066	-0,157	0,255
hsa-miR-4683	0,002	-0,175	-0,298	-0,157	0,150
hsa-miR-643	-0,131	-0,221	-0,118	-0,157	0,056
hsa-let-7a	-0,202	-0,186	-0,081	-0,156	0,066
hsa-miR-1227	-0,045	-0,152	-0,271	-0,156	0,113
hsa-miR-152	-0,089	-0,069	-0,308	-0,155	0,133

Annexe 3: New MicroRNAs inhibit Glypican-3 and act as tumor suppressors in Human Liver Cancer

hsa-miR-3681	-0,137	-0,059	-0,267	-0,154	0,105
hsa-miR-4432	-0,085	-0,213	-0,164	-0,154	0,064
hsa-miR-369-5p	-0,247	-0,207	-0,007	-0,154	0,129
hsa-miR-323b-5p	-0,387	-0,031	-0,039	-0,152	0,203
hsa-miR-4430	-0,014	-0,136	-0,301	-0,151	0,144
hsa-miR-769-5p	-0,120	-0,182	-0,150	-0,151	0,031
hsa-miR-3150b-5p	-0,109	0,940	-0,190	-0,150	0,057
hsa-miR-339-5p	-0,172	-0,117	-0,160	-0,150	0,029
hsa-miR-767-5p	-0,036	-0,273	-0,139	-0,149	0,119
hsa-miR-4512	-0,130	-0,441	-0,169	-0,149	0,027
hsa-miR-4428	-0,083	-0,166	-0,195	-0,148	0,058
hsa-miR-4652-5p	-0,192	0,950	-0,104	-0,148	0,062
hsa-miR-548a1	-0,072	-0,211	-0,160	-0,148	0,070
hsa-miR-4800-3p	-0,181	-0,213	-0,044	-0,146	0,090
hsa-miR-663b	-0,101	-0,096	-0,241	-0,146	0,082
hsa-miR-4501	0,032	-0,192	-0,279	-0,146	0,161
hsa-miR-26a-1*	0,038	-0,421	-0,055	-0,146	0,242
hsa-miR-4417	0,050	-0,245	-0,239	-0,145	0,169
hsa-miR-611	-0,053	-0,338	-0,041	-0,144	0,168
hsa-miR-4488	-0,099	-0,263	-0,069	-0,144	0,104
hsa-miR-3914	0,004	-0,180	-0,254	-0,144	0,133
hsa-miR-1233	-0,053	-0,234	-0,143	-0,143	0,091
hsa-miR-4270	-0,160	-0,073	-0,194	-0,142	0,062
hsa-miR-2117	-0,043	-0,177	-0,206	-0,142	0,087
hsa-miR-1286	-0,181	-0,185	-0,058	-0,141	0,072
hsa-miR-3619-5p	-0,138	-0,130	-0,155	-0,141	0,013
hsa-miR-4790-3p	-0,029	-0,175	-0,219	-0,141	0,099
hsa-miR-4301	-0,335	-0,020	-0,067	-0,141	0,170
hsa-let-7d*	-0,073	-0,143	-0,206	-0,141	0,067
hsa-miR-708*	-0,036	-0,291	-0,093	-0,140	0,134
hsa-miR-1296	-0,076	-0,129	-0,214	-0,140	0,069
hsa-miR-4770	-0,066	-0,125	-0,228	-0,140	0,082
hsa-miR-4754	-0,020	-0,059	-0,339	-0,139	0,174
hsa-miR-378g	-0,164	-0,107	-0,145	-0,139	0,029
hsa-miR-374b*	0,069	-0,311	-0,173	-0,138	0,192
hsa-miR-1250	-0,061	-0,077	-0,277	-0,138	0,120
hsa-miR-378h	-0,158	-0,144	-0,113	-0,138	0,023
hsa-miR-3689a-5p // hsa-miR-3689b // hsa- miR-3689e	-0,048	-0,102	-0,263	-0,138	0,112
hsa-miR-558	-0,034	-0,229	-0,149	-0,138	0,098
hsa-miR-146b-5p	-0,085	-0,044	-0,283	-0,137	0,128
hsa-miR-765	-0,016	-0,195	-0,199	-0,137	0,105
hsa-miR-196b*	-0,009	-0,227	-0,173	-0,136	0,114
hsa-miR-4692	-0,141	-0,108	-0,160	-0,136	0,026
hsa-miR-3675-5p	0,059	-0,220	-0,246	-0,136	0,169
hsa-miR-3074-3p	-0,082	-0,001	-0,320	-0,134	0,166
hsa-miR-4519	-0,109	-0,118	-0,174	-0,134	0,036
hsa-miR-98	-0,119	-0,090	-0,192	-0,133	0,052
hsa-miR-1178	-0,092	-0,117	-0,191	-0,133	0,052
hsa-miR-597	0,023	-0,209	-0,212	-0,133	0,135
hsa-miR-4314	-0,036	-0,153	-0,210	-0,133	0,089
hsa-miR-299-5p	-0,145	-0,232	-0,019	-0,132	0,107
hsa-miR-22*	-0,028	-0,322	-0,046	-0,132	0,165
hsa-miR-4659a-5p	0,016	0,900	-0,280	-0,132	0,209
hsa-miR-516b* // hsa- miR-516a-3p	-0,336	-0,037	-0,018	-0,130	0,179
hsa-miR-541	-0,247	-0,096	-0,048	-0,130	0,104
hsa-miR-127-3p	-0,283	-0,064	-0,043	-0,130	0,133
hsa-let-7g*	-0,106	-0,196	-0,087	-0,130	0,058
hsa-miR-424*	-0,436	0,178		-0,129	0,434
hsa-miR-4643	-0,141	-0,191	-0,051	-0,128	0,070
hsa-miR-183	-0,123	-0,332	0,072	-0,127	0,202
hsa-miR-4656	-0,058	-0,142	-0,181	-0,127	0,063
hsa-miR-296-5p	-0,141	-0,211	-0,028	-0,127	0,092
hsa-miR-125a-5p	-0,253	-0,106	-0,022	-0,127	0,117
hsa-miR-367*	-0,204	-0,050		-0,127	0,109
hsa-miR-222	-0,050	-0,129	-0,200	-0,126	0,075
hsa-miR-3669	-0,011	-0,132	-0,233	-0,125	0,111
hsa-miR-4706	-0,063	0,950	-0,186	-0,125	0,087

Annexe 3: New MicroRNAs inhibit Glypican-3 and act as tumor suppressors in Human Liver Cancer

hsa-miR-4664-3p	0,023	-0,140	-0,258	-0,125	0,141
hsa-miR-589	0,040	-0,230	-0,184	-0,125	0,144
hsa-miR-4726-5p	-0,035	-0,104	-0,232	-0,124	0,100
hsa-miR-361-5p	-0,138	-0,196	-0,034	-0,123	0,082
hsa-miR-380*	-0,019	-1,934	-0,225	-0,122	0,145
hsa-miR-885-5p	-0,078	-0,167	-0,121	-0,122	0,045
hsa-miR-1224-5p	-0,032	-0,191	-0,143	-0,122	0,082
hsa-miR-499-5p	-0,183	-0,139	-0,043	-0,122	0,072
hsa-miR-95	-0,213	-0,066	-0,086	-0,122	0,079
hsa-miR-21*	0,041	-0,406	0,004	-0,120	0,248
hsa-miR-105	-0,016	-0,097	-0,247	-0,120	0,117
hsa-miR-185*	-0,154	-0,141	-0,063	-0,120	0,049
hsa-miR-1283	0,020	-0,169	-0,207	-0,119	0,122
hsa-miR-454*	-0,069	-0,961	-0,168	-0,118	0,070
hsa-miR-3924	-0,016	-0,261	-0,075	-0,117	0,128
hsa-miR-1262	-0,054	-0,169	-0,129	-0,117	0,058
hsa-miR-936	-0,055	-0,247	-0,047	-0,116	0,113
hsa-miR-1246	-0,083	-0,100	-0,162	-0,115	0,042
hsa-miR-513b	-0,052	-0,074	-0,218	-0,115	0,090
hsa-miR-29a*	0,053	-0,253	-0,143	-0,114	0,155
hsa-miR-933	0,006	-0,140	-0,208	-0,114	0,110
hsa-miR-4475	-0,008	-0,139	-0,193	-0,114	0,095
hsa-miR-4650-3p	-0,050	-0,201	-0,090	-0,114	0,078
hsa-miR-3150b-3p	-0,081	-0,119	-0,138	-0,113	0,029
hsa-miR-33a	-0,182	-0,110	-0,045	-0,113	0,069
hsa-miR-409-5p	-0,189	0,006	-0,152	-0,112	0,103
hsa-miR-4782-5p	-0,112	-0,125	-0,096	-0,111	0,015
hsa-miR-2682*	0,170	-0,391		-0,111	0,397
hsa-miR-7	-0,234	-0,073	-0,023	-0,110	0,110
hsa-miR-320e	-0,037	-0,159	-0,134	-0,110	0,064
hsa-miR-186*	0,034	0,876	-0,253	-0,109	0,203
hsa-miR-4311	-0,059	-0,187	-0,081	-0,109	0,068
hsa-miR-3616-5p	-0,016	0,990	-0,202	-0,109	0,131
hsa-miR-1302	-0,160	0,099	-0,265	-0,109	0,187
hsa-miR-509-3p	-0,173	-0,344	0,192	-0,109	0,274
hsa-let-7f-2*	-0,194	-0,022		-0,108	0,121
hsa-miR-4730	-0,099	-0,154	-0,070	-0,108	0,043
hsa-miR-3155	0,075	-0,292	-0,105	-0,107	0,184
hsa-miR-4774-3p	-0,191	-0,136	0,006	-0,107	0,101
hsa-miR-3672	-0,102	0,990	-0,112	-0,107	0,007
hsa-miR-4485	0,042	-0,294	-0,069	-0,107	0,171
hsa-miR-4446-3p	-0,083	0,960	-0,131	-0,107	0,034
hsa-miR-1207-3p	0,003	-0,156	-0,168	-0,107	0,095
hsa-miR-4327	-0,091	-0,240	0,010	-0,107	0,126
hsa-miR-637	0,005	-0,108	-0,216	-0,107	0,111
hsa-miR-150*	-0,038	1,564	-0,174	-0,106	0,096
hsa-miR-125b-1*	0,078	-0,245	-0,152	-0,106	0,167
hsa-miR-4727-3p	-0,197	-0,032	-0,091	-0,106	0,084
hsa-miR-3164	-0,017	-0,061	-0,240	-0,106	0,118
hsa-miR-1226*	-0,079	0,146	-0,384	-0,106	0,266
hsa-miR-513a-5p	0,044	-0,166	-0,195	-0,106	0,131
hsa-miR-4684-5p	0,038	-0,249	-0,104	-0,105	0,144
hsa-miR-335*	-0,079	-0,229	-0,006	-0,105	0,114
hsa-miR-4274	-0,019	0,940	-0,191	-0,105	0,122
hsa-miR-4717-3p	-0,254	-0,033	-0,026	-0,105	0,130
hsa-miR-491-5p	-0,217	-0,002	-0,094	-0,104	0,107
hsa-miR-664	-0,082	-0,171	-0,059	-0,104	0,060
hsa-miR-30c-2*	-0,007	-0,195	-0,109	-0,104	0,095
hsa-miR-499a-3p	0,033	-0,176	-0,166	-0,103	0,118
hsa-miR-525-3p	-0,110	-0,190	-0,009	-0,103	0,090
hsa-miR-3605-3p	-0,050	-0,117	-0,140	-0,102	0,046
hsa-miR-4317	-0,075	-0,213	-0,018	-0,102	0,100
hsa-miR-4662b	-0,009	-0,087	-0,210	-0,102	0,101
hsa-miR-3685	-0,035	-0,110	-0,158	-0,101	0,062
hsa-miR-30c-1*	0,038	-0,213	-0,128	-0,101	0,128
hsa-miR-519c-5p // hsa-miR-519b-5p // hsa-miR-523* // hsa-miR-518a* // hsa-miR-522* // hsa-miR-519a*	-0,010	-0,079	-0,214	-0,101	0,104

Annexe 3: New MicroRNAs inhibit Glypican-3 and act as tumor suppressors in Human Liver Cancer

hsa-miR-3908	-0,023	-0,182	-0,097	-0,100	0,079
hsa-miR-4662a-5p	-0,067	-0,018	-0,215	-0,100	0,102
hsa-miR-188-5p	-0,133	-0,056	-0,111	-0,100	0,040
hsa-miR-3122	-0,210	-0,013	-0,077	-0,100	0,100
hsa-miR-2110	-0,131	-0,100	-0,068	-0,100	0,032
hsa-miR-3185	-0,037	0,029	-0,290	-0,099	0,169
hsa-miR-4666-5p	-0,080	-0,047	-0,171	-0,099	0,064
hsa-miR-625*	-0,208	0,009		-0,099	0,153
hsa-miR-455-5p	-0,173	-0,067	-0,057	-0,099	0,064
hsa-miR-3160-3p	-0,143	0,046	-0,200	-0,099	0,129
hsa-miR-503	-0,051	-0,097	-0,148	-0,099	0,049
hsa-miR-423-3p	-0,271	-0,022	-0,003	-0,098	0,149
hsa-miR-629	-0,410	-0,117	0,232	-0,098	0,321
hsa-miR-526b	-0,019	-0,094	-0,182	-0,098	0,082
hsa-miR-33a*	-0,139	-0,662	-0,057	-0,098	0,058
hsa-miR-135a	-0,101	-0,189	-0,004	-0,098	0,092
hsa-miR-377*	-0,061	-0,169	-0,063	-0,098	0,062
hsa-miR-4695-5p	-0,049	-0,070	-0,173	-0,097	0,067
hsa-miR-2113	-0,076	1,000	-0,117	-0,097	0,029
hsa-miR-147	-0,187	0,008	-0,108	-0,096	0,099
hsa-miR-124	-0,091	-0,161	-0,033	-0,095	0,064
hsa-miR-3941	-0,003	-0,029	-0,253	-0,095	0,138
hsa-miR-606	-0,023	-0,181	-0,081	-0,095	0,080
hsa-miR-218-2*	-0,039	-0,160	-0,086	-0,095	0,061
hsa-let-7a*	0,082	-0,203	-0,163	-0,095	0,155
hsa-miR-2909	-0,110	-0,053	-0,119	-0,094	0,036
hsa-miR-134	-0,053	-0,048	-0,180	-0,094	0,074
hsa-miR-4323	-0,088	1,100	-0,099	-0,094	0,008
hsa-miR-4300	-0,085	-0,109	-0,086	-0,093	0,014
hsa-miR-15a	-0,111	-0,002	-0,168	-0,093	0,084
hsa-miR-3136-5p	0,055	-0,217	-0,117	-0,093	0,138
hsa-miR-1322	0,042	-0,143	-0,177	-0,093	0,118
hsa-miR-1269	-0,048	-0,102	-0,125	-0,092	0,039
hsa-miR-2467-5p	-0,020	-0,244	-0,011	-0,092	0,132
hsa-miR-4708-5p	-0,073	-0,212	0,010	-0,092	0,112
hsa-miR-10a*	-0,007	-0,176	-0,090	-0,091	0,085
hsa-miR-92a-1*	-0,191	0,009		-0,091	0,141
hsa-miR-1253	-0,012	0,002	-0,262	-0,091	0,148
hsa-miR-758	-0,118	-0,037	-0,117	-0,090	0,047
hsa-miR-4719	0,001	-0,218	-0,054	-0,090	0,114
hsa-miR-214*	-0,007	-0,132	-0,130	-0,090	0,072
hsa-miR-4308	0,051	-0,005	-0,314	-0,089	0,196
hsa-miR-15b*	0,092	-0,241	-0,118	-0,089	0,168
hsa-miR-1321	0,086	-0,282	-0,071	-0,089	0,184
hsa-miR-2681*	-0,030	-0,842	-0,148	-0,089	0,084
hsa-miR-4740-5p	-0,077	-0,144	-0,045	-0,089	0,050
hsa-miR-3142	-0,040	-0,033	-0,193	-0,089	0,090
hsa-miR-153	0,037	-0,161	-0,141	-0,088	0,109
hsa-miR-4742-5p	-0,078	-0,095	-0,091	-0,088	0,009
hsa-miR-516b	-0,026	-0,208	-0,029	-0,087	0,104
hsa-miR-1275	0,090	-0,237	-0,115	-0,087	0,165
hsa-miR-3127-5p	-0,097	-0,061	-0,103	-0,087	0,023
hsa-miR-3664-3p	-0,384	-0,018	0,142	-0,087	0,270
hsa-miR-610	0,117	-0,226	-0,151	-0,087	0,180
hsa-miR-340*	-0,042	-0,126	-0,091	-0,086	0,042
hsa-miR-3683	-0,040	-0,008	-0,211	-0,086	0,109
hsa-miR-1260	-0,023	-0,057	-0,178	-0,086	0,082
hsa-miR-3977	0,005	-0,094	-0,167	-0,086	0,086
hsa-miR-4761-5p	-0,092	0,009	-0,172	-0,085	0,091
hsa-miR-485-5p	-0,162	-0,031	-0,060	-0,084	0,069
hsa-miR-3616-3p	-0,119	-0,014	-0,119	-0,084	0,060
hsa-miR-4511	0,023	-0,043	-0,229	-0,083	0,131
hsa-miR-4312	-0,115	0,075	-0,209	-0,083	0,145
hsa-miR-4654	-0,172	-0,163	0,086	-0,083	0,146
hsa-miR-329	0,068	-0,176	-0,139	-0,083	0,131
hsa-miR-4306	-0,036	-0,081	-0,131	-0,082	0,048
hsa-miR-4723-5p	-0,054	-0,074	-0,119	-0,082	0,033
hsa-miR-1236	0,039	-0,164	-0,122	-0,082	0,107
hsa-miR-212	-0,084	-0,152	-0,011	-0,082	0,070
hsa-miR-323b-3p	-0,289	-0,143	0,186	-0,082	0,243

Annexe 3: New MicroRNAs inhibit Glypican-3 and act as tumor suppressors in Human Liver Cancer

hsa-miR-106b*	-0,193	-0,002	-0,049	-0,081	0,100
hsa-miR-424	-0,051	-0,040	-0,151	-0,081	0,061
hsa-miR-761	-0,055	-0,013	-0,175	-0,081	0,084
hsa-miR-1197	-0,119	0,028	-0,152	-0,081	0,096
hsa-miR-3141	-0,043	-0,104	-0,094	-0,080	0,033
hsa-miR-663	-0,042	0,930	-0,117	-0,080	0,053
hsa-miR-4523	0,074	-0,052	-0,261	-0,080	0,169
hsa-miR-3688-5p	0,042	-0,100	-0,181	-0,080	0,113
hsa-miR-202*	0,028	-0,888	-0,186	-0,079	0,151
hsa-miR-4752	-0,022	-0,187	-0,028	-0,079	0,094
hsa-miR-3180-3p	0,003	-0,118	-0,122	-0,079	0,071
hsa-miR-4500	0,006	-0,094	-0,149	-0,079	0,079
hsa-miR-32*	0,012	-1,463	-0,170	-0,079	0,128
hsa-miR-4796-3p	-0,026	-0,108	-0,102	-0,079	0,046
hsa-miR-767-3p	-0,215	0,089	-0,110	-0,079	0,154
hsa-miR-4646-3p	-0,042	0,022	-0,215	-0,079	0,123
hsa-miR-410	-0,077	-0,274	0,116	-0,079	0,195
hsa-miR-3133	0,050	-0,140	-0,146	-0,078	0,112
hsa-miR-297	-0,200	0,025	-0,060	-0,078	0,114
hsa-miR-628-5p	-0,002	-0,197	-0,035	-0,078	0,104
hsa-miR-3714	-0,095	0,053	-0,191	-0,078	0,123
hsa-miR-325	0,099	-0,051	-0,281	-0,078	0,191
hsa-miR-363*	-0,054	-0,131	-0,047	-0,077	0,047
hsa-miR-4786-5p	-0,057	-0,051	-0,124	-0,077	0,040
hsa-miR-3173-3p	-0,049	0,013	-0,194	-0,077	0,107
hsa-miR-150	-0,031	-0,246	0,047	-0,076	0,152
hsa-miR-302d*	0,071	-0,260	-0,040	-0,076	0,169
hsa-miR-4677-3p	-0,102	-0,220	0,093	-0,076	0,158
hsa-miR-545*	0,044	0,668	-0,196	-0,076	0,170
hsa-miR-124*	0,006	-0,227	-0,006	-0,076	0,131
hsa-miR-3157-5p	-0,058	0,014	-0,182	-0,076	0,099
hsa-miR-676*	-0,008	-0,235	0,017	-0,076	0,139
hsa-miR-135a*	-0,078	-0,053	-0,095	-0,075	0,021
hsa-miR-3658	0,028	-0,047	-0,206	-0,075	0,119
hsa-miR-1273e	0,115	-0,224	-0,115	-0,075	0,173
hsa-miR-449b	-0,036	-0,016	-0,170	-0,074	0,084
hsa-miR-490-3p	-0,153	0,000	-0,069	-0,074	0,076
hsa-miR-138-2*	-0,063	-0,085		-0,074	0,015
hsa-miR-4759	0,042	-0,074	-0,189	-0,074	0,116
hsa-miR-507	-0,024	-0,163	-0,033	-0,073	0,078
hsa-miR-103a	-0,183	-0,147	0,111	-0,073	0,160
hsa-miR-195*	0,045	-0,093	-0,171	-0,073	0,109
hsa-miR-302c*	0,056	-0,183	-0,092	-0,073	0,120
hsa-miR-378*	0,008	-0,131	-0,094	-0,072	0,072
hsa-miR-3157-3p	-0,017	-0,047	-0,153	-0,072	0,072
hsa-miR-634	-0,049	-0,082	-0,085	-0,072	0,020
hsa-miR-873	-0,090	-0,168	0,042	-0,072	0,106
hsa-miR-130a*	0,017	0,750	-0,161	-0,072	0,126
hsa-miR-194*	-0,059	-0,128	-0,028	-0,071	0,051
hsa-miR-3159	0,042	-0,149	-0,105	-0,071	0,100
hsa-miR-4283	0,031	-0,188	-0,053	-0,070	0,111
hsa-miR-143	-0,091	-0,025	-0,094	-0,070	0,039
hsa-miR-4257	-0,031	-0,090	-0,089	-0,070	0,034
hsa-miR-4648	-0,094	-0,086	-0,028	-0,070	0,036
hsa-miR-4639-5p	0,050	-0,036	-0,222	-0,070	0,139
hsa-miR-3194-5p	-0,102	0,009	-0,115	-0,069	0,068
hsa-miR-4662a-3p	0,059	-0,127	-0,140	-0,069	0,111
hsa-miR-4724-5p	0,012	-0,056	-0,164	-0,069	0,088
hsa-miR-155*	-0,041	-0,097		-0,069	0,040
hsa-miR-365	-0,112	0,005	-0,100	-0,069	0,064
hsa-miR-3173-5p	-0,043	-0,135	-0,029	-0,069	0,058
hsa-miR-4433	-0,002	-0,247	0,043	-0,069	0,156
hsa-miR-135b	-0,067	-0,053	-0,085	-0,069	0,016
hsa-miR-3689f	0,132	-0,066	-0,272	-0,069	0,202
hsa-miR-4533	-0,021	-0,087	-0,098	-0,069	0,042
hsa-miR-125a-3p	-0,095	-0,160	0,050	-0,068	0,107
hsa-miR-3940-5p	0,063	-0,224	-0,044	-0,068	0,145
hsa-miR-4278	-0,131	-0,104	0,030	-0,068	0,086
hsa-miR-4731-5p	0,039	-0,013	-0,230	-0,068	0,143
hsa-miR-4268	0,062	-0,169	-0,096	-0,068	0,118

Annexe 3: New MicroRNAs inhibit Glypican-3 and act as tumor suppressors in Human Liver Cancer

hsa-miR-4424	0,020	-0,220	-0,003	-0,068	0,132
hsa-miR-499a-5p	0,026	-0,046	-0,182	-0,068	0,106
hsa-miR-101*	0,012	-0,105	-0,110	-0,068	0,069
hsa-miR-541*	-0,129	-0,006		-0,067	0,087
hsa-miR-1292	-0,089	0,008	-0,119	-0,067	0,066
hsa-miR-1267	-0,095	-0,035	-0,069	-0,066	0,030
hsa-miR-433	0,001	-0,034	-0,166	-0,066	0,088
hsa-miR-130b	-0,119	-0,096	0,016	-0,066	0,072
hsa-miR-3166	-0,200	-0,052	0,054	-0,066	0,128
hsa-miR-3925-3p	0,007	-0,023	-0,182	-0,066	0,101
hsa-miR-3139	-0,014	-0,141	-0,042	-0,066	0,067
hsa-miR-641	-0,091	0,119	-0,224	-0,065	0,173
hsa-miR-4290	0,004	-0,029	-0,171	-0,065	0,093
hsa-miR-3201	0,010	-0,041	-0,165	-0,065	0,090
hsa-miR-30b	-0,087	-0,076	-0,032	-0,065	0,029
hsa-miR-646	-0,163	0,970	0,033	-0,065	0,139
hsa-miR-185	-0,048	-0,010	-0,136	-0,064	0,065
hsa-miR-486-5p	-0,137	0,010	-0,064	-0,064	0,073
hsa-miR-4800-5p	0,037	-0,114	-0,114	-0,064	0,087
hsa-miR-30c	-0,150	-0,062	0,021	-0,064	0,086
hsa-miR-3944-3p	-0,166	-0,013	-0,011	-0,064	0,089
hsa-miR-1306	-0,236	-0,058	0,105	-0,063	0,171
hsa-miR-18b	0,017	-0,073	-0,134	-0,063	0,076
hsa-miR-574-3p	-0,132	0,048	-0,104	-0,063	0,097
hsa-miR-4742-3p	0,006	-0,113	-0,081	-0,063	0,062
hsa-miR-1269b	0,026	-0,235	0,022	-0,063	0,150
hsa-miR-3943	0,013	-0,210	0,010	-0,063	0,128
hsa-miR-4747-5p	0,064	-0,116	-0,135	-0,062	0,110
hsa-miR-636	0,033	1,000	-0,158	-0,062	0,135
hsa-miR-499-3p	-0,032	0,044	-0,197	-0,062	0,123
hsa-miR-25*	-0,157	0,033		-0,062	0,134
hsa-miR-181c	-0,076	-0,003	-0,107	-0,062	0,053
hsa-miR-4324	0,096	-0,098	-0,184	-0,062	0,143
hsa-miR-28-5p	-0,115	0,055	-0,124	-0,062	0,101
hsa-miR-4745-5p	0,096	-0,130	-0,148	-0,061	0,136
hsa-miR-548ac	-0,037	-0,034	-0,109	-0,060	0,042
hsa-miR-877	-0,016	0,022	-0,186	-0,060	0,111
hsa-miR-548j	0,018	0,960	-0,137	-0,060	0,110
hsa-miR-3680	0,020	1,020	-0,139	-0,060	0,113
hsa-miR-100*	0,010	-0,111	-0,077	-0,059	0,062
hsa-miR-4494	0,121	-0,218	-0,079	-0,059	0,170
hsa-miR-143*	0,010	-0,128		-0,059	0,097
hsa-miR-3913-3p	0,025	-0,034	-0,167	-0,059	0,098
hsa-miR-301a	-0,094	0,020	-0,102	-0,059	0,068
hsa-miR-27b	-0,077	-0,026	-0,073	-0,059	0,028
hsa-miR-1264	-0,051	-0,066	0,561	-0,059	0,011
hsa-miR-3665	0,129	-0,121	-0,183	-0,058	0,165
hsa-miR-1245	-0,062	-0,015	-0,098	-0,058	0,042
hsa-miR-4713-3p	0,005	-0,107	-0,073	-0,058	0,057
hsa-miR-548t	-0,072	-0,066	-0,035	-0,058	0,020
hsa-miR-210	-0,047	-0,106	-0,020	-0,058	0,044
hsa-miR-449c*	0,070	-0,197	-0,045	-0,057	0,134
hsa-miR-4716-3p	0,035	-0,015	-0,193	-0,057	0,120
hsa-miR-3919	-0,077	-0,011	-0,084	-0,057	0,040
hsa-miR-27a	0,014	-0,029	-0,157	-0,057	0,089
hsa-miR-548b-5p	0,050	-0,093	-0,129	-0,057	0,095
hsa-miR-133a	-0,004	-0,141	-0,026	-0,057	0,073
hsa-miR-4788	-0,025	-0,146	0,000	-0,057	0,078
hsa-miR-4319	-0,200	0,046	-0,018	-0,057	0,128
hsa-miR-4763-5p	0,004	-0,013	-0,162	-0,057	0,091
hsa-miR-617	-0,018	-0,071	-0,081	-0,057	0,034
hsa-miR-1193	0,022	-0,323	0,132	-0,056	0,237
		-			
hsa-miR-138-1*	-0,056	2,80994619061 52+4,53236014 182719i		-0,056	#DIV/0!
hsa-miR-572	-0,099	0,025	-0,094	-0,056	0,071
hsa-miR-874	-0,162	-0,034	0,029	-0,056	0,098
hsa-miR-19a	-0,077	-0,105	0,016	-0,055	0,063
hsa-miR-3132	0,013	0,013	-0,192	-0,055	0,118

