



HAL
open science

Etude de l'implication des miARNs dans le cancer du sein triple négatif et la régulation de BRCA1.

Insaf Fkih M'Hamed

► To cite this version:

Insaf Fkih M'Hamed. Etude de l'implication des miARNs dans le cancer du sein triple négatif et la régulation de BRCA1.. Médecine humaine et pathologie. Université d'Auvergne - Clermont-Ferrand I; Université de Monastir (Tunisie), 2015. Français. NNT : 2015CLF1MM19 . tel-01657435

HAL Id: tel-01657435

<https://theses.hal.science/tel-01657435>

Submitted on 6 Dec 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.

Ecole Doctorale des Sciences de la Vie,
de la Santé, de l'Agronomie et de l'Environnement

THESE EN COTUTELLE

Présentée à l'Université d'Auvergne pour l'obtention du grade de
Docteur d'Université

Spécialité

Oncologie Moléculaire

Soutenance le 10 Décembre 2015

Par

Insaf FKIH M'HAMED

*Etude de l'implication des miARNs dans le
cancer du sein triple négatif et la régulation de
BRCA1*

Directeurs de thèse : Pr. Yves-Jean BIGNON
Pr. Abderraouf KENANI

Rapporteurs

Dr. Pierre BUSSON

Pr. Mounir TRIMECHE

Membres

Pr. Ahmed Salaheddine MASMOUDI

Pr. Yves-Jean BIGNON

Pr. Abderraouf KENANI

Dr. Maud PRIVAT

Département d'Oncogénétique du Centre Jean Perrin, Clermont-Ferrand

EA4677 ERTICa - Equipe de Recherche sur les Traitements Individualisés du Cancer

Laboratoire de Biochimie, UR 12ES08 "Signalisation Cellulaire et Pathologies",

Faculté de Médecine de Monastir



UdA | Université d'Auvergne



المعهد العالي للبيوتكنولوجيا بالمنستير
INSTITUT SUPERIEUR DE BIOTECHNOLOGIE DE MONASTIR



Ecole Doctorale des Sciences de la Vie,
de la Santé, de l'Agronomie et de l'Environnement

THESE EN COTUTELLE

Présentée à l'Université d'Auvergne pour l'obtention du grade de
Docteur d'Université

Spécialité

Oncologie Moléculaire

Soutenance le 10 Décembre 2015

Par

Insaf FKIH M'HAMED

*Etude de l'implication des miARNs dans le
cancer du sein triple négatif et la régulation de
BRCA1*

Directeurs de thèse : Pr. Yves-Jean BIGNON
Pr. Abderraouf KENANI

Rapporteurs

Dr. Pierre BUSSON

Pr. Mounir TRIMECHE

Membres

Pr. Ahmed Salaheddine MASMOUDI

Pr. Yves-Jean BIGNON

Pr. Abderraouf KENANI

Dr. Maud PRIVAT

Département d'Oncogénétique du Centre Jean Perrin, Clermont-Ferrand

EA4677 ERTICa - Equipe de Recherche sur les Traitements Individualisés du Cancer

Laboratoire de Biochimie, UR 12ES08 "Signalisation Cellulaire et Pathologies",

Faculté de Médecine de Monastir



UdA | Université d'Auvergne



المعهد العالي للبيوتكنولوجيا بالمنستير
INSTITUT SUPERIEUR DE BIOTECHNOLOGIE DE MONASTIR



Remerciements

Je tiens à exprimer tous mes remerciements à mon Directeur de thèse Monsieur le Professeur **Yves-Jean BIGNON**, directeur du Laboratoire de Biologie Médicale OncoGènAuvergne et directeur du département d'oncogénétique au Centre Jean Perrin, à Clermont-Ferrand, pour m'avoir accueillie dans son équipe. Je lui suis très reconnaissante d'avoir mis à ma disposition les moyens nécessaires à la réalisation de ma thèse. Qu'il trouve ici l'assurance de ma profonde gratitude.

Je remercie également mon directeur de thèse, Monsieur **Abderraouf KENANI**, Professeur de Biochimie et de Biologie Moléculaire à la Faculté de Médecine de Monastir, et Directeur de l'Unité de recherche UR 12ES08 "Signalisation Cellulaire et Pathologies". Son soutien, ses conseils, ses encouragements ainsi que sa gentillesse m'ont particulièrement aidé durant ces quatre années de thèse en cotutelle. Qu'il trouve dans ces lignes toute ma reconnaissance et mon profond respect.

Je tiens aussi à adresser mes plus vifs remerciements au Docteur **Maud PRIVAT** (laboratoire d'oncologie Moléculaire au centre Jean Perrin) pour sa présence remarquable durant la réalisation de ce travail, ses encouragements et son engagement dans toutes les étapes de mon encadrement.

Je souhaite remercier vivement Monsieur **Mounir TRIMECHE**, Professeur d'Anatomie à la Faculté de Médecine de Sousse et au laboratoire d'Anatomie et Cytologie Pathologiques du CHU Farhat Hached Sousse pour son collaboration qui m'a permis d'accomplir la dernière partie de ma thèse.

Je remercie également les membres du jury pour l'honneur qu'ils me font, et notamment le Dr. **Pierre BUSSON** (Directeur de recherche au CNRS, UMR 8126, Institut Gustave Roussy, Villejuif, France), le Pr. **Mounir TRIMECHE** (laboratoire

d'Anatomie et Cytologie Pathologiques du CHU Farhat Hached Sousse) et le Pr. **Ahmed Salaheddine MASMOUDI**, (Professeur de biochimie et de biologie moléculaire à l'Institut Supérieur de Biotechnologie de Sidi Thabet) pour avoir accepté de faire partie de mon jury et d'évaluer mon travail de thèse.

Mes remerciements s'adressent également aux membres du Laboratoire de Biochimie (Monastir), aux membres du laboratoire d'Oncologie Moléculaire, à toute l'équipe ERTICA au centre Jean Perrin.

J'aimerais aussi remercier mes chers parents (**Habib & Zahira**), à qui je dois tout ce que je suis, que Dieu vous préserve et vous accorde une longue vie.

Je remercie de tout mon cœur mon époux **Walid** qui n'a cessé de m'encourager tout au long de ces années, d'être à côté de moi dans les moments les plus difficiles.

Je remercie également, mon beau père et ma belle mère, mes frères et mes beaux frères, ma sœur et ma belle sœur, toute ma famille, mes amis.

Je dédie particulièrement ce travail à l'âme de mon cher oncle **Hamadi**. J'espère que tu es fière de moi là où tu es.

À tous ceux qui nous ont prêté aide de près ou de loin, pour l'accomplissement de ce travail.

Sommaire

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	1
<i>Partie I-Les cancers du sein Triple Négatif</i>	2
I. Oncogenèse moléculaire des cancers du sein	2
II. Facteurs de risques des cancers du sein.....	4
1. Facteurs de risque acquis	4
2. Facteurs génétiques	9
III. Classifications des cancers du sein	10
1. Classification histologique.....	11
2. Classification moléculaire.....	12
IV. Spécificités cliniques, Pronostiques, thérapeutiques des cancers du sein Triple-Négatif..	16
<i>Partie II - Le gène BRCA1</i>	21
I. Structure du gène, du transcrit et de la protéine BRCA1.....	21
II. Fonctions de la protéine BRCA1	23
1. Rôle dans la réparation de l'ADN.....	24
2. Rôle dans la régulation de la transcription.....	26
3. Rôle dans le contrôle du cycle cellulaire.....	27
III. BRCA1 dans le risque familial et sporadique du cancer du sein	28
1. Mutations germinales de <i>BRCA1</i> dans le cancer du sein familial.....	28
2. Implications de BRCA1 dans le cancer du sein sporadique	29
2.1 Mutations somatiques	30
2.2 Méthylation du promoteur de <i>BRCA1</i>	30
2.3 Surexpression du gène <i>ID4</i> (répresseur de <i>BRCA1</i>)	31
2.4 Régulation de BRCA1 par des micro-ARNs	31
<i>Partie III- Les microARN (miARN)</i>	33
I. Biogénèse des miARN.....	33
II. Modes d'actions	37
1. Interaction miARN/ARNm.....	37
2. Les différents modes d'action des miARNs.....	40
2.1. Clivage des ARNm cibles	42
2.2. Déadénylation et dégradation de l'ARNm.....	43
2.3. Répression de la traduction par les miARN	44

2.4. Cas particuliers d'activation de traduction.....	45
III. miARN et le cancer du sein	46
1. Perturbations de l'expression de miARN dans le cancer du sein.....	46
2. Fonction des miARN dans le cancer du sein	48
2.1. Les miARNs oncogènes / suppresseurs de tumeur dans le cancer du.....	48
2.2. Les miARNs et le cancer du sein triple négatif (CSTN).....	51
PROBLEMATIQUE ET OBJECTIFS	54
MATERIEL ET METHODES	57
I. Matériel utilisé.....	58
1. Lignées cellulaires.....	58
2. Tissus mammaires en paraffine.....	61
II. Méthodes.....	64
1. Extraction d'ARN	64
2. PCR quantitative	65
3. miScript miRNA PCR Array	66
4. Transfection Cellulaire.....	68
5. Prolifération cellulaire.....	69
6. Analyse in silico de quatre miARN dans les données TCGA.....	70
7. Immunohistochimie.....	70
8. Analyse statistique	72
RESULTATS	73
<i>Partie I- Etude in vitro de l'expression de miARN et BRCA1 dans des lignées cellulaires de cancer du sein humain</i>	<i>74</i>
I. miR-10b et de miR-26a sont préférentiellement exprimés dans les lignées cellulaires dérivées de cancer du sein triple négatif	74
II. miR-146a et miR-153 ciblant la région 3'-UTR de <i>BRCA1</i>	75
III. L'expression du gène <i>BRCA1</i> est réglée par miR-10b, miR-26a et miR-153	81
IV. L'expression de l' <i>EGFR</i> est pas réglée par miR-146a dans les cellules MDA-MB-231 et MCF7	84
V. Stimulation et Inhibition de la prolifération cellulaire par miARNs.....	85
<i>Partie II- Analyse de l'expression in silico de miARNs sélectionnés dans la base de données TCGA.....</i>	<i>86</i>
I. L'expression différentielle de miR-10b, miR-26a, miR-146a et miR-153 dans TCGA	86

<i>Partie III- Etude ex vivo de l'expression de miARN et BRCA1 dans des tissus mammaires en paraffine</i>	88
I. Résultats cliniques des patientes atteintes du cancer du sein.....	88
II. Expression de BRCA1 chez des patientes atteintes du cancer du sein.....	89
III. Analyse du taux d'expression de miR-146a, miR-153, miR-10b et miR- 26a dans les tissus mammaires inclus en paraffine	90
IV. . Relation entre les données clinico-pathologiques et l'expression de miARNs	92
V. Pas de relation entre l'expression de miARNs et l'expression de BRCA1.....	95
VI. . Corrélation entre l'expression de miARNs analysés chez les patientes TN et non TN.	96
VII. Les miARNs analysés et les voies de signalisation impliquées dans le cancer du sein triple négatif.....	99
DISCUSSION ET PERSPECTIVES	103
I. Les miARNs comme biomarqueurs potentiels dans le cancer du sein triple négatif	104
1. miR-10b	104
2. miR-26a.....	106
3. miR-146a.....	107
4. miR-153	108
II. Identification des gènes cibles des miARNs « biomarqueurs » et les voies de signalisations impliquées dans le cancer du sein triple négatif.....	110
III. Les miARNs peuvent constituer des outils thérapeutiques pour le cancer du sein triple négatif.....	113
REFERENCES	117
ANNEXES	137

Liste d'abréviations

ADAR1	Adenosine Deaminase Acting on RNA 1
ADIPOR1	Adiponectin receptor 1
ADN	Acide Desoxyribonucléique
Ago	Argonaute
Arid4b	AT-rich interactive domain-containing protein 4B
ARN	Acide ribonucléique
ARNt	ARN de transfert
ATM	Ataxia Telangectasia Mutated
ATR	Ataxia Telangectasia and Rad3 Related
AXL	AXL Receptor Tyrosine Kinase
BARD1	BRCA1-associated RING domain 1
BASC	BRCA1 Associated genome Surveillance Complex
BCL2	B-cell lymphoma 2
BCL2A1	Bcl-2-related protein A1
Bim	Bcl-2-like protein 11
BIRC5	Baculoviral inhibitor of apoptosis repeat-containing 5
BRCA1	Breast Cancer gene 1
BRCA2	Breast Cancer gene 2
BRCT	BRCA1-C-Terminus
BRIP1	BRCA1 interacting protein C-terminal helicase 1
CAF1-CCR4-NOT	transcription complex
CCND2	Cyclin D2
CCNE2	Cyclin E2
CD40LG	CD40 Ligand
CD44	antigen (Indian blood group)
CD86	Cluster of Differentiation 86
CDC42	Cell division control protein 42 homolog
CDH1	Cadherin-1
CDKN1A	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1
CHEK2	Checkpoint Kinase 1
CK	Cytokératine
C-KIT	Tyrosine-protein kinase Kit
CSTN	Cancer du sein triple négatif
Ct	Cycle threshold
CTLA-4	Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4
CXCL12/SDF1	C-X-C motif chemokine 12 / stromal cell-derived factor 1
CXCL8	Interleukin 8
CXCR4	C-X-C chemokine receptor type 4
CYP1B1	Cytochrome P450 1B1
DGCR8	DiGeorge syndrome critical region 8
DNAJB6	DnaJ homolog subfamily B member 6
EGFR	Epidermal growth factor receptor
EiF4F	Eukaryotic initiation factor
EphA2	Ephrin type-A receptor 2
ER- α	Estrogen receptor alpha
FAB7	Frontabdominal-7

FADD	Fas-associated death domain
FN1	Fibronectin
TrkB	Tropomyosin receptor kinase
E2F1	Transcription factor E2F1
FOXA1	Forkhead box protein A1
FOXO1	Forkhead box protein O1
FOXO3a	Forkhead box O3
GADD45	Growth Arrest and DNA Damage
GATA-3	Trans-acting T-cell-specific transcription factor GATA-3
GSK3B	Glycogen synthase kinase 3 beta
GW182	Glycine-tryptophan repeats containing proteins
Gy	Grey
HER2	human epidermal growth factor receptor 2
HER3	human epidermal growth factor receptor 3
VEGF-A	Vascular endothelial growth factor A
HIF-1	Hypoxia-inducible factors
HMGA2	High-mobility group AT-hook 2
HoxB3	Homeobox protein Hox-B3
HOXD10	Homeobox D10
HOXO1	Homeobox A1
HR	Homologous Recombination
H-Ras	Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog
hsa	Homo sapiens
Hsp90	Heat shock protein 90
ID4	Inhibitor of DNA binding 4
IFNB1	Interferon beta
IGF1	Insulin-like growth factor 1
IGFBP2	Insulin-like growth factor-binding protein 2
IGF-IR	Insulin-like growth factor 1 receptor
INCa	Institut National du Cancer
IRAK1	Interleukin-1 receptor-associated kinase 1
IRAK2	Interleukin-1 receptor-associated kinase-like 2
IRS1	Insulin receptor substrate 1
ITGB8	Integrin beta-8
JAK2	Janus kinase 2
KI67	Antigen Identified By Monoclonal Antibody Ki-67
KLF4	Kruppel-like factor 4
KRAS	GTPase KRas
LAMC1	Laminin subunit gamma-1
LASP1	LIM and SH3 domain protein 1
LMO2	LIM domain only 2 (rhombotin-like 1)
LNМ	lymph Node Metastasis
LUMA	Luminal A
LUMB	Luminal B
m7G	7-Methylguanosine
MCL-1	Induced myeloid leukemia cell differentiation protein Mcl-1
MERTK	Proto-oncogene tyrosine-protein kinase MER
MET	MET proto-oncogene, receptor tyrosine kinase
miARN	microARN
miRSC	miRNA-RNA-Induced Silencing Complex

MMP1	Matrix metalloproteinase-1
MRE11	Double-strand break repair protein MRE11A
MSN	Moesin Protein Coding gene
MTDH	Metadherin
MUC1	Mucin 1, cell surface associated
OCT4	Octamer-binding transcription factor 4
MYC	Gene codes for transcription factor
NES	Nuclear Export Sequence
NFKb	Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells
NFKB1	Nuclear factor NF-kappa-B p105 subunit
NFRSF-6	Tumor necrosis factor receptor superfamily member 6
NHEJ	Non-homologous end joining
NLS	Nuclear Localization Sequences
NR4A3	Nuclear receptor subfamily 4, group A, member 3
N-Ras	Neuroblastoma RAS viral oncogene homolog
NSB1	Nibrin gene
OMS	Organisation mondiale de la santé
ORF	Open Reading Frame
ORL	Oto-Rhino-aryngologie
P27Kip1	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1B
P53	Tumor protein p53
PAK1	Serine/threonine-protein kinase PAK 1
DIAPH2	Protein diaphanous homolog 2
PALB2	Partner and localizer of BRCA2
PARP	Poly (ADP-ribose) polymerase
PCNA	Proliferating cell nuclear antigen
PCR	Polymerase chain reaction
PD-1	Programmed cell death protein 1
PDCD4	Programmed cell death protein 4
PD-L1	Programmed death-ligand 1
PFN1	Profilin-1
PITPNC1	Phosphatidylinositol Transfer Protein, Cytoplasmic 1
PRKCE	Protein kinase C epsilon type
PTEN	Phosphatase and tensin homolog
qPCR	Real-Time quantitative PCR
qRT-PCR	Real-time reverse transcription-PCR
RAD50	DNA repair protein RAD50
RAD51	DNA repair protein RAD51
RASD1	Dexamethasone-induced Ras-related protein 1
RB1	Retinoblastoma protein
RDX	Radixin
RECK	Reversion-inducing-cysteine-rich protein with kazal motifs
RH	Recombinaison Homologue
RhoA	Ras homolog gene family, member A
RING	Really Interesting New Gen
RISC	RNA-induced silencing complex
RP	Progesterone receptor
RSP1	Random septum position protein Rsp1
RTKN	Rhotekin

SBR	Scarff Bloom and Richardson
Sec23a	Sec23 homolog A (<i>S. cerevisiae</i>)
SIRT1	NAD-dependent deacetylase sirtuin-1
SLC7A11	Cystine/glutamate transporter
SMAD1	SMAD family member 1
SMAD4	SMAD family member n°4
SNAI2	Zinc finger protein SNAI2
SNP	Single nucleotide polymorphism
SOCS1	Suppressor of cytokine signaling 1
SOX4	Transcription factor SOX-4
STAT1	Signal transducer and activator of transcription 1
STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3
STK11	Serine/threonine kinase 11
Suz 12	Polycomb protein SUZ12
TCGA	The Cancer Genome Atlas
TGF	transforming Growth Factor
TET	Ten-eleven translocation methylcytosine dioxygenase
THS	Traitement hormonal substitutif
Tiam1	T-cell lymphoma invasion and metastasis-inducing protein 1
TIMP3	Metalloproteinase inhibitor 3
TK	Tyrosine Kinase
TN	Triple Négatif
TP53	Tumor protein p53
TPM1	Tropomyosin alpha-1 chain
TRAF6	TNF receptor associated factors
TRBP	RISC-loading complex subunit TARBP2
TRPS1	Zinc finger transcription factor Trps1
TWF1	Twinfilin-1
TWIST1	Twist-related protein 1
Ubc9	SUMO-conjugating enzyme UBC9
3'UTR	3' UnTranslated Region
5'UTR	5' UnTranslated Region
VEGF	Vascular endothelial growth factor
WAVE3	WAS Protein Family, Member 3
WIF1	Wnt inhibitory factor 1
WNT5A	Protein Wnt-5a
XRN1	5'-3' Exoribonuclease 1
ZBTB10	Zinc Finger and BTB Domain Containing 10
Zeb1/Zeb2	Zinc finger E-box-binding homeobox 1/ 2

Liste des Figures

Figure 1. Processus multi-étapes de carcinogénèse	4
Figure 2. Schéma anatomique du sein.....	12
Figure 3. Classification moléculaire des cancers du sein.....	15
Figure 4. Caractéristiques structurales et fonctionnelles de la protéine BRCA1	23
Figure 5. Fonction de BRCA1 en réponse aux dommages de l'ADN... ..	24
Figure 6. Recombinaison homologue (RH) (a), Recombinaison non-homologue (NHEJ pour non homologous end joining) (b).....	25
Figure 7. Rôle de BRCA1 dans la réparation d'ADN par recombinaison homologue	26
Figure 8. Rôle de BRCA1 dans le contrôle du cycle cellulaire suite à l'exposition aux radiations ionisantes	28
Figure 9. Spectre des mutations germinales identifiées dans le gène BRCA1	29
Figure 10. BRCA1 et microARNs.....	32
Figure 11. Biogenèse des miARN et mécanisme d'action.....	36
Figure 12. Les différents types d'interaction entre miARNs et ARNm cibles.	38
Figure 13. Régulation des ARNm cibles par les miARNs.....	42
Figure 14. Clivage de l'ARNm cible	43
Figure 15. Disposition de la plaque miScript miRNA PCR Array	67
Figure 16. Taux d'expression de miR-10b, miR-26a, miR-146a et miR-153 dans les lignées cellulaires mammaires.....	78
Figure 17. Taux d'expression de miR-146b-5p, miR-212 et miR-132 dans les lignées cellulaires mammaires	80
Figure 18. Taux d'expression de miARN et anti-miARN dans les lignées cellulaires.....	82
Figure 19. Inhibition de BRCA1 par siARN.....	83
Figure 20. Taux d'expression de BRCA1 dans les cellules MDA-MB-231 et MCF7 transfectées par les miARNs.....	83
Figure 21. Taux d'expression d'EGFR dans les cellules MDA-MB-231 et MCF7 transfectées.....	84
Figure 22. Test de la prolifération cellulaire de MDA-MB-231 et MCF7 transfectées par les miARNs.....	85
Figure 23. Analyse de l'expression in silico de quatre miARNs dans la base de données TCGA.	86
Figure 24. Taux d'expression de 4 miARNs chez des patientes TN et non TN	91

Figure 25. Expression de miARN dans les TN et les non TN selon l'âge, la taille tumorale et le grade SBR	92
Figure 26. Expression de miR-146a selon l'expression de BRCA1	93
Figure 27. Expression de miR-26a selon l'expression de BRCA1	94
Figure 28. Les différentes voies de signalisation entre les 4 miARNs (heatmap, DIANA-TarBase v.7)	100

Liste des Tableaux

Tableau 1. Les principaux gènes de prédispositions héréditaires au cancer mammaire.....	10
Tableau 2. Outils bioinformatiques de prédiction des ARNm cibles des métazoaires	40
Tableau 3. miARNs oncogènes associés avec le cancer du sein.....	49
Tableau 4. miARNs suppresseurs de tumeur associés avec le cancer du sein.....	50
Tableau 5. Les miARNs impliqués dans le cancer du sein triple négatif, avec les cibles validées et les fonctions biologiques.....	52
Tableau 6. Divers microARNs et leurs rôles de régulation dans le cancer du sein triple négatif (CSTN).....	53
Tableau 7. Statut de BRCA1 et caractéristiques immunocytochimiques des cellules de cancer du sein humain, étudiés.....	60
Tableau 8. Les données clinico-pathologiques chez des patientes atteintes du cancer du sein	62
Tableau 9. Liste des amorces de miARNs	66
Tableau 10. Liste des mimiques et des inhibiteurs de miARN sélectionnés.....	69
Tableau 11. Le profilage de microARN par miScript miRNA PCR Array entre les sous-groupes de lignées cellulaires mammaires	77
Tableau 12. miARNs ciblant la région 3'UTR de <i>BRCA1</i> prédits par cinq algorithmes.....	79
Tableau 13. Comparaison de caractères clinico-pathologiques entre les patientes TN et non TN.....	89
Tableau 14. Expression de la protéine BRCA1 révélée par immuno-histochimie chez les patientes TN et non TN.....	90
Tableau 15. Expression de miARNs chez des patientes TN et non TN.....	91
Tableau 16. Expression de miARNs selon le statut de la protéine BRCA1.....	95
Tableau 17. Corrélation entre les miARNs analysés chez les patientes TN	97
Tableau 18. Corrélation entre les miARNs analysés chez les patientes non TN	98
Tableau 19. Les différentes voies de signalisation et les gènes cibles pour les 4 miARNs (DIANA-TarBase v.7).....	101
Tableau A1. Profilage de microARN impliqués dans des lignées cellulaires de cancer du sein humain par miScript miRNA PCR array lors de la comparaison des sous-groupes de lignées de cellules.....	140

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

Partie I-Les cancers du sein Triple Négatif

Le cancer du sein est le cancer le plus fréquent chez la femme, aussi bien en France qu'en Tunisie et dans le reste du monde. Il touche près d'une femme sur 10. Il représente plus du tiers de l'ensemble des nouveaux cas de cancer chez la femme (données INCa).

I. Oncogenèse moléculaire des cancers du sein

L'oncogenèse (ou cancérogenèse) est un processus qui conduit à la transformation de cellules normales en cellules malignes. Le cancer du sein est une maladie résultant des altérations de l'ADN cellulaire, survenant dans 90% des cas dans les cellules somatiques. Dans 10 % des cas, il s'agit d'un cancer héréditaire (Key et al., 2001).

La cancérogenèse mammaire est un phénomène multifactoriel, impliquant plusieurs gènes, aussi bien dans les formes héréditaires (anomalies génétiques constitutionnelles) que dans les formes sporadiques (anomalies génétiques somatiques). Les modifications moléculaires les plus fréquemment décrites dans le cancer du sein sont des amplifications d'oncogènes, et des mutations ou délétions de gènes suppresseurs de tumeurs (Thompson et Easton, 2004). Les anomalies peuvent toucher les chromosomes (nombre aberrant de copies, translocations, délétions, perte d'hétérozygotie, extension des télomères), l'ADN (mutations ponctuelles, altérations des microsatellites, événements épigénétiques), l'ARN (sous ou surexpression, mutations), et les protéines (altérations ou modifications structurales, changement d'activité enzymatique, localisation, altération du profil d'expression) (Bièche et Lidereau, 1995 ; Bièche et al., 1999).

L'oncogenèse mammaire se déroule en plusieurs étapes (Figure 1). La première étape d'initiation se caractérise par une accumulation de mutations génétiques spontanées ou causées par l'exposition à des substances cancérigènes (chimique, viral, physique) qui, en absence de réparation, deviennent permanentes et se transmettent à la descendance cellulaire.

Des modifications génétiques (germinales ou somatiques) ou épigénétiques d'oncogènes ou de gènes suppresseurs de tumeurs provoquent l'immortalisation de la cellule. Ces cellules « initiées » génétiquement anormales, sont toujours contrôlées par l'environnement cellulaire. A ce stade, elles peuvent rester à l'état latent, sans exprimer leur potentialité oncogène, sur une longue période.

Lorsque les cellules entrent dans la seconde étape, dite de promotion, elles acquièrent leur indépendance vis-à-vis des facteurs de croissance, grâce aux proto-oncogènes, et perdent leur capacité de communication intercellulaire. Elles passent de l'état quiescent à un état prolifératif. Cette phase va donner naissance à des clones cellulaires. Ceci correspond à la formation d'une lésion précancéreuse, puis d'une tumeur bénigne. Les cellules développent alors une instabilité chromosomique qui leur confère un avantage sélectif notamment par l'accumulation de mutations dans les gènes de régulation du cycle cellulaire et des mécanismes de l'apoptose.

Enfin, lors de l'étape de progression, l'accumulation d'altérations géniques successives, favorisées par l'instabilité génétique des cellules cancéreuses, conduit à la sélection de clones de plus en plus agressifs et à l'acquisition de propriétés migratoires et invasives. Les cellules tumorales sont alors capables d'envahir les tissus adjacents et de métastaser. On parle alors de cancer invasif ou infiltrant (Jakóbisiak et al., 2003).

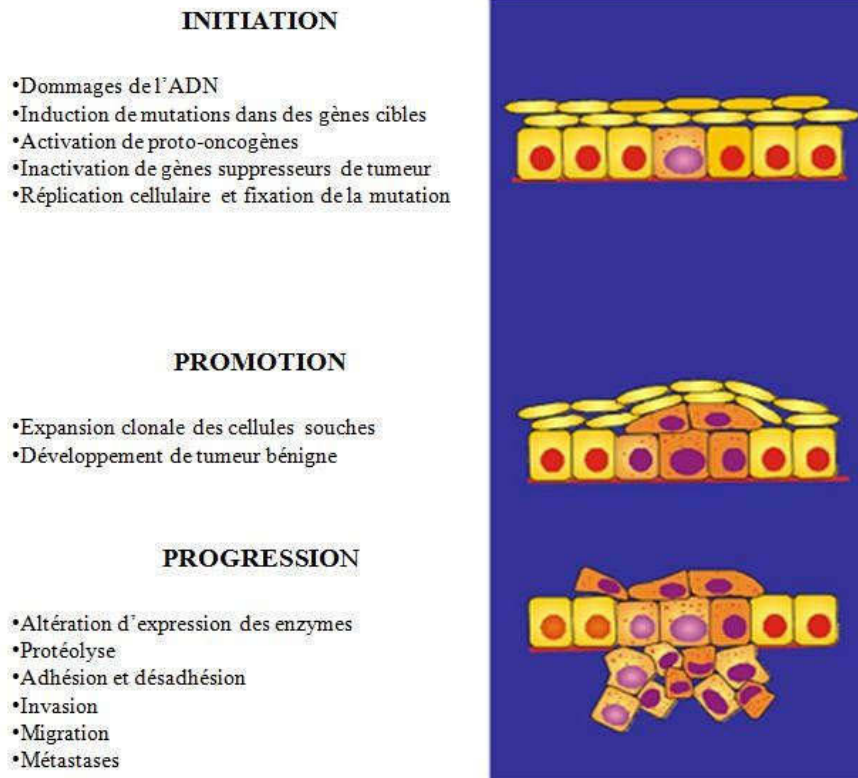


Figure 1. Processus multi-étapes de carcinogénèse (Jakóbisiak et al., 2003)

II. Facteurs de risques des cancers du sein

Bien que le cancer du sein ne soit pas attribuable à une seule étiologie, certains facteurs peuvent réduire ou accroître le risque qu'une femme en soit atteinte. Il s'agit donc d'une maladie multifactorielle.

1. Facteurs de risque acquis

▪ Le sexe et l'âge

Le cancer du sein est 100 fois plus fréquent chez la femme que chez l'homme. Le cancer de l'homme représente 2% de tous les cancers du sein et 0.5% des cancers de l'homme (Missaoui et al., 2011). Le sexe féminin constitue le principal facteur de risque de ce cancer.

L'âge est le second facteur de risque le plus important vis-à-vis du cancer du sein, avec une courbe d'incidence monotone augmentant de 30 à 70 ans. Environ 10 % des cas de cancer du

sein se manifestent chez les femmes âgées de moins de 35 ans et les cancers survenant avant 50 ans représentent 15 à 20% des cancers du sein. Le risque augmente entre 50 et 75 ans (près des deux tiers des cancers du sein) (Nkondjock et Ghadirian, 2005).

- **Facteurs cliniques**

- ✓ **Maladies bénignes du sein**

Les maladies bénignes du sein constituent un facteur de risque de cancer du sein. Elles sont histologiquement divisées en deux groupes : les lésions prolifératives et les lésions non prolifératives avec ou sans atypie. Les lésions non prolifératives ne sont généralement pas associées à un risque accru de cancer du sein ou, si elles le sont, le surrisque est très faible. Les lésions prolifératives sans atypie multiplient le risque par deux, tandis que les lésions hyperplasiques avec atypie augmentent ce risque d'au moins quatre fois (Nkondjock et Ghadirian, 2005). En plus de ces maladies bénignes du sein, une histoire personnelle de cancer du sein confère 2 à 4 fois le risque de la population générale de développer une seconde tumeur primaire du sein (Chen et al, 1999).

- ✓ **Densité mammographique**

Le risque de cancer du sein augmente avec le niveau de densité des tissus mammaires en mammographie. Pour les femmes ayant des seins denses en mammographie, le risque est multiplié de deux à six fois. Cette augmentation du risque est indépendante de l'effet des autres facteurs de risque. On estime que 30 % des cas de cancer du sein sont attribuables à une densité mammaire à la mammographie supérieure à 50 % par rapport à la moyenne (boyd et al, 1998 ; Nkondjock et Ghadirian, 2005).

- **Facteurs hormonaux**

De nombreuses études montrent que la survenue des premières règles avant l'âge de 12 ans augmente le risque de cancer du sein (Medina, 2005).

Les femmes qui ont leur ménopause après 50 ans présentent un risque accru de cancer du sein, en comparaison avec celles dont les menstruations cessent précocement. Le risque de cancer du sein augmente d'environ 3 %, pour chaque année supplémentaire, à partir de l'âge présumé de la ménopause. Cette association entre l'âge et le risque de cancer du sein est similaire, que la ménopause soit survenue naturellement, ou qu'elle résulte d'une ovariectomie bilatérale (Lacroix et Burke, 1997 ; McPherson et al., 2000). Le risque de cancer du sein est augmenté d'environ 25 % chez les femmes utilisant couramment les contraceptifs oraux. Plus les contraceptifs oraux seront utilisés longtemps, plus le nombre de cas de cancer du sein qui en résulteront sera important. Le Traitement hormonal substitutif (THS) de la ménopause est prescrit pour pallier la diminution du niveau des hormones ovariennes circulantes. Les femmes sous THS présentent un risque augmenté de cancer du sein, si on les compare aux femmes qui ne l'ont jamais utilisé et le risque de cancer du sein augmente avec la durée d'utilisation (McPherson et al., 2000 ; Nkondjock et Ghadirian, 2005 ; Merviel et al., 2011).

▪ **Facteurs liés à la reproduction**

Les femmes qui ont mené au moins une grossesse à terme avant l'âge de 30 ans présentent, en moyenne, un risque de cancer du sein diminué de 25 % par rapport aux femmes nullipares (Layde et al., 1989 ; Nkondjock et Ghadirian, 2005). L'effet protecteur de la multiparité semble augmenter proportionnellement au nombre d'accouchements.

L'effet de l'allaitement sur le risque de cancer du sein est controversé, probablement parce que la modification du risque, compte tenu de la durée moyenne de l'allaitement, est faible.

Les femmes qui ont allaité pendant une durée totale d'au moins 25 mois présentent un risque réduit de 33 %, par rapport à celles qui n'ont jamais allaité (Petraakis et al., 1987). Une diminution significative du risque de cancer du sein de plus de 4 % a été rapportée pour chaque période d'allaitement de 12 mois. L'effet protecteur de l'allaitement sur le risque de cancer du sein semble plus important chez les femmes jeunes que chez les femmes plus âgées

(key et al., 2001). D'une manière générale, plus la durée de l'allaitement est longue, plus les femmes sont protégées contre le cancer du sein.

- **Facteurs liés aux habitudes de vie et nutrition**

- ✓ **Obésité et activité physique**

L'obésité est associée à un profil hormonal soupçonné de favoriser le développement du cancer du sein. L'obésité augmente d'environ 50 % le risque de cancer du sein chez les femmes ménopausées, probablement en raison de l'augmentation des concentrations sériques d'œstradiol libre (Key et al., 2001). Toutefois, l'obésité apparaît comme un facteur de risque important après la ménopause. Par ailleurs, les femmes ayant un surpoids de plus de 20 kg à partir de l'âge de 18 ans, présentent, après la ménopause, un risque de cancer du sein multiplié par deux (Wenten et al., 2002) .

L'activité physique modérée (30 à 60 minutes au moins 4 fois par semaine) diminue le risque de cancer du sein d'environ 35 %, en particulier chez les femmes ménopausées (Schmidt et al., 2009). Un bénéfice maximal est tiré d'une activité physique soutenue tout au long de la vie. L'activité physique influence également le risque de cancer du sein en diminuant la prise de poids, en particulier après la ménopause. Les mécanismes biologiques par lesquels l'activité physique serait associée à une diminution de risque impliquent la réduction de la production d'œstrogènes et le maintien de l'équilibre énergétique (Friedenreich et al., 2001 ; Nkondjock et Ghadirian, 2005).

- ✓ **Tabac et Alcool**

La fumée du tabac est une importante source de substances carcinogènes. Pourtant, la cigarette n'est pas considérée comme un facteur de risque établi du cancer du sein. Certains investigateurs ont trouvé que les fumeuses présentent un risque réduit, d'autres aucun risque, d'autres ont rapporté une augmentation de risque associé au tabagisme. Le tabagisme passif semble associé à un risque augmenté d'environ 60 % ; ce risque est multiplié par trois chez les

femmes après la ménopause. L'effet protecteur de la cigarette dans le cancer du sein serait dû à une diminution des œstrogènes circulants et à l'action anti-œstrogénique du tabac. Il a été rapporté que les fumeuses ont une ménopause précoce et une concentration urinaire réduite d'œstrogènes pendant la phase lutéale du cycle menstruel (Hamajima et al., 2002 ; Nkondjock et Ghadirian, 2005 ; Reynolds et al., 2009).

L'alcool est le seul facteur nutritionnel établi de risque de cancer du sein. Ce risque augmente d'environ 7 % pour une consommation moyenne d'une boisson alcoolique par jour. Les femmes ayant un cancer du sein, et consommant au moins une boisson alcoolique par jour, ont une durée de survie diminuée de 15 % à 40 %, comparativement à celles qui ne boivent pas d'alcool (Yu, 1998 ; Feigelson et al., 2001).

✓ **Autres déterminants nutritionnels**

L'association entre le risque de cancer du sein et les principales composantes de l'alimentation humaine incluant les fruits et les légumes, les produits laitiers, la viande, les vitamines, les fibres et les phyto-œstrogènes a fait l'objet de nombreuses études. Un intérêt particulier a été porté sur les graisses alimentaires. D'une manière générale, les résultats restent discordants (Key et al., 2004). Par ailleurs, la restriction de l'apport énergétique durant l'enfance ou avant la première grossesse réduit le risque de cancer du sein de 23 % à 76 %. Le mécanisme de cette association impliquerait le recul de l'âge d'apparition des premières règles et la diminution du niveau de l'hormone de croissance IGF-I et des œstrogènes (Michels et Ekbom, 2004 ; Nkondjock et Ghadirian, 2005).