Annexe 3: New MicroRNAs inhibit Glypican-3 and act as tumor suppressors in Human Liver Cancer

hsa-miR-4738-5p	0,023	-0,081	-0,107	-0,055	0,069
hsa-miR-148b	-0,065	0,050	-0,149	-0,054	0,100
hsa-miR-524-3p	-0,194	-0,006	0,037	-0,054	0,123
hsa-miR-3670	0,003	0,037	-0,202	-0,054	0,129
hsa-miR-3920	-0,012	0,930	-0,096	-0,054	0,059
hsa-miR-4285	-0,047	-0,111	-0,002	-0,054	0,055
hsa-miR-518c	0,053	-0,062	-0,150	-0,053	0,102
hsa-miR-23b	0,013	-0,114	-0,059	-0,053	0,064
hsa-miR-3938	0,051	-0,109	-0,098	-0,052	0,090
hsa-miR-1303	-0,016	-0,019	-0,120	-0,052	0,059
hsa-miR-762	0,001	-0,100	-0,056	-0,052	0,051
hsa-miR-4448	-0,049	0,056	-0,162	-0,052	0,109
hsa-miR-2682	-0,040	-0,007	-0,108	-0,051	0,052
hsa-miR-3202	-0,106	-0,130	0,082	-0,051	0,116
hsa-miR-4673	-0,030	-0,003	-0,120	-0,051	0,061
hsa-miR-520a-5p	0,087	-0,132	-0,107	-0,051	0,120
hsa-miR-199b-5p	0,016	-0,093	-0,075	-0,051	0,058
hsa-miR-362-3p	-0,042	0,010	-0,119	-0,050	0,065
hsa-miR-337-5p	-0,043	0,990	-0,057	-0,050	0,010
hsa-miR-492	0,095	-0,146	-0,100	-0,050	0,128
hsa-miR-4422	0,006	0,035	-0,192	-0,050	0,124
hsa-miR-126*	0,099	-0,134	-0,116	-0,050	0,130
hsa-miR-575	-0,223	0,123	0,652	-0,050	0,441
hsa-miR-4659a-3p	-0,047	0,061	-0,163	-0,050	0,112
hsa-miR-186	-0,050	-0,008	-0,090	-0,049	0,041
hsa-miR-4729	-0,073	0,012	-0,086	-0,049	0,054
hsa-miR-4789-3p	-0,277	0,051	0,080	-0,049	0,198
hsa-miR-3974	0,100	-0,227	-0,019	-0,049	0,165
hsa-miR-3197	0,070	-0,099	-0,117	-0,049	0,103
hsa-miR-520g	0,048	-0,084	-0,110	-0,049	0,085
hsa-miR-3605-5p	-0,133	-0,297	0,285	-0,048	0,300
hsa-miR-1469	-0,088	0,000	-0,058	-0,048	0,045
hsa-miR-4778-3p	0,081	-0,083	-0,144	-0,048	0,117
hsa-miR-3649	0,096	-0,239	-0,002	-0,048	0,172
hsa-miR-4685-3p	0,086	-0,090	-0,139	-0,048	0,118
hsa-miR-18a	-0,131	-0,073	0,061	-0,048	0,099
hsa-miR-566	-0,229	-0,070	0,157	-0,047	0,194
hsa-miR-3156-3p	0,029	-0,092	-0,078	-0,047	0,066
hsa-miR-4263	0,075	-0,083	-0,134	-0,047	0,109
hsa-miR-3613-3p	0,115	0,023	-0,279	-0,047	0,206
hsa-miR-4470	0,063	0,007	-0,211	-0,047	0,145
hsa-miR-4520a-5p //	0,064	-0,042	-0,162	-0,047	0,113
hsa-miR-4520b-5p					
hsa-miR-515-5p	-0,005	0,970	-0,088	-0,047	0,059
hsa-miR-938	0,018	-0,079	-0,080	-0,047	0,056
hsa-miR-92b	-0,009	-0,549	-0,083	-0,046	0,052
hsa-miR-556-5p	-0,195	0,011	0,045	-0,046	0,130
hsa-miR-29a	-0,039	-0,042	-0,056	-0,046	0,009
hsa-miR-378	-0,092	-0,047	0,003	-0,045	0,047
hsa-miR-4638-3p	0,020	-0,064	-0,088	-0,044	0,057
hsa-miR-4773	0,032	0,017	-0,182	-0,044	0,120
hsa-miR-4452	-0,024	-0,058	-0,050	-0,044	0,018
hsa-miR-3191	-0,039	1,040	-0,049	-0,044	0,007
hsa-miR-582-5p	0,009	-0,040	-0,101	-0,044	0,055
hsa-miR-3154	0,022	0,020	-0,173	-0,043	0,112
hsa-miR-2053	-0,030	0,021	-0,121	-0,043	0,072
hsa-miR-219-5p	-0,005	-0,044	-0,080	-0,043	0,037
hsa-miR-5096	0,031	-0,121	-0,040	-0,043	0,076
hsa-miR-3591-5p	0,031	-0,098	-0,062	-0,043	0,066
hsa-miR-206	-0,091	-0,024	-0,013	-0,043	0,042
hsa-miR-3177-5p	0,007	0,019	-0,154	-0,043	0,096
hsa-miR-4700-5p	-0,029	-0,061	-0,038	-0,042	0,017
hsa-miR-4291	0,075	-0,190	-0,013	-0,042	0,135
hsa-miR-324-3p	0,048	-0,114	-0,061	-0,042	0,082
hsa-miR-211	0,107	-0,072	-0,161	-0,042	0,136
hsa-miR-4445	0,045	-0,149	-0,022	-0,042	0,098
hsa-miR-136*	-0,015	0,672	-0,069	-0,042	0,038
hsa-miR-548ai	0,027	-0,177	0,026	-0,041	0,118
hsa-miR-4710	0,027	-0,036	-0,116	-0,041	0,072
hsa-miR-4456	-0,016	-0,020	-0,088	-0,041	0,041

Annexe 3: New MicroRNAs inhibit Glypican-3 and act as tumor suppressors in Human Liver Cancer

hsa-miR-567	0,020	0,009	-0,153	-0,041	0,096
hsa-miR-489	-0,004	0,058	-0,177	-0,041	0,122
hsa-miR-484	-0,096	-0,205	0,179	-0,041	0,198
hsa-miR-4646-5p	0,025	-0,001	-0,146	-0,041	0,092
hsa-miR-520h	-0,020	0,028	-0,130	-0,041	0,081
hsa-miR-3907	-0,040	-0,151	0,069	-0,041	0,110
hsa-miR-635	0,046	-0,127	-0,163	-0,040	0,123
hsa-miR-4737	0,050	-0,172	0,002	-0,040	0,117
hsa-miR-221	-0,059	-0,024	-0,037	-0,040	0,018
hsa-miR-142-3p	-0,107	-0,107	0,095	-0,040	0,117
hsa-miR-650	-0,273	-0,040	0,194	-0,040	0,234
hsa-miR-4691-3p	0,021	-0,016	-0,122	-0,039	0,074
hsa-miR-3162-5p	0,008	-0,081	-0,043	-0,039	0,044
hsa-miR-4514	0,008	0,016	-0,139	-0,039	0,087
hsa-miR-122*	0,031	-0,613	-0,108	-0,038	0,098
hsa-miR-639	-0,084	0,032	-0,063	-0,038	0,061
hsa-miR-4722-5p	0,082	-0,050	-0,147	-0,038	0,115
hsa-miR-4745-3p	-0,011	-0,125	0,023	-0,038	0,078
hsa-miR-1913	0,089	-0,081	-0,121	-0,038	0,112
hsa-miR-129-5p	-0,105	-0,062	0,055	-0,037	0,083
hsa-miR-193b*	0,013	-0,123	-0,002	-0,037	0,074
hsa-miR-556-3p	0,079	-0,126	-0,064	-0,037	0,105
hsa-miR-1471	0,091	-0,203	0,002	-0,037	0,151
hsa-miR-302a*	0,027	-1,455	-0,100	-0,036	0,089
hsa-miR-548k	0,064	-0,032	-0,142	-0,036	0,103
hsa-miR-600	0,020	-0,007	-0,122	-0,036	0,075
hsa-miR-3671	-0,100	0,015	-0,024	-0,036	0,058
hsa-miR-3196	-0,282	0,051	0,124	-0,036	0,216
hsa-miR-3934	0,060	-0,162	-0,004	-0,035	0,114
hsa-miR-450b-3p	-0,169	-0,027	0,090	-0,035	0,130
hsa-miR-4667-5p	0,062	-0,077	-0,092	-0,035	0,085
hsa-miR-875-5p	-0,084	-0,021	0,000	-0,035	0,044
hsa-miR-3913-5p	0,082	0,026	-0,214	-0,035	0,157
hsa-miR-200a*	0,079	-0,123	-0,062	-0,035	0,104
hsa-miR-4686	0,002	-0,008	-0,098	-0,035	0,055
hsa-miR-512-5p	0,045	-0,120	-0,030	-0,035	0,083
hsa-miR-216b	0,003	-0,009	-0,098	-0,035	0,055
hsa-miR-4776-5p	-0,007	-0,045	-0,052	-0,035	0,024
hsa-miR-624	0,175	-0,100	-0,179	-0,035	0,186
hsa-miR-4725-5p	-0,010	-0,045	-0,047	-0,034	0,021
hsa-miR-384	-0,016	1,030	-0,053	-0,034	0,026
hsa-miR-591	0,019	-0,134	0,014	-0,034	0,087
hsa-miR-1273c	-0,120	0,092	-0,074	-0,034	0,111
hsa-miR-4694-5p	0,052	-0,081	-0,072	-0,034	0,074
hsa-miR-579	-0,065	-0,033	-0,003	-0,034	0,031
hsa-miR-3619-3p	0,012	-0,121	0,008	-0,034	0,075
hsa-let-7g	-0,054	0,020	-0,066	-0,034	0,047
hsa-miR-4446-5p	0,040	-0,074	-0,066	-0,033	0,064
hsa-miR-3116	0,040	-0,044	-0,095	-0,033	0,068
hsa-miR-130a	-0,129	0,135	-0,104	-0,032	0,146
hsa-miR-3149	-0,008	-0,079	-0,009	-0,032	0,041
hsa-miR-4642	0,030	-0,096	-0,031	-0,032	0,063
hsa-miR-483-3p	0,051	-0,005	-0,143	-0,032	0,100
hsa-miR-3138	0,026	0,990	-0,090	-0,032	0,082
hsa-miR-4293	0,034	-0,076	-0,054	-0,032	0,058
hsa-miR-141*	-0,063	0,002		-0,031	0,046
hsa-miR-30a	-0,051	0,064	-0,105	-0,031	0,086
hsa-miR-1244	0,011	-0,110	0,008	-0,031	0,069
hsa-miR-3199	0,025	0,115	-0,232	-0,030	0,180
hsa-miR-661	0,021	-0,065	-0,047	-0,030	0,046
hsa-miR-4294	0,029	-0,155	0,035	-0,030	0,108
hsa-miR-374b	-0,075	0,072	-0,086	-0,030	0,088
hsa-miR-4529-5p	-0,004	-0,056	-0,718	-0,030	0,037
hsa-miR-769-3p	0,016	0,097	-0,203	-0,030	0,155
hsa-miR-4521	0,034	-0,058	-0,065	-0,030	0,055
hsa-miR-4750	0,015	0,016	-0,120	-0,030	0,078
hsa-miR-19b	-0,056	-0,039	0,007	-0,029	0,032
hsa-miR-4713-5p	-0,054	-0,004	0,481	-0,029	0,035
hsa-miR-1914	0,144	-0,238	0,008	-0,029	0,194
hsa-miR-616*	-0,048	0,696	-0,010	-0,029	0,027

Annexe 3: New MicroRNAs inhibit Glypican-3 and act as tumor suppressors in Human Liver Cancer

hsa-miR-4298	0,084	-0,086	-0,085	-0,029	0,098
hsa-miR-576-3p	0,072	-0,119	-0,039	-0,029	0,096
hsa-miR-4321	0,120	-0,086	-0,119	-0,029	0,130
hsa-miR-1911	0,047	0,960	-0,104	-0,028	0,107
hsa-miR-4704-3p	0,018	-0,046	-0,055	-0,028	0,040
hsa-miR-331-3p	-0,159	-0,004	0,079	-0,028	0,121
hsa-miR-3192	0,047	-0,069	-0,060	-0,027	0,064
hsa-miR-3200-5p	-0,115	-0,017	0,051	-0,027	0,084
hsa-miR-4689	0,067	0,000	-0,147	-0,027	0,110
hsa-miR-4657	-0,033	0,027	-0,073	-0,027	0,050
hsa-miR-1909	0,010	0,040	-0,130	-0,027	0,091
hsa-miR-647	-0,013	-0,001	-0,065	-0,026	0,034
hsa-miR-605	0,041	-0,022	-0,097	-0,026	0,069
hsa-miR-4305	0,056	0,011	-0,145	-0,026	0,105
hsa-miR-3652	0,027	-0,021	-0,084	-0,026	0,056
hsa-miR-4462	0,065	-0,090	-0,052	-0,026	0,081
hsa-miR-583	0,030	0,008	-0,115	-0,026	0,078
hsa-miR-184	-0,148	-0,077	0,148	-0,026	0,154
hsa-miR-3681*	0,025	-0,076		-0,026	0,071
hsa-miR-181b	-0,029	0,046	-0,093	-0,025	0,069
hsa-miR-4459	0,181	0,027	-0,284	-0,025	0,237
hsa-miR-548b-3p	0,021	-0,053	-0,044	-0,025	0,040
hsa-miR-548x	0,061	-0,039	-0,097	-0,025	0,080
hsa-miR-4467	-0,036	0,094	-0,132	-0,025	0,113
hsa-miR-1180	0,052	0,020	-0,146	-0,024	0,106
hsa-miR-4260	0,135	-0,010	-0,198	-0,024	0,167
hsa-miR-627	0,017	-0,025	-0,065	-0,024	0,041
hsa-miR-1976	0,045	0,019	-0,136	-0,024	0,098
hsa-miR-3131	-0,022	0,057	-0,107	-0,024	0,082
hsa-miR-513c	0,008	0,037	-0,116	-0,024	0,081
hsa-miR-4753-3p	0,009	0,001	-0,080	-0,024	0,049
hsa-miR-4795-3p	0,000	-0,025	-0,046	-0,024	0,023
hsa-miR-3129-3p	0,135	-0,006	-0,199	-0,023	0,168
hsa-miR-133b	-0,089	-0,030	0,052	-0,022	0,071
hsa-miR-4303	0,098	-0,069	-0,095	-0,022	0,105
hsa-miR-1200	0,048	-0,058	-0,055	-0,022	0,060
hsa-miR-1468	-0,021	0,005	-0,048	-0,021	0,026
hsa-miR-518e	-0,023	-0,152	0,111	-0,021	0,131
hsa-miR-29b	-0,077	0,067	-0,053	-0,021	0,077
hsa-miR-598	0,064	0,036	-0,164	-0,021	0,125
hsa-miR-548aj	0,031	-0,051	-0,043	-0,021	0,045
hsa-miR-889	-0,041	0,038	-0,057	-0,020	0,051
hsa-miR-644	-0,011	-0,002	-0,048	-0,020	0,024
hsa-miR-3146	0,111	-0,003	-0,168	-0,020	0,140
hsa-miR-539	-0,098	0,000	0,038	-0,020	0,070
hsa-miR-3171	0,106	-0,015	-0,150	-0,020	0,128
hsa-miR-3944-5p	0,052	-0,041	-0,070	-0,020	0,064
hsa-miR-4316	0,109	-0,113	-0,054	-0,019	0,115
hsa-miR-1281	0,011	-0,132	0,063	-0,019	0,101
hsa-miR-587	0,040	-0,114	0,015	-0,019	0,083
hsa-miR-1539	0,031	-0,123	0,034	-0,019	0,090
hsa-miR-4421	-0,055	0,054	-0,055	-0,019	0,062
hsa-miR-16-2*	0,010	-0,046		-0,018	0,040
hsa-miR-423-5p	-0,071	0,055	-0,038	-0,018	0,065
hsa-miR-3713	0,122	-0,184	0,009	-0,018	0,155
hsa-miR-1273	-0,054	0,930	0,019	-0,018	0,051
hsa-miR-4464	0,037	-0,057	-0,032	-0,017	0,049
hsa-miR-335	-0,017	0,040	-0,075	-0,017	0,057
hsa-miR-3545-3p	0,090	-0,126	-0,015	-0,017	0,108
hsa-miR-3927	0,160	-0,085	-0,126	-0,017	0,155
hsa-miR-4513	-0,217	-0,031	0,198	-0,017	0,208
hsa-miR-548w	-0,284	0,004	0,230	-0,017	0,258
hsa-miR-144	-0,021	0,030	-0,059	-0,017	0,045
hsa-miR-526b*	-0,033	1,126	0,000	-0,016	0,023
hsa-miR-4486	-0,200	0,033	0,117	-0,016	0,164
hsa-miR-1470	0,077	-0,012	-0,114	-0,016	0,096
hsa-miR-4302	0,010	0,009	-0,067	-0,016	0,044
hsa-miR-29c	-0,093	-0,036	0,082	-0,016	0,089
hsa-miR-132	-0,017	0,025	-0,057	-0,016	0,041
hsa-miR-2355-3p	-0,273	0,057	0,169	-0,016	0,230

Annexe 3: New MicroRNAs inhibit Glypican-3 and act as tumor suppressors in Human Liver Cancer

hsa-miR-219-2-3p	-0,093	0,072	-0,026	-0,016	0,083
hsa-miR-219-1-3p	-0,048	0,101	-0,100	-0,016	0,104
hsa-miR-626	0,054	1,030	-0,085	-0,016	0,098
hsa-miR-4280	0,098	-0,094	-0,050	-0,016	0,101
hsa-miR-4282	0,116	-0,040	-0,122	-0,015	0,121
hsa-miR-592	-0,268	0,023	0,200	-0,015	0,237
hsa-miR-106a*	-0,071	0,041		-0,015	0,079
hsa-miR-3064-5p	-0,060	0,080	-0,063	-0,015	0,082
hsa-miR-339-3p	-0,001	-0,086	0,044	-0,014	0,066
hsa-miR-766	0,089	-0,078	-0,053	-0,014	0,090
hsa-miR-940	-0,050	0,007	0,000	-0,014	0,031
hsa-miR-4721	0,118	0,018	-0,178	-0,014	0,150
hsa-miR-24	-0,149	-0,006	0,114	-0,014	0,132
hsa-miR-3147	0,018	-0,162	0,102	-0,014	0,135
hsa-miR-604	-0,045	0,036	-0,032	-0,014	0,043
hsa-miR-488	-0,005	-0,026	-0,010	-0,014	0,011
hsa-miR-921	0,017	-0,111	0,054	-0,013	0,087
hsa-miR-4264	0,129	-0,077	-0,091	-0,013	0,124
hsa-miR-4444	0,041	-0,038	-0,042	-0,013	0,047
hsa-miR-4722-3p	0,047	0,009	-0,095	-0,013	0,074
hsa-miR-4741	0,120	-0,059	-0,099	-0,013	0,116
hsa-miR-509-5p	0,056	0,001	-0,094	-0,013	0,076
hsa-miR-487b	-0,117	0,081	-0,002	-0,013	0,099
hsa-miR-145	0,038	-0,054	-0,022	-0,013	0,047
hsa-miR-183*	0,060	-0,072	-0,026	-0,013	0,067
hsa-miR-4804-3p	0,062	1,040	-0,087	-0,013	0,105
hsa-miR-4769-3p	0,086	-0,124	0,000	-0,013	0,105
hsa-miR-487a	0,102	-0,075	-0,062	-0,012	0,098
hsa-miR-1294	-0,014	0,028	-0,048	-0,011	0,038
hsa-miR-3687	0,071	0,033	-0,137	-0,011	0,111
hsa-miR-3529	0,076	0,072	-0,179	-0,010	0,146
hsa-miR-29b-2*	-0,044	-1,268	0,023	-0,010	0,047
hsa-miR-576-5p	0,000	0,034	-0,065	-0,010	0,051
hsa-miR-370	-0,097	0,041	0,025	-0,010	0,075
hsa-miR-4650-5p	-0,013	0,006	-0,023	-0,010	0,015
hsa-miR-3168	0,028	0,020	-0,078	-0,010	0,059
hsa-miR-1268	0,060	-0,133	0,043	-0,010	0,107
hsa-miR-3137	0,050	0,001	-0,081	-0,010	0,066
hsa-miR-4506	0,115	-0,067	-0,077	-0,010	0,108
hsa-miR-4746-3p	0,120	-0,067	-0,081	-0,010	0,112
hsa-miR-1825	-0,014	0,940	-0,005	-0,009	0,007
hsa-miR-181a	-0,050	0,014	0,008	-0,009	0,035
hsa-miR-4489	-0,044	-0,027	0,043	-0,009	0,046
hsa-miR-1912	0,013	0,061	-0,101	-0,009	0,083
hsa-miR-1265	0,028	0,080	-0,133	-0,008	0,111
hsa-miR-4691-5p	0,051	-0,041	-0,034	-0,008	0,051
hsa-miR-2964a-3p	0,107	-0,011	-0,119	-0,008	0,113
hsa-miR-4757-3p	0,158	0,049	-0,230	-0,008	0,200
hsa-miR-200b	-0,048	0,042	-0,018	-0,008	0,046
hsa-miR-1273g	0,050	-0,093	0,019	-0,008	0,075
hsa-miR-651	0,018	0,040	-0,081	-0,008	0,064
hsa-miR-215	0,070	-0,026	-0,066	-0,007	0,070
hsa-miR-4528	-0,003	0,062	-0,081	-0,007	0,072
hsa-miR-4443	0,166	-0,051	-0,137	-0,007	0,156
hsa-miR-548g	0,163	0,041	-0,225	-0,007	0,199
hsa-miR-4714-5p	-0,008	-0,084	0,072	-0,007	0,078
hsa-miR-4525	-0,016	0,005	-0,009	-0,007	0,011
hsa-miR-571	0,021	-0,065	0,025	-0,006	0,051
hsa-miR-4531	-0,241	-0,004	0,227	-0,006	0,234
hsa-miR-586	0,063	-0,065	-0,016	-0,006	0,065
hsa-miR-3169	-0,065	0,119	-0,071	-0,006	0,108
hsa-miR-4787-3p	-0,034	0,040	-0,024	-0,006	0,040
hsa-miR-3662	0,056	-0,003	-0,069	-0,005	0,062
hsa-miR-3975	0,124	-0,148	0,008	-0,005	0,137
hsa-miR-4680-3p	0,024	1,040	-0,035	-0,005	0,041
hsa-miR-378f	0,099	0,017	-0,132	-0,005	0,117
hsa-miR-518a-3p	0,009	0,022	-0,047	-0,005	0,037
hsa-miR-181a*	0,139	-0,074	-0,080	-0,005	0,125
hsa-miR-3656	0,069	0,007	-0,090	-0,005	0,080
hsa-miR-4769-5p	0,129	-0,187	0,044	-0,005	0,163

Annexe 3: New MicroRNAs inhibit Glypican-3 and act as tumor suppressors in Human Liver Cancer

hsa-miR-3691-5p	-0,163	0,007	0,142	-0,004	0,153
hsa-miR-4484	0,061	0,057	-0,130	-0,004	0,109
hsa-miR-652	-0,049	-0,023	0,059	-0,004	0,056
hsa-miR-573	0,172	-0,073	-0,110	-0,004	0,153
hsa-miR-603	0,073	-0,092	0,008	-0,004	0,083
hsa-miR-3678-3p	-0,057	0,017	0,030	-0,004	0,047
hsa-miR-653	-0,074	0,094	-0,030	-0,003	0,087
hsa-miR-4697-3p	-0,067	0,066	-0,009	-0,003	0,067
hsa-miR-3180-5p	0,015	0,064	-0,087	-0,003	0,077
hsa-miR-892a	0,022	0,007	-0,037	-0,003	0,031
hsa-miR-548ae	0,016	0,004	-0,027	-0,003	0,022
hsa-miR-4724-3p	0,295	-0,088	-0,214	-0,003	0,265
hsa-miR-599	0,024	0,051	-0,080	-0,002	0,069
hsa-miR-151b	-0,046	0,066	-0,025	-0,002	0,060
hsa-miR-4799-5p	0,074	-0,061	-0,016	-0,001	0,069
hsa-miR-648	0,032	0,063	-0,098	-0,001	0,086
hsa-miR-548a-5p	0,038	-0,064	0,023	-0,001	0,055
hsa-miR-193b	0,118	-0,194	0,073	-0,001	0,169
hsa-miR-452	0,081	0,040	-0,123	-0,001	0,108
hsa-miR-2392	0,053	0,089	-0,144	0,000	0,125
hsa-miR-612	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
hsa-miR-5481	0,011	-0,048	0,037	0,000	0,044
hsa-miR-1273f	-0,064	0,138	-0,074	0,000	0,120
hsa-miR-495	0,032	0,009	-0,039	0,001	0,036
hsa-miR-623	-0,116	-0,062	0,181	0,001	0,158
hsa-miR-581	0,128	0,039	-0,164	0,001	0,150
hsa-miR-4504	-0,255	0,091	0,167	0,001	0,225
hsa-miR-154	-0,094	0,059	0,040	0,002	0,083
hsa-miR-30e	-0,024	0,010	0,019	0,002	0,022
hsa-miR-4253	0,072	-0,008	-0,057	0,002	0,065
hsa-miR-584	0,109	-0,179	0,078	0,003	0,158
hsa-miR-4720-3p	0,618	0,005	0,001	0,003	0,003
hsa-miR-202	0,093	0,023	-0,107	0,003	0,102
hsa-miR-30a*	0,108	-0,097	0,000	0,004	0,102
hsa-miR-3177-3p	-0,069	0,042	0,039	0,004	0,063
hsa-miR-4799-3p	0,003	0,126	-0,117	0,004	0,122
hsa-miR-3620	-0,008	0,063	-0,043	0,004	0,054
hsa-miR-708	-0,022	0,100	-0,065	0,004	0,086
hsa-miR-3973	0,143	-0,067	-0,064	0,004	0,120
hsa-miR-361-3p	0,146	-0,150	0,018	0,005	0,148
hsa-miR-885-3p	0,071	0,034	-0,091	0,005	0,085
hsa-miR-1284	0,076	0,030	-0,090	0,005	0,086
hsa-miR-3174	0,219	-0,084	-0,118	0,005	0,186
hsa-miR-4771	0,071	0,065	-0,120	0,006	0,109
hsa-miR-1254	0,038	0,113	-0,134	0,006	0,127
hsa-miR-711	-0,071	0,031	0,060	0,007	0,069
hsa-miR-3928	0,098	0,087	-0,164	0,007	0,148
hsa-miR-3922-5p	-0,043	0,049	0,015	0,007	0,047
hsa-miR-18b*	0,070	-1,002	-0,057	0,007	0,090
hsa-miR-548n	0,093	0,990	-0,080	0,007	0,122
hsa-miR-372	0,122	-0,072	-0,030	0,007	0,102
hsa-miR-3144-5p	0,065	0,019	-0,062	0,007	0,064
hsa-miR-554	0,047	0,074	-0,099	0,007	0,093
hsa-miR-373	0,094	0,980	-0,080	0,007	0,123
hsa-miR-1225-5p	0,075	-0,012	-0,041	0,007	0,060
hsa-miR-3917	0,205	-0,034	-0,150	0,007	0,181
hsa-miR-4653-3p	0,166	-0,148	0,005	0,008	0,157
hsa-miR-4509	0,168	-0,082	-0,062	0,008	0,139
hsa-miR-337-3p	-0,021	0,040	0,005	0,008	0,030
hsa-miR-4652-3p	0,050	0,071	-0,096	0,008	0,091
hsa-miR-3647-3p	0,006	0,062	-0,040	0,009	0,051
hsa-miR-4740-3p	-0,247	0,044	0,231	0,009	0,241
hsa-miR-3650	-0,196	0,017	0,209	0,010	0,151
hsa-miR-4758-5p	-0,728	0,063	-0,044	0,010	0,076
hsa-miR-891b	-0,059	-0,012	0,101	0,010	0,082
hsa-miR-3654	0,017	-0,080	0,093	0,010	0,087
hsa-miR-4315	0,116	-0,022	-0,064	0,010	0,094
hsa-miR-4466	0,018	0,020	-0,008	0,010	0,016
hsa-miR-3151	0,085	-0,011	-0,044	0,010	0,067
hsa-miR-520d-5p	0,105	0,011	-0,086	0,010	0,095