✓ **Radiations ionisantes**

Un suivi intensif de plusieurs groupes de population a montré que le sein est l'un des organes les plus sensibles aux effets des radiations (Key et al., 2001). L'exposition du tissu mammaire aux radiations ionisantes, avant l'âge de 40 ans, est susceptible de provoquer un cancer du sein dans les années ultérieures. Il a également été montré que l'effet des radiations

ionisantes, chez les femmes exposées avant l'âge de 40 ans, est associé à un risque de cancer du sein multiplié par trois, pour une exposition évaluée à 1 Gy (Boice, 1996 ; Nkondjock et Ghadirian, 2005). Le risque de cancer du sein est similaire pour une exposition unique ou pour des expositions multiples à intensité totale égale (Little et al., 1999). Les radiations ionisantes augmentent le risque de cancer du sein dans la mesure où elles endommagent l'ADN et ses constituants. Des études suggèrent que des variabilités génétiques individuelles peuvent influencer la sensibilité aux radiations ionisantes (Ronckers et al., 2005 ; Wakeford, 2004).

2. Facteurs génétiques

5 à 10 % des cancers mammaires ont une origine génétique c'est-à-dire qu'il existe une agrégation familiale du cancer du sein dans une même branche parentale (Wooster et Weber, 2003). L'histoire familiale est associée, de manière régulière, à un risque accru de cancer du sein. Le risque relatif pour toute forme de parenté est d'environ 1,9 et l'excès de risque est plus marqué chez les femmes plus jeunes et lorsque la maladie s'est développée chez une proche parente (mère, fille ou sœur), avant l'âge de 50 ans (Pharoah et al., 1997).

Par ailleurs, certaines mutations génétiques sont susceptibles d'augmenter le risque de cancer du sein. Deux gènes, *BRCA1* (Breast Cancer associated gene 1) et *BRCA2* (Breast Cancer associated gene 2) localisés respectivement sur les chromosomes 17q et 13q, semblent les plus impliqués (Miki et al., 1994 ; Wooster et al., 1995). Ils apparaissent être des régulateurs importants de la réparation de l'ADN, du cycle cellulaire, et de l'apoptose (Gudmundsdottir et Ashworth, 2006). Une mutation délétère dans l'un de ces gènes de prédisposition héréditaire confère un risque cumulé de développer un cancer du sein de 80-85% pour les femmes et 6 % pour les hommes, lorsque le sujet porteur de ces gènes atteint l'âge de 70 ans (Ford et al., 1998 ; Wolpert et al., 2000). Pourtant, ces mutations ne sont détectées que dans 10-15% des cancers du sein familiaux (Ford et al., 1995 ; Newman et al., 1997).

Un troisième gène TP53 est à l'origine de tableaux familiaux très particuliers de cancer du sein associant principalement le syndrome de Li-Fraumeni, lié essentiellement à une mutation germinale hétérozygote du gène TP53, des cas de sarcomes, de tumeurs cérébrales et d'hémopathies (Chompret et al., 2000 ; Frebourg et al, 2001).

D'autres gènes de prédisposition, responsables de syndromes autosomiques dominants plus rares et comportant un risque modéré de cancer du sein, ont également été identifiés (Tableau 1) (Turnbull et Rahman, 2008).

Tableau 1. Les principaux gènes de prédispositions héréditaires au cancer mammaire (Turnbull et Rahman, 2008)

Gène/Locus	Syndrome associé	Risque Relatif	Fréquence dans la population	Autre type de cancers associés
<i>BRCA1</i>		>10	0.1%	Ovaire
<i>BRCA2</i>	Anémie de Fanconi groupe D1	>10	0.1%	Ovaire, Prostate
<i>TP53</i>	Li-Fraumeni	>10	rare	Ostéosarcome
<i>PTEN</i>	Cowden	2–10	rare	Thyroïde, Endomètre
<i>STK11</i>	Peutz-Jeghers	2–10	rare	Gastro-intestinal
<i>CDH1</i>		2–10	rare	Gastrique diffus
<i>ATM</i>	Ataxie-Télangiectasie	2–3	0.4%	Lymphomes
<i>CHEK2</i>		2–3	0.4%	Leucémie, colon
<i>BRIP1</i>	Anémie de Fanconi groupe J	2–3	0.1%	-
<i>PALB2</i>	Anémie de Fanconi groupe N	2–4	rare	Pancréas
10q26, 16q12, 2q35, 8q24, 5p12	-	1.08–1.26	24–50%	-
11p15, 5q11	-	1.07–1.13	28–30%	-
2q33	-	1.13	0.87	-

III. Classifications des cancers du sein

Le cancer du sein est une maladie complexe caractérisée par l'accumulation de multiples altérations moléculaires qui prennent naissance au niveau des unités cellulaires des tissus épithéliaux de la glande mammaire (Gonçalves et al., 2005). Il est cependant inapproprié de parler « du » cancer du sein tant ses formes sont différentes. Au niveau anatomique, on

distingue principalement les carcinomes canaux des carcinomes lobulaires. Les deux pouvant être soit *in situ* soit infiltrant. Cette classification morphologique a été améliorée par la connaissance des anomalies moléculaires des cancers du sein, aboutissant à définir des sous-groupes de cancers : luminal A, luminal B, HER2, basal-like, normal-like.

1. Classification histologique

Pour comprendre cette classification qui se rapporte aux constituants normaux du sein, il est nécessaire de faire un rappel concernant l'anatomie du sein. Chaque sein contient une glande mammaire (elle-même composée de quinze à vingt compartiments séparés par du tissu graisseux) et du tissu de soutien qui contient des vaisseaux (sanguins et lymphatiques), des fibres et de la graisse. Chacun des compartiments de la glande mammaire est constitué de lobules et de canaux. Le rôle des lobules est de produire le lait en période d'allaitement. Les canaux transportent le lait vers le mamelon (Figure 2).

Initialement, le cancer du sein a été défini par ses caractéristiques morphologiques et immunohistochimiques selon l'OMS. Dans plus de 95% des cas, les tumeurs malignes du sein se développent à partir des cellules épithéliales glandulaires et sont donc appelées des adénocarcinomes (ou des carcinomes). Les adénocarcinomes galactophoriques ou canaux sont majoritaires et représentent 70 à 80% des carcinomes infiltrants. Les adénocarcinomes lobulaires sont moins fréquents, entre 5 et 15%. Mais il existe d'autres formes rares de carcinomes infiltrants, tels que les carcinomes médullaires (2%), les carcinomes mucineux (ou colloïdes) (2%), les carcinomes tubuleux (1%), les carcinomes apocrines (dérivent des cellules lactifères) et la maladie de Paget (tumeur du mamelon)

Dans de rares cas, les cellules cancéreuses mammaires prolifèrent en carcinome *in situ* sans rupture de la lame basale, par opposition au carcinome infiltrant. Il existe 4 types architecturaux de carcinomes canaux *in situ* (massif, cribriforme, papillaire et comédo) dont le pronostic est favorable. D'autres types de cancer du sein, plus rares, qui prennent

naissance dans le tissu conjonctif du sein représentent moins de 1% de toutes les tumeurs malignes du sein et constituent un groupe de lésions disparates comportant les sarcomes phyllodes, les sarcomes mésoenchymateux, les angiosarcomes et les lymphomes non hodgkiniens primitifs du sein (Tubiana et Koscielny, 1987).

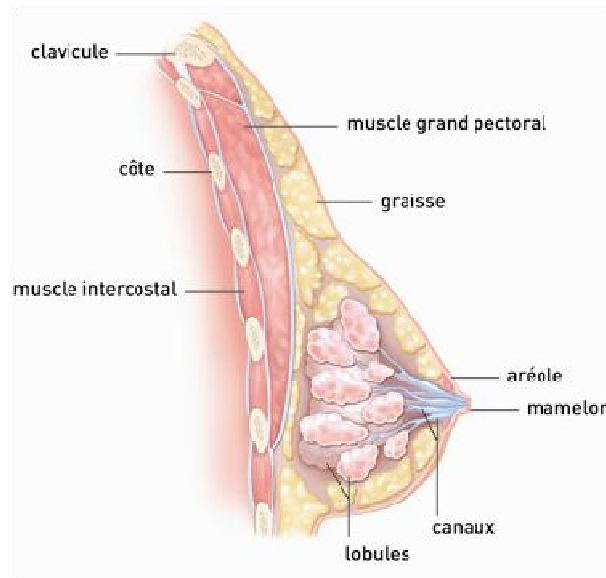


Figure 2. Schéma anatomique du sein

<http://www.e-cancer.fr/images/stories/cancerinfo/Sein/structure-sein-web-ok.jpg>

2. Classification moléculaire

L'étude de l'expression génique permet de proposer une nouvelle classification dite moléculaire en classes ou sous-types dans le cancer du sein.

Perou et al. ont été les premiers en 2000 à subdiviser les cancers du sein en sous-groupes selon leur profil d'expression génique basé sur l'analyse de plus de 40 000 gènes. Ils ont individualisé tout d'abord deux groupes principaux en fonction de l'expression des récepteurs aux estrogènes (RE). Ils ont identifié cinq sous-types de carcinomes en les comparant au tissu normal : Luminal A, Luminal B, HER2, basal-like et normal-like (Perou et al., 2000 ; Sorlie et al., 2001) (Figure 3).

✓ **Luminal A**

Ce groupe comprend des tumeurs RE+ dont l'expression génique est proche de celle des cellules épithéliales luminales dont le profil immunohistochimique est caractérisé par l'expression de certaines cytokératines, CK8/18 et CK19.

Le sous-type Luminal A représente 50 à 55 % des cancers du sein. Il est caractérisé par une expression élevée des gènes des RE, une expression élevée de gènes régulés par RE (GATA-3, FOX A1, etc.), une faible expression des gènes liés à la prolifération, une absence de surexpression de HER2 (Human Epidermal growth factor Receptor-2). Le gène TP53 est muté dans 13 % des cas. Sur le plan du phénotype, en pratique clinique, ce type correspond à des carcinomes tubuleux, et à des cancers canauxaires infiltrants ou cancers lobulaires infiltrants de grade I ou II, avec index de prolifération faible (Ki67 < 14 %, interprété en technique d'immuno-histochimie) (Valentin et al., 2012 ; Boissérie-Lacroix et al., 2013).

✓ **Luminal B**

Il représente environ 20 % cancers du sein. Par comparaison avec le groupe luminal A, il se caractérise par une expression plus faible des gènes des RE, une expression moindre de gènes régulés par RE (GATA-3, FOX A1, etc.), et une expression élevée des gènes liés à la prolifération. Le gène TP53 est muté dans 66 % des cas. Sur le plan du phénotype, en pratique clinique, ce type correspond à des carcinomes infiltrants de grade II ou III, exprimant les RE (RE+), avec Her2 Score 0, 1+, 2+ non amplifié, avec fort index de prolifération (Ki67 > 14 %). Les carcinomes survenant dans le cadre de mutations du gène *BRCA2* appartiennent souvent à ce type moléculaire (Boissérie-Lacroix et al., 2013).

✓ **HER2**

Il représente 15-20 % des cancers du sein. Il est caractérisé par l'absence d'expression des gènes liés aux RE, l'expression élevée des gènes de l'amplicon HER2 (GRB7, etc.), l'expression élevée des gènes liés à la prolifération. Le gène TP53 est muté dans 71 % des

cas. Sur le plan du phénotype, en pratique clinique, ce type correspond à des carcinomes infiltrants de grade II ou III, n'exprimant pas les RE (RE⁻), avec Her2 Score 3+ ou 2+ en immuno-histochimie, amplifié en FISH, quel que soit le Ki67 (Boisserie-Lacroix et al., 2013).

✓ **Basal-like**

Les tumeurs de type basal-like sont caractérisées par l'expression de gènes identiques à ceux exprimés par les cellules basales myoépithéliales de la glande mammaire, d'où le nom de « basal-like ». Il représente 10-15 % des cancers du sein et 56 à 85 % des cancers Triple Négatif (TN) (Les cancers TN représentent 7 à 16 % de tous les cancers et 70 % des tumeurs survenant chez des femmes *BRC1* mutées). Ils sont caractérisés par une absence complète d'expression du gène des RE et à la progestérone et de HER2 (« triple négativité »). Le sous-type basal-like exprime les cytokératines (CK) de haut poids moléculaires ou CK basales (ainsi dénommées à cause de leur expression dans les cellules basales ou myoépithéliales des canaux galactophores normaux). Il est caractérisé par l'absence d'expression des RE, l'expression des gènes de kératines de haut poids moléculaire (CK5, CK14, CK17), laminine et FAB7, l'expression élevée des gènes liés à la prolifération (surexpression de l'EGFR). On observe une mutation du gène TP53 dans 82 % des cas. En pratique clinique, ce type correspond à un phénotype histologique déterminé : cancer canalaire infiltrant de grade III, peu différencié, RH⁻, HER2⁻, avec infiltrat lymphocytaire, zones de nécrose tumorale, zone centrale fibrosée, et contours pushing (front continu de poussée tumorale, sans stroma réaction). Il s'agit d'un groupe hétérogène regroupant 85 % des tumeurs *BRC1* mutées, les cancers médullaires et métaplasiques (Foulkes et al., 2003 ; Valentin et al., 2012 ; Vincent-Salomon et al., 2010 ; Boisserie-Lacroix et al., 2013).

✓ **Normal-like**

L'expression génique est proche de celle du tissu mammaire normal, phénotype « normal ». Il s'avère que cette catégorie identifiait en fait des artefacts de dilution des ADN tumoraux par

les ADN du tissu mammaire normal. En revanche, trois nouvelles catégories ont été identifiées au sein des tumeurs RE négatives :

Les tumeurs basses en claudin « claudin-low » dont le phénotype se rapproche de celui des cellules souches (Hennessey et al., 2009), qui rassemblent la majorité des carcinomes à cellules fusiformes ou métaplasiques ; le groupe « apocrine moléculaire » présentant une activation du récepteur aux androgènes (Farmer et al., 2005) et un groupe « interféron rich » exprimant en particulier STAT1 (Transducteur de signal et activateur de la transcription 1) (Hu et al., 2006). La valeur pronostique et l'utilité clinique des ces trois derniers groupes reste à déterminer (Valentin et al., 2012).

Cette classification moléculaire a clairement amélioré la compréhension de la maladie en démontrant son hétérogénéité moléculaire.

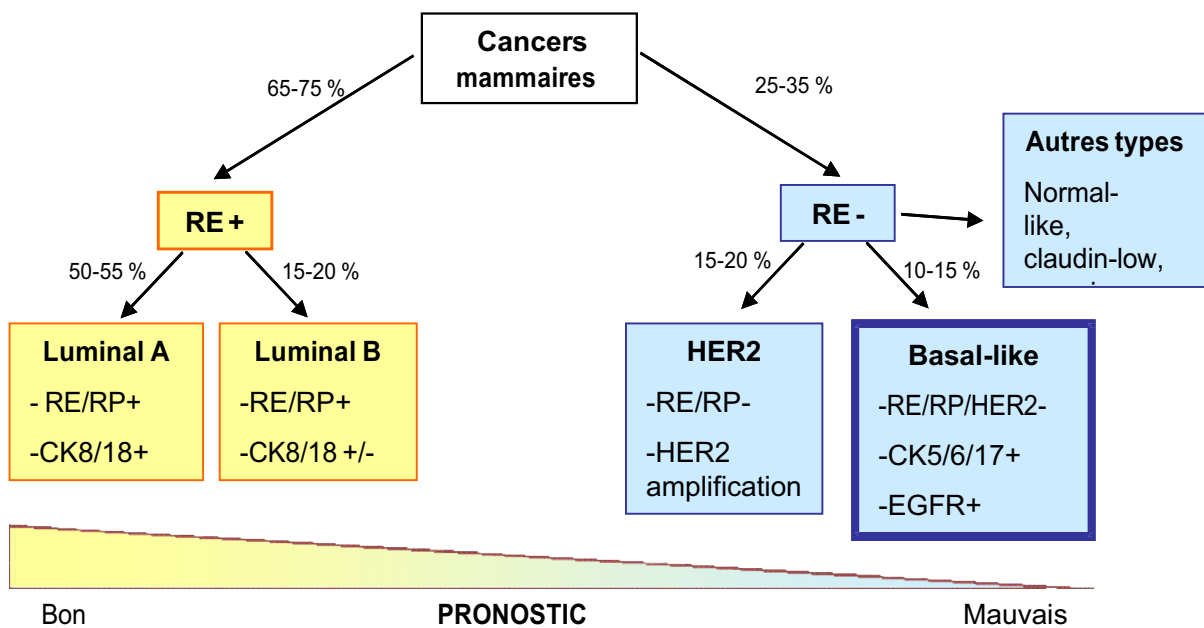


Figure 3. Classification moléculaire des cancers du sein (Valentin et al., 2012)

IV. Spécificités cliniques, Pronostiques, thérapeutiques des cancers du sein Triple Négatif

Le cancer du sein triple négatif est associé à un profil clinique défavorable avec un haut risque de rechute métastatique précoce. De plus, ce type de cancer du sein ne présente aucune cible thérapeutique propre et son pronostic est donc particulièrement mauvais. La définition de facteurs prédictifs de la réponse tumorale aux différents traitements et l'apport des thérapies ciblées sont deux pistes susceptibles d'améliorer la prise en charge et la survie des patients atteints par ce type de cancer extrêmement agressif (Freres et al., 2010).

✓ Spécificités cliniques

A la mammographie, le cancer du sein «triple négatif» se présente, la plupart du temps, sous la forme d'une masse circonscrite sans micro-calcifications et spicules caractéristiques du cancer du sein classique. Cette particularité évoque un cancer agressif, à prolifération majeure sans carcinome canalaire in situ associé. Ces tumeurs sont fréquemment rehaussées en IRM et hyper-fixantes en TEP-TDM (Tomographie par émission de positons).

Sur le plan histologique, on retrouve essentiellement des carcinomes canauxaux de haut grade (grade 3 de Bloom dans 66 % des cas). Les caractéristiques tumorales sont celles d'un cancer agressif : architecture peu différenciée, haut index mitotique, rapport nucléo-cytoplasmique important, noyaux irréguliers et hyper-chromatiques. La masse tumorale refoule les tissus voisins et présente des zones de nécrose géographiques et souvent centrales. La taille tumorale moyenne est plus élevée dans le groupe des cancers du sein «triple négatif» que dans les autres groupes (> 2 centimètres de diamètre au diagnostic dans 2/3 des cas) (Freres et al., 2010 ; Gonçalves et al., 2013).

✓ Spécificités pronostiques

Le cancer du sein «triple négatif» se caractérise par un profil de récurrence particulier. Le risque de rechute augmente au cours des deux premières années pour atteindre un pic après 2-

3 ans, puis diminue au cours des cinq années suivantes. La majorité des patientes qui ne présentent pas de récurrence après huit ans d'évolution sont guéries contrairement aux autres types de cancer du sein où le risque de récurrence persiste même tardivement. En cas de récurrence, la médiane de survie est de 9 mois, contre 20 mois pour les autres types de tumeur, avec une réponse moindre à la chimiothérapie.

La récurrence à distance constitue la majorité des cas, sans récurrence locale préalable. Dans le cancer de type triple négatif, par rapport aux autres groupes de cancer du sein, le risque de métastases à distance est moins important au niveau des os et du foie alors qu'il augmente au niveau du cerveau et des poumons. Le risque de récurrence locale est mal défini puisqu'il varie selon les études publiées. On remarque tout de même que ces récurrences sont plus précoces dans le cancer du sein «triple négatif» que dans les autres types de cancer du sein. L'absence d'expression de CK19 est associée à un plus haut risque de récurrence locale. Le risque de métastases ganglionnaires est, lui aussi, mal défini. Cependant, il n'existe aucune corrélation entre la taille de la tumeur et le risque d'envahissement ganglionnaire pour les tumeurs de moins de cinq centimètres de diamètre. Cette caractéristique est bien connue pour le cancer du sein associé à une mutation de *BRCA1*, qui, généralement, s'apparente au cancer du sein «triple négatif». Tous les décès causés par le cancer du sein «triple négatif» surviennent dans les 10 ans après le diagnostic (Freres et al., 2010 ; Brady-West et McGrowder, 2001 ; Gonçalves et al., 2013).

✓ **Spécificités Thérapeutiques**

En dehors de la chirurgie et de la radiothérapie, la chimiothérapie est le seul traitement systémique validé dans le cancer du sein «triple négatif». Etant donné leur index mitotique élevé, ces tumeurs sont davantage chimiosensibles, particulièrement aux anthracyclines et, peut-être aussi, aux platines et ses dérivés.

Elles répondent également aux taxanes mais n'y sont pas plus sensibles que les cancers du sein non triple négatif. Le schéma actuellement validé est un schéma séquentiel FEC (Fluorouracil, Epirubicine, Cyclophosphamide) / taxane. Malgré leur chimiosensibilité, les cancers du sein «triple négatif» sont de moins bon pronostic en raison d'une progression rapide chez les non-répondeurs. Aujourd'hui, les études se focalisent sur les traitements ciblés afin d'augmenter l'efficacité thérapeutique dans les cancers du sein «triple négatif».

Le traitement ciblé s'attaque aux cibles moléculaires qui sont supposées jouer un rôle dans la carcinogénèse. Différentes voies de signalisation sont activées dans les cancers du sein triple négatif et pourraient potentiellement servir de cibles thérapeutiques dans ces cancers :

La voie de l'EGFR

L'EGFR (Epithelial Growth Factor Receptor ou HER-1) est un récepteur de type tyrosine kinase (TK) surexprimé dans 66 % des cancers du sein «triple négatif». Il existe deux types de thérapie ciblée sur ce récepteur, les anticorps monoclonaux et les inhibiteurs de son activité tyrosine kinase. Le blocage du récepteur entraîne la non-activation des kinases associées, une inhibition de la croissance cellulaire, une induction de l'apoptose, une diminution des métalloprotéinases de la matrice extracellulaire et une diminution de la vascularisation. Ces médicaments (ex : cetuximab, gefitinib...) sont déjà utilisés dans le traitement des cancers pulmonaire, colorectal et ORL métastasés et sont à l'étude en cancérologie mammaire et plus particulièrement en ce qui concerne le cancer du sein «triple négatif» (Freres et al., 2010 ; Gonçalves et al., 2013).

c-kit

c-kit est un facteur de croissance exprimé dans 31 % des cancers du sein avec un profil triple négatif. Une étude de Simon et al a cependant montré une faible incidence de mutation des gènes kit dans ces cancers (Simon et al., 2004). L'Imatinib mesylate est un inhibiteur de l'activité tyrosine kinase de c-kit mais surtout de la protéine Bcr-Abl impliquée dans la transformation néoplasique des leucémies myéloïdes chroniques.

Son activité en cancérologie mammaire n'a pas encore été démontrée.

Les inhibiteurs de l'angiogénèse

La néo-angiogenèse joue un rôle important dans la croissance tumorale. Le VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) est le premier facteur contrôlant la formation des vaisseaux. Il n'est pas surexprimé de façon spécifique dans le cancer du sein «triple négatif», mais la vascularisation joue un rôle important dans la dissémination métastatique de la maladie. Le bevacizumab est un anticorps monoclonal anti-VEGF. Son taux de réponse en monothérapie est faible, mais, associé au paclitaxel, il augmente significativement la survie sans rechute mais pas la survie globale. Deux études ont récemment confirmé le bénéfice en termes de survie sans progression d'une association du bévacizumab avec le docétaxel (étude AVADO) et à la capécitabine (Freres et al., 2010).

Les mécanismes de réparation de l'ADN et les inhibiteurs PARP

BRCA1 joue un rôle majeur dans la réparation des cassures des doubles brins de l'ADN par le mécanisme de recombinaison homologue (HR). L'expression de la protéine BRCA1 est significativement plus faible dans les tumeurs mammaires avec un grade histologique élevé, un déficit d'expression des récepteurs hormonaux et un profil triple négatif (basal-like) (Freres et al., 2010). Ainsi, la voie BRCA1 est probablement dysfonctionnelle dans les cancers du sein «triple négatif». Des mutations constitutionnelles, un mécanisme épigénétique, une régulation post-transcriptionnelle par des micro-ARN (Moskwa et al., 2011), la méthylation du promoteur du *BRCA1*, pourraient être en cause. Ces tumeurs présentant une altération de la voie BRCA1 ont une sensibilité accrue aux sels de platine, qui génèrent des cassures ADN, d'où l'idée de les utiliser d'avantage dans le traitement du cancer du sein «triple négatif». Les cellules avec une dysfonction de la voie BRCA1 seraient également sensibles aux inhibiteurs d'une enzyme, la Poly (ADP-ribose) polymérase (PARP).

Cette enzyme est activée par les cassures ADN simples brins et permet la réparation de cette cassure unique. Dans ces tumeurs BRCA1 déficientes, la réparation des cassures de l'ADN est impossible si les deux voies de réparation PARP et HR sont inhibées. Or, la perte de fonction BRCA1 inhibe la voie HR et les cellules tumorales soumises aux inhibiteurs PARP sont vouées à l'apoptose.

Autres cibles thérapeutiques potentielles

Les autres exemples de cibles potentielles dans les cancers du sein triple négatif comprennent la protéine P53 fréquemment mutée, le récepteur tyrosine kinase MET, la régulation transcriptionnelle avec les histones déacétylases ou avec des microARNs (Moskwa et al., 2011), la protéine chaperonne HSP90, la voie NOTCH, ou encore les acteurs moléculaires de la réponse immune tels que NFkB, le récepteur CXCR4 et son ligand CXCL12/SDF1, le récepteur JAK2, ainsi que les molécules de régulation de la réponse T cytotoxique CTLA-4 ou PD-1 et PD-L1, dont le ciblage par anticorps monoclonaux est en cours de développement clinique (Gonçalves et al., 2013).

Partie II - Le gène *BRCA1*

I. Structure du gène, du transcrit et de la protéine *BRCA1*

Le gène *BRCA1* a été localisé sur le chromosome 17q21-1 (Miki et al., 1994). Il est constitué de 5592 nucléotides distribués sur environ 100 kb d'ADN génomique dont 40 % sont des séquences répétées de type « *Alu* ». Le gène *BRCA1* est formé de 24 exons dont 22 sont codants. L'exon 1 est non codant et correspond à la majeure partie de l'extrémité 5'-UTR (de l'anglais 5' UnTranslated Region), laquelle comprend aussi le début de l'exon 2 jusqu'au codon d'initiation de la traduction. Le codon de terminaison est situé au début de l'exon 24 où commence l'extrémité 3'-UTR comportant le signal de polyadénylation. L'exon 4 est non codant aussi et comporte un motif de séquences *Alu* répétées (Smith et al., 1996).

La caractéristique du gène *BRCA1* est la présence d'un grand exon central (exon 11) de 3426 pb, qui représente plus de 60% de la séquence codante. La taille des autres exons varie de 41 à 311 pb. Les introns représentent 91% de la séquence du gène, et comportent plusieurs séquences répétées, dont 42% sont de type *Alu*, pouvant être à l'origine de mutations ou de réarrangements suite à des recombinaisons (Miki et al., 1994). Bien que très polymorphe, ce gène est conservé chez les mammifères (Yang et Lippman, 1999).

L'ARN messager majeur du gène *BRCA1* est de 7,8 kb et code une phosphoprotéine de 1863 acides aminés de 220 kDa. Le messenger primaire de *BRCA1* possède un nombre élevé de variants d'épissage, qui ne sont pas tous fonctionnels. Différentes études ont mis en évidence l'existence de trois variants d'épissage prédominants : un transcrit ne contenant pas les exons 9 et 10 (*BRCA1* Δ 9, 10) ; un transcrit ne contenant pas la majorité de l'exon 11 (*BRCA1* Δ 11b) et un transcrit combinant ces deux épissages alternatifs (*BRCA1* Δ 9, 10, 11b) (Lu et al., 1996 ; Thakur et al., 1997 ; Orban et Olah., 2003). Le variant *BRCA1* Δ 11b est exprimé à plus faible niveau que le transcrit sauvage (Wilson et al., 1997). Tous ces variants sont exprimés

de façon ubiquitaire aussi bien dans les cellules épithéliales mammaires que dans les lignées cellulaires dérivées de tumeurs mammaires, mais leurs rôles restent inconnus.

La protéine BRCA1 présente de nombreux domaines ayant des fonctions différentes (Figure 4) :

- Un domaine RING (Really Interesting New Gen) « **RING finger** », ou domaine en doigt de zinc à l'extrémité amino-terminale englobant les acides aminés 1 à 109 (exons 2-7) (Miki et al 1994 ; Clark et al., 2012). Il s'agit d'une région riche en résidus cystéine et histidine, pouvant lier des ions zinc. Il serait impliqué au niveau de différentes interactions protéines-protéines et protéine-ADN et il semble nécessaire aux fonctions de régulation de la transcription, de recombinaison et réparation de l'ADN (Lovering et al., 1993) ;
- Deux domaines **BRCT** (BRCA1-C-Terminus) à l'extrémité carboxy-terminale, s'étendant sur les résidus aminés 1 646 à 1 863. Il s'agit d'un motif d'acides aminés acides répétés en tandem. Ils interviendraient au niveau des interactions protéines-protéines et dans la réponse aux dommages de l'ADN (Callebaut et Mornon, 1997 ; Huyton et al., 2000 ; Clark et al., 2012). A travers son domaine BRCT, la protéine BRCA1 interagit avec différents partenaires dont p53, BRCA2 et RNA Helicase A qui lie BRCA1 à l'ARN polymérase II (Anderson et al., 1998).
- Deux sites de signalisation de localisation nucléaire **NLS** (Nuclear Localization Sequences), ils sont localisés à l'extrémité 5' de l'exon 11 (NLS1 : aa 503-508 et NLS2 : aa 607-614) et impliqués dans les interactions protéine-protéine. Seul le premier motif est essentiel à la localisation nucléaire de la protéine (Miki et al ., 1994 ; Thakur et al., 1997 ; Clark et al., 2012).
- un domaine d'exportation nucléaire **NES** (Nuclear Export Sequence) à proximité de l'extrémité amino-terminale de BRCA1 entre les résidus 81 et 99. Ce domaine faciliterait

l'exportation de la protéine du noyau vers le cytoplasme par un mécanisme dépendant d'un récepteur d'export nucléaire (Rodriguez et Henderson, 2000 ; Clark et al., 2012).

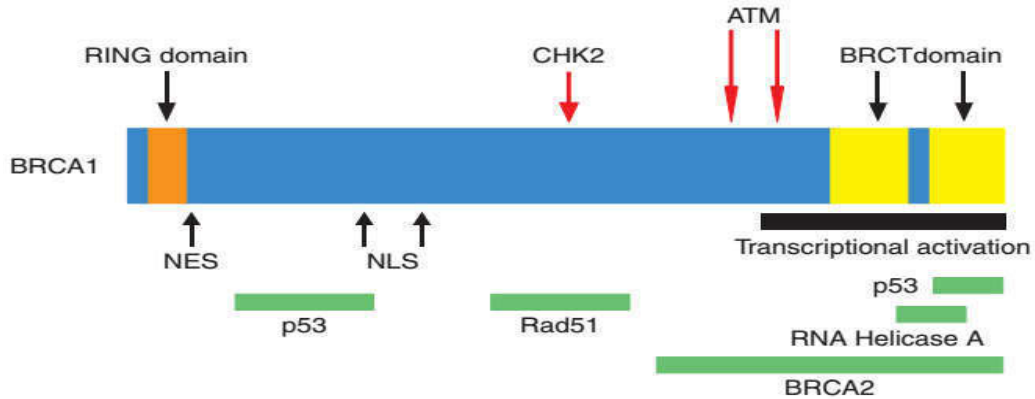


Figure 4. Caractéristiques structurales et fonctionnelles de la protéine BRCA1 (Yoshida et Miki, 2004)

II. Fonctions de la protéine BRCA1

BRCA1 est une phosphoprotéine majoritairement nucléaire de 220 kDa, qui naviguerait entre les deux compartiments cellulaires du fait de la mise en évidence des signaux d'export et de localisation nucléaire. Le gène *BRCA1* est exprimé de manière ubiquitaire mais plus abondamment dans les seins, les ovaires, le thymus et les testicules (Miki et al., 1994 ; Thakur et al., 1997). Cette protéine interagit avec plusieurs partenaires protéiques et intervient dans des processus clés tels que la réparation de l'ADN, la régulation de la transcription, le contrôle du cycle cellulaire (Figure 5).

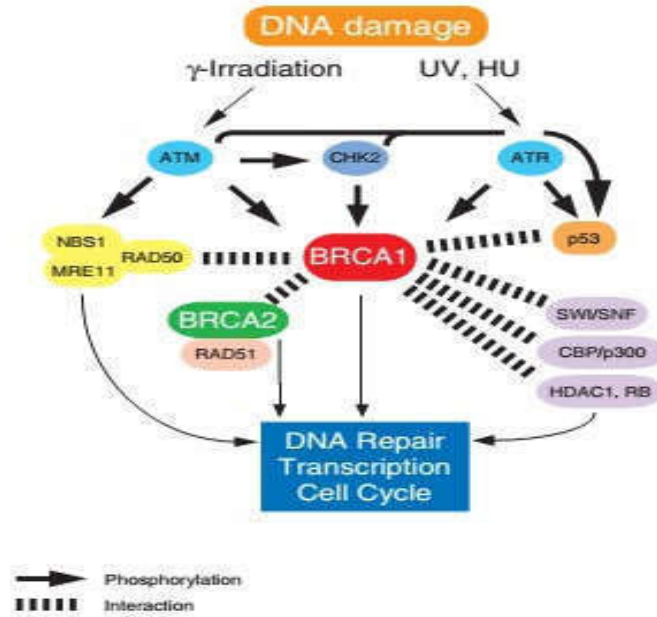


Figure 5. Fonction de BRCA1 en réponse aux dommages de l'ADN (Yoshida et Miki, 2004)

1. Rôle dans la réparation de l'ADN

Les cellules déficientes en BRCA1 présentent une hypersensibilité aux radiations ionisantes, accumulant spontanément des aberrations chromosomiques (cassures des chromosomes, translocations, formation de micronoyaux, duplication du centrosome). De plus, elles montrent un défaut au niveau de la réparation par recombinaison homologue (RH), alors que la recombinaison non-homologue (NHEJ pour non homologous end joining) (Figure 6) apparaît indemne (Venkitarman et al, 2001). Ces résultats suggèrent l'implication de BRCA1 dans la réponse aux lésions de l'ADN par recombinaison homologue, qui est la voie de réparation la plus fidèle. Par ailleurs, la participation de BRCA1 dans la réparation des lésions de l'ADN a été confortée par sa colocalisation et son interaction avec RAD51, homologue eucaryote de Rec A bactérien, impliqué dans la reconnaissance et la réparation des cassures double brin d'ADN (Venkitarman et al., 2001, Yoshida et Miki, 2004). La protéine RAD51 se lie aux structures simple brin de l'ADN au niveau des cassures double brins, afin de former un filament nucléoprotéique permettant l'échange d'informations entre les molécules d'ADN.

BRCA1 ne se lie pas directement à RAD51 mais s'associe à des complexes protéiques : interaction avec le complexe BASC (BRCA1 Associated genome Surveillance Complex) de 15 sous unités comprenant des suppresseurs de tumeur, des protéines de la réparation et le complexe MRE11/RAD50/ NSB1 (MRN) (Wang et al 2000).

Suite à des lésions de l'ADN, BRCA1 va être hyperphosphorylée par différentes kinases (ATM, ATR, CHEK2) selon le type de dommage induit. BRCA1 quitte alors les foci nucléaires pour s'accumuler au niveau des structures répliquatives lésées marquées par PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) et déclenche alors toute la machinerie de réparation de l'ADN (Figures 5, 7). En fait, BRCA1 jouerait un rôle de chef d'orchestre, coordonnant les différentes réponses cellulaires mises en jeu lors de la détection des lésions de l'ADN et donc le maintien de l'intégrité du génome (Yoshida et Miki, 2004).

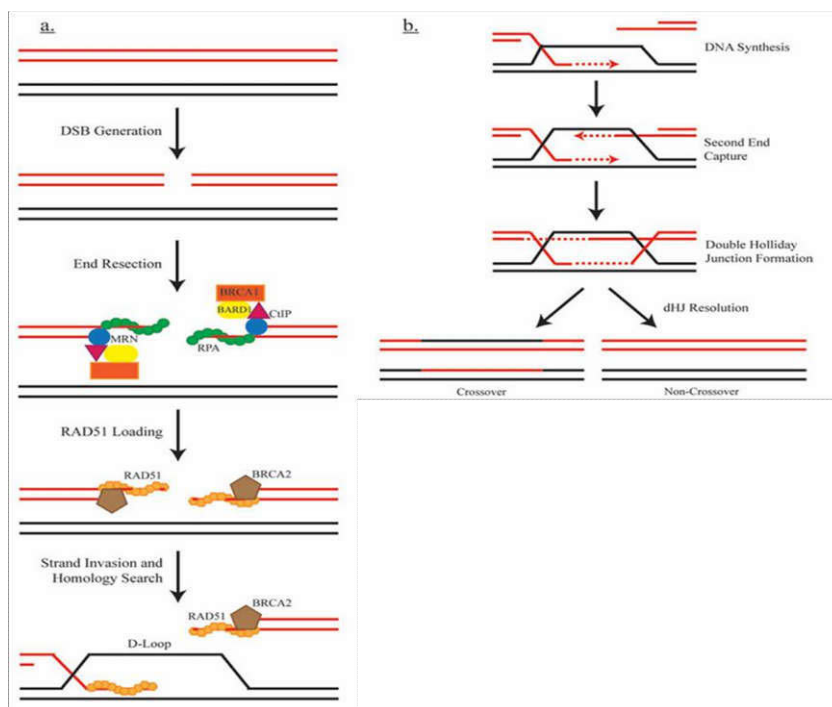


Figure 6. Recombinaison homologue (RH) (a), Recombinaison non-homologue (NHEJ pour non homologous end joining) (b) (O'Donovan et Livingston, 2010).