Annexe 3: New MicroRNAs inhibit Glypican-3 and act as tumor suppressors in Human Liver Cancer

hsa-miR-34b	0,030	0,055	-0,054	0,010	0,057
hsa-miR-103b	0,165	0,005	-0,139	0,010	0,152
hsa-miR-548d-5p	0,138	0,024	-0,131	0,010	0,135
hsa-miR-4307	-0,062	0,014	0,080	0,011	0,071
hsa-miR-1237	-0,094	0,088	0,038	0,011	0,094
hsa-miR-4442	-0,243	0,102	0,173	0,011	0,223
hsa-miR-1183	0,089	0,097	-0,154	0,011	0,143
hsa-miR-92a	0,183	0,011	-0,160	0,011	0,171
hsa-miR-670	-0,051	0,073	0,013	0,012	0,062
hsa-miR-466	0,125	-0,056	-0,034	0,012	0,098
hsa-miR-3647-5p	0,170	-0,040	-0,094	0,012	0,139
hsa-miR-4792	0,113	-0,092	0,015	0,012	0,103
hsa-miR-632	0,155	-0,041	-0,078	0,012	0,125
hsa-miR-16-1*	-0,018	0,043		0,012	0,043
hsa-miR-630	0,059	-0,321	0,298	0,012	0,312
hsa-miR-622	0,214	0,002	-0,179	0,012	0,197
hsa-miR-3184	0,005	0,090	-0,057	0,012	0,074
hsa-miR-935	-0,087	0,048	0,077	0,013	0,087
hsa-miR-615-5p	-0,053	-0,016	0,108	0,013	0,085
hsa-miR-208b	-0,053	0,084	0,008	0,013	0,069
hsa-miR-1290	0,089	-0,028	-0,021	0,013	0,066
hsa-miR-4774-5p	0,135	-0,140	0,045	0,013	0,140
hsa-miR-552	0,029	0,126	-0,114	0,013	0,121
hsa-miR-10a	-0,116	0,081	0,075	0,013	0,112
hsa-miR-4490	0,106	0,067	-0,133	0,013	0,128
hsa-miR-4262	0,097	0,092	-0,148	0,014	0,140
hsa-miR-148b*	-0,074	0,101		0,014	0,123
hsa-miR-4645-5p	0,129	0,021	-0,109	0,014	0,119
hsa-miR-4472	0,060	-0,006	-0,013	0,014	0,040
hsa-miR-548f	0,092	1,020	-0,064	0,014	0,111
hsa-miR-4477a	0,009	0,067	-0,034	0,014	0,050
hsa-miR-4502	-0,018	0,018	0,043	0,014	0,031
hsa-miR-4258	0,047	-0,049	0,044	0,014	0,055
hsa-miR-4289	-0,317	0,109	0,251	0,014	0,296
hsa-miR-4487	-0,007	0,050	0,001	0,015	0,031
hsa-miR-4758-3p	0,050	0,002	-0,008	0,015	0,031
hsa-miR-3673	0,065	-0,037	0,017	0,015	0,051
hsa-miR-4762-3p	-0,043	0,086	0,002	0,015	0,066
hsa-miR-30a*	0,138	-0,083	-0,009	0,015	0,112
hsa-miR-429	0,068	0,052	-0,073	0,016	0,077
hsa-miR-4476	0,004	-0,014	0,058	0,016	0,038
hsa-miR-4637	-0,010	0,022	0,036	0,016	0,024
hsa-miR-4287	0,080	0,072	-0,104	0,016	0,104
hsa-miR-298	-0,015	0,125	-0,062	0,016	0,097
hsa-miR-4703-5p	0,042	0,070	-0,063	0,016	0,070
hsa-miR-1228	0,125	-0,085	0,009	0,017	0,105
hsa-miR-302f	0,178	-0,098	-0,028	0,017	0,144
hsa-miR-221*	0,015	0,019		0,017	0,003
hsa-miR-3198	0,061	0,020	-0,030	0,017	0,046
hsa-miR-4714-3p	0,084	-0,035	0,003	0,017	0,061
hsa-miR-1224-3p	0,085	-0,108	0,075	0,017	0,108
hsa-miR-4711-5p	-0,017	1,040	0,052	0,018	0,049
hsa-miR-4318	0,102	-0,198	0,149	0,018	0,188
hsa-miR-4717-5p	0,075	-0,171	0,149	0,018	0,168
hsa-miR-1229	0,056	-0,023	0,020	0,018	0,040
hsa-miR-2114*	0,067	-0,031		0,018	0,069
hsa-miR-658	0,139	-0,027	-0,056	0,019	0,105
hsa-miR-1323	0,098	1,080	-0,060	0,019	0,112
hsa-miR-4682	0,017	0,142	-0,101	0,019	0,121
hsa-miR-759	0,058	0,092	-0,092	0,019	0,098
hsa-miR-4458	-0,139	0,197	0,002	0,020	0,169
hsa-miR-3666	0,101	0,041	-0,083	0,020	0,094
hsa-miR-199a-3p // hsa-miR-199b-3p	-0,001	-0,045	0,105	0,020	0,077
hsa-miR-485-3p	0,124	-0,060	-0,005	0,020	0,094
hsa-miR-2277-3p	-0,021	0,110	-0,030	0,020	0,079
hsa-miR-3065-3p	0,102	-0,015	-0,027	0,020	0,072
hsa-miR-30b*	-0,009	0,050		0,020	0,042
hsa-miR-204	-0,080	0,042	0,098	0,020	0,091
hsa-miR-920	-0,110	0,005	0,166	0,020	0,139

Annexe 3: New MicroRNAs inhibit Glypican-3 and act as tumor suppressors in Human Liver Cancer

hsa-miR-9	-0,006	-0,138	0,206	0,020	0,174
hsa-miR-181d	-0,093	0,002	0,152	0,020	0,124
hsa-miR-330-5p	-0,014	-0,121	0,197	0,021	0,162
hsa-miR-4772-5p	0,121	0,050	-0,109	0,021	0,118
hsa-miR-1280	0,142	-0,041	-0,038	0,021	0,105
hsa-miR-4753-5p	0,094	0,070	-0,100	0,021	0,106
hsa-miR-645	0,180	-0,056	-0,059	0,021	0,137
hsa-miR-19a*	0,137	0,862	-0,094	0,022	0,163
hsa-miR-4299	0,063	0,058	-0,056	0,022	0,067
hsa-miR-106a	0,083	-0,059	0,041	0,022	0,073
hsa-miR-4288	-0,044	0,083	0,026	0,022	0,063
hsa-miR-4743	0,079	-0,008	-0,006	0,022	0,050
hsa-miR-4505	0,020	0,124	-0,079	0,022	0,102
hsa-miR-20b	-0,009	-0,004	0,080	0,022	0,050
hsa-miR-3190	0,102	0,042	-0,077	0,022	0,091
hsa-miR-431	0,018	0,176	-0,126	0,023	0,151
hsa-miR-374a	0,081	0,055	-0,069	0,023	0,080
hsa-miR-4261	0,053	0,097	-0,083	0,023	0,094
hsa-miR-331-5p	-0,039	0,046	0,061	0,023	0,054
hsa-miR-455-3p	0,067	0,063	-0,060	0,023	0,072
hsa-miR-4755-3p	0,080	0,046	-0,055	0,023	0,070
hsa-miR-4265	0,086	0,028	-0,043	0,024	0,065
hsa-miR-522	0,185	-0,004	-0,109	0,024	0,149
hsa-miR-518f	0,039	-0,074	0,108	0,024	0,092
hsa-miR-1908	0,142	0,033	-0,102	0,024	0,122
hsa-miR-3663-3p	0,121	0,970	-0,072	0,024	0,136
hsa-miR-200b*	0,085	-0,058	0,046	0,024	0,074
hsa-miR-2116	-0,136	0,127	0,083	0,024	0,141
hsa-miR-4276	0,137	-0,027	-0,037	0,025	0,098
hsa-miR-4735-3p	0,190	0,039	-0,155	0,025	0,173
hsa-miR-3189-3p	0,038	-0,108	0,146	0,025	0,127
hsa-miR-3926	0,058	0,127	-0,110	0,025	0,122
hsa-miR-194	-0,123	0,076	0,122	0,025	0,130
hsa-miR-548c-5p	0,067	0,970	-0,017	0,025	0,059
hsa-miR-4495	-0,218	0,011	0,284	0,026	0,251
hsa-miR-770-5p	0,066	-0,007	0,018	0,026	0,037
hsa-miR-1245b-5p	-0,035	0,127	-0,014	0,026	0,088
hsa-miR-513a-3p	0,157	-0,002	-0,077	0,026	0,120
hsa-miR-4474-5p	-0,065	0,054	0,089	0,026	0,081
hsa-miR-99a*	-0,128	0,356	-0,149	0,026	0,286
hsa-miR-4309	0,096	-0,116	0,100	0,026	0,123
hsa-miR-3674	0,053	0,005	0,022	0,027	0,024
hsa-miR-3668	0,029	-0,012	0,065	0,027	0,039
hsa-miR-4292	0,147	-0,144	0,078	0,027	0,152
hsa-miR-501-5p	0,121	-0,044	0,004	0,027	0,085
hsa-miR-197	0,043	0,049	-0,010	0,027	0,033
hsa-miR-570	-0,090	0,186	-0,014	0,027	0,143
hsa-miR-1255a	0,098	1,020	-0,043	0,028	0,100
hsa-miR-324-5p	0,099	-0,149	0,134	0,028	0,154
hsa-miR-146b-3p	0,091	-0,053	0,047	0,028	0,074
hsa-miR-1184	0,039	-0,120	0,166	0,028	0,143
hsa-miR-595	0,009	-0,031	0,108	0,029	0,072
hsa-miR-4527	0,070	0,047	-0,030	0,029	0,053
hsa-miR-3680*	-0,031	0,089		0,029	0,085
hsa-miR-181a-2*	0,017	0,041		0,029	0,018
hsa-miR-28-3p	-0,064	0,204	-0,053	0,029	0,152
hsa-miR-532-5p	0,014	0,043	0,031	0,029	0,014
hsa-miR-302b*	0,093	-0,985	-0,034	0,030	0,090
hsa-miR-4794	0,007	0,129	-0,047	0,030	0,090
hsa-miR-29c*	0,124	-0,029	-0,005	0,030	0,082
hsa-miR-668	0,177	-0,190	0,104	0,030	0,194
hsa-miR-137	0,047	0,100	-0,056	0,030	0,079
hsa-miR-548am	0,141	0,061	-0,111	0,031	0,129
hsa-miR-4313	0,082	1,120	-0,021	0,031	0,073
hsa-miR-549	0,098	-0,023	0,018	0,031	0,062
hsa-miR-1203	0,123	0,007	-0,037	0,031	0,083
hsa-miR-3186-5p	0,100	0,019	-0,025	0,031	0,063
hsa-miR-519a	0,093	-0,073	0,074	0,031	0,091
hsa-miR-4793-5p	0,042	1,050	0,021	0,032	0,015
hsa-miR-3152-5p	0,093	0,086	-0,082	0,032	0,099

Annexe 3: New MicroRNAs inhibit Glypican-3 and act as tumor suppressors in Human Liver Cancer

hsa-miR-497	0,257	-0,112	-0,048	0,032	0,197
hsa-miR-1225-3p	0,024	0,017	0,056	0,032	0,021
hsa-miR-4748	-0,022	0,054	0,068	0,033	0,048
hsa-miR-20a	-0,066	0,117	0,049	0,033	0,093
hsa-miR-421	-0,029	0,116	0,012	0,033	0,075
hsa-miR-425	0,001	0,043	0,057	0,033	0,029
hsa-miR-490-5p	0,017	0,061	0,022	0,034	0,024
hsa-miR-578	0,105	0,073	-0,077	0,034	0,097
hsa-miR-3689d	0,034	0,124	-0,057	0,034	0,090
hsa-miR-378e	0,095	0,039	-0,031	0,034	0,063
hsa-miR-187	-0,041	0,070	0,074	0,034	0,066
hsa-miR-32	-0,003	0,035	0,071	0,035	0,037
hsa-miR-1234	0,005	-0,016	0,116	0,035	0,071
hsa-miR-3170	0,105	0,117	-0,118	0,035	0,132
hsa-miR-662	0,092	0,031	-0,017	0,035	0,055
hsa-miR-3145-3p	0,051	1,020	0,020	0,035	0,022
hsa-miR-378i	0,247	-0,117	-0,025	0,035	0,189
hsa-miR-4435	0,058	0,071	-0,023	0,035	0,051
hsa-miR-1252	0,066	0,032	0,008	0,035	0,029
hsa-miR-3140-5p	0,160	0,006	-0,059	0,035	0,113
hsa-miR-4786-3p	0,094	0,059	-0,046	0,036	0,073
hsa-miR-4267	0,048	0,067	-0,007	0,036	0,038
hsa-miR-4461	-0,008	0,233	-0,116	0,036	0,178
hsa-miR-671-3p	0,044	0,212	-0,147	0,036	0,180
hsa-miR-4426	0,084	-0,009	0,035	0,036	0,046
hsa-let-7a-2*	0,150	0,861	-0,077	0,037	0,160
hsa-miR-519d	0,062	0,029	0,019	0,037	0,023
hsa-miR-34c-5p	-0,020	0,073	0,058	0,037	0,050
hsa-miR-659	0,072	0,051	-0,012	0,037	0,044
hsa-miR-4804-5p	0,107	-0,046	0,050	0,037	0,077
hsa-miR-369-3p	-0,002	0,059	0,054	0,037	0,033
hsa-miR-4520a-3p	0,027	0,112	-0,028	0,037	0,071
hsa-miR-4699-3p	0,105	1,160	-0,030	0,037	0,096
hsa-miR-545	0,152	0,052	-0,090	0,038	0,122
hsa-miR-4427	0,197	-0,035	-0,048	0,038	0,138
hsa-miR-877*	0,123	-0,066	0,058	0,038	0,096
hsa-miR-1282	-0,119	0,023	0,211	0,038	0,166
hsa-miR-1251	-0,042	0,098	0,059	0,038	0,072
hsa-miR-4259	-0,173	0,017	0,270	0,038	0,222
hsa-miR-3614-3p	0,118	-0,023	0,021	0,039	0,072
hsa-miR-532-3p	-0,057	0,170	0,004	0,039	0,117
hsa-miR-4480	0,080	0,065	-0,027	0,039	0,058
hsa-miR-2467-3p	0,154	-0,038	0,003	0,040	0,101
hsa-miR-1910	-0,007	0,121	0,005	0,040	0,070
hsa-miR-4795-5p	0,223	-0,101	-0,002	0,040	0,166
hsa-miR-544b	0,051	0,124	-0,056	0,040	0,090
hsa-miR-4676-5p	0,076	0,038	0,005	0,040	0,036
hsa-miR-3145-5p	0,089	0,063	-0,032	0,040	0,064
hsa-miR-891a	0,109	-0,056	0,068	0,040	0,086
hsa-miR-4447	0,113	0,063	-0,055	0,040	0,086
hsa-miR-151-3p	0,071	0,065	-0,014	0,040	0,047
hsa-miR-383	0,141	0,095	-0,114	0,041	0,136
hsa-miR-548an	0,038	-0,070	0,155	0,041	0,112
hsa-miR-548q	0,137	-0,007	-0,007	0,041	0,083
hsa-miR-4668-3p	0,123	0,041	-0,041	0,041	0,082
hsa-miR-338-5p	-0,049	0,087	0,084	0,041	0,077
hsa-miR-4534	0,126	0,087	-0,091	0,041	0,116
hsa-miR-30d	-0,001	0,070	0,055	0,041	0,037
hsa-miR-494	-0,029	0,151	0,002	0,041	0,096
hsa-miR-942	0,026	1,050	0,057	0,042	0,022
hsa-miR-1263	0,116	0,081	-0,071	0,042	0,099
hsa-miR-4659b-5p	0,064	0,018	0,043	0,042	0,023
hsa-miR-3923	0,102	0,070	-0,044	0,042	0,077
hsa-miR-4503	0,100	-0,178	0,206	0,043	0,198
hsa-miR-4763-3p	-0,056	0,106	0,079	0,043	0,087
hsa-miR-4699-5p	0,035	0,118	-0,023	0,043	0,071
hsa-miR-4787-5p	0,158	0,034	-0,063	0,043	0,111
hsa-miR-149	-0,100	0,159	0,071	0,043	0,132
hsa-miR-4272	0,152	0,013	-0,035	0,043	0,097
hsa-miR-375	0,031	0,080	0,020	0,044	0,032

Annexe 3: New MicroRNAs inhibit Glypican-3 and act as tumor suppressors in Human Liver Cancer

hsa-miR-144*	0,001	0,193	-0,061	0,044	0,133
hsa-miR-3156-5p	-0,191	0,049	0,275	0,044	0,233
hsa-miR-568	0,007	0,019	0,108	0,044	0,055
hsa-miR-631	0,067		0,022	0,044	0,032
hsa-miR-3661	0,115	0,070	-0,051	0,045	0,085
hsa-miR-24-2*	-0,020	0,110		0,045	0,092
hsa-miR-4532	0,135	0,002	-0,002	0,045	0,078
hsa-miR-4482	0,102	0,990	-0,009	0,046	0,079
hsa-miR-380	0,068	0,103	-0,031	0,046	0,069
hsa-miR-4438	0,117	-0,038	0,061	0,046	0,078
hsa-miR-4423-3p	0,140	0,066	-0,066	0,047	0,104
hsa-miR-378d	0,071	0,015	0,054	0,047	0,029
hsa-miR-2115*	0,078	0,016		0,047	0,044
hsa-miR-328	-0,023	0,057	0,107	0,047	0,066
hsa-miR-146a*	0,037	0,057		0,047	0,014
hsa-miR-518d-3p	0,060	-0,034	0,115	0,047	0,075
hsa-miR-3140-3p	0,128	0,146	-0,132	0,047	0,156
hsa-miR-4328	0,098	0,124	-0,079	0,048	0,110
hsa-miR-4790-5p	0,153	-0,004	-0,006	0,048	0,091
hsa-miR-34a*	0,122	-0,026		0,048	0,104
hsa-miR-3148	0,228	0,022	-0,106	0,048	0,168
hsa-miR-3182	0,203	0,016	-0,075	0,048	0,141
hsa-miR-31	0,006	-0,014	0,154	0,049	0,092
hsa-miR-205*	0,118	-0,021		0,049	0,098
hsa-miR-553	0,149	1,000	-0,052	0,049	0,142
hsa-miR-512-3p	0,095	-0,058	0,110	0,049	0,093
hsa-miR-3135b	-0,227	0,850	-0,476	0,049	0,705
hsa-miR-142-5p	-0,032	-0,005	0,185	0,049	0,118
hsa-miR-4286	0,185	1,010	-0,086	0,049	0,191
hsa-miR-4279	0,111	-0,124	0,164	0,050	0,154
hsa-miR-3936	0,064	0,093	-0,006	0,050	0,051
hsa-miR-5047	0,145	0,070	-0,065	0,050	0,107
hsa-miR-411	0,045	0,085	0,022	0,051	0,032
hsa-miR-548y	0,050	0,091	0,012	0,051	0,040
hsa-miR-3144-3p	0,149	-0,007	0,011	0,051	0,085
hsa-miR-302e	0,097	0,138	-0,082	0,051	0,117
hsa-miR-3126-3p	0,094	0,087	-0,028	0,051	0,068
hsa-miR-519a*	0,179	-0,077		0,051	0,181
hsa-miR-299-3p	0,158	0,050	-0,054	0,051	0,106
hsa-miR-4671-5p	0,246	-0,119	0,027	0,051	0,183
hsa-miR-3667-3p	0,022	0,119	0,014	0,051	0,059
hsa-miR-1208	0,293	0,213	-0,352	0,052	0,352
hsa-miR-3911	0,035	1,090	0,068	0,052	0,023
hsa-miR-4638-5p	0,132	0,970	-0,029	0,052	0,113
hsa-miR-4756-3p	0,086	0,053	0,016	0,052	0,035
hsa-miR-642b	-0,047	0,036	0,166	0,052	0,108
hsa-miR-548ab	0,217	0,106	-0,167	0,052	0,197
hsa-miR-2861	0,237	-0,035	-0,047	0,052	0,161
hsa-miR-548a-3p	0,110	0,049	-0,003	0,052	0,057
hsa-miR-326	0,020	0,048	0,087	0,052	0,034
hsa-miR-4757-5p	0,107	0,114	-0,065	0,052	0,102
hsa-miR-498	-0,014	0,151	0,019	0,052	0,088
hsa-miR-4663	0,116	0,115	-0,075	0,052	0,110
hsa-miR-4732-3p	0,164	-0,057	0,050	0,052	0,110
hsa-miR-26b	-0,010	0,032	0,136	0,053	0,075
hsa-miR-548i	0,205	0,023	-0,070	0,053	0,140
hsa-miR-4776-3p	0,099	0,035	0,026	0,053	0,040
hsa-miR-3074-5p	0,071	0,090	-0,002	0,053	0,048
hsa-miR-3667-5p	-0,067	0,077	0,151	0,054	0,111
hsa-miR-559	0,008	0,138	0,017	0,054	0,073
hsa-miR-3120-3p	0,062	0,179	-0,077	0,055	0,128
hsa-miR-1243	0,070	0,163	-0,068	0,055	0,116
hsa-miR-128	-0,063	0,002	0,226	0,055	0,152
hsa-miR-3937	0,101	-0,012	0,078	0,055	0,060
hsa-miR-3614-5p	0,054	0,058	0,055	0,056	0,002
hsa-miR-4768-3p	0,148	0,110	0,001	0,056	0,078
hsa-miR-483-5p	0,015	-0,101	0,254	0,056	0,181
hsa-miR-208a	-0,121	0,036	0,254	0,056	0,188
hsa-miR-3136-3p	-0,005	0,017	0,157	0,056	0,088
hsa-miR-3916	0,031	0,040	0,099	0,057	0,037

Annexe 3: New MicroRNAs inhibit Glypican-3 and act as tumor suppressors in Human Liver Cancer

hsa-miR-301b	0,199	0,049	-0,078	0,057	0,139
hsa-miR-3921	0,073	0,041	0,056	0,057	0,016
hsa-miR-4731-3p	0,081	0,040	0,050	0,057	0,022
hsa-miR-3175	0,085	0,032	0,053	0,057	0,027
hsa-miR-4697-5p	0,097	0,092	-0,018	0,057	0,065
hsa-miR-4766-3p	0,172	0,112	-0,113	0,057	0,150
hsa-miR-4304	0,082	0,076	0,013	0,057	0,038
hsa-miR-4760-5p	0,128	1,040	-0,014	0,057	0,100
hsa-miR-21	0,032	0,111	0,030	0,058	0,046
hsa-miR-1248	-0,013		0,128	0,058	0,100
hsa-miR-139-5p	-0,053	0,214	0,012	0,058	0,139
hsa-miR-4761-3p	0,110	-0,065	0,129	0,058	0,107
hsa-miR-548h	0,219	0,077	-0,122	0,058	0,171
hsa-miR-1972	0,059	0,072	0,044	0,058	0,014
hsa-miR-2681	0,121	1,010	-0,004	0,058	0,089
hsa-miR-4497	0,079	0,136	-0,039	0,058	0,089
hsa-miR-4429	0,145	0,017	0,015	0,059	0,075
hsa-miR-514b-5p	0,118	0,094	-0,035	0,059	0,082
hsa-miR-502-3p	0,190	1,090	-0,072	0,059	0,185
hsa-miR-4537	0,922	0,122	-0,003	0,059	0,088
hsa-miR-3591-3p	0,153	0,130	-0,105	0,059	0,143
hsa-miR-3648	0,161	0,031	-0,013	0,060	0,090
hsa-miR-3679-5p	0,063	0,124	-0,008	0,060	0,066
hsa-miR-656	0,121	0,031	0,028	0,060	0,053
hsa-miR-4439	0,079	0,117	-0,016	0,060	0,069
hsa-miR-1343	0,164	0,056	-0,039	0,060	0,102
hsa-miR-4658	0,197	0,042	-0,057	0,060	0,128
hsa-miR-4796-5p	-0,096	-0,058	0,336	0,061	0,239
hsa-miR-148a*	0,073	0,018	0,092	0,061	0,038
hsa-miR-614	0,235	-0,012	-0,040	0,061	0,152
hsa-miR-4653-5p	0,099	0,157	-0,071	0,062	0,118
hsa-miR-2114	0,150	0,118	-0,083	0,062	0,126
hsa-miR-1206	-0,054	0,113	0,126	0,062	0,100
hsa-miR-4681	0,147	0,076	-0,037	0,062	0,093
hsa-miR-1301	0,187	0,068	-0,069	0,062	0,128
hsa-miR-450b-5p	0,062	-0,082	0,206	0,062	0,144
hsa-miR-4778-5p	0,199	-0,003	-0,009	0,062	0,118
hsa-miR-412	-0,218	0,026	0,380	0,063	0,301
hsa-miR-3189-5p	0,070	0,156	-0,037	0,063	0,097
hsa-miR-3622b-5p	0,119	0,080	-0,007	0,064	0,065
hsa-miR-4468	0,128	1,040	0,001	0,064	0,090
hsa-miR-376c	-0,127	0,089	0,231	0,064	0,180
hsa-miR-3127-3p	0,097	0,135	-0,038	0,065	0,091
hsa-miR-1305	0,131	0,097	-0,033	0,065	0,087
hsa-miR-505	0,114	0,081	0,000	0,065	0,059
hsa-miR-760	-0,067	0,057	0,206	0,065	0,137
hsa-miR-1238	0,144	0,044	0,008	0,065	0,070
hsa-miR-939	0,148	-0,017	0,065	0,065	0,082
hsa-miR-875-3p	0,042	0,087	0,066	0,065	0,022
hsa-miR-3153	0,082	0,960	0,050	0,066	0,023
hsa-miR-3972	0,121	0,110	-0,031	0,067	0,085
hsa-miR-23c	0,054	0,129	0,017	0,067	0,057
hsa-miR-3065-5p	0,199	-0,026	0,028	0,067	0,118
hsa-miR-371-5p	0,127	0,148	-0,075	0,067	0,123
hsa-miR-649	0,159	-0,121	0,163	0,067	0,163
hsa-miR-374a*	0,003	0,131		0,067	0,090
hsa-miR-3910	0,087	0,048	0,065	0,067	0,019
hsa-miR-3179	0,158	0,014	0,030	0,067	0,079
hsa-miR-149*	-0,096	0,231		0,067	0,231
hsa-miR-4668-5p	0,068	0,102	0,033	0,068	0,035
hsa-miR-3655	0,165	1,130	-0,030	0,068	0,138
hsa-miR-1278	0,173	0,008	0,023	0,068	0,092
hsa-miR-4436a	0,196	0,040	-0,032	0,068	0,117
hsa-miR-517c	0,126	0,082	-0,004	0,068	0,066
hsa-miR-888	0,101	1,010	0,036	0,068	0,046
hsa-miR-548ah	0,330	-0,026	-0,100	0,068	0,230
hsa-miR-3200-3p	0,131	1,060	0,006	0,068	0,088
hsa-miR-519c-3p	0,155	-0,037	0,088	0,068	0,098
hsa-miR-1	-0,005	0,186	0,025	0,069	0,103
hsa-miR-551a	0,043	0,109	0,055	0,069	0,036

Annexe 3: New MicroRNAs inhibit Glypican-3 and act as tumor suppressors in Human Liver Cancer

hsa-miR-381	-0,001	0,167	0,042	0,069	0,087
hsa-miR-4273	0,015	0,145	0,048	0,069	0,068
hsa-miR-2052	0,181	0,107	-0,078	0,070	0,133
hsa-miR-4639-3p	0,114	0,101	-0,005	0,070	0,065
hsa-miR-523	-0,153	0,153	0,210	0,070	0,196
hsa-miR-1181	0,151	0,940	-0,009	0,071	0,113
hsa-miR-4766-5p	0,098	0,066	0,049	0,071	0,025
hsa-miR-4782-3p	0,060	0,186	-0,032	0,071	0,110
hsa-miR-4693-3p	0,232	1,020	-0,089	0,072	0,227
hsa-miR-4746-5p	-0,096	0,008	0,305	0,072	0,208
hsa-miR-222*	0,032	0,112		0,072	0,056
hsa-miR-596	0,180	-0,085	0,123	0,072	0,139
hsa-miR-660	0,149	0,103	-0,035	0,072	0,096
hsa-miR-4685-5p	0,196	0,027	-0,006	0,072	0,109
hsa-miR-342-5p	0,032	0,095	0,091	0,073	0,036
hsa-miR-3123	0,133	1,060	0,014	0,073	0,084
hsa-miR-33b*	0,071	1,213	0,077	0,074	0,004
hsa-miR-802	0,152	1,020	-0,005	0,074	0,111
hsa-miR-557	0,176	0,027	0,019	0,074	0,088
hsa-miR-4783-3p	0,099	0,107	0,017	0,075	0,050
hsa-miR-514b-3p	0,132	0,037	0,055	0,075	0,051
hsa-miR-136	0,038	0,093	0,093	0,075	0,032
hsa-miR-4436b-5p	-0,201	0,144	0,286	0,076	0,250
hsa-miR-3689b* // hsa-miR-3689c	0,248	-0,017	-0,001	0,077	0,149
hsa-miR-4803	0,065	0,230	-0,065	0,077	0,148
hsa-miR-633	0,154	0,104	-0,029	0,077	0,095
hsa-miR-3622b-3p	0,245	0,960	-0,091	0,077	0,238
hsa-miR-642a	0,157	0,087	-0,014	0,077	0,086
hsa-miR-548p	0,064	0,119	0,049	0,077	0,037
hsa-miR-4295	0,119	0,086	0,028	0,077	0,046
hsa-miR-1226	0,203	0,135	-0,106	0,078	0,162
hsa-miR-3152-3p	0,158	0,132	-0,057	0,078	0,117
hsa-miR-4651	0,153	0,104	-0,023	0,078	0,091
hsa-miR-3651	0,115	-0,109	0,230	0,079	0,172
hsa-miR-3692	0,087	-0,053	0,202	0,079	0,127
hsa-miR-4320	0,172	0,054	0,010	0,079	0,084
hsa-miR-508-3p	-0,040	0,060	0,217	0,079	0,129
hsa-miR-4296	0,218	0,032	-0,008	0,081	0,121
hsa-miR-4671-3p	0,183	0,073	-0,013	0,081	0,098
hsa-miR-519e	0,197	-0,083	0,130	0,081	0,146
hsa-miR-3176	0,181	0,100	-0,037	0,081	0,111
hsa-miR-382	0,019	0,156	0,070	0,082	0,069
hsa-miR-4690-5p	0,142	0,006	0,098	0,082	0,070
hsa-miR-501-3p	-0,005	0,198	0,052	0,082	0,105
hsa-miR-924	0,082	0,064	0,100	0,082	0,018
hsa-miR-4455	0,163	0,090	-0,007	0,082	0,086
hsa-miR-3118	-0,010	0,223	0,034	0,082	0,124
hsa-miR-2964a-5p	0,075	0,116	0,057	0,083	0,030
hsa-miR-24-1*	-0,050	0,215		0,083	0,187
hsa-miR-4310	0,280	-0,046	0,015	0,083	0,173
hsa-miR-4755-5p	0,153	1,040	0,013	0,083	0,099
hsa-miR-3160-5p	0,278	0,029	-0,057	0,083	0,174
hsa-miR-1827	0,063	0,161	0,026	0,084	0,070
hsa-miR-4449	0,164	0,077	0,009	0,084	0,078
hsa-miR-944	0,177	0,111	-0,037	0,084	0,109
hsa-miR-4767	0,150	-0,054	0,154	0,084	0,119
hsa-miR-3940-3p	0,139	0,159	-0,047	0,084	0,114
hsa-miR-223*	0,133	0,111	0,008	0,084	0,067
hsa-miR-3143	0,197	0,004	0,051	0,084	0,101
hsa-miR-520b	0,267	-0,034	0,021	0,085	0,160
hsa-miR-4749-3p	0,127	0,081	0,050	0,086	0,038
hsa-miR-655	0,006	0,167	0,086	0,086	0,081
hsa-miR-191	0,019	0,140	0,100	0,086	0,062
hsa-miR-615-3p	-0,008	0,117	0,150	0,086	0,083
hsa-miR-4431	0,094	0,146	0,018	0,086	0,064
hsa-miR-890	0,231	0,040	-0,011	0,087	0,127
hsa-miR-1202	0,088	1,120	0,086	0,087	0,001
hsa-miR-4720-5p	0,150	-0,007	0,117	0,087	0,083
hsa-miR-4775	0,098	0,144	0,019	0,087	0,063

Annexe 3: New MicroRNAs inhibit Glypican-3 and act as tumor suppressors in Human Liver Cancer

hsa-miR-620	0,140	-0,074	0,196	0,087	0,143
hsa-miR-4696	0,091	0,212	-0,041	0,087	0,126
hsa-miR-3163	0,077	0,133	0,054	0,088	0,041
hsa-miR-3664-5p	0,135	0,092	0,038	0,088	0,049
hsa-miR-4704-5p	0,061	0,043	0,161	0,088	0,063
hsa-miR-1537	0,134	0,007	0,125	0,089	0,070
hsa-miR-10b	-0,033	0,227	0,073	0,089	0,130
hsa-miR-1324	0,153	0,017	0,098	0,089	0,068
hsa-miR-3194-3p	0,180	0,135	-0,046	0,090	0,120
hsa-miR-3150a-5p	0,092	1,020	0,087	0,090	0,004
hsa-miR-25	-0,013	0,126	0,156	0,090	0,090
hsa-miR-548ak	0,116	0,084	0,070	0,090	0,023
hsa-miR-330-3p	0,180	0,161	-0,069	0,091	0,139
hsa-miR-4649-3p	-0,004	0,005	0,272	0,091	0,157
hsa-miR-22	0,090	0,169	0,014	0,091	0,077
hsa-miR-1279	0,130	0,160	-0,018	0,091	0,095
hsa-miR-3960	0,076	0,224	-0,027	0,091	0,126
hsa-miR-127-5p	0,065	0,102	0,106	0,091	0,023
hsa-miR-4275	0,186	0,035	0,052	0,091	0,083
hsa-miR-4676-3p	0,117	0,050	0,109	0,092	0,036
hsa-miR-1179	0,072	0,109	0,094	0,092	0,018
hsa-miR-574-5p	0,073	0,241	-0,039	0,092	0,141
hsa-miR-3688-3p	0,069	1,080	0,116	0,092	0,033
hsa-miR-1298	0,082	0,080	0,118	0,093	0,022
hsa-miR-4798-5p	0,086	0,075	0,121	0,094	0,024
hsa-miR-199a-5p	-0,036	0,001	0,187	0,094	0,132
hsa-miR-371b-5p	0,093	0,095	0,154	0,094	0,002
hsa-miR-500b	0,175	0,061	0,047	0,094	0,070
hsa-miR-548o	0,099	-0,043	0,228	0,094	0,136
hsa-miR-3978	0,169	0,023	0,095	0,096	0,073
hsa-miR-3130-5p	0,110	1,100	0,082	0,096	0,019
hsa-miR-624*	-0,066	0,346	0,008	0,096	0,219
hsa-miR-200a	0,039	0,092	0,159	0,096	0,060
hsa-miR-100	0,140	0,104	0,046	0,097	0,047
hsa-miR-1276	-0,182	0,092	0,379	0,097	0,280
hsa-miR-548d-3p	0,148	0,094	0,048	0,097	0,050
hsa-miR-582-3p	0,177	0,142	-0,028	0,097	0,110
hsa-miR-1915	0,039	0,100	0,153	0,097	0,057
hsa-miR-3606	0,160	0,138	-0,006	0,097	0,090
hsa-miR-33b	0,037	0,155	0,102	0,098	0,059
hsa-miR-3064-3p	0,113	1,220	0,083	0,098	0,021
hsa-miR-504	0,008	0,209	0,080	0,099	0,101
hsa-miR-509-3-5p	0,165	1,150	0,033	0,099	0,094
hsa-miR-4661-5p	0,198	-0,187	0,287	0,099	0,252
hsa-miR-3945	0,111	-0,018	0,204	0,099	0,112
hsa-miR-3621	0,115	0,070	0,115	0,100	0,026
hsa-miR-92b*	0,126	0,743	0,074	0,100	0,037
hsa-miR-4479	0,161	0,016	0,124	0,100	0,075
hsa-miR-302a	-0,037	0,328	0,010	0,100	0,199
hsa-miR-3188	-0,017	0,101	0,218	0,101	0,117
hsa-miR-4760-3p	0,088	0,215	0,000	0,101	0,108
hsa-miR-517b	0,086	0,117	0,101	0,101	0,016
hsa-miR-3912	0,153	0,036	0,116	0,102	0,059
hsa-miR-521	0,132	0,088	0,088	0,103	0,026
hsa-miR-1273d	0,153	0,134	0,022	0,103	0,071
hsa-miR-1299	0,190	0,073	0,047	0,103	0,076
hsa-miR-346	0,106	0,165	0,039	0,103	0,063
hsa-miR-4666-3p	0,135	0,001	0,174	0,103	0,091
hsa-miR-657	0,247	0,139	-0,075	0,104	0,164
hsa-miR-4420	0,173	0,106	0,032	0,104	0,071
hsa-miR-3119	0,156	0,149	0,007	0,104	0,084
hsa-miR-141	0,017	0,140	0,155	0,104	0,076
hsa-miR-126	0,049	0,231	0,033	0,104	0,110
hsa-miR-3158-3p	0,150	0,140	0,023	0,104	0,070
hsa-miR-4251	0,117	0,227	-0,030	0,105	0,129
hsa-miR-198	0,181	0,144	-0,011	0,105	0,102
hsa-miR-4255	0,142	1,040	0,068	0,105	0,052
hsa-miR-4481	0,183	0,103	0,029	0,105	0,077
hsa-miR-4471	0,281	0,061	-0,025	0,105	0,158
hsa-miR-10b*	0,097	0,182	0,037	0,105	0,073

Annexe 3: New MicroRNAs inhibit Glypican-3 and act as tumor suppressors in Human Liver Cancer

hsa-miR-4520b-3p	-0,029		0,241	0,106	0,191
hsa-miR-3691-3p	0,157	0,053	0,108	0,106	0,052
hsa-miR-3622a-3p	0,146	0,177	-0,001	0,107	0,095
hsa-miR-223	0,035	0,262	0,024	0,107	0,134
hsa-miR-1261	0,130	0,077	0,116	0,107	0,028
hsa-miR-618	0,121	0,159	0,042	0,107	0,060
hsa-miR-378c	0,147	0,054	0,122	0,108	0,048
hsa-miR-4749-5p	-0,200	0,870	-0,345	0,108	0,664
hsa-miR-4641	0,089	0,185	0,052	0,109	0,068
hsa-miR-3622a-5p	0,106	0,103	0,118	0,109	0,008
hsa-miR-4797-5p	0,183	0,106	0,040	0,110	0,071
hsa-miR-511	0,159	0,171	0,001	0,110	0,095
hsa-miR-4450	0,094	-0,006	0,243	0,110	0,126
hsa-miR-892b	0,145	0,144	0,044	0,111	0,058
hsa-miR-4507	0,083	0,128	0,124	0,112	0,025
hsa-miR-4297	0,211	0,011	0,117	0,113	0,100
hsa-miR-340	0,040	0,269	0,031	0,113	0,134
hsa-miR-1270	0,063	0,167	0,111	0,114	0,052
hsa-miR-4777-3p	0,211	0,127	0,004	0,114	0,104
hsa-miR-676	0,343	0,084	-0,083	0,114	0,215
hsa-miR-452*	-0,058	-1,075	1,477	0,115	1,284
hsa-miR-4680-5p	0,144	0,021	0,180	0,115	0,083
hsa-miR-4647	0,146	0,013	0,188	0,116	0,091
hsa-miR-3660	0,277	-0,016	0,086	0,116	0,149
hsa-miR-4465	0,081	0,102	0,165	0,116	0,044
hsa-miR-4492	0,173	0,054	0,122	0,117	0,060
hsa-miR-3617	0,177	0,196	-0,022	0,117	0,121
hsa-miR-601	0,171	0,018	0,167	0,119	0,088
hsa-miR-155	0,189	0,064	0,103	0,119	0,064
hsa-miR-4329	0,188	0,075	0,095	0,119	0,060
hsa-miR-4667-3p	0,148	0,097	0,116	0,120	0,026
hsa-miR-320c	0,225	0,076	0,059	0,120	0,091
hsa-miR-2276	0,037	1,120	0,205	0,121	0,119
hsa-miR-590-3p	0,094	0,386	-0,118	0,121	0,253
hsa-miR-720	0,106	0,104	0,154	0,121	0,028
hsa-miR-362-5p	0,194	0,109	0,061	0,122	0,067
hsa-miR-4762-5p	-0,046	-0,039	0,451	0,122	0,285
hsa-miR-1258	0,024	0,071	0,271	0,122	0,131
hsa-miR-555	0,247	-0,056	0,175	0,122	0,158
hsa-miR-224*	0,282	-0,036		0,123	0,225
hsa-miR-3618	0,063	0,190	0,117	0,123	0,064
hsa-miR-409-3p	0,027	0,164	0,179	0,123	0,084
hsa-miR-139-3p	0,046	0,102	0,223	0,124	0,091
hsa-miR-4693-5p	0,145	0,207	0,019	0,124	0,096
hsa-miR-205	0,060	0,085	0,226	0,124	0,089
hsa-miR-625	0,159	0,105	0,108	0,124	0,030
hsa-miR-3609	0,121	0,113	0,138	0,124	0,012
hsa-miR-4701-5p	0,090	0,126	0,159	0,125	0,034
hsa-miR-4716-5p	-0,163	0,820	-0,281	0,125	0,605
hsa-miR-4518	0,170	0,196	0,010	0,126	0,101
hsa-miR-191*	0,069	0,183		0,126	0,081
hsa-miR-671-5p	0,029	0,253	0,098	0,127	0,114
hsa-miR-17	0,015	0,096	0,271	0,127	0,131
hsa-miR-3193	0,093	0,215	0,076	0,128	0,076
hsa-miR-4707-3p	0,188	0,185	0,012	0,128	0,101
hsa-miR-561	0,241	0,109	0,037	0,129	0,104
hsa-miR-432	0,196	0,142	0,049	0,129	0,075
hsa-miR-934	0,193	0,193	0,002	0,129	0,111
hsa-miR-3607-3p	0,206	1,040	0,053	0,130	0,108
hsa-miR-4493	0,224	0,181	-0,016	0,130	0,128
hsa-miR-3121-3p	0,173	0,197	0,019	0,130	0,096
hsa-miR-3653	0,222	0,146	0,020	0,130	0,102
hsa-miR-628-3p	0,135	0,242	0,014	0,130	0,114
hsa-miR-1182	0,110	0,155	0,125	0,130	0,023
hsa-miR-373*	0,030	0,370	-0,008	0,131	0,208
hsa-miR-4669	0,147	0,095	0,157	0,133	0,033
hsa-miR-520f	-0,057	0,157	0,300	0,133	0,180
hsa-miR-4727-5p	0,177	0,149	0,073	0,133	0,054
hsa-miR-550b	0,165	0,219	0,017	0,134	0,104
hsa-miR-3976	0,113	-0,055	0,345	0,134	0,201

Annexe 3: New MicroRNAs inhibit Glypican-3 and act as tumor suppressors in Human Liver Cancer

hsa-miR-3942-3p	-0,022	0,142	0,283	0,134	0,153
hsa-miR-4709-5p	0,225	0,158	0,023	0,135	0,103
hsa-miR-3181	0,014	-0,006	0,398	0,135	0,228
hsa-miR-4705	0,150	0,202	0,055	0,136	0,074
hsa-miR-3167	0,256	0,110	0,043	0,136	0,109
hsa-miR-214	0,044	0,288	0,079	0,137	0,132
hsa-miR-1204	0,243	0,114	0,055	0,137	0,096
hsa-miR-4715-3p	0,147	0,208	0,058	0,138	0,076
hsa-miR-876-5p	0,097	0,258	0,060	0,139	0,105
hsa-miR-3135	0,152	0,144	0,121	0,139	0,016
hsa-miR-1297	0,160	0,078	0,180	0,139	0,054
hsa-miR-4694-3p	0,241	0,150	0,029	0,140	0,107
hsa-miR-500a	0,167	0,176	0,077	0,140	0,055
hsa-miR-4281	0,160	0,247	0,013	0,140	0,118
hsa-miR-1277	0,182	0,080	0,161	0,141	0,054
hsa-miR-4733-5p	0,191	0,162	0,070	0,141	0,063
hsa-miR-3115	0,214	0,207	0,002	0,141	0,120
hsa-miR-616	0,203	0,237	-0,014	0,142	0,136
hsa-miR-4772-3p	0,173	0,170	0,083	0,142	0,051
hsa-miR-4764-3p	0,178	0,225	0,025	0,143	0,105
hsa-miR-4797-3p	0,207	0,161	0,061	0,143	0,074
hsa-miR-718	0,234	0,153	0,042	0,143	0,096
hsa-miR-2355-5p	0,190	1,170	0,097	0,143	0,065
hsa-miR-543	0,007	0,237	0,187	0,144	0,121
hsa-miR-3677-5p	0,107	0,195	0,130	0,144	0,046
hsa-miR-517a	0,168	0,142	0,126	0,145	0,021
hsa-miR-101	-0,041	0,311	0,167	0,146	0,177
hsa-miR-3155b	0,193	0,136	0,108	0,146	0,043
hsa-miR-4744	0,192	1,110	0,101	0,146	0,064
hsa-miR-1915*	0,138	0,601	0,156	0,147	0,013
hsa-miR-320d	0,204	0,049	0,188	0,147	0,085
hsa-miR-4636	0,219	0,137	0,087	0,147	0,067
hsa-miR-4499	0,173	0,203	0,069	0,149	0,070
hsa-miR-4747-3p	0,152	0,207	0,089	0,149	0,059
hsa-miR-4659b-3p	0,099	0,192	0,159	0,150	0,047
hsa-miR-1207-5p	0,108	0,003	0,340	0,150	0,173
hsa-miR-3686	0,236	0,099	0,117	0,151	0,074
hsa-miR-26a	0,119	0,118	0,215	0,151	0,056
hsa-miR-4781-5p	0,280	0,124	0,050	0,151	0,117
hsa-miR-548c-3p	0,197	1,120	0,106	0,152	0,064
hsa-miR-514	0,150	0,189	0,120	0,153	0,035
hsa-miR-520e	0,286	0,164	0,009	0,153	0,139
hsa-miR-562	0,199	1,040	0,108	0,153	0,064
hsa-miR-1295	0,198	1,130	0,112	0,155	0,061
hsa-miR-377	0,169	0,203	0,095	0,156	0,055
hsa-miR-563	0,206	0,178	0,084	0,156	0,064
hsa-miR-486-3p	0,055	0,242	0,171	0,156	0,094
hsa-miR-4271	0,235	0,155	0,079	0,156	0,078
hsa-miR-3676	0,086	0,163	0,221	0,157	0,068
hsa-miR-371b-3p	0,170	0,223	0,077	0,157	0,074
hsa-miR-588	0,225	0,182	0,065	0,157	0,083
hsa-miR-4526	0,179	0,175	0,118	0,158	0,034
hsa-miR-34c-3p	0,220	0,224	0,033	0,159	0,109
hsa-miR-320b	0,078	0,242	0,159	0,159	0,082
hsa-miR-338-3p	0,100	0,290	0,092	0,161	0,112
hsa-miR-544	0,127	0,172	0,187	0,162	0,032
hsa-miR-550a*	0,124	0,200		0,162	0,053
hsa-miR-518b	0,221	0,155	0,112	0,162	0,055
hsa-miR-3922-3p	0,192	0,237	0,066	0,165	0,089
hsa-miR-4793-3p	0,282	0,120	0,094	0,165	0,102
hsa-miR-4798-3p	0,194	1,090	0,139	0,166	0,039
hsa-miR-519b-3p	0,243	0,166	0,091	0,166	0,076
hsa-miR-548ag	0,256	0,047	0,197	0,167	0,108
hsa-miR-3124-3p	0,101		0,232	0,167	0,092
hsa-miR-551b	0,056	0,361	0,083	0,167	0,169
hsa-miR-200c*	0,237	0,111	0,153	0,167	0,064
hsa-miR-4483	0,156	0,275	0,073	0,168	0,102
hsa-miR-106b	0,102	0,182	0,222	0,169	0,061
hsa-miR-4783-5p	0,265	0,177	0,066	0,169	0,100
hsa-miR-496	0,015	0,224	0,269	0,169	0,136

Annexe 3: New MicroRNAs inhibit Glypican-3 and act as tumor suppressors in Human Liver Cancer

hsa-miR-3129-5p	0,189	0,061	0,259	0,170	0,100
hsa-miR-4254	0,240	0,150	0,120	0,170	0,062
hsa-miR-2054	0,061	0,069	0,380	0,170	0,182
hsa-miR-188-3p	0,071	0,232	0,210	0,171	0,087
hsa-miR-3942-5p	0,259	0,158	0,098	0,172	0,081
hsa-miR-548s	0,227	0,211	0,079	0,172	0,081
hsa-miR-515-3p	0,201	0,219	0,107	0,175	0,060
hsa-miR-4256	0,290	0,208	0,031	0,176	0,132
hsa-miR-4640-3p	0,095		0,260	0,178	0,117
hsa-miR-4801	0,133	0,306	0,097	0,179	0,112
hsa-miR-200c	0,122	0,233	0,181	0,179	0,056
hsa-miR-448	0,051	0,246	0,243	0,180	0,111
hsa-miR-4478	0,212	1,070	0,149	0,180	0,045
hsa-miR-4728-3p	-0,037	0,187	0,393	0,181	0,215
hsa-miR-4538	0,253	0,122	0,169	0,181	0,066
hsa-miR-3183	0,311	0,036	0,199	0,182	0,139
hsa-miR-491-3p	0,064	0,280	0,202	0,182	0,109
hsa-miR-4496	0,283	0,139	0,123	0,182	0,088
hsa-miR-4491	0,237	1,050	0,128	0,183	0,077
hsa-miR-1257	0,246	0,207	0,097	0,183	0,077
hsa-miR-4711-3p	0,186	0,261	0,104	0,184	0,079
hsa-miR-374c	0,223	0,220	0,107	0,184	0,066
hsa-miR-4330	0,057	0,371	0,124	0,184	0,047
hsa-miR-3187-3p	0,262	0,019	0,273	0,184	0,144
hsa-miR-4791	0,183	0,280	0,093	0,186	0,094
hsa-miR-3158-5p	0,175	0,312	0,070	0,186	0,122
hsa-miR-304*	0,255	-0,109	0,412	0,186	0,267
hsa-miR-4715-5p	0,077	0,287	0,196	0,187	0,105
hsa-miR-607	0,225	1,100	0,152	0,188	0,052
hsa-miR-550a	0,138		0,238	0,188	0,071
hsa-miR-4655-3p	0,177	0,184	0,205	0,189	0,015
hsa-miR-1268b	0,210	0,097	0,260	0,189	0,084
hsa-miR-590-5p	0,130	0,317	0,128	0,192	0,108
hsa-miR-148a	0,128	0,228	0,224	0,193	0,057
hsa-miR-593	0,288	0,175	0,123	0,195	0,085
hsa-miR-505*	0,099	0,459	0,030	0,196	0,230
hsa-miR-4419b	0,156	0,214	0,220	0,197	0,035
hsa-miR-4535	0,257	1,130	0,138	0,197	0,084
hsa-miR-3657	0,214	0,320	0,061	0,198	0,130
hsa-miR-3615	0,202	0,323	0,070	0,198	0,127
hsa-miR-302b	0,239	0,240	0,116	0,198	0,072
hsa-miR-296-3p	0,031	0,220	0,346	0,199	0,158
hsa-miR-3124-5p	0,314	0,246	0,043	0,201	0,141
hsa-miR-4718	0,249	0,267	0,094	0,203	0,095
hsa-miR-1538	0,281		0,127	0,204	0,109
hsa-miR-4322	0,266	0,210	0,138	0,205	0,064
hsa-miR-302d	0,141	0,278	0,201	0,207	0,069
hsa-miR-4457	0,108	0,281	0,232	0,207	0,089
hsa-miR-520d-3p	0,310	0,213	0,112	0,212	0,099
hsa-miR-4655-5p	0,263	0,180	0,193	0,212	0,045
hsa-miR-3678-5p	0,277	0,213	0,149	0,213	0,064
hsa-miR-4768-5p	-0,057	0,181	0,515	0,213	0,287
hsa-miR-4690-3p	1,359	0,087	0,340	0,213	0,179
hsa-miR-569	0,237	0,156	0,248	0,213	0,050
hsa-miR-450a	0,137	0,181	0,322	0,213	0,096
hsa-miR-20a*	0,224	1,513	0,206	0,215	0,013
hsa-miR-367	0,140	0,263	0,243	0,215	0,066
hsa-miR-454	0,357	1,130	0,080	0,219	0,196
hsa-miR-1291	0,323	0,168	0,167	0,219	0,090
hsa-miR-4633-3p	0,163	0,311	0,187	0,221	0,079
hsa-miR-937	0,108	0,342	0,214	0,221	0,117
hsa-miR-4469	0,218	0,277	0,169	0,222	0,054
hsa-miR-4785	0,247	0,081	0,338	0,222	0,131
hsa-miR-4665-3p	-0,002	0,250	0,430	0,226	0,217
hsa-miR-922	0,391	0,147	0,144	0,227	0,141
hsa-miR-520a-3p	0,193	0,131	0,361	0,229	0,119
hsa-miR-497*	0,160	0,300		0,230	0,099
hsa-miR-4517	0,239	0,287	0,181	0,236	0,053
hsa-miR-187*	0,332	1,122	0,141	0,237	0,135
hsa-miR-4661-3p	-0,106	0,243	0,575	0,237	0,340

Annexe 3: New MicroRNAs inhibit Glypican-3 and act as tumor suppressors in Human Liver Cancer

hsa-miR-217	0,301	0,174	0,249	0,238	0,090
hsa-miR-3909	0,230	0,296	0,188	0,238	0,054
hsa-miR-216a	0,192	0,190	0,332	0,238	0,082
hsa-miR-4453	0,286	1,180	0,199	0,242	0,061
hsa-miR-3935	0,028	0,243	0,456	0,242	0,214
hsa-miR-3679-3p	0,284	0,295	0,152	0,244	0,079
hsa-miR-1272	0,287	0,204	0,254	0,248	0,042
hsa-miR-4477b	0,327	0,246	0,177	0,250	0,075
hsa-miR-302c	0,290	0,279	0,217	0,262	0,039
hsa-miR-99b	0,158	0,280	0,349	0,262	0,097
hsa-miR-4672	0,322	0,195	0,282	0,266	0,065
hsa-miR-654-3p	0,224	0,339	0,260	0,274	0,059
hsa-miR-638	0,245	0,415	0,167	0,276	0,127
hsa-miR-520c-3p	0,502	0,257	0,081	0,280	0,212
hsa-miR-4325	0,361	0,308	0,177	0,282	0,095
hsa-miR-363	0,208	0,412	0,238	0,286	0,110
hsa-miR-4454	0,317	0,219	0,326	0,287	0,059
hsa-miR-23b*	0,220	0,373		0,297	0,108
hsa-miR-3689a-3p	0,272	0,424	0,216	0,304	0,108
hsa-miR-621	0,239	0,304	0,396	0,313	0,079
hsa-miR-3677-3p	0,356	0,354	0,230	0,313	0,072
hsa-miR-4451	0,304	0,377	0,272	0,318	0,054
hsa-miR-4436b-3p	0,345	0,362	0,251	0,320	0,060
hsa-miR-99a	0,306	0,281	0,374	0,320	0,048
hsa-miR-4725-3p	0,230	0,511	0,219	0,320	0,165
hsa-miR-4726-3p	0,409	0,327	0,232	0,323	0,088
hsa-miR-542-5p	0,050	0,340	0,603	0,331	0,276
hsa-miR-542-3p	0,281	0,575	0,180	0,346	0,205
hsa-miR-3659	0,235	0,350	0,456	0,347	0,110
hsa-miR-675*	0,270	0,459	0,322	0,350	0,097
hsa-miR-1289	0,341	0,298	0,424	0,354	0,064
hsa-miR-3178	0,331	0,440	0,298	0,356	0,074
hsa-miR-3663-5p	0,315	0,330	0,430	0,358	0,063
hsa-miR-602	0,214	0,345	0,536	0,365	0,162
hsa-miR-3682-3p	0,354	0,469	0,315	0,379	0,080
hsa-miR-371-3p	0,429	0,420	0,305	0,385	0,070
hsa-miR-1256	0,209	0,416	0,559	0,395	0,176
hsa-miR-3117-5p	0,409	0,455	0,406	0,424	0,027
hsa-miR-4777-5p	0,350	0,595	0,402	0,449	0,129
hsa-miR-548m	0,467	0,463	0,419	0,450	0,027
hsa-miR-1247	0,414	0,548	0,412	0,458	0,078
hsa-miR-516a-5p	0,387	0,493	0,538	0,473	0,078
hsa-miR-3610	0,458	0,477	0,474	0,475	0,002
hsa-miR-320a	0,390	0,525	0,535	0,483	0,081
hsa-miR-4708-3p	0,052	0,476	0,553	0,514	0,054
hsa-miR-887	0,606	0,568	0,436	0,537	0,090
hsa-miR-3939	0,749	0,647	0,462	0,620	0,145
hsa-miR-3195	0,948	1,167	0,350	0,822	0,423
hsa-miR-4632	0,785	0,876	0,912	0,858	0,065
hsa-miR-4634	0,972	0,853	0,779	0,868	0,097
hsa-miR-941	1,026	1,027	0,973	1,009	0,031
hsa-miR-4695-3p	1,254	1,199	1,415	1,289	0,113

Cartier F et al, Supplementary Table S2

miRNA	Dual-Fluorescence FunREG screening			Effect on Endogenous Glypican-3			Algorithm of prediction
	3'-UTR	5'-UTR	3'+ 5'-UTR	Total	Membrane	mRNA	
miR-135b-3p	✓	-	-	✓	✓	-	RNAhybrid, Targetscan, miRanda, PICTAR5
miR-140-5p	✓	-	-	✓ (+)	✓ (+)	-	Targetscan, miRanda, PICTAR5, DIANAmt
miR-193a-3p	✓	-	-	-	-	ND	-
miR-203a-3p	-	-	✓	✓	-	✓ (+)	PICTAR5
miR-300	✓	-	-	-	-	ND	-
miR-376b-3p	✓	-	-	✓	✓	-	-
miR-4252	✓	-	-	✓	✓	-	-
miR-4460	-	-	✓	✓ (+)	✓ (+)	-	-
miR-4510	✓	-	-	✓	✓	✓	RNAhybrid, Targetscan
miR-4635	-	✓	-	✓	✓	-	RNAhybrid
miR-548aa	-	✓	-	✓	✓	-	-
miR-548v	-	-	✓	-	✓	-	-
miR-593-5p	✓	-	-	-	-	ND	-
miR-675	✓	-	-	-	-	ND	-

“✓”: Negative effect; “✓ (+)”: Positive effect; “-”: no effect or no predicted interaction (right column); “ND”: not determined.

Supplementary Table S2. Result summary of the DF-FunREG screening and validation experiments on endogenous Glypican-3 expression.

Cartier F et al, Supplementary Table S3

	miR-4510	miR-203a-3p	miR-548aa	miR-376b-3p	miR-548v
Gender F (17, 17%), M (85, 83%)	NS	NS	NS	NS	NS
Age (years) <63.5 (47, 46%), >=63.5 (55, 54%)	NS	NS	NS	NS	NS
Ethiology AL (31, 31%) AL HBV (3, 3%) AL HBV HCV (1, 1%) AL HBV METAB (1, 1%) AL HCV (1, 1%) AL HM (3, 3%) AL METAB (1, 1%) HBV (5, 5%) HBV HCV (19, 19%) HBV OTHER (3, 3%) HCV (2, 2%) HM (11.5, 11.5%) METAB (4, 4%)	NS	NS	NS	NS	NS
Number of distal nodules	NS	NS	NS	NS	NS
Poor prognosis good (11,46%), poor (13,54%)	NS	NS	NS	NS	NS
Child Pugh (classe) A (87, 95%), B (5, 5%)	NS	NS	NS	NS	NS
Ascites No (62, 94%), Yes (4, 6%)	NS	NS	NS	NS	NS
AlphaFoeto (ng/ml) <=20 (41, 43%), >20 (52, 54%)	NS	NS	NS	NS	NS
Largest nodule diameter (cm) <=50 (41, 41%), >50 (60, 59%)	NS	NS	NS	NS	NS
Satellite nodules No (52, 52%), Yes (48, 48%)	NS	NS	p=0,05 (↗ No)	NS	NS
Vascular invasion No (43, 43%), Yes (57, 57%)	NS	NS	NS	NS	NS
Portal vein microscopic invasion No (43, 43%), Yes (56, 57%)	NS	NS	NS	NS	NS
EdmoNSon grade I-II (45, 45%), III-IV (54, 55%)	NS	NS	NS	NS	NS
Tumoral capsule Absent (25, 25%), Intact (16, 16%), Invaded (59, 59%)	NS	NS	NS	NS	NS
Normal liver histology CIRR (34, 34%), NL (14, 14%), PF (17, 17%), HCA (36, 36%)	NS	NS	NS	NS	NS
Metavir-fibrosis (non-tumorous liver) F0 (11, 11%), F1 (19, 20%) F2 (24, 25%) F3 (9, 9%) F4 (33,34%)	NS	NS	NS	NS	NS
X5 gene score Good prognosis (45, 49%), Poor prognosis (47, 51%)	NS	NS	NS	NS	NS
Mutation CTNNB1 status Mu (22, 41%), NMu (32, 59%)	NS	NS	NS	NS	NS
Mutation P53 status Mu (23, 23%), NMu (79, 77%)	NS	NS	NS	p=0,02 (↗ NMu)	NS

AL: alcohol; CIRR: cirrhosis; F: female; HBV: hepatitis B virus; HCA: chronic active hepatitis ; HCV: hepatitis C virus; HM: hematochromatosis; M: male; METAB: metabolic syndrome; Mu: mutated; NL: normal liver; NMu: non mutated; PF: portal fibrosis. X5_gene.score: see Nault JC et al. Gastroenterology. 2013 Jul;145(1):176-87. doi: 10.1053/j.gastro.2013.03.051.