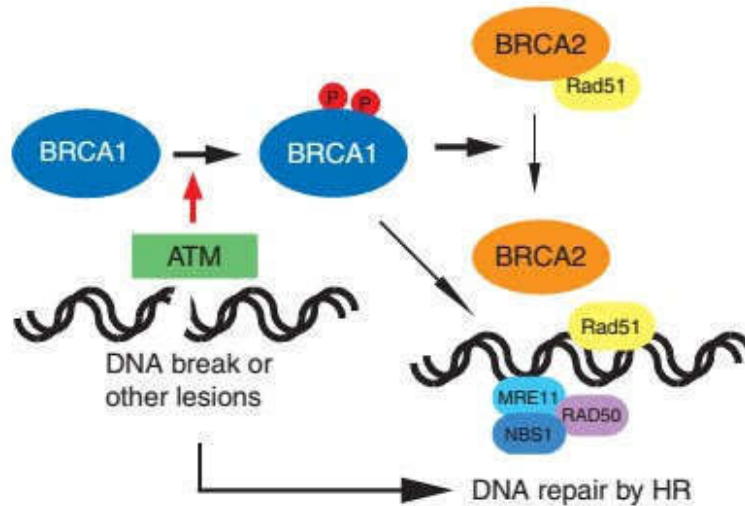


Figure 7. Rôle de BRCA1 dans la réparation d'ADN par recombinaison homologue

(Yoshida et Miki, 2004)

2. Rôle dans la régulation de la transcription

La protéine BRCA1 est un composant du complexe ARN polymérase II-holoenzyme, protéine indispensable à la formation du complexe de la transcription (Scully et al., 1997), auquel il est lié via l'interaction entre son domaine BRCT et l'ARN hélicase A (Anderson et al., 1998). BRCA1 interagit aussi avec les co-activateurs transcriptionnels p300/CBP (Pao et al., 2000) ainsi que le co-répresseur transcriptionnel CtIP (Li et al., 1999) (Figure 5).

De plus, BRCA1 associée à BARD1 (BRCA1-associated RING domain 1) pourrait utiliser son activité ubiquitine ligase pour bloquer l'initiation de la synthèse de l'ARNm en ubiquitinant le complexe de pré-initiation transcriptionnel (Horwitz et al., 2007). BRCA1, par son association avec des complexes remodelant la chromatine (Bochar et al., 2000), et des régulateurs d'acétylation/désacétylation des histones (Yarden et Brody, 1999), faciliterait l'accessibilité de l'ADN aux complexes de la transcription et de la réparation.

Certaines études ont montré que les mutations à l'extrémité 3' de *BRCA1* atténuent son association avec l'ARN hélicase A (Yoshida et Miki, 2004), et les mutations qui génèrent une protéine BRCA1 tronquée au niveau de l'extrémité C-terminale n'induisent pas la transcription des gènes rapporteurs, ce qui suggère que BRCA1 peut fonctionner comme régulateur transcriptionnel, et que cette fonction peut être un composant critique de la suppression tumorale (Welch et King, 2001).

3. Rôle dans le contrôle du cycle cellulaire

Le contrôle du cycle cellulaire joue un rôle essentiel dans l'homéostasie cellulaire et le maintien de l'intégrité du génome. En effet, il prévient la propagation des dommages de l'ADN par l'arrêt du cycle cellulaire afin de permettre l'activation du système de réparation des lésions.

Des études réalisées sur des cellules défectueuses pour différentes protéines de réponse aux dommages de l'ADN ont démontré que ATM et BRCA1 sont requis pour des contrôles efficaces au niveau des phases G1/S et G2/M (Xu et al., 1999). Suite à des radiations ionisantes, ATM est activée et va phosphoryler CtIP ce qui perturbe le complexe CtIP-CtBP-BRCA1. BRCA1 est ainsi libérée et assure l'activation transcriptionnelle des gènes p21 (G1-cyclin-dependent kinase inhibitor) et GADD45, qui sont des gènes cibles de p53 (Harkin et al., 1999 ; Jin et al., 2000 ; Yoshida et Miki, 2004).

Ces gènes contribuent à l'inhibition de la prolifération et à l'arrêt du cycle cellulaire aux phases G1/S et G2/M, pour permettre la réparation des lésions de l'ADN. Il semblerait que l'association de BRCA1 à p53 redirige l'activité de celle-ci des voies apoptotiques vers la réparation de l'ADN et l'arrêt du cycle cellulaire (Figure 8).

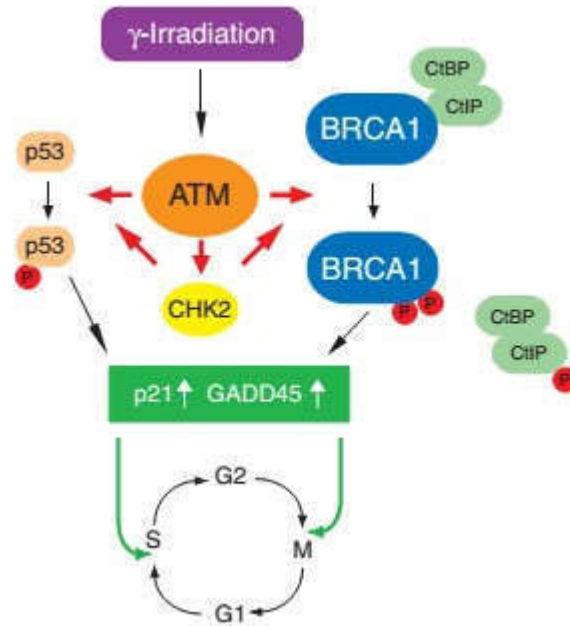


Figure 8. Rôle de BRCA1 dans le contrôle du cycle cellulaire suite à l'exposition aux radiations ionisantes (Yoshida et Miki, 2004)

III. BRCA1 dans le risque familial et sporadique du cancer du sein

1. Mutations germinales de *BRCA1* dans le cancer du sein familial

De nombreuses mutations germinales du gène *BRCA1* ont été décrites, dans des familles présentant un grand nombre de cancers du sein et/ou de l'ovaire, confirmant ainsi le rôle majeur de ce gène de prédisposition. De très nombreuses études ont été entreprises pour la recherche de mutations de *BRCA1* dans différents pays. Une base de données a été créée par le consortium international du cancer du sein afin de répertorier les différentes mutations, c'est le Breast Cancer Information Core (BIC) (<http://research.nhgri.nih.gov/bic/>) (Friend et al., 1995 ; BIC Database).

Les mutations germinales du gène *BRCA1* sont réparties tout au long des régions codantes de ce gène. Il n'existe aucune mutation « hot spot » (c'est à dire un site où la fréquence des mutations est anormalement élevée). Différents types de mutations ont été identifiés (Figure 9).

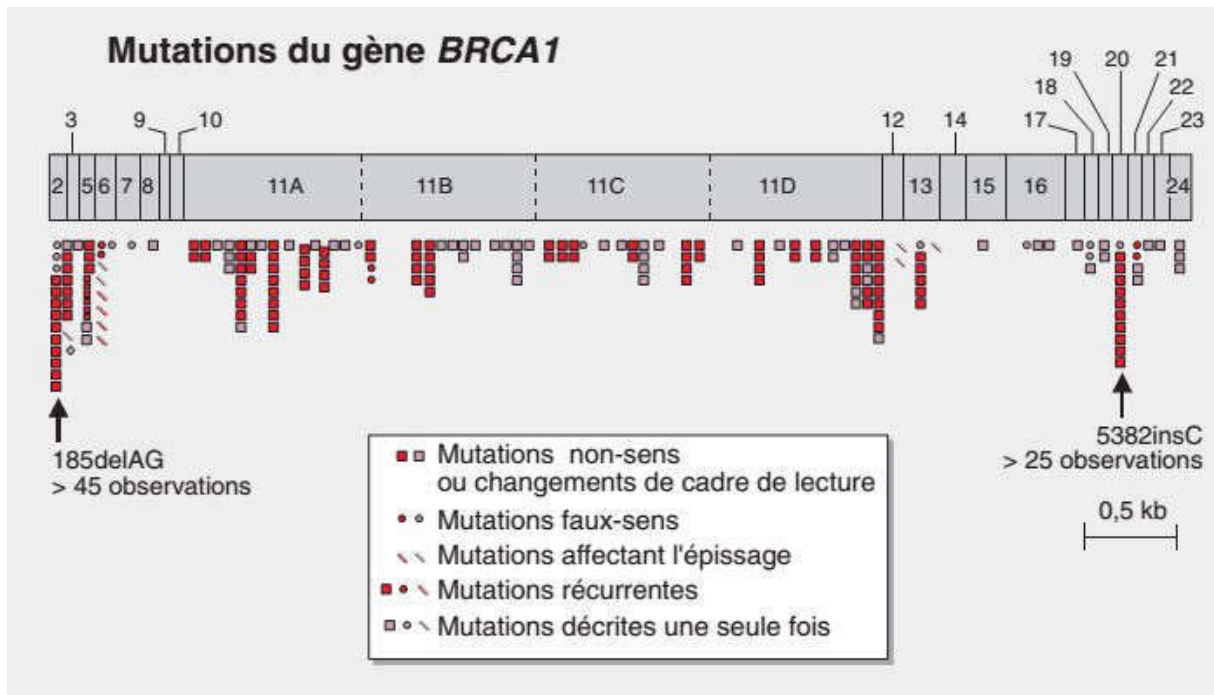


Figure 9. Spectre des mutations germinales identifiées dans le gène BRCA1.

Illustrations extraites du BIC (breast cancer information core) qui compile les mutations communiquées par les participants au groupe collaboratif (Feunteun, 1999).

2. Implications de BRCA1 dans le cancer du sein sporadique

Thompson et ses collaborateurs qui ont conclu que BRCA1 possède un rôle fondamental dans les cancers sporadiques ont observé une diminution significative des niveaux d'expression de BRCA1 lors de la transition du stade de cancers *in situ* au stade de tumeurs mammaires invasives. Aussi, il a montré que l'inhibition de BRCA1 par des oligonucléotides anti-sens entraînait une croissance accélérée des cellules mammaires normales et des cellules tumorales, montrant ainsi que BRCA1 se comportait comme un régulateur négatif de la croissance des cellules épithéliales mammaires (Thompson et al., 1995). Un certain nombre d'études ont confirmé la fréquence d'une sous-expression de l'ARNm de BRCA1 ou de sa protéine dans les cancers sporadiques du sein (Thompson et al., 1995, Ozçelik et al., 1998, Magdinier et al., 1998 ; Dinesh et al., 2006).

Il a été suggéré que BRCA1 est inactivé par les mutations constitutionnelles dans des prédispositions héréditaires aux cancers du sein. Cependant dans la majorité des cancers du sein sporadiques, la diminution de l'activité transcriptionnelle de BRCA1 peut être le reflet de la présence de mutations somatiques, la méthylation du promoteur, de l'action du répresseur ID4 ou encore d'une régulation post-transcriptionnelle par des micro-ARN. (Chen et al., 1996 ; Matros et al., 2005 ; Rakha et al., 2008).

2.1. Mutations somatiques

Des mutations somatiques de *BRCA1* ont été mises en évidence dans environ 10% de tumeurs ovariennes (Hosking et al., 1995 ; Merajver et al., 1995 ; Khoo et al., 1999), alors que seulement quelques mutations ont été identifiées dans les tumeurs mammaires (Khoo et al., 1999, Seo et al., 2004 ; Haitian et al., 2008). Les mutations somatiques de *BRCA1* sont donc des événements exceptionnels dans les cancers du sein sporadiques.

En Tunisie, les mutations somatiques ont été également peu étudiées. Une mutation non sens 1294del40 au niveau de l'exon 11 du gène *BRCA1* a été identifiée chez une patiente parmi 150 cas sporadiques. Cette mutation aurait donc, une fréquence de 0.66% chez les femmes tunisiennes atteintes de cancer mammaire sporadique (Mestiri et al., 2000).

2.2. Méthylation du promoteur de *BRCA1*

Des chercheurs ont montré une régulation négative de BRCA1, en identifiant une zone fortement méthylée au niveau du promoteur de ce gène REF. Ce promoteur de BRCA1 est inclus dans un grand îlot de CpG. La méthylation de l'îlot de CpG de BRCA1 réprimait l'expression de ce gène. Cette inhibition implique les protéines de liaison à l'ADN méthylé ou protéines à "Méthyl Binding Domain" (Magdinier et al., 2000 ; Billard et al., 2002).

2.3. Surexpression du gène *ID4* (répresseur de *BRCA1*)

Certaines publications ont mis en évidence que la surexpression du gène *ID4* (inhibitor of DNA binding 4) dans le cancer du sein sporadique diminue l'expression de *BRCA1* par inhibition de son promoteur (Berger et al., 2001 ; Roldán et al., 2006 ; Wen et al., 2012). Mueller et Roskelley ont montré que l'inactivation d'*ID4* a pu augmenter l'expression du gène *BRCA1* dans les cellules MCF7 et il semble y avoir une relation réciproque entre les niveaux d'*ID4* et *BRCA1* (Mueller et Roskelley, 2002).

2.4. Régulation de *BRCA1* par des micro-ARNs

Les microARN sont une classe de petits ARN non codants qui peuvent réguler l'expression de *BRCA1*. Les miARNs qui régulent négativement *BRCA1* en interagissant avec son 3'UTR entraînent une réduction des niveaux de *BRCA1* et donc une instabilité génomique en raison de défauts dans la réparation l'ADN. D'autre Part, *BRCA1* contrôle l'expression de certains miARNs, soit des miARNs oncogènes tel que miR-155 ou miARNs suppresseurs de tumeur tel que miR-205 (Figure 10). Une étude de Riaz et ses collaborateurs a indiqué que quelques miARNs seulement ont été associés à une mutation constitutionnelle de *BRCA1*. En comparant l'expression des miARNs entre des lignées cellulaires mutées et sauvages pour *BRCA1*, ils ont trouvé deux miARNs qui ont été fortement exprimés dans les lignées cellulaires mutées pour *BRCA1* : hsa-miR-29b et hsa-miR-891b (avec fold change ≥ 2) (Riaz et al., 2013). Nous détaillerons les miARNs dans la partie III.

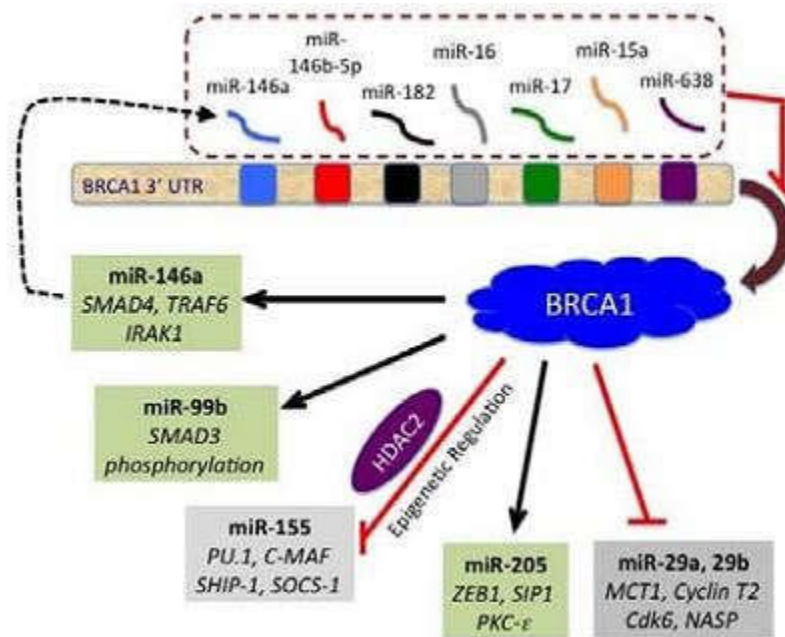


Figure 10. BRCA1 et microARNs.

Les miARNs qui régulent BRCA1 en interagissant avec son 3' UTR sont indiqués dans la partie supérieure (pointillé encadré). Dans la partie inférieure, les miARNs qui sont régulés positivement ou négativement par BRCA1 sont présentés dans des boîtes vertes ou grises, respectivement. Certaines des cibles connues de chaque miARN sont indiqués en italique. Une boucle de rétroaction possible pour le miR-146a est indiquée par une ligne pointillée avec une flèche (Chang et Sharan, 2012).

Partie III- Les microARN (miARN)

Les microARN (miARN) sont une grande classe de petits ARN non-codants conservés d'environ 19 à 25 nucléotides. Ils sont impliqués dans la régulation de l'expression de plus de 30 % des gènes codant pour des protéines de mammifères (Filipowicz et al., 2008). La mise en évidence de cette classe d'ARN a été initialement découverte chez *Caenorhabditis elegans* au début des années 1990 par Victor Ambros et ses collègues.

Plusieurs études vont par la suite décrire des centaines de microARNs uniques et conservés chez différentes espèces tels que la mouche *D. melanogaster*, la souris, les plantes ou dans des lignées cellulaires humaines (Pasquinelli et al., 2000 ; Reinhart et al., 2002 ; Aravin et al., 2003 ; Dostie et al., 2003 ; Houbaviy et al., 2003 ; Lagos-Quintana et al., 2001; 2002 ; 2003 ; Lim et al., 2003 ; Bartel, 2004). Le nombre croissant de miARN identifiés conduit Sam Griffith-Jones de la « Wellcome Trust Sanger Institute » à créer un registre disponible en ligne de séquences miARN publiés, (Griffiths-Jones, 2004). Aujourd'hui, cette base de données en ligne est appelé miRBase et peut être consultée en ligne à <http://www.mirbase.org/>. La dernière version de la base de données miARN (version 20.0, juin 2013) contient 24 521 loci de microARN de 206 espèces (30 424 microARN matures) (Kozomara et Griffiths-Jones, 2014). On en dénombre actuellement 1881 précurseurs chez l'homme (2603 miARNs matures), répertoriés dans miRBase.

I. Biogénèse des miARN

Plusieurs études ont montré que les gènes codant pour les miARN ne sont pas distribués dans les génomes de façon aléatoire. (Lagos-Quintana et al., 2001 ; Lee et al., 2002 ; Rodriguez et al., 2004 ; DiLeva et al., 2006 ; Saini et al., 2007; Griffiths-Jones et al., 2008 ; Czech et Hannon, 2011). Les miRNAs sont codés dans le génome au sein d'unités transcriptionnelles codant ou non pour des protéines. De plus, les gènes codant pour plusieurs miARN sont

souvent regroupés en « clusters » et produisent un transcrit primaire unique polycistronique (Lee et al., 2002 ; Rodrigez et al., 2004 ; Cai et al., 2004). La transcription des miARN originaires d'introns est apparemment conditionnée par celle de la protéine, miARNs introniques seraient co-transcrits avec leur gène hôte (Rodriguez et al., 2004 ; Baskerville et Bartel, 2005 ; Kim et Kim, 2007) alors que les miARN codés par des gènes indépendants semblent avoir leurs propres promoteurs et systèmes de régulation (Lagos-Quintana et al., 2001 ; Cai et al., 2004 ; Oszolak et al., 2008; Corcoran et al., 2009; Monteys et al., 2010).