Supplementary Table S3. Correlation between expression of GPC3-regulating miRNAs and clinical parameters. NS: not significant.

Cartier F et al, Supplementary Table S4

Patient features	Features	Number of cases (%)
Gender	Male	85 (83%)
Age mean (min, max)	mean (min, max)	57,2 (18-79)
Tumor differentiation (Edmondson)	I-II	45 (45%)
	III-IV	54 (55%)
Etiology	Alcohol	45 (44,5%)
	HCV	18 (17,6%)
	HBV	29 (28,4%)
	NASH	9 (8,8%)
	hemochromatosis	6 (5,8%)
Fibrosis in non-tumor liver (METAVIR)	other	12 (11,7%)
	F0	11 (11%)
	F1	19 (20%)
	F2	24 (25%)
	F3	9 (9%)
CTNNB1	F4	33 (34%)
	Mutated	38 (38,7%)
TP53	non-mutated	60 (61,2%)
	Mutated	23 (22,5%)
5_gene_score	non-mutated	79 (77,4%)
	P1	45 (48,9%)
	P2	47 (51%)

Supplementary Table S4. Clinical and genetic characteristics in a series of 117 liver samples (19 NTL and 98 HCC).

RÉFÉRENCES

- Aden, D.P., Fogel, A., Plotkin, S., Damjanov, I., and Knowles, B.B. (1979). Controlled synthesis of HBsAg in a differentiated human liver carcinoma-derived cell line. *Nature* 282, 615–616.
- Afanasyeva, E.A., Mestdagh, P., Kumps, C., Vandesomepele, J., Ehemann, V., Theissen, J., Fischer, M., Zapatka, M., Brors, B., Savelyeva, L., et al. (2011). MicroRNA miR-885-5p targets CDK2 and MCM5, activates p53 and inhibits proliferation and survival. *Cell Death Differ.* 18, 974–984.
- Ahmad, A., Sarkar, S.H., Bitar, B., Ali, S., Aboukameel, A., Sethi, S., Li, Y., Bao, B., Kong, D., Banerjee, S., et al. (2012). Garcinol Regulates EMT and Wnt Signaling Pathways In Vitro and In Vivo, Leading to Anticancer Activity against Breast Cancer Cells. *Am. Assoc. Cancer Res.* 11, 2193–2201.
- Akhtar, M.M., Micolucci, L., Islam, M.S., Olivieri, F., and Procopio, A.D. (2016). Bioinformatic tools for microRNA dissection. *Nucleic Acids Res.* 44, 24.
- Alexiou, P., Maragkakis, M., Papadopoulos, G.L., Reczko, M., and Hatzigeorgiou, A.G. (2009). Lost in translation: an assessment and perspective for computational microRNA target identification. *Bioinformatics* 25, 3049–3055.
- Ambros, V. (2011). MicroRNAs and developmental timing. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 21, 511–517.
- Ameres, S.L., and Zamore, P.D. (2013). Diversifying microRNA sequence and function. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 14, 475–488.
- Amuro, Y., Tanaka, M., Higashino, K., Hayashi, E., Endo, T., Kishimoto, S., Nakabayashi, H., and Sato, J. (1982). Bile acid synthesis by long-term cultured cell line established from human hepatoblastoma. *J. Clin. Invest.* 70, 1128–1130.
- Ansell, P., Mitchell, C.D., Roman, E., Simpson, J., Birch, J.M., and Eden, T.O.B. (2005). Relationships between perinatal and maternal characteristics and hepatoblastoma: a report from the UKCCS. *Eur. J. Cancer* 41, 741–748.
- Aqeilan, R.I., Calin, G.A., and Croce, C.M. (2009). miR-15a and miR-16-1 in cancer: discovery, function and future perspectives. *Cell Death Differ.* 17, 215–220.
- Araki, Y., Okamura, S., Hussain, S.P., Nagashima, M., He, P., Shiseki, M., Miura, K., and Harris, C.C. (2003). Regulation of Cyclooxygenase-2 Expression by the Wnt and Ras Pathways. *Cancer Res.* 63, 728–734.
- Aravin, A.A., Lagos-Quintana, M., Yalcin, A., Zavolan, M., Marks, D., Snyder, B., Gaasterland, T., Meyer, J., and Tuschl, T. (2003). The small RNA profile during *Drosophila melanogaster* development. *Dev. Cell* 5, 337–350.
- Archbold, H.C., Yang, Y.X., Chen, L., and Cadigan, K.M. (2012). How do they do Wnt they do?: regulation of transcription by the Wnt/ β -catenin pathway. *Acta Physiol.* 204, 74–109.
- Aretz, S., Koch, A., Uhlhaas, S., Friedl, W., Propping, P., Schweinitz, D. von, and Pietsch, T. (2006). Should children at risk for familial adenomatous polyposis be screened for hepatoblastoma and children with apparently sporadic hepatoblastoma be screened for APC germline mutations? *Pediatr. Blood Cancer* 47, 811–818.
- Armengol, C., Cairo, S., Fabre, M., and Buendia, M.A. (2011). Wnt signaling and hepatocarcinogenesis: The hepatoblastoma model. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 43, 265–270.
- Aronson, D.C., Czauderna, P., Maibach, R., Perilongo, G., and Morland, B. (2014). The treatment of hepatoblastoma: Its evolution and the current status as per the SIOPEL trials. *J. Indian Assoc. Pediatr. Surg.* 19, 201–207.

- Bader, A.G., Daige, C.L., Kelnar, K., Priddy, L., Dysart, S., Wiggins, J., Zhao, J., Leatherbury, N., Omotola, M., Stoudemire, J., et al. (2012). Preclinical data of a microRNA-based therapy for hepatocellular carcinoma (Chicago, IL).
- Bagga, S., Bracht, J., Hunter, S., Massirer, K., Holtz, J., Eachus, R., and Pasquinelli, A.E. (2005). Regulation by let-7 and lin-4 miRNAs Results in Target mRNA Degradation. *Cell* *122*, 553–563.
- Balke, M., Neumann, A., Kersting, C., Agelopoulos, K., Gebert, C., Gosheger, G., Buerger, H., and Hagedorn, M. (2010). Morphologic characterization of osteosarcoma growth on the chick chorioallantoic membrane. *BMC Res. Notes* *3*, 58.
- Bartel, D.P. (2009). MicroRNAs: Target Recognition and Regulatory Functions. *Cell* *136*, 215–233.
- van Beest, M., Dooijes, D., Wetering, M. van de, Kjaerulff, S., Bonvin, A., Nielsen, O., and Clevers, H. (2000). Sequence-specific HMG box factors recognize 10-12 base pair minor groove motifs. *J. Biol. Chem.*
- Behm-Ansmant, I., Rehwinkel, J., Doerks, T., Stark, A., Bork, P., and Izaurralde, E. (2006). mRNA degradation by miRNAs and GW182 requires both CCR4:NOT deadenylase and DCP1:DCP2 decapping complexes. *Genes Dev.* *20*, 1885–1898.
- Benhamouche, S., Decaens, T., Godard, C., Chambrey, R., Rickman, D.S., Moinard, C., Vasseur-Cognet, M., Kuo, C.J., Kahn, A., Perret, C., et al. (2006). Apc Tumor Suppressor Gene Is the “Zonation-Keeper” of Mouse Liver. *Dev. Cell* *10*, 759–770.
- Berezikov, E., Tetering, G. van, Verheul, M., Belt, J. van de, Laake, L. van, Vos, J., Verloop, R., Wetering, M. van de, Guryev, V., Takada, S., et al. (2006). Many novel mammalian microRNA candidates identified by extensive cloning and RAKE analysis. *Genome Res.* *16*, 1289–1298.
- Bissig-Choisat, B., Kettlun-Leyton, C., Legras, X.D., Zorman, B., Barzi, M., Chen, L.L., Amin, M.D., Huang, Y.-H., Pautler, R.G., Hampton, O.A., et al. (2016). Novel patient-derived xenograft and cell line models for therapeutic testing of pediatric liver cancer. *J. Hepatol.*
- Boman, F, Bossard, C, Fabre, M, Diab, M, Bonnevalle, M, and Boccon-Gibod, L (2004). Mesenchymal Hamartomas of the Liver May Be Associated with Increased Serum Alpha Foetoprotein Concentrations and Mimic Hepatoblastomas. *Eur. J. Pediatr. Surg.* *14*, 63–66.
- Bonci, D., Coppola, V., Musumeci, M., Addario, A., Giuffrida, R., Memeo, L., D’Urso, L., Pagliuca, A., Biffoni, M., Labbaye, C., et al. (2008). The miR-15a–miR-16-1 cluster controls prostate cancer by targeting multiple oncogenic activities. *Nat. Med.* *14*, 1271–1277.
- Bouchie, A. (2013). First microRNA mimic enters clinic. *Nat. Biotechnol.* *31*, 577–577.
- Bouvet, D. (2003). Études structurales de la stabilité en solution de complexes de platine anticancéreux.
- Boyden, L.M., Mao, J., Belsky, J., Mitzner, L., Farhi, A., Mitnick, M.A., Wu, D., Insogna, K., and Lifton, R.P. (2002). High Bone Density Due to a Mutation in LDL-Receptor–Related Protein 5. *N. Engl. J. Med.* *346*, 1513–1521.
- Braun, J.E., Huntzinger, E., and Izaurralde, E. (2012). A Molecular Link between miRISCs and Deadenylases Provides New Insight into the Mechanism of Gene Silencing by MicroRNAs. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *4*, a012328.

- Braza-Boïls, A., Marí-Alexandre, J., Gilabert, J., Sánchez-Izquierdo, D., España, F., Estellés, A., and Gilabert-Estellés, J. (2014). MicroRNA expression profile in endometriosis: its relation to angiogenesis and fibrinolytic factors. *Hum. Reprod.* *29*, 978–988.
- Brembeck, F.H., Schwarz-Romond, T., Bakkers, J., Wilhelm, S., Hammerschmidt, M., and Birchmeier, W. (2004). Essential role of BCL9-2 in the switch between β -catenin's adhesive and transcriptional functions. *Genes Dev.* *18*, 2225–2230.
- Brennecke, J., Stark, A., Russell, R.B., and Cohen, S.M. (2005). Principles of MicroRNA–Target Recognition. *PLOS Biol* *3*, e85.
- Breuhahn, K., Longerich, T., and Schirmacher, P. (2006). Dysregulation of growth factor signaling in human hepatocellular carcinoma. *Oncogene* *25*, 3787–3800.
- Broderick, J.A., and Zamore, P.D. (2011). MicroRNA therapeutics. *Gene Ther.* *18*, 1104–1110.
- Brown, B.D., and Naldini, L. (2009). Exploiting and antagonizing microRNA regulation for therapeutic and experimental applications. *Nat. Rev. Genet.* *10*, 578–585.
- Brown, K.M., Chu, C., and Rana, T.M. (2005). Target accessibility dictates the potency of human RISC. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *12*, 469–470.
- Brueckner, B., Stresemann, C., Kuner, R., Mund, C., Musch, T., Meister, M., Sultmann, H., and Lyko, F. (2007). The Human let-7a-3 Locus Contains an Epigenetically Regulated MicroRNA Gene with Oncogenic Function. *Cancer Res.* *67*, 1419–1423.
- Buendia, M.A. (2014). Unravelling the genetics of hepatoblastoma: Few mutations, what else? *J. Hepatol.* *61*, 1202–1204.
- Cai, X., Hagedorn, C.H., and Cullen, B.R. (2004). Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA N. Y. N* *10*, 1957–1966.
- Cairo, S., Armengol, C., De Reyniès, A., Wei, Y., Thomas, E., Renard, C.-A., Goga, A., Balakrishnan, A., Semeraro, M., Gresh, L., et al. (2008). Hepatic Stem-like Phenotype and Interplay of Wnt/ β -Catenin and Myc Signaling in Aggressive Childhood Liver Cancer. *Cancer Cell* *14*, 471–484.
- Cairo, S., Wang, Y., de Reyniès, A., Duroire, K., Dahan, J., Redon, M.-J., Fabre, M., McClelland, M., Wang, X.W., Croce, C.M., et al. (2010). Stem cell-like micro-RNA signature driven by Myc in aggressive liver cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107*, 20471–20476.
- Calin, G.A., and Croce, C.M. (2006). MicroRNA signatures in human cancers. *Nat. Rev. Cancer* *6*, 857–866.
- Calin, G.A., Dumitru, C.D., Shimizu, M., Bichi, R., Zupo, S., Noch, E., Aldler, H., Rattan, S., Keating, M., Rai, K., et al. (2002). Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *99*, 15524–15529.
- Calin, G.A., Sevignani, C., Dumitru, C.D., Hyslop, T., Noch, E., Yendamuri, S., Shimizu, M., Rattan, S., Bullrich, F., Negrini, M., et al. (2004). Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 2999–3004.
- Callegari, E., Gramantieri, L., Domenicali, M., D'Abundo, L., Sabbioni, S., and Negrini, M. (2015). MicroRNAs in liver cancer: a model for investigating pathogenesis and novel therapeutic approaches. *Cell Death Differ.* *22*, 46–57.

- Capurro, M.I., Xu, P., Shi, W., Li, F., Jia, A., and Filmus, J. (2008). Glypican-3 Inhibits Hedgehog Signaling during Development by Competing with Patched for Hedgehog Binding. *Dev. Cell* 14, 700–711.
- Carmell, M.A., Xuan, Z., Zhang, M.Q., and Hannon, G.J. (2002). The Argonaute family: tentacles that reach into RNAi, developmental control, stem cell maintenance, and tumorigenesis. *Genes Dev.* 16, 2733–2742.
- Chan, J.A., Krichevsky, A.M., and Kosik, K.S. (2005). MicroRNA-21 Is an Antiapoptotic Factor in Human Glioblastoma Cells. *Cancer Res.* 65, 6029–6033.
- Chang, H., Kim, N., Park, J.H., Nam, R.H., Choi, Y.J., Lee, H.S., Yoon, H., Shin, C.M., Park, Y.S., Kim, J.M., et al. (2015). Different MicroRNA Expression Levels in Gastric Cancer Depending on *Helicobacter pylori* Infection. *Gut Liver* 9, 188–196.
- Chen, B., Dodge, M.E., Tang, W., Lu, J., Ma, Z., Fan, C.-W., Wei, S., Hao, W., Kilgore, J., Williams, N.S., et al. (2009a). Small molecule-mediated disruption of Wnt-dependent signaling in tissue regeneration and cancer. *Nat. Chem. Biol.* 5, 100–107.
- Chen, F., Zhao, X., Peng, J., Bo, L., Fan, B., and Ma, D. (2014). Integrated microRNA-mRNA analysis of coronary artery disease. *Mol. Biol. Rep.* 41, 5505–5511.
- Chen, T.T.-L., Rakheja, D., Hung, J.Y., Hornsby, P.J., Tabaczewski, P., Malogolowkin, M., Feusner, J., Miskevich, F., Schultz, R., and Tomlinson, G.E. (2009b). Establishment and characterization of a cancer cell line derived from an aggressive childhood liver tumor. *Pediatr. Blood Cancer* 53, 1040–1047.
- Chen, Y., Gao, D.-Y., and Huang, L. (2015). In vivo delivery of miRNAs for cancer therapy: Challenges and strategies. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 81, 128–141.
- Choi, S.Y.C., Lin, D., Gout, P.W., Collins, C.C., Xu, Y., and Wang, Y. (2014). Lessons from patient-derived xenografts for better in vitro modeling of human cancer. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 79–80, 222–237.
- Chong, M.M.W., Zhang, G., Cheloufi, S., Neubert, T.A., Hannon, G.J., and Littman, D.R. (2010). Canonical and alternate functions of the microRNA biogenesis machinery. *Genes Dev.* 24, 1951–1960.
- Christodoulides, C., Scarda, A., Granzotto, M., Milan, G., Nora, E., Keogh, J., Pergola, G., Stirling, H., Pannacciulli, N., Sethi, J.K., et al. (2006). WNT10B mutations in human obesity. *Diabetologia* 49, 678–684.
- Chu, C., and Rana, T.M. (2006). Translation Repression in Human Cells by MicroRNA-Induced Gene Silencing Requires RCK/p54. *PLOS Biol* 4, e210.
- Ciafrè, S.A., Galardi, S., Mangiola, A., Ferracin, M., Liu, C.-G., Sabatino, G., Negrini, M., Maira, G., Croce, C.M., and Farace, M.G. (2005). Extensive modulation of a set of microRNAs in primary glioblastoma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 334, 1351–1358.
- Cimmino, A., Calin, G.A., Fabbri, M., Iorio, M.V., Ferracin, M., Shimizu, M., Wojcik, S.E., Aqeilan, R.I., Zupo, S., Dono, M., et al. (2005). miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102, 13944–13949.
- Cohen, MM Jr (2005). Beckwith-Wiedemann Syndrome: Historical, Clinicopathological, and Etiopathogenetic Perspectives. *Pediatr. Dev. Pathol.* 8, 287–304.
- Cole, K.A., Attiyeh, E.F., Mosse, Y.P., Laquaglia, M.J., Diskin, S.J., Brodeur, G.M., and Maris, J.M. (2008). A Functional Screen Identifies miR-34a as a Candidate Neuroblastoma Tumor Suppressor Gene. *Mol. Cancer Res.* 6, 735–742.

- Cong, F., and Varmus, H. (2004). Nuclear-cytoplasmic shuttling of Axin regulates subcellular localization of β -catenin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 2882–2887.
- Connolly, E., Melegari, M., Landgraf, P., Tchaikovskaya, T., Tennant, B.C., Slagle, B.L., Rogler, L.E., Zavolan, M., Tuschl, T., and Rogler, C.E. (2008). Elevated Expression of the miR-17–92 Polycistron and miR-21 in Hepadnavirus-Associated Hepatocellular Carcinoma Contributes to the Malignant Phenotype. *Am. J. Pathol.* *173*, 856–864.
- Cordes, K.R., Sheehy, N.T., White, M.P., Berry, E.C., Morton, S.U., Muth, A.N., Lee, T.-H., Miano, J.M., Ivey, K.N., and Srivastava, D. (2009). miR-145 and miR-143 regulate smooth muscle cell fate and plasticity. *Nature* *460*, 705–710.
- Corney, D.C., Flesken-Nikitin, A., Godwin, A.K., Wang, W., and Nikitin, A.Y. (2007). MicroRNA-34b and MicroRNA-34c Are Targets of p53 and Cooperate in Control of Cell Proliferation and Adhesion-Independent Growth. *Cancer Res.* *67*, 8433–8438.
- de la Coste, A., Romagnolo, B., Billuart, P., Renard, C.-A., Buendia, M.-A., Soubrane, O., Fabre, M., Chelly, J., Beldjord, C., Kahn, A., et al. (1998). Somatic mutations of the β -catenin gene are frequent in mouse and human hepatocellular carcinomas. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *95*, 8847–8851.
- Cui, H., Hu, B., Li, T., Ma, J., Alam, G., Gunning, W.T., and Ding, H.-F. (2007). Bmi-1 Is Essential for the Tumorigenicity of Neuroblastoma Cells. *Am. J. Pathol.* *170*, 1370–1378.
- Cummins, J.M., He, Y., Leary, R.J., Pagliarini, R., Diaz, L.A., Sjoblom, T., Barad, O., Bentwich, Z., Szafranska, A.E., Labourier, E., et al. (2006). The colorectal microRNAome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *103*, 3687–3692.
- Czauderna, P., Lopez-Terrada, D., Hiyama, E., Häberle, B., Malogolowkin, M.H., and Meyers, R.L. (2014). Hepatoblastoma state of the art: pathology, genetics, risk stratification, and chemotherapy. *Curr. Opin. Pediatr.* *26*, 19–28.
- Czauderna, P., Haeberle, B., Hiyama, E., Rangaswami, A., Krailo, M., Maibach, R., Rinaldi, E., Feng, Y., Aronson, D., Malogolowkin, M., et al. (2016). The Children’s Hepatic tumors International Collaboration (CHIC): Novel global rare tumor database yields new prognostic factors in hepatoblastoma and becomes a research model. *Eur. J. Cancer* *52*, 92–101.
- Dahiya, N., Sherman-Baust, C.A., Wang, T.-L., Davidson, B., Shih, I.-M., Zhang, Y., Iii, W.W., Becker, K.G., and Morin, P.J. (2008). MicroRNA Expression and Identification of Putative miRNA Targets in Ovarian Cancer. *PLOS ONE* *3*, e2436.
- Daige, C., Priddy, L., Kelnar, K., Zhao, J., Dysart, S., Bader, A., and Brown, D. (2011). The development of a miRNA-based therapeutic candidate for hepatocellular carcinoma. (San Francisco, CA).
- Dangi-Garimella, S., Yun, J., Eves, E.M., Newman, M., Erkeland, S.J., Hammond, S.M., Minn, A.J., and Rosner, M.R. (2009). Raf kinase inhibitory protein suppresses a metastasis signalling cascade involving LIN28 and let-7. *EMBO J.* *28*, 347–358.
- Davis, B.N., Hilyard, A.C., Lagna, G., and Hata, A. (2008). SMAD proteins control DROSHA-mediated microRNA maturation. *Nature* *454*, 56–61.
- Denli, A.M., Tops, B.B.J., Plasterk, R.H.A., Ketting, R.F., and Hannon, G.J. (2004). Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature* *432*, 231–235.
- Derrien, T., Johnson, R., Bussotti, G., Tanzer, A., Djebali, S., Tilgner, H., Guernec, G., Martin, D., Merkel, A., Knowles, D.G., et al. (2012). The GENCODE v7 catalog of human long noncoding RNAs: Analysis of their gene structure, evolution, and expression. *Genome Res.* *22*, 1775–1789.

- Desdouets, C., Fabre, M., Gauthier, F., Bréchet, C., and Sobczak-Thépot, J. (1995). Proliferation and differentiation of a human hepatoblastoma transplanted in the Nude mouse. *J. Hepatol.* *23*, 569–577.
- Di Leva, G., Gasparini, P., Piovan, C., Ngankeu, A., Garofalo, M., Taccioli, C., Iorio, M.V., Li, M., Volinia, S., Alder, H., et al. (2010). MicroRNA Cluster 221-222 and Estrogen Receptor α Interactions in Breast Cancer. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* *102*, 706–721.
- Di Leva, G., Garofalo, M., and Croce, C.M. (2013). microRNAs in cancer. *Annu. Rev. Pathol.* *9*, 287–314.
- Doench, J.G., and Sharp, P.A. (2004). Specificity of microRNA target selection in translational repression. *Genes Dev.* *18*, 504–511.
- Doi, I. (1976). Establishment of a cell line and its clonal sublines from a patient with hepatoblastoma. *Gan* *67*, 1–10.
- Dueck, A., Ziegler, C., Eichner, A., Berezikov, E., and Meister, G. (2012). microRNAs associated with the different human Argonaute proteins. *Nucleic Acids Res.* *40*, 9850–9862.
- D’Uva, G., Bertoni, S., Lauriola, M., Carolis, S.D., Pacilli, A., D’Anello, L., Santini, D., Taffurelli, M., Ceccarelli, C., Yarden, Y., et al. (2013). Beta-Catenin/HuR Post-Transcriptional Machinery Governs Cancer Stem Cell Features in Response to Hypoxia. *PLOS ONE* *8*, e80742.
- Dweep, H., and Gretz, N. (2015). miRWalk2.0: a comprehensive atlas of microRNA-target interactions. *Nat. Methods* *12*, 697–697.
- Ebert, M.S., Neilson, J.R., and Sharp, P.A. (2007). MicroRNA sponges: competitive inhibitors of small RNAs in mammalian cells. *Nat. Methods* *4*, 721–726.
- Eichenmüller, M., Gruner, I., Hagl, B., Häberle, B., Müller-Höcker, J., von Schweinitz, D., and Kappler, R. (2009). Blocking the hedgehog pathway inhibits hepatoblastoma growth. *Hepatology* *49*, 482–490.
- Eichenmüller, M., Trippel, F., Kreuder, M., Beck, A., Schwarzmayr, T., Häberle, B., Cairo, S., Leuschner, I., von Schweinitz, D., Strom, T.M., et al. (2014). The genomic landscape of hepatoblastoma and their progenies with HCC-like features. *J. Hepatol.* *61*, 1312–1320.
- Eicher, C., Dewerth, A., Thomale, J., Ellerkamp, V., Hildenbrand, S., Warmann, S.W., Fuchs, J., and Armeanu-Ebinger, S. (2013). Effect of sorafenib combined with cytostatic agents on hepatoblastoma cell lines and xenografts. *Br. J. Cancer* *108*, 334–341.
- Eichhorn, S.W., Guo, H., McGeary, S.E., Rodriguez-Mias, R.A., Shin, C., Baek, D., Hsu, S., Ghoshal, K., Villén, J., and Bartel, D.P. (2014). mRNA Destabilization Is the Dominant Effect of Mammalian MicroRNAs by the Time Substantial Repression Ensues. *Mol. Cell* *56*, 104–115.
- Ellerkamp, V., Armeanu-Ebinger, S., Wenz, J., Warmann, S.W., Schäfer, J., Ruck, P., and Fuchs, J. (2011). Successful Establishment of an Orthotopic Hepatoblastoma In Vivo Model in NOD/LtSz-scid IL2R γ null Mice. *PLOS ONE* *6*, e23419.
- Elmén, J., Lindow, M., Silahtaroglu, A., Bak, M., Christensen, M., Lind-Thomsen, A., Hedtjærn, M., Hansen, J.B., Hansen, H.F., Straarup, E.M., et al. (2008a). Antagonism of microRNA-122 in mice by systemically administered LNA-antimiR leads to up-regulation of a large set of predicted target mRNAs in the liver. *Nucleic Acids Res.* *36*, 1153–1162.
- Elmén, J., Lindow, M., Schütz, S., Lawrence, M., Petri, A., Obad, S., Lindholm, M., Hedtjærn, M., Hansen, H.F., Berger, U., et al. (2008b). LNA-mediated microRNA silencing in non-human primates. *Nature* *452*, 896–899.

- Emami, K.H., Nguyen, C., Ma, H., Kim, D.H., Jeong, K.W., Eguchi, M., Moon, R.T., Teo, J.-L., Oh, S.W., Kim, H.Y., et al. (2004). A small molecule inhibitor of β -catenin/cyclic AMP response element-binding protein transcription. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 12682–12687.
- Engelman, J.A., Luo, J., and Cantley, L.C. (2006). The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. *Nat. Rev. Genet.* *7*, 606–619.
- Enright, A.J., John, B., Gaul, U., Tuschl, T., Sander, C., and Marks, D.S. (2004). MicroRNA targets in *Drosophila*. *Genome Biol.* *5*, R1.
- Epis, M.R., Barker, A., Giles, K.M., Beveridge, D.J., and Leedman, P.J. (2011). The RNA-binding Protein HuR Opposes the Repression of ERBB-2 Gene Expression by MicroRNA miR-331-3p in Prostate Cancer Cells. *J. Biol. Chem.* *286*, 41442–41454.
- Esteller, M. (2008). Epigenetics in Cancer. *N. Engl. J. Med.* *358*, 1148–1159.
- Eulalio, A., Rehwinkel, J., Stricker, M., Huntzinger, E., Yang, S.-F., Doerks, T., Dorner, S., Bork, P., Boutros, M., and Izaurralde, E. (2007a). Target-specific requirements for enhancers of decapping in miRNA-mediated gene silencing. *Genes Dev.* *21*, 2558–2570.
- Eulalio, A., Behm-Ansmant, I., and Izaurralde, E. (2007b). P bodies: at the crossroads of post-transcriptional pathways. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *8*, 9–22.
- Fabian, M.R., Sonenberg, N., and Filipowicz, W. (2010). Regulation of mRNA Translation and Stability by microRNAs. *Annu. Rev. Biochem.* *79*, 351–379.
- Fabian, M.R., Cieplak, M.K., Frank, F., Morita, M., Green, J., Srikumar, T., Nagar, B., Yamamoto, T., Raught, B., Duchaine, T.F., et al. (2011). miRNA-mediated deadenylation is orchestrated by GW182 through two conserved motifs that interact with CCR4–NOT. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *18*, 1211–1217.
- Felicetti, F., Errico, M.C., Bottero, L., Segnalini, P., Stoppacciaro, A., Biffoni, M., Felli, N., Mattia, G., Petrini, M., Colombo, M.P., et al. (2008). The Promyelocytic Leukemia Zinc Finger–MicroRNA-221/-222 Pathway Controls Melanoma Progression through Multiple Oncogenic Mechanisms. *Cancer Res.* *68*, 2745–2754.
- Felli, N., Fontana, L., Pelosi, E., Botta, R., Bonci, D., Facchiano, F., Liuzzi, F., Lulli, V., Morsilli, O., Santoro, S., et al. (2005). MicroRNAs 221 and 222 inhibit normal erythropoiesis and erythroleukemic cell growth via kit receptor down-modulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *102*, 18081–18086.
- Flynt, A.S., Greimann, J.C., Chung, W.-J., Lima, C.D., and Lai, E.C. (2010). MicroRNA Biogenesis via Splicing and Exosome-Mediated Trimming in *Drosophila*. *Mol. Cell* *38*, 900–907.
- Fornari, F., Gramantieri, L., Ferracin, M., Veronese, A., Sabbioni, S., Calin, G.A., Grazi, G.L., Giovannini, C., Croce, C.M., Bolondi, L., et al. (2008). MiR-221 controls CDKN1C/p57 and CDKN1B/p27 expression in human hepatocellular carcinoma. *Oncogene* *27*, 5651–5661.
- Friedman, R.C., Farh, K.K.-H., Burge, C.B., and Bartel, D.P. (2009). Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res.* *19*, 92–105.
- von Frowein, J., Pagel, P., Kappler, R., von Schweinitz, D., Roscher, A., and Schmid, I. (2011). MicroRNA-492 is processed from the keratin 19 gene and up-regulated in metastatic hepatoblastoma. *Hepatology* *53*, 833–842.