La biogenèse des miARNs se déroule en deux étapes séquentielles, l'une nucléaire et l'autre cytoplasmique. Dans le noyau, des miARN sont transcrits par la polymérase II en précurseurs assez longs, capés par la structure 7-méthyl-guanosine (m7G) à l'extrémité 5', polyadénylés par une queue poly-A à l'extrémité 3' comportant une ou plusieurs structures en tige boucle et une boucle terminale de taille assez variable, reconnue par la ribonucléase III Drosha et son partenaire DGCR8 (DiGeorge syndrome critical region 8) (Denli et al., 2004). Durant cette étape, ces pri-miARN sont clivés par Drosha/DGCR8, en laissant une extrémité chevauchante de 2 nucléotides en 3', pour former des pré-miARN (miARN précurseurs) d'une longueur d'environ 70 bases caractérisée par une tige-boucle d'ARN double brin (dite imparfaite puisque renfermant quelques mésappariements). D'autre part, la machinerie d'épissage est impliquée aussi dans la voie de génération des pré-miARN « voie de mirtrons : un pré-miARN constitué d'un intron court » (Berezikov et al., 2007; Okamura et al., 2007; Ruby et al., 2007 ; Chan et slack, 2007). Cette voie permet la synthèse d'un pré-miARN à partir de l'intron libéré, après épissage (splicing) et libération du lasso, qui se structure en forme de tige-boucle (Figure 11). Les extrémités 5' et 3' du pré-mirtrons, se distinguent des pré-miARNs classiques, correspondent aux sites d'épissage donneurs GU et accepteurs AG (Okamura et al., 2007).

Les pré-miARN sont ensuite exportés activement vers le cytoplasme grâce au complexe Exportine-5 couplé à la GTPase Ran pour subir d'autres maturations (Yi et al., 2003; Bohnsack et al., 2004; Lund et al., 2004). Dans le cytoplasme, le pré-miARN est pris en charge par Dicer, une autre RNase de type III. Le Dicer clive le pré-miARN et libère un duplex « miARN / miARN* » ou « miARN-5p /miARN-3p », qui correspond à la partie inférieure de la « tige » du pré-miARN débarrassé de la boucle, d'environ 20 pb avec des extrémités 3' sortantes de 2 nucléotides de chaque côté, caractéristiques des clivages successifs par les RNases III Drosha et Dicer (Bernstein et al., 2001; Hutvagner et al., 2001). Pour la stabilité et la maturation de pré-miARN, Dicer s'associe avec plusieurs autres protéines permettant de se lier aux ARN double brin, comme TRBP (Transactivating response RNA-binding protein) ou PACT (protein activator of the interferon-induced protein kinase) ou ADAR1 (adenosine deaminase acting on RNA 1) (Kim et al., 2009 ; Takahashi et al., 2015). Ces cofacteurs servent également au recrutement d'une protéine de la famille Argonaute (Ago) et du facteur GW182 (Glycine-tryptophan repeats containing proteins) qui s'associent avec Dicer pour former le complexe nucléoprotéique RISC (RNA-induced silencing complex). Chez les mammifères, quatre protéines Ago (Ago1-4) interviennent dans les interactions miARN-ARN cible. Seule Ago2, chez l'homme, présente une activité endonucléase. Le facteur GW182 interagit directement avec la protéine Ago. Les protéines GW182 présentent de répétitions de glycine et tryptophane (GW, WG ou GWG) d'où découle leur nom (Hock et Meister, 2008 ; Bouasker et Simard, 2012).

Le duplex « miARN / miARN* » est pris en charge par ce complexe RISC, séparé rapidement par une hélicase. Un seul brin des deux brins du duplex sera sélectionné et incorporé dans le complexe RISC, l'autre brin (brin passager) est ensuite dégradé (ou rarement utilisé comme brin guide et incorporé à un RISC). Ce miARN mature guide le complexe RISC pour la

régulation des gènes cibles dépendant de la complémentarité entre le miARN et l'ARNm (Matranga et al., 2005; Filipowicz et al., 2008 ; Bouasker et Simard, 2012).

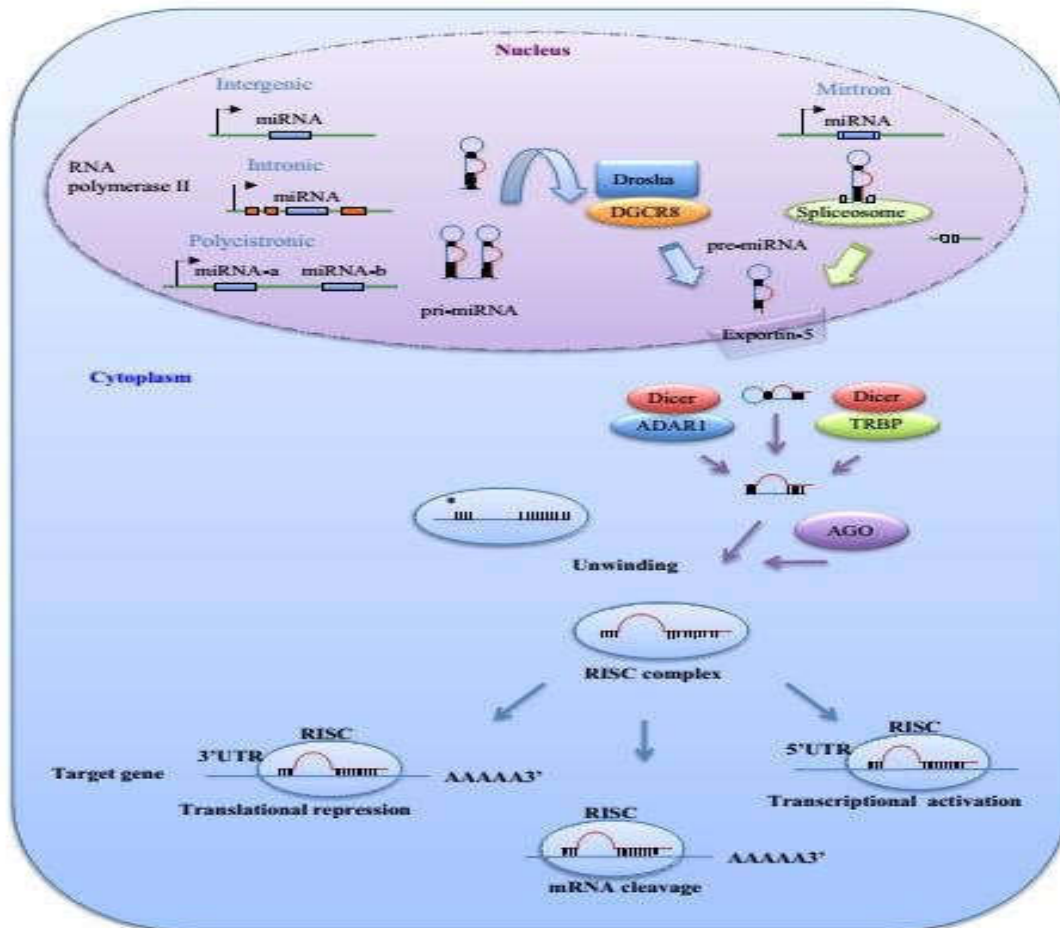


Figure 11. Biogenèse des miARN et mécanisme d'action.

Les miARN sont initialement transcrits par l'ARN polymérase II ou III comme pri-miARN, qui sont clivés en pré-miARN dans le noyau par Drosha-DGCR8. Le précurseur miARN (pré-miARN) peut également être généré par la voie mirtron. Les pré-miARN, sont exportés vers le cytoplasme par Exportin-5 et ensuite clivés dans un complexe comprenant Dicer (RNase de type III) et le cofacteur ADARI (adenosine deaminase acting on RNA 1) ou TRBP (Transactivating response RNA-binding protein). Le brin fonctionnel d'un miARN mature est incorporé dans le complexe RISC (RNA-induced silencing complex), qui contient les protéines GW182 et Argonautes (AGO). Dans le cadre de ce complexe, le miARN mature module l'expression de gènes en se liant à des séquences partiellement complémentaires dans les 3'UTRs ou 5'UTR de ARNm cibles, conduisant à la dégradation de l'ARNm, l'inhibition traductionnelle, ou rarement à l'activation de la traduction (Takahashi et al., 2015).

II. Modes d'actions

1. Interaction miARN/ARNm

L'interaction entre le complexe miRNA-induced silencing complex (miRISC) et les ARN messagers (ARNm) s'effectue généralement au niveau de 3'UTRs (untranslated regions) des ARNm cibles. Cette interaction nécessite la présence d'une forte complémentarité sur les nucléotides 2 à 7, voire 8, en 5' du miARN, une région appelée 5'd'ancrage ou « seed region » (Lewis et al., 2005 ; DiLeva et al., 2006 ; Grimson et al., 2007 ; Filipowicz et al., 2008 ; Bartel 2009). Une substitution de nucléotides dans la région seed conservée aurait pour conséquence une perturbation de l'appariement et une perte de l'activité régulatrice des miARNs (Lewis et al., 2003 ; Lai 2002; Lim et al., 2003).

Différents types d'appariement sont possible entre miARN et ARNm cible illustrées par la figure 12 (Bartel 2009).

L'accessibilité des miARN à leurs cibles dépend aussi du contexte structural et moléculaire du 3'UTR. Une structure fermée en tige au niveau du site de reconnaissance miARN-ARNm diminue l'accessibilité du miARN ainsi que sa répression (Kertesz et al., 2007).

Le site de reconnaissance doit être proche (à 15 nucléotides) du codon stop ou de la queue polyA, pour les longs 3'UTRs ; se situer dans une région riche en AU pour faciliter l'accessibilité à l'ARNm ; et pour une plus grande efficacité de régulation ce site doit coexister avec des sites de reconnaissance d'autres miARNs (phénomène répressif coopératif) (Grimson 2007; Filipowicz et al., 2008 ; Bartel 2009).

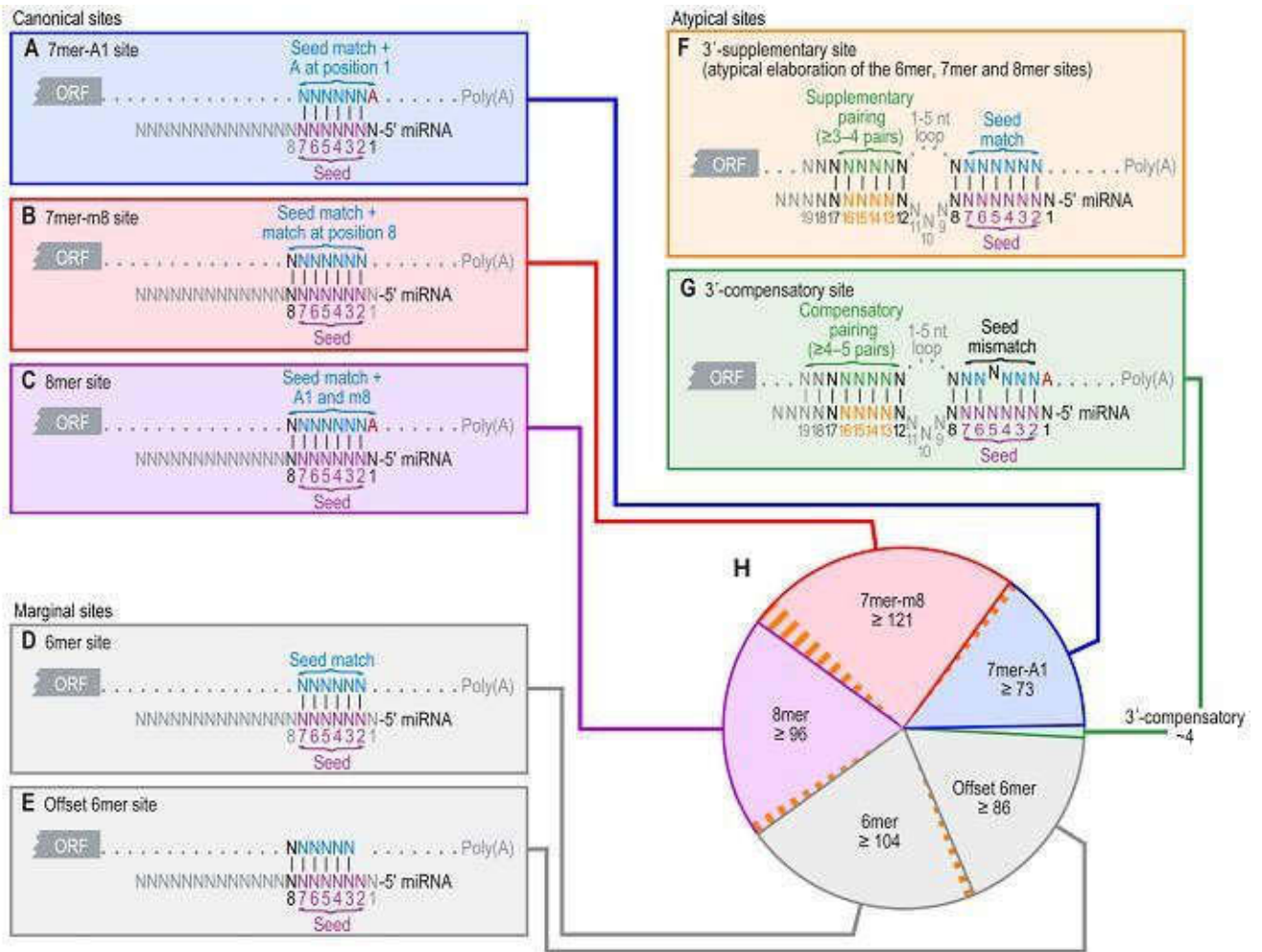


Figure 12. Les différents types d'interaction entre miARNs et ARNm cibles.

A, B et C sont des sites d'appariement dits « canoniques » ou classiques. D et E sont des sites d'appariement « marginaux », beaucoup moins spécifiques et efficaces. F et G sont des sites d'appariement « atypiques », nécessitant une complémentarité entre la partie 3' du miARN et l'ARNm. Les tirets verticaux illustrent la complémentarité parfaite entre la séquence seed et le 3'UTR de l'ARNm. ORF, cadre de lecture ouvert (Open Reading Frame) (Bartel 2009).

En se basant sur cette conservation de la région seed et de la partie complémentaire au sein de l'ARNm, plusieurs algorithmes réussissent à prédire les cibles d'un miARN donné. La grande partie de ces algorithmes se focalisent sur les régions 3'UTR des ARNm chez les mammifères, combinant des données expérimentales, génomiques, voire même thermodynamiques (comme la robustesse de l'interaction de la région 5' d'ancrage, le nombre de miRNAs sur le 3'UTR, conservation des régions cibles au sein de différents espèces, contexte de site de reconnaissance, les énergies de liaison, flexibilité de réglage des paramètres...), afin d'en ressortir des règles qui expliqueraient la reconnaissance miARN-ARNm. Quelques outils bioinformatiques sont référencés dans le tableau 2 (Bartel 2009).

Il a ainsi été montré que les régions 5'UTR ou ORF (Open Reading Frame) sont également la cible de miRNAs (Kloosterman et al., 2004; Lytle et al., 2007 ; et al., 2008 ; Duursma et al., 2008). Certains algorithmes telles que RegRNA ou PITA fournissent des prédictions sur cette interaction miARN-5'UTR (Tableau 2).

Ces algorithmes ont l'avantage de diminuer le nombre de faux positifs même s'ils comportent, comme toute prédiction, des limites pour mettre en place des modèles fiables à cause de la multitude de facteurs cellulaires (protéiques et structuraux) et l'hétérogénéité des cibles (Bartel 2009; Friedman et al., 2009).

Tableau 2. Outils bioinformatiques de prédiction des ARNm cibles des métazoaires

(Bartel 2009)

Nom	Lien internet (accessible mai 2015)	Références
TargescanHuman	http://www.targetscan.org/vert_61/	Friedman et al., 2009)
Tarbase	http://diana.imis.athena-innovation.gr/DianaTools/index.php?r=tarbase/index	(Papadopoulo s et al., 2009)
MiRanda	http://www.microrna.org/microrna/home.do	(Betel et al., 2008)
MicroCosmTargets	http://www.ebi.ac.uk/enright-srv/microcosm/htdocs/targets/v5/	(Griffiths-Jones et al., 2008)
PicTar	http://pictar.mdc-berlin.de/cgi-bin/PicTar_vertibrate.cgi	(Krek et al., 2005)
RegRNA	http://regrna2.mbc.nctu.edu.tw/	(Huang et al., 2006)
RNA22	https://cm.jefferson.edu/rna22/	(Miranda et al., 2006)
PITA	http://genie.weizmann.ac.il/pubs/mir07/mir07_data.html	(Kertesz et al., 2007)
miRbase (base de données ; version 20.0, juin 2013)	http://www.mirbase.org/	(Kozomara et Griffiths-Jones, 2014)

2. Les différents modes d'action des miARNs

Pour comprendre comment un miARN régule l'expression de sa cible, il est nécessaire de faire un rappel sur la structure de l'ARNm et du mécanisme de la traduction.

Après leur transcription, la maturation des ARNm se caractérise par l'ajout d'une coiffe m7G en 5' (7-méthylguanosine en position 5' terminale) et une queue polyA en 3'. Ces deux éléments assurent une meilleure stabilité de l'ARNm en empêchant sa dégradation par des exonucléases. La traduction des ARNm procède ensuite selon trois étapes :

L'initiation correspond au recrutement des différents facteurs du complexe eIF4F (eukaryotic initiation factor 4F) qui reconnaissent la coiffe en 5'. Le complexe eIF4F, après sa

phosphorylation, permet de recruter à la coiffe le complexe de pré-initiation 43s qui contient la sous-unité ribosomique 40S, l'ARNt méthionine initiateur et d'autres facteurs protéiques.

Ce complexe 43S commence alors le balayage de la région 5' à la recherche du codon d'initiation AUG. Ensuite le 43S se dissocie et permet la formation d'un autre complexe, 80S, constitué après fixation de la sous-unité ribosomique 60S avec la petite sous-unité 40S. L'élongation peut alors débuter. La queue poly(A) interagit avec le facteur eIF4F grâce à une protéine spécifique PABP (poly(A) binding protein) pour assurer la circulation de l'ARNm. Ceci permet le rapprochement du 5'UTR et du 3'UTR et augmente l'efficacité de la traduction.

L'élongation correspond à la production de la chaîne polypeptidique. Au cours de cette étape, le ribosome 80S se déplace de codon en codon de l'ORF en associant chaque codon à l'ARNt correspondant pour ajouter le bon acide aminé à l'extrémité carboxy-terminale du peptide néo-synthétisé.

La terminaison se fait quand le ribosome arrive au codon stop. Le polypeptide est alors dissocié (Filipowicz 2008 ; Jackson et al., 2010 ; Huntzinger et Izaurralde, 2011).

Chez les mammifères, la majorité des miARN ciblent les ARNm pour diminuer l'expression du gène soit par répression traductionnelle soit par clivage de l'ARNm, en fonction de la complémentarité de la séquence miARN-ARNm. Rarement, cette interaction induit une activation traductionnelle lorsque le miRISC se lie à la région 5' non traduite (5'UTR), au cadre de lecture ouvert (ORF) ou à la région 3' non traduite (3'UTR) (Bartel et al., 2004; Di Leva et al., 2006; Vasudevan et al., 2007 ; Filipowicz et al., 2008 ; Garzon et al., 2010 ; Czech and Hannon, 2011) (Figure 13).