- Fuchs, J., Schmidt, D., Pietsch, T., Miller, K., and von Schweinitz, D. (1996). Successful transplantation of human hepatoblastoma into immunodeficient mice. *J. Pediatr. Surg.* *31*, 1241–1246.
- Fujimoto, A., Totoki, Y., Abe, T., Boroevich, K.A., Hosoda, F., Nguyen, H.H., Aoki, M., Hosono, N., Kubo, M., Miya, F., et al. (2012). Whole-genome sequencing of liver cancers identifies etiological influences on mutation patterns and recurrent mutations in chromatin regulators. *Nat. Genet.* *44*, 760–764.
- Fukuda, T., Yamagata, K., Fujiyama, S., Matsumoto, T., Koshida, I., Yoshimura, K., Mihara, M., Naitou, M., Endoh, H., Nakamura, T., et al. (2007). DEAD-box RNA helicase subunits of the Drosha complex are required for processing of rRNA and a subset of microRNAs. *Nat. Cell Biol.* *9*, 604–611.
- Gaidatzis, D., van Nimwegen, E., Hausser, J., and Zavolan, M. (2007). Inference of miRNA targets using evolutionary conservation and pathway analysis. *BMC Bioinformatics* *8*, 69.
- Garber, J.E., Li, F.P., Kingston, J.E., Krush, A.J., Strong, L.C., Finegold, M.J., Bertario, L., BÜlow, S., Filippone, A., Gedde-Dahl, T., et al. (1988). Hepatoblastoma and Familial Adenomatous Polyposis. *J. Natl. Cancer Inst.* *80*, 1626–1628.
- Garofalo, M., Quintavalle, C., Romano, G., Croce, C.M., and Condorelli, G. (2012). miR221/222 in Cancer: Their Role in Tumor Progression and Response to Therapy. *Curr. Mol. Med.* *12*, 27–33.
- Garzon, R., Heaphy, C.E.A., Havelange, V., Fabbri, M., Volinia, S., Tsao, T., Zanesi, N., Kornblau, S.M., Marcucci, G., Calin, G.A., et al. (2009). MicroRNA 29b functions in acute myeloid leukemia. *Blood* *114*, 5331–5341.
- Garzon, R., Marcucci, G., and Croce, C.M. (2010). Targeting microRNAs in cancer: rationale, strategies and challenges. *Nat. Rev. Drug Discov.* *9*, 775–789.
- Glorian, V., Maillot, G., Polès, S., Iacovoni, J.S., Favre, G., and Vagner, S. (2011). HuR-dependent loading of miRNA RISC to the mRNA encoding the Ras-related small GTPase RhoB controls its translation during UV-induced apoptosis. *Cell Death Differ.* *18*, 1692–1701.
- Gong, Y., Slee, R.B., Fukai, N., Rawadi, G., Roman-Roman, S., Reginato, A.M., Wang, H., Cundy, T., Glorieux, F.H., Lev, D., et al. (2001). LDL Receptor-Related Protein 5 (LRP5) Affects Bone Accrual and Eye Development. *Cell* *107*, 513–523.
- Goren, I., Lee, S.-Y., Maucher, D., Nüsing, R., Schlich, T., Pfeilschifter, J., and Frank, S. (2015). Inhibition of cyclooxygenase-1 and -2 activity in keratinocytes inhibits PGE2 formation and impairs vascular endothelial growth factor release and neovascularisation in skin wounds. *Int. Wound J.* n/a-n/a.
- Gottardi, C.J., and Gumbiner, B.M. (2004). Distinct molecular forms of β -catenin are targeted to adhesive or transcriptional complexes. *J. Cell Biol.* *167*, 339–349.
- Gougelet, A., Sartor, C., Bachelot, L., Godard, C., Marchiol, C., Renault, G., Tores, F., Nitschke, P., Cavard, C., Terris, B., et al. (2016). Antitumour activity of an inhibitor of miR-34a in liver cancer with β -catenin-mutations. *Gut* *65*, 1024–1034.
- Gray, S.G., Eriksson, T., Ekström, C., Holm, S., Schweinitz, D. von, Kogner, P., Sandstedt, B., Pietsch, T., and Ekstöm, T.J. (2000). Altered expression of members of the IGF-axis in hepatoblastomas. *Br. J. Cancer* *82*, 1561–1567.

- Gregory, R.I., Yan, K., Amuthan, G., Chendrimada, T., Doratotaj, B., Cooch, N., and Shiekhattar, R. (2004). The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature* 432, 235–240.
- Griffiths-Jones, S., Saini, H.K., Dongen, S. van, and Enright, A.J. (2008). miRBase: tools for microRNA genomics. *Nucleic Acids Res.* 36, D154–D158.
- Grimson, A., Farh, K.K.-H., Johnston, W.K., Garrett-Engele, P., Lim, L.P., and Bartel, D.P. (2007). MicroRNA Targeting Specificity in Mammals: Determinants beyond Seed Pairing. *Mol. Cell* 27, 91–105.
- Gu, Y., Zhang, Y., Zhao, C., Pan, Y., Smales, R., Wang, H., Ni, Y., Zhang, H., Ni, J., Ma, J., et al. (2014). Serum microRNAs as potential biomarkers of mandibular prognathism. *Oral Dis.* 20, 55–61.
- Guan, X., Liu, Z., Liu, H., Yu, H., Wang, L.-E., Sturgis, E.M., Li, G., and Wei, Q. (2013). A functional variant at the miR-885-5p binding site of CASP3 confers risk of both index and second primary malignancies in patients with head and neck cancer. *FASEB J.* 27, 1404–1412.
- Gui, J., Tian, Y., Wen, X., Zhang, W., Zhang, P., Gao, J., Run, W., Tian, L., Jia, X., and Gao, Y. (2011). Serum microRNA characterization identifies miR-885-5p as a potential marker for detecting liver pathologies. *Clin. Sci.* 120, 183–193.
- Guichard, C., Amaddeo, G., Imbeaud, S., Ladeiro, Y., Pelletier, L., Maad, I.B., Calderaro, J., Bioulac-Sage, P., Letexier, M., Degos, F., et al. (2012). Integrated analysis of somatic mutations and focal copy-number changes identifies key genes and pathways in hepatocellular carcinoma. *Nat. Genet.* 44, 694–698.
- Guil, S., and Esteller, M. (2009). DNA methylomes, histone codes and miRNAs: Tying it all together. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 41, 87–95.
- Gumireddy, K., Young, D.D., Xiong, X., Hogenesch, J.B., Huang, Q., and Deiters, A. (2008). Small Molecule Inhibitors of MicroRNA miR-21 Function. *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* 47, 7482–7484.
- Guo, B., Zhai, D., Cabezas, E., Welsh, K., Nouraini, S., Satterthwait, A.C., and Reed, J.C. (2003). Humanin peptide suppresses apoptosis by interfering with Bax activation. *Nature* 423, 456–461.
- Guo, X., Liao, Q., Chen, P., Li, X., Xiong, W., Ma, J., Li, X., Luo, Z., Tang, H., Deng, M., et al. (2011). The microRNA-processing enzymes: Drosha and Dicer can predict prognosis of nasopharyngeal carcinoma. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 138, 49–56.
- Guo, Y., Chen, Y., Ito, H., Watanabe, A., Ge, X., Kodama, T., and Aburatani, H. (2006). Identification and characterization of lin-28 homolog B (LIN28B) in human hepatocellular carcinoma. *Gene* 384, 51–61.
- Guo, Y., Tian, P., Yang, C., Liang, Z., Li, M., Sims, M., Lu, L., Zhang, Z., Li, H., Pfeffer, L.M., et al. (2013). Silencing the Double-Stranded RNA Binding Protein DGCR8 Inhibits Ovarian Cancer Cell Proliferation, Migration, and Invasion. *Pharm. Res.* 32, 769–778.
- Gupta, R.A., and DuBois, R.N. (2001). Colorectal cancer prevention and treatment by inhibition of cyclooxygenase-2. *Nat. Rev. Cancer* 1, 11–21.
- Gupta, A.A., Gerstle, J.T., Ng, V., Wong, A., Fecteau, A., Malogolowkin, M.H., Meyers, R.L., Grant, D., and Grant, R.M. (2011). Critical review of controversial issues in the management of advanced pediatric liver tumors. *Pediatr. Blood Cancer* 56, 1013–1018.

- Gyugos, M., Lendvai, G., Kenessey, I., Schlachter, K., Halász, J., Nagy, P., Garami, M., Jakab, Z., Schaff, Z., and Kiss, A. (2014). microRNA expression might predict prognosis of epithelial hepatoblastoma. *Virchows Arch.* *464*, 419–427.
- Ha, M., and Kim, V.N. (2014). Regulation of microRNA biogenesis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *15*, 509–524.
- Han, J., Lee, Y., Yeom, K.-H., Kim, Y.-K., Jin, H., and Kim, V.N. (2004). The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes Dev.* *18*, 3016–3027.
- Han, J., Lee, Y., Yeom, K.-H., Nam, J.-W., Heo, I., Rhee, J.-K., Sohn, S.Y., Cho, Y., Zhang, B.-T., and Kim, V.N. (2006). Molecular Basis for the Recognition of Primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 Complex. *Cell* *125*, 887–901.
- Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* *144*, 646–674.
- Hansen, T.B., Kjems, J., and Bramsen, J.B. (2011). Enhancing miRNA annotation confidence in miRBase by continuous cross dataset analysis. *RNA Biol.* *8*, 378–383.
- Harada, T., Matsuo, K., Kodama, S., Higashihara, H., Nakayama, Y., and Ikeda, S. (1995). Adult Hepatoblastoma: Case Report and Review of the Literature. *Aust. N. Z. J. Surg.* *65*, 686–688.
- Hashizume, K., Nakajo, T., Kawarasaki, H., Iwanaka, T., Kanamori, Y., Tanaka, K., Utuki, T., Mishina, J., and Watanabe, T. (1991). Prader-Willi syndrome with del(15)(q11,q13) associated with hepatoblastoma. *Acta Paediatr. Jpn. Overseas Ed.* *33*, 718–722.
- Hata, Y., Uchino, J., Sato, K., Sasaki, F., Une, Y., Naito, H., Manabe, K., Kuwahara, T., and Kasai, Y. (1982). Establishment of an experimental model of human hepatoblastoma. *Cancer* *50*, 97–101.
- Hayashita, Y., Osada, H., Tatematsu, Y., Yamada, H., Yanagisawa, K., Tomida, S., Yatabe, Y., Kawahara, K., Sekido, Y., and Takahashi, T. (2005). A Polycistronic MicroRNA Cluster, miR-17-92, Is Overexpressed in Human Lung Cancers and Enhances Cell Proliferation. *Cancer Res.* *65*, 9628–9632.
- He, B., You, L., Uematsu, K., Xu, Z., Lee, A.Y., Matsangou, M., McCormick, F., and Jablons, D.M. (2004). A Monoclonal Antibody against Wnt-1 Induces Apoptosis in Human Cancer Cells. *Neoplasia N. Y. N* *6*, 7–14.
- He, L., Thomson, J.M., Hemann, M.T., Hernando-Monge, E., Mu, D., Goodson, S., Powers, S., Cordon-Cardo, C., Lowe, S.W., Hannon, G.J., et al. (2005). A microRNA polycistron as a potential human oncogene. *Nature* *435*, 828–833.
- He, L., He, X., Lim, L.P., de Stanchina, E., Xuan, Z., Liang, Y., Xue, W., Zender, L., Magnus, J., Ridzon, D., et al. (2007). A microRNA component of the p53 tumour suppressor network. *Nature* *447*, 1130–1134.
- He, T.-C., Sparks, A.B., Rago, C., Hermeking, H., Zawel, L., Costa, L.T. da, Morin, P.J., Vogelstein, B., and Kinzler, K.W. (1998). Identification of c-MYC as a Target of the APC Pathway. *Science* *281*, 1509–1512.
- Helwak, A., Kudla, G., Dudnakova, T., and Tollervey, D. (2013). Mapping the Human miRNA Interactome by CLASH Reveals Frequent Noncanonical Binding. *Cell* *153*, 654–665.
- Hendrix, N.D., Wu, R., Kuick, R., Schwartz, D.R., Fearon, E.R., and Cho, K.R. (2006). Fibroblast Growth Factor 9 Has Oncogenic Activity and Is a Downstream Target of Wnt Signaling in Ovarian Endometrioid Adenocarcinomas. *Cancer Res.* *66*, 1354–1362.

- Heo, I., Joo, C., Kim, Y.-K., Ha, M., Yoon, M.-J., Cho, J., Yeom, K.-H., Han, J., and Kim, V.N. (2009). TUT4 in Concert with Lin28 Suppresses MicroRNA Biogenesis through Pre-MicroRNA Uridylation. *Cell* 138, 696–708.
- Heravi-Moussavi, A., Anglesio, M.S., Cheng, S.-W.G., Senz, J., Yang, W., Prentice, L., Fejes, A.P., Chow, C., Tone, A., Kalloger, S.E., et al. (2012). Recurrent Somatic DICER1 Mutations in Nonepithelial Ovarian Cancers. *N. Engl. J. Med.* 366, 234–242.
- Hidalgo, M., Amant, F., Biankin, A.V., Budinská, E., Byrne, A.T., Caldas, C., Clarke, R.B., Jong, S. de, Jonkers, J., Mælandsmo, G.M., et al. (2014). Patient-Derived Xenograft Models: An Emerging Platform for Translational Cancer Research. *Cancer Discov.* 4, 998–1013.
- Hinck, L., Näthke, I.S., Papkoff, J., and Nelson, W.J. (1994). Dynamics of cadherin/catenin complex formation: novel protein interactions and pathways of complex assembly. *J. Cell Biol.* 125, 1327–1340.
- Hishiki, T., Matsunaga, T., Sasaki, F., Yano, M., Ida, K., Horie, H., Kondo, S., Watanabe, K.-I., Oue, T., Tajiri, T., et al. (2010). Outcome of hepatoblastomas treated using the Japanese Study Group for Pediatric Liver Tumor (JPLT) protocol-2: report from the JPLT. *Pediatr. Surg. Int.* 27, 1–8.
- Hollstein, M., Sidransky, D., Vogelstein, B., and Harris, C.C. (1991). p53 mutations in human cancers. *Science* 253, 49–53.
- Hoshida, Y., Nijman, S.M.B., Kobayashi, M., Chan, J.A., Brunet, J.-P., Chiang, D.Y., Villanueva, A., Newell, P., Ikeda, K., Hashimoto, M., et al. (2009). Integrative Transcriptome Analysis Reveals Common Molecular Subclasses of Human Hepatocellular Carcinoma. *Cancer Res.* 69, 7385–7392.
- Huang, J., Wu, J., Li, Y., Li, X., Yang, T., Yang, Q., and Jiang, Y. (2014). Deregulation of Serum MicroRNA Expression Is Associated with Cigarette Smoking and Lung Cancer. *BioMed Res. Int.* 2014, e364316.
- Huber, A.H., and Weis, W.I. (2001). The Structure of the β -Catenin/E-Cadherin Complex and the Molecular Basis of Diverse Ligand Recognition by β -Catenin. *Cell* 105, 391–402.
- Huber, A.H., Nelson, W.J., and Weis, W.I. (1997). Three-Dimensional Structure of the Armadillo Repeat Region of β -Catenin. *Cell* 90, 871–882.
- Huntzinger, E., Braun, J.E., Heimstädt, S., Zekri, L., and Izaurralde, E. (2010). Two PABPC1-binding sites in GW182 proteins promote miRNA-mediated gene silencing. *EMBO J.* 29, 4146–4160.
- Huntzinger, E., Kuzuoğlu-Öztürk, D., Braun, J.E., Eulalio, A., Wohlbold, L., and Izaurralde, E. (2013). The interactions of GW182 proteins with PABP and deadenylases are required for both translational repression and degradation of miRNA targets. *Nucleic Acids Res.* 41, 978–994.
- Hutvagner, G., Simard, M.J., Mello, C.C., and Zamore, P.D. (2004). Sequence-Specific Inhibition of Small RNA Function. *PLoS Biol.* 2.
- Hwang, S.-Y., Deng, X., Byun, S., Lee, C., Lee, S.-J., Suh, H., Zhang, J., Kang, Q., Zhang, T., Westover, K.D., et al. (2016). Direct Targeting of β -Catenin by a Small Molecule Stimulates Proteasomal Degradation and Suppresses Oncogenic Wnt/ β -Catenin Signaling. *Cell Rep.* 16, 28–36.
- Ibrahim, A.F., Weirauch, U., Thomas, M., Grünweller, A., Hartmann, R.K., and Aigner, A. (2011). MicroRNA Replacement Therapy for miR-145 and miR-33a Is Efficacious in a Model of Colon Carcinoma. *Cancer Res.* 71, 5214–5224.

- Ikonen, M., Liu, B., Hashimoto, Y., Ma, L., Lee, K.-W., Niikura, T., Nishimoto, I., and Cohen, P. (2003). Interaction between the Alzheimer's survival peptide humanin and insulin-like growth factor-binding protein 3 regulates cell survival and apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *100*, 13042–13047.
- Ipsaro, J.J., and Joshua-Tor, L. (2015). From guide to target: molecular insights into eukaryotic RNA-interference machinery. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *22*, 20–28.
- Iwakawa, H., and Tomari, Y. (2015). The Functions of MicroRNAs: mRNA Decay and Translational Repression. *Trends Cell Biol.* *25*, 651–665.
- Jafarnejad, S.M., Sjoestroem, C., Martinka, M., and Li, G. (2013). Expression of the RNase III enzyme DROSHA is reduced during progression of human cutaneous melanoma. *Mod. Pathol.* *26*, 902–910.
- Jakubovic, B.D., and Jothy, S. (2007). Glypican-3: From the mutations of Simpson–Golabi–Behmel genetic syndrome to a tumor marker for hepatocellular carcinoma. *Exp. Mol. Pathol.* *82*, 184–189.
- Jalvy-Delvaile, S., Maurel, M., Majo, V., Pierre, N., Chabas, S., Combe, C., Rosenbaum, J., Saggiocco, F., and Grosset, C.F. (2012). Molecular basis of differential target regulation by miR-96 and miR-182: the Glypican-3 as a model. *Nucleic Acids Res.* *40*, 1356–1365.
- Janssen, H.L.A., Reesink, H.W., Lawitz, E.J., Zeuzem, S., Rodriguez-Torres, M., Patel, K., van der Meer, A.J., Patick, A.K., Chen, A., Zhou, Y., et al. (2013). Treatment of HCV Infection by Targeting MicroRNA. *N. Engl. J. Med.* *368*, 1685–1694.
- Javerzat, S., Franco, M., Herbert, J., Platonova, N., Peille, A.-L., Pantesco, V., Vos, J.D., Assou, S., Bicknell, R., Bikfalvi, A., et al. (2009). Correlating Global Gene Regulation to Angiogenesis in the Developing Chick Extra-Embryonic Vascular System. *PLOS ONE* *4*, e7856.
- Jho, E. -h., Zhang, T., Domon, C., Joo, C.-K., Freund, J.-N., and Costantini, F. (2002). Wnt/ -Catenin/Tcf Signaling Induces the Transcription of Axin2, a Negative Regulator of the Signaling Pathway. *Mol. Cell. Biol.* *22*, 1172–1183.
- Jia, D., Dong, R., Jing, Y., Xu, D., Wang, Q., Chen, L., Li, Q., Huang, Y., Zhang, Y., Zhang, Z., et al. (2014). Exome sequencing of hepatoblastoma reveals novel mutations and cancer genes in the Wnt pathway and ubiquitin ligase complex. *Hepatology* *60*, 1686–1696.
- Jinek, M., Fabian, M.R., Coyle, S.M., Sonenberg, N., and Doudna, J.A. (2010). Structural insights into the human GW182-PABC interaction in microRNA-mediated deadenylation. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *17*, 238–240.
- Johnson, S.M., Grosshans, H., Shingara, J., Byrom, M., Jarvis, R., Cheng, A., Labourier, E., Reinert, K.L., Brown, D., and Slack, F.J. (2005). RAS Is Regulated by the let-7 MicroRNA Family. *Cell* *120*, 635–647.
- Jopling, C.L., Yi, M., Lancaster, A.M., Lemon, S.M., and Sarnow, P. (2005). Modulation of Hepatitis C Virus RNA Abundance by a Liver-Specific MicroRNA. *Science* *309*, 1577–1581.
- Jopling, C.L., Schütz, S., and Sarnow, P. (2008). Position-Dependent Function for a Tandem MicroRNA miR-122-Binding Site Located in the Hepatitis C Virus RNA Genome. *Cell Host Microbe* *4*, 77–85.
- Kamada, S., Kikkawa, U., Tsujimoto, Y., and Hunter, T. (2005). Nuclear Translocation of Caspase-3 Is Dependent on Its Proteolytic Activation and Recognition of a Substrate-like Protein(s). *J. Biol. Chem.* *280*, 857–860.

- Kanazawa, A., Tsukada, S., Sekine, A., Tsunoda, T., Takahashi, A., Kashiwagi, A., Tanaka, Y., Babazono, T., Matsuda, M., Kaku, K., et al. (2004). Association of the Gene Encoding Wingless-Type Mammary Tumor Virus Integration-Site Family Member 5B (WNT5B) with Type 2 Diabetes. *Am. J. Hum. Genet.* *75*, 832–843.
- Karube, Y., Tanaka, H., Osada, H., Tomida, S., Tatematsu, Y., Yanagisawa, K., Yatabe, Y., Takamizawa, J., Miyoshi, S., Mitsudomi, T., et al. (2005). Reduced expression of Dicer associated with poor prognosis in lung cancer patients. *Cancer Sci.* *96*, 111–115.
- Kasahara, M., Ueda, M., Haga, H., Hiramatsu, H., Kobayashi, M., Adachi, S., Sakamoto, S., Oike, F., Egawa, H., Takada, Y., et al. (2005). Living-Donor Liver Transplantation for Hepatoblastoma. *Am. J. Transplant.* *5*, 2229–2235.
- Kertesz, M., Iovino, N., Unnerstall, U., Gaul, U., and Segal, E. (2007). The role of site accessibility in microRNA target recognition. *Nat. Genet.* *39*, 1278–1284.
- Khvorova, A., Reynolds, A., and Jayasena, S.D. (2003). Functional siRNAs and miRNAs Exhibit Strand Bias. *Cell* *115*, 209–216.
- Kim, V.N. (2005). MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *6*, 376–385.
- Kim, Y.-K., and Kim, V.N. (2007). Processing of intronic microRNAs. *EMBO J.* *26*, 775–783.
- Kim, B., Lee, J., Park, J.W., Kwon, T.K., Baek, S.K., Hwang, I., and Kim, S. (2013). An essential microRNA maturing microprocessor complex component DGCR8 is up-regulated in colorectal carcinomas. *Clin. Exp. Med.* *14*, 331–336.
- Kim, H.H., Kuwano, Y., Srikantan, S., Lee, E.K., Martindale, J.L., and Gorospe, M. (2009). HuR recruits let-7/RISC to repress c-Myc expression. *Genes Dev.* *23*, 1743–1748.
- Kim, I., Kwak, H., Lee, H.K., Hyun, S., and Jeong, S. (2012). β -Catenin recognizes a specific RNA motif in the cyclooxygenase-2 mRNA 3'-UTR and interacts with HuR in colon cancer cells. *Nucleic Acids Res.* *40*, 6863–6872.
- Kim, N.H., Kim, H.S., Kim, N.-G., Lee, I., Choi, H.-S., Li, X.-Y., Kang, S.E., Cha, S.Y., Ryu, J.K., Na, J.M., et al. (2011). p53 and MicroRNA-34 Are Suppressors of Canonical Wnt Signaling. *Sci Signal* *4*, ra71-ra71.
- Kinzler, K.W., Nilbert, M.C., Su, L.K., Vogelstein, B., Bryan, T.M., Levy, D.B., Smith, K.J., Preisinger, A.C., Hedge, P., McKechnie, D., et al. (1991). Identification of FAP locus genes from chromosome 5q21. *Science* *253*, 661–665.
- Kisker, O., Onizuka, S., Banyard, J., Komiyama, T., Becker, C.M., Achilles, E.G., Barnes, C.M., O'Reilly, M.S., Folkman, J., and Pirie-Shepherd, S.R. (2001). Generation of Multiple Angiogenesis Inhibitors by Human Pancreatic Cancer. *Cancer Res.* *61*, 7298–7304.
- Koch, A., Denkhaus, D., Albrecht, S., Leuschner, I., Schweinitz, D. von, and Pietsch, T. (1999). Childhood Hepatoblastomas Frequently Carry a Mutated Degradation Targeting Box of the β -Catenin Gene. *Cancer Res.* *59*, 269–273.
- Kopic, S., Eirich, K., Schuster, B., Hanenberg, H., Varon-Mateeva, R., Rittinger, O., Schimpl, G., Schindler, D., and Jones, N. (2011). Hepatoblastoma in a 4-year-old girl with Fanconi anaemia. *Acta Paediatr.* *100*, 780–783.
- Korinek, V., Barker, N., Morin, P.J., Wichen, D. van, Weger, R. de, Kinzler, K.W., Vogelstein, B., and Clevers, H. (1997). Constitutive Transcriptional Activation by a β -Catenin-Tcf Complex in APC^{-/-} Colon Carcinoma. *Science* *275*, 1784–1787.

- Korinek, V., Barker, N., Moerer, P., van Donselaar, E., Huls, G., Peters, P.J., and Clevers, H. (1998). Depletion of epithelial stem-cell compartments in the small intestine of mice lacking Tcf-4. *Nat. Genet.* *19*, 379–383.
- Kosaki, R., Takenouchi, T., Takeda, N., Kagami, M., Nakabayashi, K., Hata, K., and Kosaki, K. (2014). Somatic CTNNB1 mutation in hepatoblastoma from a patient with Simpson-Golabi-Behmel syndrome and germline GPC3 mutation. *Am. J. Med. Genet. A.* *164A*, 993–997.
- Kota, J., Chivukula, R.R., O'Donnell, K.A., Wentzel, E.A., Montgomery, C.L., Hwang, H.-W., Chang, T.-C., Vivekanandan, P., Torbenson, M., Clark, K.R., et al. (2009). Therapeutic microRNA Delivery Suppresses Tumorigenesis in a Murine Liver Cancer Model. *Cell* *137*, 1005–1017.
- Kozaki, K., Imoto, I., Mogi, S., Omura, K., and Inazawa, J. (2008). Exploration of Tumor-Suppressive MicroRNAs Silenced by DNA Hypermethylation in Oral Cancer. *Cancer Res.* *68*, 2094–2105.
- Kozomara, A., and Griffiths-Jones, S. (2014). miRBase: annotating high confidence microRNAs using deep sequencing data. *Nucleic Acids Res.* *42*, D68–D73.
- Kramps, T., Peter, O., Brunner, E., Nellen, D., Froesch, B., Chatterjee, S., Murone, M., Züllig, S., and Basler, K. (2002). Wnt/Wingless Signaling Requires BCL9/Legless-Mediated Recruitment of Pygopus to the Nuclear β -Catenin-TCF Complex. *Cell* *109*, 47–60.
- Krek, A., Grün, D., Poy, M.N., Wolf, R., Rosenberg, L., Epstein, E.J., MacMenamin, P., da Piedade, I., Gunsalus, K.C., Stoffel, M., et al. (2005). Combinatorial microRNA target predictions. *Nat. Genet.* *37*, 495–500.
- Krol, J., Loedige, I., and Filipowicz, W. (2010). The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nat. Rev. Genet.* *11*, 597–610.
- Krützfeldt, J., Rajewsky, N., Braich, R., Rajeev, K.G., Tuschl, T., Manoharan, M., and Stoffel, M. (2005). Silencing of microRNAs in vivo with “antagomirs.” *Nature* *438*, 685–689.
- Kumar, M.S., Lu, J., Mercer, K.L., Golub, T.R., and Jacks, T. (2007). Impaired microRNA processing enhances cellular transformation and tumorigenesis. *Nat. Genet.* *39*, 673–677.
- Kumar, M.S., Pester, R.E., Chen, C.Y., Lane, K., Chin, C., Lu, J., Kirsch, D.G., Golub, T.R., and Jacks, T. (2009). Dicer1 functions as a haploinsufficient tumor suppressor. *Genes Dev.* *23*, 2700–2704.
- Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Lendeckel, W., and Tuschl, T. (2001). Identification of Novel Genes Coding for Small Expressed RNAs. *Science* *294*, 853–858.
- Laloo, B., Simon, D., Veillat, V., Lauzel, D., Guyonnet-Duperat, V., Moreau-Gaudry, F., Saggiocco, F., and Grosset, C. (2009). Analysis of Post-transcriptional Regulations by a Functional, Integrated, and Quantitative Method. *Mol. Cell. Proteomics* *8*, 1777–1788.
- Lambertz, I., Nittner, D., Mestdagh, P., Denecker, G., Vandesompele, J., Dyer, M.A., and Marine, J.-C. (2010). Monoallelic but not biallelic loss of Dicer1 promotes tumorigenesis in vivo. *Cell Death Differ.* *17*, 633–641.
- Laperche, Y. (2003). Oval cells and liver regeneration. *Médecine Sci.* *MS 19*, 697–698.
- Lau, N.C., Lim, L.P., Weinstein, E.G., and Bartel, D.P. (2001). An Abundant Class of Tiny RNAs with Probable Regulatory Roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science* *294*, 858–862.
- Laurent-Puig, P., and Zucman-Rossi, J. (2006). Genetics of hepatocellular tumors. *Oncogene* *25*, 3778–3786.

- Lee, Y. (2002). MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *EMBO J.* *21*, 4663–4670.
- Lee, H.K., and Jeong, S. (2006). β -Catenin stabilizes Cyclooxygenase-2 mRNA by interacting with AU-rich elements of 3'-UTR. *Nucleic Acids Res.* *34*, 5705–5714.
- 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., and Schmittgen, T.D. (2007). Expression profiling identifies microRNA signature in pancreatic cancer. *Int. J. Cancer J. Int. Cancer* *120*, 1046–1054.
- Lee, R.C., Feinbaum, R.L., and 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., et al. (2003). The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* *425*, 415–419.
- Lee, Y., Kim, M., Han, J., Yeom, K.-H., Lee, S., Baek, S.H., and Kim, V.N. (2004). MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J.* *23*, 4051–4060.
- Lepourcelet, M., Chen, Y.-N.P., France, D.S., Wang, H., Crews, P., Petersen, F., Bruseo, C., Wood, A.W., and Shivdasani, R.A. (2004). Small-molecule antagonists of the oncogenic Tcf/ β -catenin protein complex. *Cancer Cell* *5*, 91–102.
- Lewis, B.P., Shih, I., Jones-Rhoades, M.W., Bartel, D.P., and Burge, C.B. (2003). Prediction of Mammalian MicroRNA Targets. *Cell* *115*, 787–798.
- Lewis, B.P., Burge, C.B., and Bartel, D.P. (2005). Conserved Seed Pairing, Often Flanked by Adenosines, Indicates that Thousands of Human Genes are MicroRNA Targets. *Cell* *120*, 15–20.
- Li, Z., and Rana, T.M. (2014). Therapeutic targeting of microRNAs: current status and future challenges. *Nat. Rev. Drug Discov.* *13*, 622–638.
- Li, L., Yu, C., Gao, H., and Li, Y. (2010). Argonaute proteins: potential biomarkers for human colon cancer. *BMC Cancer* *10*, 38.
- Li, M., Shuman, C., Fei, Y.L., Cutiongco, E., Bender, H.A., Stevens, C., Wilkins-Haug, L., Day-Salvatore, D., Yong, S.L., Geraghty, M.T., et al. (2001). GPC3 mutation analysis in a spectrum of patients with overgrowth expands the phenotype of Simpson-Golabi-Behmel syndrome. *Am. J. Med. Genet.* *102*, 161–168.
- Li, N., Fu, H., Tie, Y., Hu, Z., Kong, W., Wu, Y., and Zheng, X. (2009). miR-34a inhibits migration and invasion by down-regulation of c-Met expression in human hepatocellular carcinoma cells. *Cancer Lett.* *275*, 44–53.
- Lim, S.O. (2005). Expression of heat shock proteins (HSP27, HSP60, HSP70, HSP90, GRP78, GRP94) in hepatitis B virus-related hepatocellular carcinomas and dysplastic nodules. *World J. Gastroenterol.* *11*, 2072.
- Lin, S., and Gregory, R.I. (2015). MicroRNA biogenesis pathways in cancer. *Nat. Rev. Cancer* *15*, 321–333.
- Lin, R.-J., Lin, Y.-C., Chen, J., Kuo, H.-H., Chen, Y.-Y., Diccianni, M.B., London, W.B., Chang, C.-H., and Yu, A.L. (2010). microRNA Signature and Expression of Dicer and Drosha Can Predict Prognosis and Delineate Risk Groups in Neuroblastoma. *Cancer Res.* *70*, 7841–7850.
- Litten, J.B., and Tomlinson, G.E. (2008). Liver Tumors in Children. *The Oncologist* *13*, 812–820.

- Liu, J., Ruan, B., You, N., Huang, Q., Liu, W., Dang, Z., Xu, W., Zhou, T., Ji, R., Cao, Y., et al. (2013). Downregulation of miR-200a Induces EMT Phenotypes and CSC-like Signatures through Targeting the β -catenin Pathway in Hepatic Oval Cells. *PLOS ONE* 8, e79409.
- Lizé, M., Pilarski, S., and Dobbstein, M. (2009). E2F1-inducible microRNA 449a/b suppresses cell proliferation and promotes apoptosis. *Cell Death Differ.* 17, 452–458.
- Llave, C., Kasschau, K.D., Rector, M.A., and Carrington, J.C. (2002). Endogenous and Silencing-Associated Small RNAs in Plants. *Plant Cell* 14, 1605–1619.
- Lodrini, M., Oehme, I., Schroeder, C., Milde, T., Schier, M.C., Kopp-Schneider, A., Schulte, J.H., Fischer, M., Preter, K.D., Pattyn, F., et al. (2013). MYCN and HDAC2 cooperate to repress miR-183 signaling in neuroblastoma. *Nucleic Acids Res.* 41, 6018–6033.
- Lodygin, D., Tarasov, V., Epanchintsev, A., Berking, C., Knyazeva, T., Körner, H., Knyazev, P., Diebold, J., and Hermeking, H. (2008). Inactivation of miR-34a by aberrant CpG methylation in multiple types of cancer. *Cell Cycle* 7, 2591–2600.
- López-Terrada, D., Gunaratne, P.H., Adesina, A.M., Pulliam, J., Hoang, D.M., Nguyen, Y., Mistretta, T.-A., Margolin, J., and Finegold, M.J. (2009a). Histologic subtypes of hepatoblastoma are characterized by differential canonical Wnt and Notch pathway activation in DLK+ precursors. *Hum. Pathol.* 40, 783–794.
- López-Terrada, D., Cheung, S.W., Finegold, M.J., and Knowles, B.B. (2009b). Hep G2 is a hepatoblastoma-derived cell line. *Hum. Pathol.* 40, 1512–1515.
- López-Terrada, D., Alaggio, R., de Dávila, M.T., Czauderna, P., Hiyama, E., Katzenstein, H., Leuschner, I., Malogolowkin, M., Meyers, R., Ranganathan, S., et al. (2014). Towards an international pediatric liver tumor consensus classification: proceedings of the Los Angeles COG liver tumors symposium. *Mod. Pathol.* 27, 472–491.
- Loreni, F., Mancino, M., and Biffo, S. (2014). Translation factors and ribosomal proteins control tumor onset and progression: how? *Oncogene* 33, 2145–2156.
- Lou, W., Chen, Q., Ma, L., Liu, J., Yang, Z., Shen, J., Cui, Y., Bian, X., and Qian, C. (2013). Oncolytic adenovirus co-expressing miRNA-34a and IL-24 induces superior antitumor activity in experimental tumor model. *J. Mol. Med.* 91, 715–725.
- 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., et al. (2005). MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* 435, 834–838.
- Lujambio, A., and Lowe, S.W. (2012). The microcosmos of cancer. *Nature* 482, 347–355.
- Lujambio, A., Calin, G.A., Villanueva, A., Ropero, S., Sánchez-Céspedes, M., Blanco, D., Montuenga, L.M., Rossi, S., Nicoloso, M.S., Faller, W.J., et al. (2008). A microRNA DNA methylation signature for human cancer metastasis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105, 13556–13561.
- Lund, E., Güttinger, S., Calado, A., Dahlberg, J.E., and Kutay, U. (2004). Nuclear Export of MicroRNA Precursors. *Science* 303, 95–98.
- Luo, J.-H., Ren, B., Keryanov, S., Tseng, G.C., Rao, U.N.M., Monga, S.P., Strom, S., Demetris, A.J., Nalesnik, M., Yu, Y.P., et al. (2006). Transcriptomic and genomic analysis of human hepatocellular carcinomas and hepatoblastomas. *Hepatology* 44, 1012–1024.
- Lustig, B., Jerchow, B., Sachs, M., Weiler, S., Pietsch, T., Karsten, U., Wetering, M. van de, Clevers, H., Schlag, P.M., Birchmeier, W., et al. (2002). Negative Feedback Loop of Wnt Signaling through Upregulation of Conductin/Axin2 in Colorectal and Liver Tumors. *Mol. Cell. Biol.* 22, 1184–1193.

- Lytle, J.R., Yario, T.A., and Steitz, J.A. (2007). Target mRNAs are repressed as efficiently by microRNA-binding sites in the 5' UTR as in the 3' UTR. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *104*, 9667–9672.
- Ma, J.-B., Ye, K., and Patel, D.J. (2004). Structural basis for overhang-specific small interfering RNA recognition by the PAZ domain. *Nature* *429*, 318–322.
- MacDonald, B.T., Tamai, K., and He, X. (2009). Wnt/ β -Catenin Signaling: Components, Mechanisms, and Diseases. *Dev. Cell* *17*, 9–26.
- Magrelli, A., Azzalin, G., Salvatore, M., Viganotti, M., Tosto, F., Colombo, T., Devito, R., Di Masi, A., Antocchia, A., Lorenzetti, S., et al. (2009). Altered microRNA Expression Patterns in Hepatoblastoma Patients. *Transl. Oncol.* *2*, 157–163.
- Makanya, A.N., Dimova, I., Koller, T., Styp-Rekowska, B., and Djonov, V. (2016). Dynamics of the Developing Chick Chorioallantoic Membrane Assessed by Stereology, Allometry, Immunohistochemistry and Molecular Analysis. *PLOS ONE* *11*, e0152821.
- Mallo, M., and Alonso, C.R. (2013). The regulation of Hox gene expression during animal development. *Development* *140*, 3951–3963.
- Malogolowkin, M.H., Katzenstein, H.M., Meyers, R.L., Krailo, M.D., Rowland, J.M., Haas, J., and Finegold, M.J. (2011). Complete Surgical Resection Is Curative for Children With Hepatoblastoma With Pure Fetal Histology: A Report From the Children's Oncology Group. *J. Clin. Oncol.* *29*, 3301–3306.
- Manchester, K.M., Warren, D.J., Erlandson, R.A., Wheatley, J.M., and Quaglia, M.P.L. (1995). Establishment and characterization of a novel hepatoblastoma-derived cell line. *J. Pediatr. Surg.* *30*, 553–558.
- Manivel, C., Wick, M.R., Abenzoza, P., and Dehner, L.P. (1986). Teratoid hepatoblastoma. The nosologic dilemma of solid embryonic neoplasms of childhood. *Cancer* *57*, 2168–2174.
- Maragkakis, M., Vergoulis, T., Alexiou, P., Reczko, M., Plomaritou, K., Gousis, M., Kourtis, K., Koziris, N., Dalamagas, T., and Hatzigeorgiou, A.G. (2011). DIANA-microT Web server upgrade supports Fly and Worm miRNA target prediction and bibliographic miRNA to disease association. *Nucleic Acids Res.* *39*, W145–W148.
- Martinez-Outschoorn, U.E., Lin, Z., Whitaker-Menezes, D., Howell, A., Sotgia, F., and Lisanti, M.P. (2012). Ketone body utilization drives tumor growth and metastasis. *Cell Cycle* *11*, 3964–3971.
- Maurel, M., Dejeans, N., Taouji, S., Chevet, E., and Grosset, C.F. (2013a). MicroRNA-1291-mediated silencing of IRE1 α enhances Glypican-3 expression. *RNA* *19*, 778–788.
- Maurel, M., Jalvy, S., Ladeiro, Y., Combe, C., Vachet, L., Saggiocco, F., Bioulac-Sage, P., Pitard, V., Jacquemin-Sablon, H., Zucman-Rossi, J., et al. (2013b). A functional screening identifies five micromRNAs controlling glypican-3: role of mir-1271 down-regulation in hepatocellular carcinoma. *Hepatology* *57*, 195–204.
- Meng, F., Henson, R., Lang, M., Wehbe, H., Maheshwari, S., Mendell, J.T., Jiang, J., Schmittgen, T.D., and Patel, T. (2006). Involvement of Human Micro-RNA in Growth and Response to Chemotherapy in Human Cholangiocarcinoma Cell Lines. *Gastroenterology* *130*, 2113–2129.
- Meng, F., Henson, R., Wehbe-Janek, H., Ghoshal, K., Jacob, S.T., and Patel, T. (2007). MicroRNA-21 Regulates Expression of the PTEN Tumor Suppressor Gene in Human Hepatocellular Cancer. *Gastroenterology* *133*, 647–658.

- Meng, Y., Shao, C., Wang, H., and Chen, M. (2012). Are all the miRBase-registered microRNAs true? *RNA Biol.* 9, 249–253.
- Meyers, R., Aronson, D.C., and von Schweinitz, D. (2011). Pediatric liver tumors. In *Principles and Practice of Pediatric Oncology*, (Philadelphia: Lippincott William Wilkins), pp. 838–60.
- Meyers, R.L., Rowland, J.R., Krailo, M., Chen, Z., Katzenstein, H.M., and Malogolowkin, M.H. (2009). Predictive power of pretreatment prognostic factors in children with hepatoblastoma: A report from the Children’s Oncology Group. *Pediatr. Blood Cancer* 53, 1016–1022.
- Meyers, R.L., Czauderna, P., and Otte, J.-B. (2012). Surgical treatment of hepatoblastoma. *Pediatr. Blood Cancer* 59, 800–808.
- Micsenyi, A., Tan, X., Sneddon, T., Luo, J.-H., Michalopoulos, G.K., and Monga, S.P.S. (2004). β -Catenin is temporally regulated during normal liver development. *Gastroenterology* 126, 1134–1146.
- Miranda, K.C., Huynh, T., Tay, Y., Ang, Y.-S., Tam, W.-L., Thomson, A.M., Lim, B., and Rigoutsos, I. (2006). A Pattern-Based Method for the Identification of MicroRNA Binding Sites and Their Corresponding Heteroduplexes. *Cell* 126, 1203–1217.
- Miyazaki, Y., Adachi, H., Katsuno, M., Minamiyama, M., Jiang, Y.-M., Huang, Z., Doi, H., Matsumoto, S., Kondo, N., Iida, M., et al. (2012). Viral delivery of miR-196a ameliorates the SBMA phenotype via the silencing of CELF2. *Nat. Med.* 18, 1136–1141.
- Molenaar, J.J., Domingo-Fernández, R., Ebus, M.E., Lindner, S., Koster, J., Drabek, K., Mestdagh, P., van Sluis, P., Valentijn, L.J., van Nes, J., et al. (2012). LIN28B induces neuroblastoma and enhances MYCN levels via let-7 suppression. *Nat. Genet.* 44, 1199–1206.
- Mongroo, P.S., and Rustgi, A.K. (2010). The role of the miR-200 family in epithelial-mesenchymal transition. *Cancer Biol. Ther.* 10, 219–222.
- Monteys, A.M., Spengler, R.M., Wan, J., Tecedor, L., Lennox, K.A., Xing, Y., and Davidson, B.L. (2010). Structure and activity of putative intronic miRNA promoters. *RNA* 16, 495–505.
- Moon, R.T., Kohn, A.D., Ferrari, G.V.D., and Kaykas, A. (2004). WNT and β -catenin signalling: diseases and therapies. *Nat. Rev. Genet.* 5, 691–701.
- Moretti, F., Kaiser, C., Zdanowicz-Specht, A., and Hentze, M.W. (2012). PABP and the poly(A) tail augment microRNA repression by facilitated miRISC binding. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 19, 603–608.
- Morin, P.J., Sparks, A.B., Korinek, V., Barker, N., Clevers, H., Vogelstein, B., and Kinzler, K.W. (1997). Activation of β -Catenin-Tcf Signaling in Colon Cancer by Mutations in β -Catenin or APC. *Science* 275, 1787–1790.
- Mu, P., Han, Y.-C., Betel, D., Yao, E., Squatrito, M., Ogdowski, P., Stanchina, E. de, D’Andrea, A., Sander, C., and Ventura, A. (2009). Genetic dissection of the miR-17~92 cluster of microRNAs in Myc-induced B-cell lymphomas. *Genes Dev.* 23, 2806–2811.
- Muller, H., Samanta, R., and Wieschaus, E. (1999). Wingless signaling in the *Drosophila* embryo: zygotic requirements and the role of the frizzled genes. *Development* 126, 577–586.
- Muralidhar, B., Winder, D., Murray, M., Palmer, R., Barbosa-Morais, N., Saini, H., Roberts, I., Pett, M., and Coleman, N. (2011). Functional evidence that Drosha overexpression in cervical squamous cell carcinoma affects cell phenotype and microRNA profiles. *J. Pathol.* 224, 496–507.

- Musumeci, M., Coppola, V., Addario, A., Patrizii, M., Maugeri-Saccà, M., Memeo, L., Colarossi, C., Francescangeli, F., Biffoni, M., Collura, D., et al. (2011). Control of tumor and microenvironment cross-talk by miR-15a and miR-16 in prostate cancer. *Oncogene* *30*, 4231–4242.
- Najdi, R., Holcombe, R., and Waterman, M. (2011). Wnt signaling and colon carcinogenesis: Beyond APC. *J. Carcinog.* *10*, 5.
- Neufeld, K.L., Zhang, F., Cullen, B.R., and White, R.L. (2000). APC-mediated downregulation of β -catenin activity involves nuclear sequestration and nuclear export. *EMBO Rep.* *1*, 519–523.
- Newman, M.A., Thomson, J.M., and Hammond, S.M. (2008). Lin-28 interaction with the Let-7 precursor loop mediates regulated microRNA processing. *RNA* *14*, 1539–1549.
- Ng, E.K.O., Chong, W.W.S., Jin, H., Lam, E.K.Y., Shin, V.Y., Yu, J., Poon, T.C.W., Ng, S.S.M., and Sung, J.J.Y. (2009). Differential expression of microRNAs in plasma of patients with colorectal cancer: a potential marker for colorectal cancer screening. *Gut* *58*, 1375–1381.
- Nielsen, C.B., Shomron, N., Sandberg, R., Hornstein, E., Kitzman, J., and Burge, C.B. (2007). Determinants of targeting by endogenous and exogenous microRNAs and siRNAs. *RNA* *13*, 1894–1910.
- Nikiforova, M.N., Tseng, G.C., Steward, D., Diorio, D., and Nikiforov, Y.E. (2008). MicroRNA Expression Profiling of Thyroid Tumors: Biological Significance and Diagnostic Utility. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* *93*, 1600–1608.
- Nishisho, I., Nakamura, Y., Miyoshi, Y., Miki, Y., Ando, H., Horii, A., Koyama, K., Utsunomiya, J., Baba, S., and Hedge, P. (1991). Mutations of chromosome 5q21 genes in FAP and colorectal cancer patients. *Science* *253*, 665–669.
- Nowak-Sliwinska, P., Segura, T., and Iruela-Arispe, M.L. (2014). The chicken chorioallantoic membrane model in biology, medicine and bioengineering. *Angiogenesis* *17*, 779–804.
- O’Connell, R.M., Rao, D.S., Chaudhuri, A.A., Boldin, M.P., Taganov, K.D., Nicoll, J., Paquette, R.L., and Baltimore, D. (2008). Sustained expression of microRNA-155 in hematopoietic stem cells causes a myeloproliferative disorder. *J. Exp. Med.* *205*, 585–594.
- O’Donnell, K.A., Wentzel, E.A., Zeller, K.I., Dang, C.V., and Mendell, J.T. (2005). c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression. *Nature* *435*, 839–843.
- O’Hara, A.J., Wang, L., Dezube, B.J., Harrington, W.J., Damania, B., and Dittmer, D.P. (2009). Tumor suppressor microRNAs are underrepresented in primary effusion lymphoma and Kaposi sarcoma. *Blood* *113*, 5938–5941.
- Okamura, K., Hagen, J.W., Duan, H., Tyler, D.M., and Lai, E.C. (2007). The Mirtron Pathway Generates microRNA-Class Regulatory RNAs in *Drosophila*. *Cell* *130*, 89–100.
- Okamura, K., Phillips, M.D., Tyler, D.M., Duan, H., Chou, Y., and Lai, E.C. (2008). The regulatory activity of microRNA* species has substantial influence on microRNA and 3’ UTR evolution. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *15*, 354–363.
- Olena, A.F., and Patton, J.G. (2010). Genomic organization of microRNAs. *J. Cell. Physiol.* *222*, 540–545.
- Olive, V., Bennett, M.J., Walker, J.C., Ma, C., Jiang, I., Cordon-Cardo, C., Li, Q.-J., Lowe, S.W., Hannon, G.J., and He, L. (2009). miR-19 is a key oncogenic component of mir-17-92. *Genes Dev.* *23*, 2839–2849.

- Ota, A., Tagawa, H., Karnan, S., Tsuzuki, S., Karpas, A., Kira, S., Yoshida, Y., and Seto, M. (2004). Identification and Characterization of a Novel Gene, C13orf25, as a Target for 13q31-q32 Amplification in Malignant Lymphoma. *Cancer Res.* 64, 3087–3095.
- Otte, J. b., Pritchard, J., Aronson, D. c., Brown, J., Czauderna, P., Maibach, R., Perilongo, G., Shafford, E., and Plaschkes, J. (2004). Liver transplantation for hepatoblastoma: Results from the International Society of Pediatric Oncology (SIOP) study SIOPEL-1 and review of the world experience. *Pediatr. Blood Cancer* 42, 74–83.
- Oue, T., Yoneda, A., Uehara, S., Yamanaka, H., and Fukuzawa, M. (2010). Increased expression of the hedgehog signaling pathway in pediatric solid malignancies. *J. Pediatr. Surg.* 45, 387–392.
- OuYang, H.-Y., Xu, J., Luo, J., Zou, R.-H., Chen, K., Le, Y., Zhang, Y.-F., Wei, W., Guo, R.-P., and Shi, M. (2016). MEP1A contributes to tumor progression and predicts poor clinical outcome in human hepatocellular carcinoma. *Hepatology* 63, 1227–1239.
- Overhoff, M., Alken, M., Far, R.K.-K., Lemaitre, M., Lebleu, B., Sczakiel, G., and Robbins, I. (2005). Local RNA Target Structure Influences siRNA Efficacy: A Systematic Global Analysis. *J. Mol. Biol.* 348, 871–881.
- Ozen, M., Creighton, C.J., Ozdemir, M., and Ittmann, M. (2007). Widespread deregulation of microRNA expression in human prostate cancer. *Oncogene* 27, 1788–1793.
- Ozsolak, F., Poling, L.L., Wang, Z., Liu, H., Liu, X.S., Roeder, R.G., Zhang, X., Song, J.S., and Fisher, D.E. (2008). Chromatin structure analyses identify miRNA promoters. *Genes Dev.* 22, 3172–3183.
- Palacios, J., and Gamallo, C. (1998). Mutations in the β -Catenin Gene (CTNNB1) in Endometrioid Ovarian Carcinomas. *Cancer Res.* 58, 1344–1347.
- Pallante, P., Visone, R., Ferracin, M., Ferraro, A., Berlingieri, M.T., Troncone, G., Chiappetta, G., Liu, C.G., Santoro, M., Negrini, M., et al. (2006). MicroRNA deregulation in human thyroid papillary carcinomas. *Endocr. Relat. Cancer* 13, 497–508.
- Parker, J.S., Roe, S.M., and Barford, D. (2005). Structural insights into mRNA recognition from a PIWI domain–siRNA guide complex. *Nature* 434, 663–666.
- Pasquinelli, A.E., Reinhart, B.J., Slack, F., Martindale, M.Q., Kuroda, M.I., Maller, B., Hayward, D.C., Ball, E.E., Degnan, B., Müller, P., et al. (2000). Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA. *Nature* 408, 86–89.
- Pekarsky, Y., and Croce, C.M. (2015). Role of miR-15/16 in CLL. *Cell Death Differ.* 22, 6–11.
- Perilongo, G., and Shafford, E.A. (1999). Liver tumours. *Eur. J. Cancer* 35, 953–958.
- Perilongo, G., Shafford, E., Maibach, R., Aronson, D., Brugières, L., Brock, P., Childs, M., Czauderna, P., MacKinlay, G., Otte, J.B., et al. (2004). Risk-adapted treatment for childhood hepatoblastoma: final report of the second study of the International Society of Paediatric Oncology—SIOPEL 2. *Eur. J. Cancer* 40, 411–421.
- Perilongo, G., Malogolowkin, M., and Feusner, J. (2012). Hepatoblastoma clinical research: Lessons learned and future challenges. *Pediatr. Blood Cancer* 59, 818–821.
- Perriard, J.-C., Hirschy, A., and Ehler, E. (2003). Dilated Cardiomyopathy: A Disease of the Intercalated Disc? *Trends Cardiovasc. Med.* 13, 30–38.
- Pham, T.H., Iqbal, C.W., Grams, J.M., Zarroug, A.E., Wall, J.C.H., Ishitani, M.B., Nagorney, D.M., and Moir, C. (2007). Outcomes of primary liver cancer in children: an appraisal of experience. *J. Pediatr. Surg.* 42, 834–839.

- Piao, X., Zhang, X., Wu, L., and Belasco, J.G. (2010). CCR4-NOT Deadens mRNA Associated with RNA-Induced Silencing Complexes in Human Cells. *Mol. Cell. Biol.* *30*, 1486–1494.
- Pietsch, T., Fonatsch, C., Albrecht, S., Maschek, H., Wolf, H.K., and von Schweinitz, D. (1996). Characterization of the continuous cell line HepT1 derived from a human hepatoblastoma. *Lab. Investig. J. Tech. Methods Pathol.* *74*, 809–818.
- Pilia, G., Hughes-Benzie, R.M., MacKenzie, A., Baybayan, P., Chen, E.Y., Huber, R., Neri, G., Cao, A., Forabosco, A., and Schlessinger, D. (1996). Mutations in GPC3, a glypican gene, cause the Simpson-Golabi-Behmel overgrowth syndrome. *Nat. Genet.* *12*, 241–247.
- Pineau, P., Volinia, S., McJunkin, K., Marchio, A., Battiston, C., Terris, B., Mazzaferro, V., Lowe, S.W., Croce, C.M., and Dejean, A. (2010). miR-221 overexpression contributes to liver tumorigenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *107*, 264–269.
- Pio, R., Ajona, D., and Lambris, J.D. (2013). Complement inhibition in cancer therapy. *Semin. Immunol.* *25*, 54–64.
- Place, R.F., Li, L.-C., Pookot, D., Noonan, E.J., and Dahiya, R. (2008). MicroRNA-373 induces expression of genes with complementary promoter sequences. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *105*, 1608–1613.
- Pokutta, S., and Weis, W.I. (2000). Structure of the Dimerization and β -Catenin- Binding Region of α -Catenin. *Mol. Cell* *5*, 533–543.
- Poliseno, L., Salmena, L., Zhang, J., Carver, B., Haveman, W.J., and Pandolfi, P.P. (2010). A coding-independent function of gene and pseudogene mRNAs regulates tumour biology. *Nature* *465*, 1033–1038.
- Pramanik, D., Campbell, N.R., Karikari, C., Chivukula, R., Kent, O.A., Mendell, J.T., and Maitra, A. (2011). Restitution of Tumor Suppressor MicroRNAs Using a Systemic Nanovector Inhibits Pancreatic Cancer Growth in Mice. *Am. Assoc. Cancer Res.* *10*, 1470–1480.
- Raveche, E.S., Salerno, E., Scaglione, B.J., Manohar, V., Abbasi, F., Lin, Y.-C., Fredrickson, T., Landgraf, P., Ramachandra, S., Huppi, K., et al. (2007). Abnormal microRNA-16 locus with synteny to human 13q14 linked to CLL in NZB mice. *Blood* *109*, 5079–5086.
- Reid, G., Pel, M.E., Kirschner, M.B., Cheng, Y.Y., Mugridge, N., Weiss, J., Williams, M., Wright, C., Edelman, J.J.B., Vallety, M.P., et al. (2013). Restoring expression of miR-16: a novel approach to therapy for malignant pleural mesothelioma. *Ann. Oncol.* *24*, 3128–3135.
- Reinhart, B.J., Slack, F.J., Basson, M., Pasquinelli, A.E., Bettinger, J.C., Rougvie, A.E., Horvitz, H.R., and Ruvkun, G. (2000). The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* *403*, 901–906.
- Reinhart, B.J., Weinstein, E.G., Rhoades, M.W., Bartel, B., and Bartel, D.P. (2002). MicroRNAs in plants. *Genes Dev.* *16*, 1616–1626.
- Richmond, J. (2000). The 3Rs - Past, Present and Future. *Scand. J. Lab. Anim. Sci.* *27*, 84–92.
- Ro, S., Park, C., Young, D., Sanders, K.M., and Yan, W. (2007). Tissue-dependent paired expression of miRNAs. *Nucleic Acids Res.* *35*, 5944–5953.
- Roccaro, A.M., Sacco, A., Thompson, B., Leleu, X., Azab, A.K., Azab, F., Runnels, J., Jia, X., Ngo, H.T., Melhem, M.R., et al. (2009). MicroRNAs 15a and 16 regulate tumor proliferation in multiple myeloma. *Blood* *113*, 6669–6680.