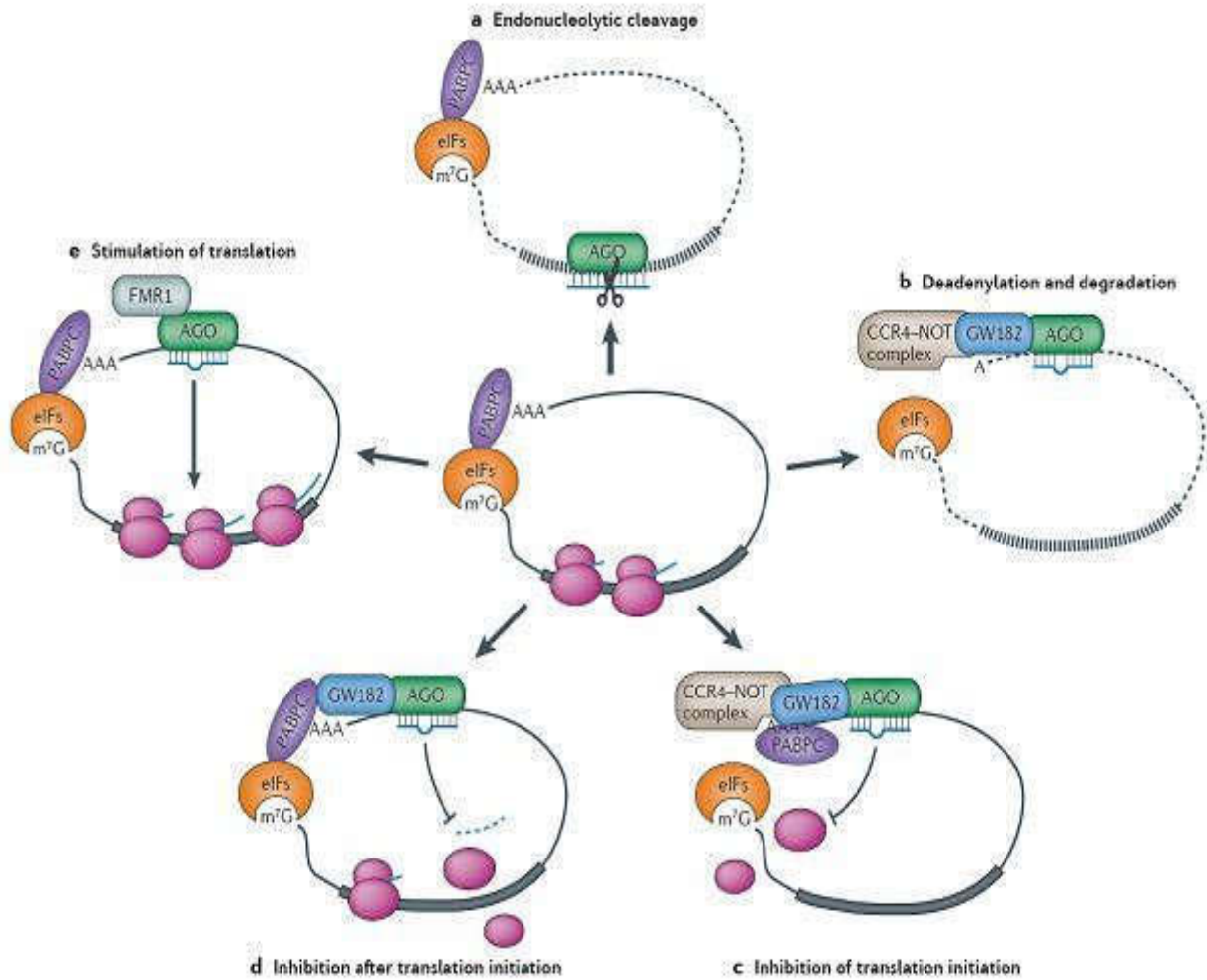


Figure 13. Régulation des ARNm cibles par les miARNs.

a. Clivage endonucléotidique de l'ARNm par Ago2. b. Déadénylation et dégradation de l'ARNm. c. Inhibition de l'initiation de la traduction. d. Inhibition de l'étape d'élongation. e. Activation de la traduction. La partie centrale représente la circularisation des ARNm. En rose, les ribosomes ; en orange, les complexes d'initiation eIF et en violet, les protéines de liaison à la queue poly(A) PABPC (Pasquinelli, 2012).

2.1. Clivage des ARNm cibles

Pour cliver l'ARNm cible par le complexe miRISC, une complémentarité quasi parfaite entre miARN et ARNm cible doit avoir lieu sur les nucléotides 2-7 voire 8 de la région seed. Aussi, le miARN doit être associé à la protéine Ago2 puisque c'est la seule des 4 protéines Argonaute qui a une activité endonucléase pour effectuer un clivage de l'ARNm. Ce clivage a

toujours lieu entre les bases 10 et 11 du miARN et génère deux fragments d'ARNm cible : l'un possède l'extrémité 5'- phosphate et l'autre l'extrémité 3'-hydroxyl, qui sont dégradés par la suite (Figures 13a, 14). Ce mécanisme de dégradation reste plus fréquent chez les plantes que chez les animaux (Jones-Rhoades et al., 2006 ; Pasquinelli, 2012 ; Huntzinger et Izaurralde, 2011 ; Ameres et Zamore, 2013).

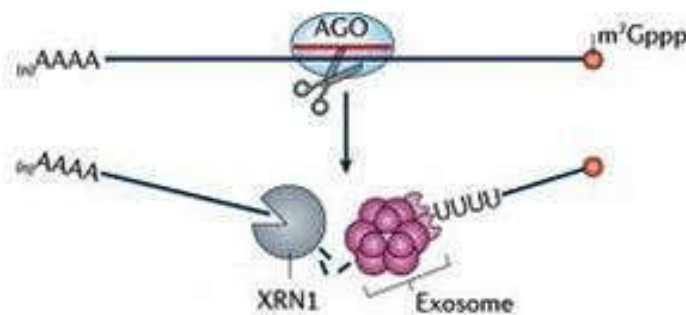


Figure 14. Clivage de l'ARNm cible

L'activité endonucléase de la protéine Ago2 clive l'ARNm cible en deux fragments, dégradés par la suite par l'exoribonucléase 5'→3' (XRN1) et le complexe exonucléolytique 3'→5' (exosome) (Ameres et Zamore, 2013).

1.1. Déadénylation et dégradation de l'ARNm

Indépendamment de la présence d'une complémentarité parfaite, la déstabilisation des ARNm ciblés par des miARN a été montrée par plusieurs études récentes. Une diminution du niveau d'expression des ARNm est responsable à elle seule de plus de 84% de la baisse de l'expression protéique (Guo et al., 2010 ; Huntzinger et Izaurralde 2011). Cette diminution des ARNm par le miARN est la conséquence d'une déadénylation (suppression de la queue polyA de ces ARNm) (Wu et al., 2006). Cette déadénylation est effectuée par le complexe de déadénylation CAF1-CCR4-NOT recruté au niveau de la queue polyA suite à une interaction

entre les protéines Argonautes et les protéines GW182 (Parker et Song, 2004) (Figure 13b). Une fois l'ARNm déadénylé, la coiffe m7G en 5' est éliminée par le complexe DCP2 et ses cofacteurs. La dégradation des ARNm décoiffés se fait par une exonucléase 5'-3' (XRN1) (Eulalio et al., 2007). L'ensemble de ces protéines impliquées dans la dégradation 5' à 3' ainsi que des ARNm réprimés sont localisées dans des granules cytoplasmiques appelées p-bodies (Processing bodies) ou GW-bodies à cause des protéines GW182 qui les constituent (Sheth et Parker, 2003 ; Parker et Song, 2004 ; Ding et al., 2005 ; Filipowicz 2008; Huntzinger et Izaurralde, 2011).

2.2. Répression de la traduction par les miARN

Lors d'appariement imparfait entre le miARN et sa cible, ce qui est le cas pour la plupart des miARN animaux, le miRISC inhibe la traduction de l'ARNm cible. Plusieurs études indiquent que le blocage de la traduction a lieu au niveau de l'initiation, d'autres pensent que le blocage se fait à des stades post-initiation (Kiriakidou et al., 2007 ; Huntzinger et Izaurralde 2011; Pasquinelli 2012).

Le blocage de l'initiation de la traduction (Figure 13c) se ferait par plusieurs mécanismes qui ont été décrits dans des études sur des cellules en culture. L'inhibition de l'initiation de la traduction peut se faire par une inhibition de la reconnaissance de la coiffe suite à un mécanisme d'interaction de la protéine Ago2 avec la coiffe suggérant donc que la fixation d'Ago2 à la coiffe lui permet d'entrer en compétition avec la fixation du complexe d'initiation eIF4E (Olsen et Ambros, 1999 ; Humphreys et al., 2005 ; Pillai et al., 2005 ; Kiriakidou et al., 2007 ; Huntzinger et Izaurralde 2011; Pasquinelli 2012).

Aussi, l'inhibition de recrutement de la sous-unité ribosomique 60S via le recrutement du facteur eIF6 entraîne le blocage de l'initiation de la traduction. L'association d'eIF6 au complexe miRISC au niveau de l'ARNm cible permettrait donc d'empêcher le recrutement de

la sous-unité 60S car cette protéine est impliquée dans la biogénèse et la maturation des sous-unités ribosomiques 60S (Chendrimada et al., 2007).

L'inhibition de la traduction induite par les miARNs à des stades post-initiation (Figure 13d) peut se faire par deux mécanismes possibles. Le premier mécanisme est le détachement prématuré des ribosomes en cours d'élongation. Petersen et ses collaborateurs montrent que la fixation des miARNs au niveau de 3'UTR de l'ARNm cible interfère avec l'élongation à distance et induit une terminaison prématurée (Petersen et al., 2006). Le deuxième mécanisme est la dégradation co-translationnelle des polypeptides naissants par une protéase inconnue (Pillai et al., 2005 ; Nottrott et al., 2006 ; Petersen et al., 2006).

2.3. Cas particuliers d'activation de traduction

Rarement, les microARNs sont également capables de stimuler la traduction de certains gènes. Quelques cas de régulation positive par activation de traduction ont été observés par interaction entre miARN et la région 5'UTR de l'ARNm cible. Orom et ses collègues ont montré que l'interaction de miR-10a et le 5'UTR des ARNm de diverses protéines ribosomiques est capable d'activer leur traduction (Orom et al., 2008).

De même, miR-122 en se fixant à la région 5'UTR stimule la réplication de l'ARN du virus de l'hépatite C (Jopling et al., 2008).

Dans certains cas et sous des conditions de stress cellulaires, l'interaction de miARN et la région 3'UTR de l'ARNm cible a été associée à l'activation de l'expression plutôt que la répression. Pendant un arrêt du cycle cellulaire, le miR-369-3 est capable d'activer la traduction de TNF α (Tumor necrosis factor α) en se fixant à des séquences riches en A-U placées dans la région 3'UTR de l'ARNm de TNF α . Ces séquences sont capables de recruter diverses protéines Argonautes et autres facteurs associés au miARNs (Vasudevan et al., 2007 ; Pasquinelli, 2012). Ceci suggère qu'il y ait une réversibilité d'action des miARN dans le contrôle de la traduction des ARNm cibles en fonction du cycle cellulaire.

III. miARN et le cancer du sein

1. Perturbations de l'expression de miARN dans le cancer du sein

Plusieurs techniques de clonage, séquençage, qPCR, hybridation in situ, puces à miARN ont mis en évidence que l'expression des miARN est perturbée dans le cancer du sein et dans d'autres types de cancers. La dérégulation de leurs expressions pourrait être engendrée par plusieurs mécanismes :

- Les perturbations de l'expression par réarrangement chromosomique sont révélées par le fait que les miARN sont en général localisés dans des régions génomiques associées aux cancers. 72,8%, des loci de miARN montrent une altération du nombre de leurs copies dans les cancers du sein (Calin et al., 2004 ; Zhang et al., 2006).
- Les perturbations d'expression des miARN par régulation transcriptionnelle : lors de l'étape de transcription des gènes par l'ARN polymérase II, l'expression des miARN peut également être régulée par des facteurs de transcription. Par exemple, une hyperméthylation du gène mir-9-1 corrèle avec une diminution de l'expression de miR-9 dans certaines tumeurs de cancers du sein (Lehmann et al., 2008). On peut citer également, l'exemple d'une protéine favorisant la progression métastatique de cellules cancéreuses mammaires (protéine Twist) qui augmente la transcription et l'expression de miR-10b dans des cellules métastatiques (Ma et al., 2007). D'autres miARN sont régulés par des facteurs de transcription inductibles par des hormones et en particulier les récepteurs des œstrogènes impliqués dans la prolifération cellulaire des cancers du sein (Adams et al., 2007; Bhat-Nakshatri et al., 2009; Wickramasinghe et al., 2009).

- Les perturbations d'expression des miARN par des défauts dans le mécanisme de biogenèse ont été observées dans différents cancers (Sekine et al., 2009; Sugito et al., 2006). Des aberrations d'expression des protéines ou des complexes impliquées dans la machinerie de biogenèse tels que Drosha/DGCR8 et Dicer/TRBP2 par d'autres facteurs (exp : p53) contribuant à la perturbation d'expression des miARNs (Boominathan, 2010).
- Les perturbations d'expression des miARN par des polymorphismes de nucléotides SNP (Single Nucleotide Polymorphism) qui existent dans le loci contenant les miARN affectant par la suite l'expression de miARN mature. Dans les cancers du sein, on trouve par exemple un SNP (G, T) dans la région 5' de miR-125a qui perturbe la maturation du pri-miR-125a et entraîne une diminution de l'expression du miARN issu de l'allèle « T » (Duan et al., 2007 ; Li et al., 2009). Un autre SNP (G, C) retrouvé dans la tige-boucle du pré-mir-146a, se situe dans la région 5' d'ancrage de miR-146a* et affecte l'expression de miARN mature. Ce SNP, selon le type de cancer, diminue ou augmente l'expression du miR-146a mature. Dans le cancer du sein, ce SNP augmenterait l'expression du miR-146a chez des patientes qui ont un âge plus jeune (Shen et al., 2008; Xu et al., 2008).
- Les perturbations d'expression des miARN par dérégulation de la liaison miARN-ARNm cible. Cette dérégulation est engendrée par des modifications génétiques (mutations, délétions/insertions, translocations, SNP) pouvant cibler les séquences de la cible reconnues par les miARN (Gao et al., 2009 ; Wiestner et al., 2007 ; Mayr et al., 2007 ; Yu et al., 2007).

2. Fonction des miARN dans le cancer du sein

Depuis leur découverte en 1993, les miARN ont été montrés pour jouer un rôle important dans la plupart des fonctions biologiques (DiLeva et al., 2006). Chaque miARN peut réguler des centaines d'ARNm cibles, ils peuvent jouer un rôle primordial dans un large éventail de processus biologiques (Ambros, 2004), comme la tumorigenèse, en particulier dans le cancer du sein. Ce rôle a été déterminé par diverses techniques qui mettent en évidence l'effet de la surexpression, la sous-expression, la mutation des miARN sur les processus biologiques cellulaires (prolifération, cycle cellulaire, apoptose, invasion cellulaire, formation des métastases...).

2.1. Les miARNs oncogènes / suppresseurs de tumeur dans le cancer du sein

Un miARN peut être défini comme un oncogène, lorsqu'une augmentation de son expression provoque l'immortalisation de la cellule c'est-à-dire la transformation de cellules normales en cellules cancéreuses.

Quelques exemples de miARN considérés comme oncogènes dans le cancer du sein sont présentés dans le tableau 3 ci-dessous (Wang et Luo, 2015).

Tableau 3. miARNs oncogènes associés avec le cancer du sein (Wang et Luo, 2015)

miARN	Les cibles identifiées	Événement associé
miR-21	<i>TPMI, PDCD4, TIMP3, PTEN</i>	Métastase du cancer
miR-155	<i>FOXO3a, SOCS1, caspase-3, TP53, INP1</i>	Prolifération cellulaire et apoptose
miR-182	<i>RECK, MIM, FOXO1</i>	Invasion cellulaire, formation des colonies
miR-10b	<i>HOXD10, Tiam1</i>	Invasion cellulaire, migration
miR-27a	<i>HOXO1, ZBTB10</i>	Viabilité cellulaire, angiogenèse
miR-9	<i>E-cadherin</i>	Motilité cellulaire et caractère invasif, angiogenèse
miR-22	<i>TET family</i>	EMT (transition épithéliale-mésenchymateuse)
miR-181a	<i>Bim</i>	EMT, métastase du cancer
miR-373, miR-520c	<i>CD44</i>	Migration cellulaire et invasion
miR-375	<i>RASD1</i>	Prolifération cellulaire
miR-221/222	<i>TRPS1, ADIPOR1, p27Kip1</i>	Métastase du cancer, la croissance tumorale, EMT
miR-632	<i>DNAJB6</i>	Métastase du cancer
miR-7, miR-218	<i>HoxB3</i>	Cycle cellulaire, formation de colonies
miR-374a	<i>WIF1, PTEN, WNT5A</i>	Métastase du cancer

Un miARN peut être défini comme un suppresseur de tumeur, lorsqu'une diminution de son expression provoque la transformation de cellules normales en cellules cancéreuses.

Le tableau 4 montre quelques exemples de miARN considérés comme suppresseurs de tumeur dans le cancer du sein (Wang et Luo, 2015).

Tableau 4. miARNs suppresseurs de tumeur associés avec le cancer du sein (Wang et Luo, 2015)

miARN	Les cibles identifiées	Événement associé
let-7 (famille)	<i>H-Ras, HMGA2, PAK1, DIAPH2, RDX, ITGB8</i>	Initiation de tumeur, différenciation cellulaire, métastases, maintien de caractère souche cellulaire
miR-145	<i>IRS-1, ER-α, RTKN, MUC1, OCT4, N-Ras, VEGF-A</i>	Croissance tumorale, différenciation cellulaire, invasion et métastases, angiogenèse
miR-200 family	<i>ZEB1, ZEB2, HER3, Sec23a, SIRT1</i>	EMT (transition épithéliale-mésenchymateuse), croissance tumorale, métastases
miR-205	<i>ZEB1, ZEB2, HER3, VEGF-A</i>	EMT, prolifération cellulaire, invasion
miR-335	<i>SOX4, tenascin C, ER-α, IGF1, RSP1, ID4</i>	Migration et invasion tumorale, Viabilité cellulaire, apoptose
miR-126	<i>IGFBP2, MERTK, PITPNC1</i>	Angiogenèse métastatique
miR-30 (famille)	<i>Ubc9, TWF1, Vimentin, KRAS, MTDH</i>	Auto-renouvellement de cellules souches cancéreuses, apoptose, EMT
miR-146a/b	<i>IL-1-RSK, NFRSF-6</i>	Métastase du cancer
miR17-20 cluster	<i>Cyclin D1</i>	Prolifération cellulaire
miR-26b	<i>SLC7A11</i>	Apoptose cellulaire
miR-290	<i>Arid4b</i>	Apoptose cellulaire
miR-27b	<i>CYP1B1</i>	Croissance tumorale
miR-31	<i>Integrin-α5, radixin, RhoA, WAVE3, PRKCE</i>	Métastase du cancer, apoptose cellulaire
miR-125a/b	<i>HER2, HER3</i>	Invasion cellulaire
miR-203	<i>SNAI2</i>	EMT, invasion cellulaire
miR-224	<i>CDC42, CXCR4</i>	Métastase du cancer
miR-20b	<i>HIF-1, STAT3</i>	Angiogenèse
miR-206	<i>Cyclin D2</i>	Prolifération cellulaire
miR-342	<i>HER2</i>	Apoptose cellulaire
miR-519c	<i>HIF-1α</i>	Angiogenèse
miR-16	<i>Cyclin E</i>	Croissance tumorale
miR-290	<i>Arid4b</i>	Croissance tumorale, apoptose cellulaire
miR-497	<i>Cyclin E1</i>	Prolifération cellulaire et invasion
miR-133a	<i>EGFR</i>	Cycle cellulaire et prolifération
miR-26a	<i>MCL-1</i>	Prolifération cellulaire et apoptose
miR-720	<i>TWIST1</i>	Invasion cellulaire et migration
miR-7	<i>KLF4</i>	Métastase du cancer
miR-98	<i>MMP1, ALK4</i>	Angiogenèse
miR-542-3p	<i>Angiopoietin-2</i>	Angiogenèse
miR-148a/152	<i>IGF-IR, IRS1</i>	Angiogenèse

22. Les miARNs et le cancer du sein triple négatif (CSTN)

Plusieurs études et des analyses bioinformatiques ont été menées pour le profilage des miARNs impliqués dans le cancer du sein triple négatif (CSTN). Des miARNs différemment exprimés entre les sous-types de cancer du sein (basal et luminal) et selon la présence ou l'absence de récepteurs hormonaux ont été signalés par différents groupes de recherche (D'Ippolito et Iorio, 2013).