- de la Roche, M., Rutherford, T.J., Gupta, D., Veprintsev, D.B., Saxty, B., Freund, S.M., and Bienz, M. (2012). An intrinsically labile α -helix abutting the BCL9-binding site of β -catenin is required for its inhibition by carnosic acid. *Nat. Commun.* *3*, 680.
- Rodriguez, A., Griffiths-Jones, S., Ashurst, J.L., and Bradley, A. (2004). Identification of Mammalian microRNA Host Genes and Transcription Units. *Genome Res.* *14*, 1902–1910.
- Roebuck, D.J. (2011). *Pediatric Liver Tumors* (Springer Science & Business Media).
- Roebuck, D.J., Aronson, D., Clapuyt, P., Czauderna, P., Goyet, J.V. de, Gauthier, F., MacKinlay, G., Maibach, R., McHugh, K., Olsen, Ø.E., et al. (2006). 2005 PRETEXT: a revised staging system for primary malignant liver tumours of childhood developed by the SIOPEL group. *Pediatr. Radiol.* *37*, 123–132.
- Roose, J., Huls, G., Beest, M. van, Moerer, P., Horn, K. van der, Goldschmeding, R., Logtenberg, T., and Clevers, H. (1999). Synergy Between Tumor Suppressor APC and the β -Catenin-Tcf4 Target Tcf1. *Science* *285*, 1923–1926.
- Roskams, T. (2006). Liver stem cells and their implication in hepatocellular and cholangiocarcinoma. *Oncogene* *25*, 3818–3822.
- Rottiers, V., and Näär, A.M. (2012). MicroRNAs in metabolism and metabolic disorders. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *13*, 239–250.
- Rous, P., and Murphy, J. (1911). Tumor implantations in the developing embryo. *J Am Med Assoc. J Am Med Assoc* *56*:741.
- Ruby, J.G., Jan, C.H., and Bartel, D.P. (2007). Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing. *Nature* *448*, 83–86.
- Ruck, P., Xiao, J.C., and Kaiserling, E. (1996). Small epithelial cells and the histogenesis of hepatoblastoma. Electron microscopic, immunoelectron microscopic, and immunohistochemical findings. *Am. J. Pathol.* *148*, 321–329.
- Ryan, B.M., Robles, A.I., and Harris, C.C. (2010). Genetic variation in microRNA networks: the implications for cancer research. *Nat. Rev. Cancer* *10*, 389–402.
- Sasaki, F., Matsunaga, T., Iwafuchi, M., Hayashi, Y., Ohkawa, H., Ohira, M., Okamatsu, T., Sugito, T., Tsuchida, Y., Toyosaka, A., et al. (2002). Outcome of hepatoblastoma treated with the JPLT-1 (Japanese Study Group for Pediatric Liver Tumor) Protocol-1: A report from the Japanese Study Group for Pediatric Liver Tumor. *J. Pediatr. Surg.* *37*, 851–856.
- Sato, F., Tsuchiya, S., Meltzer, S.J., and Shimizu, K. (2011). MicroRNAs and epigenetics. *FEBS J.* *278*, 1598–1609.
- Saunders, M.A., Liang, H., and Li, W.-H. (2007). Human polymorphism at microRNAs and microRNA target sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 3300–3305.
- Saydam, O., Shen, Y., Würdinger, T., Senol, O., Boke, E., James, M.F., Tannous, B.A., Stemmer-Rachamimov, A.O., Yi, M., Stephens, R.M., et al. (2009). Downregulated MicroRNA-200a in Meningiomas Promotes Tumor Growth by Reducing E-Cadherin and Activating the Wnt/ β -Catenin Signaling Pathway. *Mol. Cell. Biol.* *29*, 5923–5940.
- Scheil, S., Hagen, S., Brüderlein, S., Leuschner, I., Behnisch, W., and Möller, P. (2003). Two novel in vitro human hepatoblastoma models, HepU1 and HepU2, are highly characteristic of fetal–embryonal differentiation in hepatoblastoma. *Int. J. Cancer* *105*, 347–352.
- Schetter, A., Leung, S., Sohn, J., and et al (2008). MicroRNA expression profiles associated with prognosis and therapeutic outcome in colon adenocarcinoma. *JAMA* *299*, 425–436.

- Schirle, N.T., Sheu-Gruttadauria, J., and MacRae, I.J. (2014). Structural basis for microRNA targeting. *Science* 346, 608–613.
- Schmelzer, E., Zhang, L., Bruce, A., Wauthier, E., Ludlow, J., Yao, H., Moss, N., Melhem, A., McClelland, R., Turner, W., et al. (2007). Human hepatic stem cells from fetal and postnatal donors. *J. Exp. Med.* 204, 1973–1987.
- Schnater, J.M., Köhler, S.E., Lamers, W.H., von Schweinitz, D., and Aronson, D.C. (2003). Where do we stand with hepatoblastoma? *Cancer* 98, 668–678.
- Schnater, J.M., Bruder, E., Bertschin, S., Woodtli, T., de Theije, C., Pietsch, T., Aronson, D.C., von Schweinitz, D., Lamers, W.H., and Köhler, E.S. (2006). Subcutaneous and intrahepatic growth of human hepatoblastoma in immunodeficient mice. *J. Hepatol.* 45, 377–386.
- Scholzen, T., and Gerdes, J. (2000). The Ki-67 protein: From the known and the unknown. *J. Cell. Physiol.* 182, 311–322.
- Schubert, S., Grünweller, A., Erdmann, V.A., and Kurreck, J. (2005). Local RNA Target Structure Influences siRNA Efficacy: Systematic Analysis of Intentionally Designed Binding Regions. *J. Mol. Biol.* 348, 883–893.
- Schulte, J.H., Marschall, T., Martin, M., Rosenstiel, P., Mestdagh, P., Schlierf, S., Thor, T., Vandesompele, J., Eggert, A., Schreiber, S., et al. (2010). Deep sequencing reveals differential expression of microRNAs in favorable versus unfavorable neuroblastoma. *Nucleic Acids Res.* 38, 5919–5928.
- Schultze-Florey, R., Graf, N., Vorwerk, P., Koscielniak, E., Schneider, D., and Kratz, C. (2013). DICER1 Syndrome: A New Cancer Syndrome. *Klin. Pädiatr.* 225, 177–178.
- von Schweinitz, D. (2006). Management of liver tumors in childhood. *Semin. Pediatr. Surg.* 15, 17–24.
- von Schweinitz, D. (2012). Hepatoblastoma: recent developments in research and treatment. *Semin. Pediatr. Surg.* 21, 21–30.
- Scott, G.K., Mattie, M.D., Berger, C.E., Benz, S.C., and Benz, C.C. (2006). Rapid Alteration of MicroRNA Levels by Histone Deacetylase Inhibition. *Cancer Res.* 66, 1277–1281.
- Selbach, M., Schwanhäusser, B., Thierfelder, N., Fang, Z., Khanin, R., and Rajewsky, N. (2008). Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs. *Nature* 455, 58–63.
- Sempere, L.F., Christensen, M., Silahatoglu, A., Bak, M., Heath, C.V., Schwartz, G., Wells, W., Kauppinen, S., and Cole, C.N. (2007). Altered MicroRNA Expression Confined to Specific Epithelial Cell Subpopulations in Breast Cancer. *Cancer Res.* 67, 11612–11620.
- Serrano, M., Lin, A.W., McCurrach, M.E., Beach, D., and Lowe, S.W. (1997). Oncogenic ras Provokes Premature Cell Senescence Associated with Accumulation of p53 and p16INK4a. *Cell* 88, 593–602.
- Sharma, M., Jamieson, C., Johnson, M., Molloy, M.P., and Henderson, B.R. (2012). Specific Armadillo Repeat Sequences Facilitate β -Catenin Nuclear Transport in Live Cells via Direct Binding to Nucleoporins Nup62, Nup153, and RanBP2/Nup358. *J. Biol. Chem.* 287, 819–831.
- Shitashige, M., Satow, R., Honda, K., Ono, M., Hirohashi, S., and Yamada, T. (2008). Regulation of Wnt Signaling by the Nuclear Pore Complex. *Gastroenterology* 134, 1961–1971.e4.
- Shomron, N., Golan, D., and Hornstein, E. (2009). An Evolutionary Perspective of Animal MicroRNAs and Their Targets. *J. Biomed. Biotechnol.* 2009.

- Shtutman, M., Zhurinsky, J., Simcha, I., Albanese, C., D'Amico, M., Pestell, R., and Ben-Ze'ev, A. (1999). The cyclin D1 gene is a target of the β -catenin/LEF-1 pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *96*, 5522–5527.
- Shu, G., Yang, Z., and Liu, D. (2012). Immunohistochemical study of Dicer and Drosha expression in the benign and malignant lesions of gallbladder and their clinicopathological significances. *Pathol. - Res. Pract.* *208*, 392–397.
- Sondermeijer, B.M., Bakker, A., Halliani, A., Ronde, M.W.J. de, Marquart, A.A., Tijssen, A.J., Mulders, T.A., Kok, M.G.M., Battjes, S., Maiwald, S., et al. (2011). Platelets in Patients with Premature Coronary Artery Disease Exhibit Upregulation of miRNA340* and miRNA624*. *PLOS ONE* *6*, e25946.
- Song, J.-J., Smith, S.K., Hannon, G.J., and Joshua-Tor, L. (2004). Crystal Structure of Argonaute and Its Implications for RISC Slicer Activity. *Science* *305*, 1434–1437.
- Spector, L.G., and Birch, J. (2012). The epidemiology of hepatoblastoma. *Pediatr. Blood Cancer* *59*, 776–779.
- Spencer, G.J., Utting, J.C., Etheridge, S.L., Arnett, T.R., and Genever, P.G. (2006). Wnt signalling in osteoblasts regulates expression of the receptor activator of NF κ B ligand and inhibits osteoclastogenesis in vitro. *J Cell Sci* *119*, 1283–1296.
- Srivastava, M., Begovic, E., Chapman, J., Putnam, N.H., Hellsten, U., Kawashima, T., Kuo, A., Mitros, T., Salamov, A., Carpenter, M.L., et al. (2008). The Trichoplax genome and the nature of placozoans. *Nature* *454*, 955–960.
- Stenvang, J., Petri, A., Lindow, M., Obad, S., and Kauppinen, S. (2012). Inhibition of microRNA function by anti-miR oligonucleotides. *Silence* *3*, 1.
- Stiller, C.A., Pritchard, J., and Steliarova-Foucher, E. (2006). Liver cancer in European children: Incidence and survival, 1978–1997. Report from the Automated Childhood Cancer Information System project. *Eur. J. Cancer* *42*, 2115–2123.
- Storci, G., Bertoni, S., Carolis, S.D., Papi, A., Nati, M., Ceccarelli, C., Pirazzini, C., Garagnani, P., Ferrarini, A., Buson, G., et al. (2013). Slug/ β -Catenin-Dependent Proinflammatory Phenotype in Hypoxic Breast Cancer Stem Cells. *Am. J. Pathol.* *183*, 1688–1697.
- Su, J., Zhang, A., Shi, Z., Ma, F., Pu, P., Wang, T., Zhang, J., Kang, C., and Zhang, Q. (2011). MicroRNA-200a suppresses the Wnt/ β -catenin signaling pathway by interacting with β -catenin. *Int. J. Oncol.* *40*, 1162–1170.
- Su, J.-L., Chen, P.-S., Johansson, G., and Kuo, M.-L. (2012). Function and Regulation of Let-7 Family microRNAs. *MicroRNA E J*, 34–39.
- Su, X., Chakravarti, D., Cho, M.S., Liu, L., Gi, Y.J., Lin, Y.-L., Leung, M.L., El-Naggar, A., Creighton, C.J., Suraokar, M.B., et al. (2010). TAp63 suppresses metastasis through coordinate regulation of Dicer and miRNAs. *Nature* *467*, 986–990.
- Subtelny, A.O., Eichhorn, S.W., Chen, G.R., Sive, H., and Bartel, D.P. (2014). Poly(A)-tail profiling reveals an embryonic switch in translational control. *Nature* *508*, 66–71.
- Suzuki, H.I., Yamagata, K., Sugimoto, K., Iwamoto, T., Kato, S., and Miyazono, K. (2009). Modulation of microRNA processing by p53. *Nature* *460*, 529–533.
- Szafranska, A.E., Davison, T.S., John, J., Cannon, T., Sipos, B., Maghnouj, A., Labourier, E., and Hahn, S.A. (2007). MicroRNA expression alterations are linked to tumorigenesis and non-neoplastic processes in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Oncogene* *26*, 4442–4452.

- Takamizawa, J., Konishi, H., Yanagisawa, K., Tomida, S., Osada, H., Endoh, H., Harano, T., Yatabe, Y., Nagino, M., Nimura, Y., et al. (2004). Reduced Expression of the let-7 MicroRNAs in Human Lung Cancers in Association with Shortened Postoperative Survival. *Cancer Res.* *64*, 3753–3756.
- Tay, Y., Zhang, J., Thomson, A.M., Lim, B., and Rigoutsos, I. (2008). MicroRNAs to Nanog, Oct4 and Sox2 coding regions modulate embryonic stem cell differentiation. *Nature* *455*, 1124–1128.
- Tetsu, O., and McCormick, F. (1999). β -Catenin regulates expression of cyclin D1 in colon carcinoma cells. *Nature* *398*, 422–426.
- Thiele, A., Nagamine, Y., Hauschildt, S., and Clevers, H. (2006). AU-rich elements and alternative splicing in the β -catenin 3'UTR can influence the human β -catenin mRNA stability. *Exp. Cell Res.* *312*, 2367–2378.
- Thomas, D., Pritchard, J., Davidson, R., McKiernan, P., Grundy, R.G., and de Ville de Goyet, J. (2003). Familial Hepatoblastoma and APC gene mutations: renewed call for molecular research. *Eur. J. Cancer* *39*, 2200–2204.
- Thomson, J.M., Newman, M., Parker, J.S., Morin-Kensicki, E.M., Wright, T., and Hammond, S.M. (2006). Extensive post-transcriptional regulation of microRNAs and its implications for cancer. *Genes Dev.* *20*, 2202–2207.
- Tiao, G.M., Bobey, N., Allen, S., Nieves, N., Alonso, M., Bucuvalas, J., Wells, R., and Ryckman, F. (2005). The current management of hepatoblastoma: A combination of chemotherapy, conventional resection, and liver transplantation. *J. Pediatr.* *146*, 204–211.
- Till, S., Lejeune, E., Thermann, R., Bortfeld, M., Hothorn, M., Enderle, D., Heinrich, C., Hentze, M.W., and Ladurner, A.G. (2007). A conserved motif in Argonaute-interacting proteins mediates functional interactions through the Argonaute PIWI domain. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *14*, 897–903.
- Tomlinson, G.E., and Kappler, R. (2012). Genetics and epigenetics of hepatoblastoma. *Pediatr. Blood Cancer* *59*, 785–792.
- Toretzky, J.A.M.D., Zitomersky, N.L.B.A., Eskenazi, A.E.M.D., Voigt, R.W.M.D., Strauch, E.D.M.D., Sun, C.C.M.D., Huber, R.P.D., Meltzer, S.J.M.D., and Schlessinger, D.P.D. (2001). Glypican-3 Expression in Wilms Tumor and Hepatoblastoma. *J. Pediatr. Hematol. Oncol.* *23*.
- Trang, P., Medina, P.P., Wiggins, J.F., Ruffino, L., Kelnar, K., Omotola, M., Homer, R., Brown, D., Bader, A.G., Weidhaas, J.B., et al. (2010). Regression of murine lung tumors by the let-7 microRNA. *Oncogene* *29*, 1580–1587.
- Urbach, A., Yermalovich, A., Zhang, J., Spina, C.S., Zhu, H., Perez-Atayde, A.R., Shukrun, R., Charlton, J., Sebire, N., Mifsud, W., et al. (2014). Lin28 sustains early renal progenitors and induces Wilms tumor. *Genes Dev.* *28*, 971–982.
- Valenta, T., Hausmann, G., and Basler, K. (2012). The many faces and functions of β -catenin: β -Catenin: a life by, beyond, and against the Wnt canon. *EMBO J.* *31*, 2714–2736.
- Vasudevan, S., Tong, Y., and Steitz, J.A. (2007). Switching from Repression to Activation: MicroRNAs Can Up-Regulate Translation. *Science* *318*, 1931–1934.
- Ventura, A., and Jacks, T. (2009). MicroRNAs and Cancer: Short RNAs Go a Long Way. *Cell* *136*, 586–591.
- Ventura, A., Young, A.G., Winslow, M.M., Lintault, L., Meissner, A., Erkeland, S.J., Newman, J., Bronson, R.T., Crowley, D., Stone, J.R., et al. (2008). Targeted Deletion Reveals

- Essential and Overlapping Functions of the miR-17~92 Family of miRNA Clusters. *Cell* 132, 875–886.
- Veronese, A., Visone, R., Consiglio, J., Acunzo, M., Lupini, L., Kim, T., Ferracin, M., Lovat, F., Miotto, E., Balatti, V., et al. (2011). Mutated β -catenin evades a microRNA-dependent regulatory loop. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 108, 4840–4845.
- Vester, B., and Wengel, J. (2004). LNA (Locked Nucleic Acid): High-Affinity Targeting of Complementary RNA and DNA. *Biochemistry (Mosc.)* 43, 13233–13241.
- Vogelstein, B., Papadopoulos, N., Velculescu, V.E., Zhou, S., Diaz, L.A., and Kinzler, K.W. (2013). Cancer Genome Landscapes. *Science* 339, 1546–1558.
- Volinia, S., Calin, G.A., Liu, C.-G., Ambs, S., Cimmino, A., Petrocca, F., Visone, R., Iorio, M., Roldo, C., Ferracin, M., et al. (2006). A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 2257–2261.
- Wang, D., Zhang, Z., O’Loughlin, E., Lee, T., Houel, S., O’Carroll, D., Tarakhovsky, A., Ahn, N.G., and Yi, R. (2012a). Quantitative functions of Argonaute proteins in mammalian development. *Genes Dev.* 26, 693–704.
- Wang, L.-G., Ni, Y., Su, B.-H., Mu, X.-R., Shen, H.-C., and Du, J.-J. (2013). MicroRNA-34b functions as a tumor suppressor and acts as a nodal point in the feedback loop with Met. *Int. J. Oncol.*
- Wang, X., Tang, S., Le, S.-Y., Lu, R., Rader, J.S., Meyers, C., and Zheng, Z.-M. (2008). Aberrant Expression of Oncogenic and Tumor-Suppressive MicroRNAs in Cervical Cancer Is Required for Cancer Cell Growth. *PLoS ONE* 3.
- Wang, X., Chen, J., Li, F., Lin, Y., Zhang, X., Lv, Z., and Jiang, J. (2012b). MiR-214 inhibits cell growth in hepatocellular carcinoma through suppression of β -catenin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 428, 525–531.
- Wang, Y., Medvid, R., Melton, C., Jaenisch, R., and Blelloch, R. (2007). DGCR8 is essential for microRNA biogenesis and silencing of embryonic stem cell self-renewal. *Nat. Genet.* 39, 380–385.
- Wang, Y., Toh, H.C., Chow, P., Chung, A.Y.F., Meyers, D.J., Cole, P.A., Ooi, L.L.P.J., and Lee, C.G.L. (2012c). MicroRNA-224 is up-regulated in hepatocellular carcinoma through epigenetic mechanisms. *FASEB J.* 26, 3032–3041.
- Weber, R.G., Pietsch, T., Schweinitz, D. von, and Lichter, P. (2000). Characterization of Genomic Alterations in Hepatoblastomas. *Am. J. Pathol.* 157, 571–578.
- Wei, Y., Fabre, M., Branchereau, S., Gauthier, F., Perilongo, G., and Buendia, M.-A. (2000). Activation of β -catenin in epithelial and mesenchymal hepatoblastomas. *Publ. Online* 04 Febr. 2000 Doi101038sjonc1203356 19.
- Weinberg, A.G., and Finegold, M.J. (1983). Primary hepatic tumors of childhood. *Hum. Pathol.* 14, 512–537.
- van de Wetering, M., Cavallo, R., Dooijes, D., van Beest, M., van Es, J., Loureiro, J., Ypma, A., Hursh, D., Jones, T., Bejsovec, A., et al. (1997). Armadillo Coactivates Transcription Driven by the Product of the Drosophila Segment Polarity Gene dTCF. *Cell* 88, 789–799.
- Wightman, B., Ha, I., and Ruvkun, G. (1993). Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell* 75, 855–862.

- Wisse, E., Jacobs, F., Topal, B., Frederik, P., and De Geest, B. (2008). The size of endothelial fenestrae in human liver sinusoids: implications for hepatocyte-directed gene transfer. *Gene Ther.* *15*, 1193–1199.
- Witkos, T., Koscianska, E., and Krzyzosiak, W. (2011). Practical Aspects of microRNA Target Prediction. *Curr. Mol. Med.* *11*, 93–109.
- Wray, J., Kalkan, T., Gomez-Lopez, S., Eckardt, D., Cook, A., Kemler, R., and Smith, A. (2011). Inhibition of glycogen synthase kinase-3 alleviates Tcf3 repression of the pluripotency network and increases embryonic stem cell resistance to differentiation. *Nat. Cell Biol.* *13*, 838–845.
- Wu, L., and Belasco, J.G. (2005). Micro-RNA Regulation of the Mammalian lin-28 Gene during Neuronal Differentiation of Embryonal Carcinoma Cells. *Mol. Cell. Biol.* *25*, 9198–9208.
- Wu, M., Sabbaghian, N., Xu, B., Addidou-Kalucki, S., Bernard, C., Zou, D., Reeve, A., Eccles, M., Cole, C., Choong, C., et al. (2013). Biallelic DICER1 mutations occur in Wilms tumours. *J. Pathol.* *230*, 154–164.
- Xing, Y., Takemaru, K.-I., Liu, J., Berndt, J.D., Zheng, J.J., Moon, R.T., and Xu, W. (2008). Crystal Structure of a Full-Length β -Catenin. *Struct. Lond. Engl.* *16*, 478–487.
- 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.
- Yanaihara, N., Caplen, N., Bowman, E., Seike, M., Kumamoto, K., Yi, M., Stephens, R.M., Okamoto, A., Yokota, J., Tanaka, T., et al. (2006). Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Cell* *9*, 189–198.
- Yao, G., Yin, M., Lian, J., Tian, H., Liu, L., Li, X., and Sun, F. (2010). MicroRNA-224 Is Involved in Transforming Growth Factor- β -Mediated Mouse Granulosa Cell Proliferation and Granulosa Cell Function by Targeting Smad4. *Mol. Endocrinol.* *24*, 540–551.
- Yi, F., Pereira, L., Hoffman, J.A., Shy, B.R., Yuen, C.M., Liu, D.R., and Merrill, B.J. (2011). Opposing effects of Tcf3 and Tcf1 control Wnt stimulation of embryonic stem cell self-renewal. *Nat. Cell Biol.* *13*, 762–770.
- Yi, R., Qin, Y., Macara, I.G., and Cullen, B.R. (2003). Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev.* *17*, 3011–3016.
- You, L., He, B., Xu, Z., Uematsu, K., Mazieres, J., Mikami, I., Reguart, N., Moody, T.W., Kitajewski, J., McCormick, F., et al. (2004). Inhibition of Wnt-2-mediated signaling induces programmed cell death in non-small-cell lung cancer cells. *Oncogene* *23*, 6170–6174.
- Young, D.D., Connelly, C.M., Grohmann, C., and Deiters, A. (2010). Small Molecule Modifiers of MicroRNA miR-122 Function for the Treatment of Hepatitis C Virus Infection and Hepatocellular Carcinoma. *J. Am. Chem. Soc.* *132*, 7976–7981.
- Young, L.E., Moore, A.E., Sokol, L., Meisner-Kober, N., and Dixon, D.A. (2012). The mRNA Stability Factor HuR Inhibits MicroRNA-16 Targeting of Cyclooxygenase-2. *Mol. Cancer Res.* *10*, 167–180.
- Zekri, L., Huntzinger, E., Heimstädt, S., and Izaurralde, E. (2009). The Silencing Domain of GW182 Interacts with PABPC1 To Promote Translational Repression and Degradation of MicroRNA Targets and Is Required for Target Release. *Mol. Cell. Biol.* *29*, 6220–6231.

- Zekri, L., Kuzuoğlu-Öztürk, D., and Izaurralde, E. (2013). GW182 proteins cause PABP dissociation from silenced miRNA targets in the absence of deadenylation. *EMBO J.* 32, 1052–1065.
- Zhang, L., Huang, J., Yang, N., Greshock, J., Megraw, M.S., Giannakakis, A., Liang, S., Naylor, T.L., Barchetti, A., Ward, M.R., et al. (2006). microRNAs exhibit high frequency genomic alterations in human cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 9136–9141.
- Zhang, N., Wei, P., Gong, A., Chiu, W.-T., Lee, H.-T., Colman, H., Huang, H., Xue, J., Liu, M., Wang, Y., et al. (2011). FoxM1 Promotes β -Catenin Nuclear Localization and Controls Wnt Target-Gene Expression and Glioma Tumorigenesis. *Cancer Cell* 20, 427–442.
- Zhang, T., Otevrel, T., Gao, Z., Gao, Z., Ehrlich, S.M., Fields, J.Z., and Boman, B.M. (2001). Evidence That APC Regulates Survivin Expression A Possible Mechanism Contributing to the Stem Cell Origin of Colon Cancer. *Cancer Res.* 61, 8664–8667.
- Zhao, D., Chen, S., Cai, J., Guo, Y., Song, Z., Che, J., Liu, C., Wu, C., Ding, M., and Deng, H. (2009). Derivation and Characterization of Hepatic Progenitor Cells from Human Embryonic Stem Cells. *PLOS ONE* 4, e6468.
- Zimmermann, A. (2005). The emerging family of hepatoblastoma tumours: From ontogenesis to oncogenesis. *Eur. J. Cancer* 41, 1503–1514.
- Zsiros, J., Brugieres, L., Brock, P., Roebuck, D., Maibach, R., Zimmermann, A., Childs, M., Pariente, D., Laithier, V., Otte, J.-B., et al. (2013). Dose-dense cisplatin-based chemotherapy and surgery for children with high-risk hepatoblastoma (SIOPEL-4): a prospective, single-arm, feasibility study. *Lancet Oncol.* 14, 834–842.
- Zurawel, R.H., Chiappa, S.A., Allen, C., and Raffel, C. (1998). Sporadic Medulloblastomas Contain Oncogenic β -Catenin Mutations. *Cancer Res.* 58, 896–899.
- Zynger, D.L., Gupta, A., Luan, C., Chou, P.M., Yang, G.-Y., and Yang, X.J. (2008). Expression of glypican 3 in hepatoblastoma: an immunohistochemical study of 65 cases. *Hum. Pathol.* 39, 224–230.

ABSTRACT

New in vivo model of hepatoblastoma and identification of microRNAs regulating β -catenin.

Hepatoblastoma (HBL) is the most common pediatric liver cancer. At molecular level it is characterized by activating mutations in β -catenin gene (*CTNNB1*) that cause protein accumulation and abnormal Wnt signaling pathway activation leading to malignant transformation of hepatic cells. Therefore, β -catenin is a key therapeutic target in HBL.

This manuscript describes two major parts of my thesis project that aimed to understand the role of β -catenin-regulating microRNAs in HBL carcinogenesis.

The first part presents the development of a new *in vivo* HBL model. This work consisted of making HBL-derived cells xenograft on chick embryo chorioallantoic membrane (CAM) and studying tumor development using histological and molecular approaches. My results show that HBL cells implanted on CAM modify their phenotype and activate survival and proliferation mechanisms to form organized and vascularized tumor nodules. Cell treatment with cisplatin leads to tumor progression arrest.

The second part presents results concerning the regulation of β -catenin and oncogenic processes by microRNAs in HBL cells. A functional screening allowed me to identify several microRNAs with an inhibitory effect on β -catenin. Four microRNAs down-regulated in patient tumors inhibit cell proliferation and Wnt pathway activity *in vitro*. The most efficient microRNA directly interacts with β -catenin mRNA through a unique site localized in 3' untranslated region and blocks HBL tumor growth on CAM.

During my thesis I developed a new animal model to study HBL that allows modelling rapid tumor growth and testing the impact of therapeutic molecules. My work also led to the identification of new microRNAs down-regulated in HBL tumors that inhibit β -catenin expression and act as tumor suppressor genes. Those microRNAs represent new potential therapeutic molecules for HBL treatment and could be also used as diagnostic and prognostic biomarkers.

Key words: Hepatoblastoma, Cancer, Liver, Pediatric, MicroRNAs, β -catenin, Wnt pathway, Chorioallantoic membrane, Chick.

RESUME

Nouveau modèle d'étude de l'hépatoblastome in vivo et identification de microARNs régulateurs de la β -caténine

L'hépatoblastome (HBL) est le cancer du foie le plus fréquent chez l'enfant. Au niveau moléculaire, il est caractérisé par des mutations activatrices dans le gène de la β -caténine (*CTNNB1*) entraînant une accumulation de sa protéine et une activation anormale de la voie de signalisation Wnt, responsables de la transformation maligne des cellules hépatiques. Ainsi, la β -caténine est une cible thérapeutique majeure dans l'HBL.

Ce manuscrit décrit les deux parties principales de mon projet de thèse, dont l'objectif était d'étudier le rôle de microARNs régulateurs de la β -caténine sur la carcinogenèse de l'HBL.

La première partie présente le développement d'un nouveau modèle d'étude *in vivo* de l'HBL. Ce travail a consisté à réaliser des xéno greffes de cellules dérivées d'HBL sur la membrane chorioallantoïdienne (CAM) de l'embryon de poulet, et à étudier le développement des tumeurs par des approches histologiques et moléculaires. Mes résultats montrent que les cellules d'HBL modifient leur phénotype et activent des mécanismes de survie et de prolifération pour former des nodules tumoraux structurés et vascularisés au sein de la CAM. Le traitement des cellules par le cisplatine conduit à un arrêt net de la progression tumorale.

La seconde partie présente les résultats concernant la régulation de la β -caténine et des processus oncogéniques par les microARNs dans les cellules d'HBL. Un crible fonctionnel m'a permis d'identifier plusieurs microARNs ayant un effet inhibiteur sur la β -caténine. Quatre microARNs, sous-exprimés dans les tumeurs de patients, bloquent la prolifération cellulaire et l'activité de la voie Wnt *in vitro*. Le miARN le plus efficace interagit avec l'ARNm de la β -caténine *via* un site unique localisé dans sa région 3' non traduite et bloque la croissance des tumeurs d'HBL sur la CAM.

Durant ma thèse j'ai développé un nouveau modèle animal d'étude de l'HBL qui permet de modéliser la croissance tumorale et de tester l'impact de molécules thérapeutiques. Ce travail a également permis d'identifier de nouveaux microARNs sous-exprimés dans les tumeurs d'HBL, qui inhibent l'expression de la β -caténine et agissent comme des gènes suppresseurs de tumeur. Ces microARNs constituent de potentielles nouvelles molécules thérapeutiques dans le traitement de l'HBL et pourraient aussi être utilisés comme des biomarqueurs diagnostiques et pronostiques.

Mots clefs: Hépatoblastome, Cancer, Foie, Pédiatrique, MicroARNs, β -caténine, Voie Wnt, Modèle, Membrane chorioallantoïdienne, Poulet.