Une première étude de profilage de miARNs dans le cancer du sein triple négatif a été réalisée par Cascione et ses collaborateurs en 2013. En comparant les tissus triple négatifs et les tissus normaux dans une première série, le profilage de miARN a révélé 116 miARNs dérégulés parmi lesquels miR-106b, le cluster miR-17/92, la famille miR-200 (miR-200a, miR-200b et miR-200c), miR-21 et miR-155 ont été les plus surexprimés tandis que let-7b, let-7c, miR-126, miR-145 et miR-205 étaient les plus sous-exprimés. Une deuxième série de tissus triple négatifs associés aux métastases ganglionnaires et des tissus normaux a permis l'identification de six miARN exprimés de manière différentielle dans les tissus métastatiques (miR-424, miR-125a-5p, miR-627, miR-579, let-7g, miR-101), avec miR-424 et miR-125a-5p exprimés différemment seulement dans les métastases versus tumeur primaire et dans le tissu normal versus les métastases, respectivement (Cascione et al., 2013 ; D'Ippolito et Iorio, 2013).

D'Ippolito et Iorio ont rapporté quelques exemples de miARN, considérés comme oncogènes et suppresseurs de tumeur dans le cancer du sein triple négatif provenant d'analyses *in silico* et validés par des données expérimentales sur des processus biologiques (prolifération, cycle cellulaire, apoptose, invasion / migration cellulaire, formation des métastases...) (tableau 5) (D'Ippolito et Iorio, 2013).

Tableau 5. Les miARNs impliqués dans le cancer du sein triple négatif, avec les cibles validées et les fonctions biologiques (D'Ippolito et Iorio, 2013).

miARN	Les cibles identifiées	Fonction biologique
<u>Oncogène</u>		
miR-181a/b	<i>Bim</i> <i>ATM</i>	Inhibition de l'apoptose Faible réparation des cassures d'ADN double brin
miR-146a miR-146b-5p	<i>BRCA1</i>	Contrôle de la prolifération cellulaire médiée par <i>BRCA1</i> et la recombinaison homologue
miR-182	<i>PFN1</i>	Inhibition de la prolifération cellulaire et l'invasion Induction de l'apoptose
<u>Suppresseur de tumeur</u>		
miR-200a/b	<i>Zeb1/Zeb2, Suz12, EphA2</i>	Stimulation de la différenciation de cellules épithéliales mammaires indifférenciées
miR-200c	<i>Zeb1/Zeb2</i> <i>MSN; FN1</i> <i>TrkB</i>	Inhibition d'EMT Suppression de la migration Réversion de la résistance à l'anoikisis (anoikisis : type d'apoptose)
miR-205	<i>E2F1; LAMC1</i>	Réduction de la prolifération, le cycle cellulaire et la croissance des tumeurs
miR-203	<i>BIRC5</i> <i>LASP1</i>	Réduction de la prolifération Inhibition de la migration
miR-31	<i>WAVE3; RhoA;</i> <i>Radexin</i> <i>PRKCE</i>	Réduction de potentiel métastatique Induction de l'apoptose et l'amélioration de la chimiothérapie et de radiosensibilité
miR-34a	<i>AXL</i>	Réduction de la migration

En outre, miR-21 pourrait éventuellement jouer un rôle oncogène dans le cancer du sein triple négatif comme il est surexprimé chez les patients triple négatifs du cancer du sein et son expression est souvent associée à un mauvais pronostic (Gyparaki et al., 2014).

Aussi, miR-155 induit l'angiogenèse des tumeurs et la croissance tumorale et sa surexpression est associée à des métastases, à un grade élevé et un mauvais pronostic. Une proportion importante de CSTN a montré une expression élevée de miR-155, d'ailleurs, il a été montré que l'expression de miR-155 est réprimée épigénétiquement par BRCA1 et il est surexprimé dans le cancer du sein déficient ou avec mutation du gène BRCA1.

Même si le rôle exact de miR-155 dans les CSTN est encore mal élucidé, cette observation suggère une étude plus approfondie de son rôle présumé dans les CSTN, en tant que marqueur et cible thérapeutique (Chang et al., 2011 ; D'Ippolito et Iorio, 2013 ; Gyparaki et al., 2014).

Gyparaki et ses collaborateurs ont cité différents miARNs et leurs rôles dans CSTN illustrés dans le tableau 6 (Gyparaki et al., 2014).

Tableau 6. Divers microARNs et leurs rôles de régulation dans le cancer du sein triple négatif (CSTN) (Gyparaki et al., 2014).

miARNs	Rôles dans CSTN
miR-106b, miR-17/92, miR-200 (a,b,c), miR-21, miR-155	Surexprimé dans CSTN
miR-126, miR-145, miR-205	Sous-exprimé dans CSTN
miR-424, miR-125a, miR-627, miR-579, miR-101	Métastases
miR-520g, miR-149, miR-342, miR-107, miR-520g-h, miR-155, miR-30c, miR-382	Marqueurs de statut du RE
miR-520g, miR-520d, miR-328, miR-373, miR-217, miR-504, miR-485-3p	Marqueurs de statut du RP
miR-520d, miR-30b, miR-217, miR-363, miR-383, miR-377, miR-130a, miR-422a	Marqueurs de statut HER2/neu
miR-342, miR-27b, miR-150	Marqueurs pronostiques

RE : récepteur aux œstrogènes, RP : récepteur à la progestérone, HER2: récepteur du facteur de croissance épidermique humain 2

Les miARNs pourraient représenter non seulement un niveau de complexité supplémentaire dans le profil moléculaire des CSTN, contribuant à la compréhension de la tumeur et la sous-classification, mais, ils pourraient également représenter des biomarqueurs facilement détectables pour prédire le pronostic et la réponse au traitement de ce sous-type de cancer du sein. L'identification des gènes cibles des miARNs et les voies de signalisations impliquées dans les CSTN pourraient augmenter le potentiel de miARNs en tant que biomarqueurs.

PROBLEMATIQUE ET OBJECTIFS

Bien qu'il ne représente que 10-20% de tous les cancers du sein (Valentin et al., 2012, Arnedos et al., 2012), le cancer du sein triple négatif a suscité un intérêt croissant ces dernières années. Défini par l'absence d'expression des récepteurs aux œstrogènes et à la progestérone, et l'absence de surexpression et d'amplification d'HER2, il ne dispose d'ailleurs d'aucune thérapie ciblée, ce qui complique sa prise en charge. Une forte proportion de ces tumeurs présentent des altérations du gène *BRCA1* (Perou et al., 2000 ; Gonçalves et al., 2013). *BRCA1* est un gène suppresseur de tumeur connu pour avoir des fonctions biologiques diverses, notamment dans la réparation des cassures de l'ADN. Dans les cancers du sein triple négatifs sporadiques, *BRCA1* est fréquemment inactivé au niveau transcriptionnel. Il a été montré que cette extinction de *BRCA1* pourrait être liée à la méthylation de son promoteur, à l'action du répresseur ID4 (Turner et Reis-Filho, 2006 ; Turner et al., 2007) et plus récemment à une régulation post-transcriptionnelle par des micro-ARN (Chang et Sharan, 2012).

Du fait de leur récente découverte et des nombreuses recherches en cours à leur sujet, nous avons voulu rechercher au cours de ce travail de thèse quels sont les miARNs impliqués dans l'oncogenèse mammaire et leur rôle éventuel dans l'expression de *BRCA1*, tout particulièrement dans le cancer du sein triple négatif.

La détermination du rôle des miARNs dans ce sous-type de cancer du sein pourrait permettre la mise en évidence de nouveaux marqueurs de ce cancer et également de développer de nouvelles cibles thérapeutiques.

Pour cela, trois approches ont été successivement suivies:

Tout d'abord, nous avons étudié *in vitro* l'expression de miARNs dans des lignées cellulaires humaines de cancers du sein sporadiques triple négatifs et non triple négatifs afin de sélectionner les miARNs exprimés qui pourraient cibler *BRCA1* et être impliqués dans l'oncogenèse mammaire.

Le rôle potentiel de ces miARNs, pré-sélectionnés, dans le développement du cancer du sein a été évalué par l'expression exogène des ces miARNs et leur anti-miARNs dans deux lignées de cellules cancéreuses mammaires, à savoir, MDA-MB-231 et MCF7.

Dans un deuxième temps, nous avons voulu évaluer *in silico* l'expression des ces miARNs pré-sélectionnés dans des tumeurs mammaires triple négatives et non triple négatives, grâce à la base de données TCGA (The Cancer Genome Atlas).

Enfin, après l'analyse *in vitro* et *in silico* de ces miARNs, nous avons mené une étude *ex vivo*, sur des tissus mammaires de cancer du sein triple négatif et non triple négatif inclus en paraffine, afin d'étudier l'expression des miARNs pré-sélectionnés et du gène BRCA1.

Nous avons également recherché les relations possibles qui pourraient exister entre les données clinico-pathologiques des patientes et l'expression des miARNs et de BRCA1.

MATERIEL ET METHODES

I. Matériel utilisé

1. Lignées cellulaires

Neuf lignées de cellules de cancer du sein humain et une lignée de cellules du sein bénigne (Tableau 7) ont été cultivées dans un incubateur humidifié à 37 ° C contenant 5% de CO₂.

La lignée cellulaire MCF10A a été obtenue à partir de l'American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA) et a été cultivée en milieu Eagle modifié de Dulbecco (DMEM/F12) (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) complété avec du sérum de cheval à 10%, EGF 20 ng/ml, de la toxine cholérique 100 ng/ml, de l'hydrocortisone 500 ng/ml, 2 mM de L- glutamine et 20 ng/ml de gentamicine.

Les lignées cellulaires MCF7, T47D, MDA-MB-231, HCC1937 et MDA-MB-436 ont été obtenues à partir de l'American Type Culture Collection (Manassas, VA, USA). Les cellules ont été maintenues en culture monocouche en milieu RPMI 1640 (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) complété avec 10% de sérum de veau fœtal, 2 mM de L-glutamine et 20 ng/ml de gentamicine.

Les lignées cellulaires SUM149PT et SUM1315MO2 ont été obtenues à partir de Asterand (Royston, Hertfordshire, Royaume-Uni) et ont été cultivées dans du milieu F12 de Ham, selon les instructions du fournisseur.

Les lignées cellulaires SUM1315-LXSN et SUM1315-BRCA1 ont été dérivées de la lignée cellulaire SUM1315MO2 dont BRCA1 est muté (185delAG) et qui a été transfectée de façon stable avec un plasmide LXSN vide ou un plasmide codant l'ADNc de BRCA1, LXSN-BRCA1, respectivement (Privat et al., 2009).

Lorsque les cellules sont à confluence, elles sont rincées au PBS, puis traitées à la trypsine (Trypsine-EDTA 0,25%, Gibco) pendant 2 minutes à 37°C puis sont réensemencées au 1/10ème.

Les cellules ont été fixées dans une solution Preservcyt (Thinprep) et les cytoblocs ont été préparés avec le kit Shandon Cytoblock (Thermo Scientific). Le statut des récepteurs aux œstrogènes (ER), des récepteurs à la progestérone (PR), de la protéine HER2, de la cytokératine 5/6, de la cytokératine 14, d'EGFR et de la protéine cKIT ont été déterminés par immunocytochimie sur des sections de 3 µm d'épaisseur. Des immuno-colorations ont été réalisées dans une coloration BenchmarkXT automatisée (Ventana Medical Systems) et ont été marqués semi- quantitativement par un pathologiste expert sous un microscope droit avec éclairage (Tableau 7).

Tableau 7. Statut de BRCA1 et caractéristiques immunocytochimiques des cellules de cancer du sein humain, étudiés

Lignées cellulaires				Immunocytochimie						
			Statut de BRCA1	ER	PR	HER ₂	ck5/6	CK14	EGFR	cKIT
MCF10A	Non tumoral	Benin	sauvage	-	-	-	+ (90%)	+ (80%)	+ (100%)	-
MCF7	Tumoral	Luminal	sauvage	90% (1+)	40% (1/2+)	-	-	-	-	-
T47D	Tumoral	Luminal	sauvage	50% (1/2+)	80% (1/2+)	-	-	-	+ (40%)	-
MDA-MB-231	Tumoral	TN	sauvage	-	-	-	-	-	+ (100%)	-
HCC1937	Tumoral	TN	5382ins C	-	-	-	+ (25%)	+ (20%)	+ (100%)	-
MDA-MB-436	Tumoral	TN	5396 + 1G>A	-	-	-	-	-	+ (90%)	-
SUM149PT	Tumoral	TN	2288del T	-	-	-	+ (25%)	+ (<1%)	+ (100%)	-
SUM1315 MO2	Tumoral	TN	185delA G	-	-	-	-	-	+ (90%)	-
SUM1315 -LXSN	Tumoral	TN	185delA G	-	-	-	-	-	+ (60%)	-
SUM1315 -BRCA1	Tumoral	TN	185delA G + sauvage	-	-	-	-	-	+ (80%)	-

2. Tissus mammaires en paraffine

Notre travail a porté sur une série de 50 femmes tunisiennes atteintes de cancer du sein diagnostiqués entre 2010 et 2012 et colligées par le laboratoire d'Anatomie et de Cytologie Pathologiques du CHU Farhat Hached de Sousse. Aimablement fournis par le Pr. Mounir TRIMECHE.

Pour chaque cas a été choisi un bloc de paraffine représentatif de la lésion tumorale (dans la plupart des cas, la proportion de cellules malignes dans les coupes histologiques dépasse 50%) qui servira pour les explorations morphologiques (immunohistochimie) et moléculaire (qPCR).

Les données relatives à l'expression des trois marqueurs (RE, PR et HER-2) par immunohistochimie de routine avec les informations cliniques concernant l'âge des patientes au moment du diagnostic, la taille tumorale, les métastases ganglionnaires et le grade histopronostique de Scraff Bloom et Richardson (SBR) ont été recueillies par consultation des rapports anatomopathologiques au laboratoire d'Anatomie et de Cytologie Pathologiques du CHU Farhat Hached de Sousse-Tunisie, des dossiers du Registre du Cancer du Centre et par la relecture des dossiers cliniques des patientes.

Le tableau 8 ci-dessous illustre les données clinico-pathologiques des 37 patientes retenues pour notre étude après l'extraction et le contrôle de la qualité de l'ARN.

Tableau 8. Les données clinico-pathologiques chez des patientes atteintes du cancer du sein

Référence	Type histologique	SBR	Taille	Age	LNM	RE	RP	HER2	SOUS TYPE
1	8529/11	CCI	2	5	66	1	0	0	TN
2	7349/11	CCI	2	3	40	1	0	0	TN
3	1751/11	CCI	3	3	75	1	0	0	TN
4	7261/11	CCI	3	4	34	1	0	0	TN
5	10670/11	CCI	3	4	49	0	0	0	TN
6	14600/11	CCI	2	3	54	1	0	0	TN
7	9668/12	CCI	2	5	59	1	0	0	TN
8	8208/12	CCI	3	3	55	0	0	0	TN
9	8896/12	CCI	3	3	56	1	0	0	TN
10	4040/12	CCI	3	2	37	1	0	0	TN
11	7601/12	CCI	2	2,5	57	1	0	0	TN
12	8707/12	CCI	2	3	49	0	0	0	TN
13	18547/12	CCI	2	2,7	47	0	0	0	TN
14	17299/12	CCI	2	2	63	0	0	0	TN
15	12692/12	CCI	3	2,7	37	0	0	0	TN
16	15185/12	CCI	3	6	59	0	0	0	TN
17	12945/12	CCI	3	2,5	49	0	0	0	TN
18	8033/12	CCI	1	2	45	0	0	0	TN
19	13346/10	CCI	2	4	53	1	0	0	TN
20	3986/10	CCI	2	4	42	0	0	0	TN
21	9443/10	CCI	2	4,5	37	0	0	0	TN
22	5023/10	CCI	3	3	35	1	0	0	TN
23	2838/10	CCI	3	2,5	50	1	0	0	TN
24	13424/10	CCI	3	5	59	1	0	0	TN
25	9163/10	CCI	2	7	77	1	1	0	LUM A
26	5593/10	CCI	1	4	38	1	1	1	LUM B
27	6964/10	CCI	3	1,8	41	1	1	0	LUM A
28	6111/10	CCI	2	5	46	1	1	0	LUM A
29	5782/10	CCI	2	5,5	44	1	0	0	LUM A

30	3024/10	CCI	1	3	36	0	0	1	0	LUM A
31	4413/10	CCI	1	1,5	41	1	0	1	0	LUM A
32	2650/10	CCI	3	1,5	46	1	0	1	1	LUM B
33	11961/10	CCI	2	2,5	80	1	1	1	0	LUM A
34	15937/10	CCI	1	3	45	0	1	1	0	LUM A
35	13636/10	CCI	2	3	51	0	1	1	0	LUM A
36	17488/10	CCI	2	2	55	0	1	1	0	LUM A
37	6549/10	CCI	2	3	55	1	1	1	0	LUM A

CCI : Cancers canauxaires Infiltrants; **SBR** (Scarff, Bloom and Richardson) : grade histo-pronostique ; **LNM** (lymph Node Metastasis) : Métastases ganglionnaires ; **RE**: Récepteurs aux estrogènes ; **RP** : Récepteurs de la progestérone ; **HER2** (Human Epidermal growth factor Receptor-2): Récepteur pour les facteurs de croissance épidermiques humains; Les sous-types de cancer du sein : **TN** : Triple Négatif ; **LUMA** : Luminal A ; **LUMB** : Luminal B.

II. Méthodes

1. Extraction d'ARN

✓ Sur des cultures cellulaires :

Cette méthode est réalisée sur des culots cellulaires (1.10^6 cellules lavées au PBS) grâce au kit miRNeasy mini kit, QIAGEN, France. Les ARN sont extraits selon les instructions du fournisseur par ajout de chloroforme, récupération de la phase aqueuse, ajout d'éthanol et passage sur colonne pour la récupération d'ARN total y compris les miARNs.

✓ Sur des tissus inclus en paraffine

L'extraction est réalisée sur coupes de tissus inclus en paraffine de 6 μm par le kit miRNeasy FFPE, QIAGEN, France. Les ARN sont extraits selon les instructions du fournisseur par déparaffinage des coupes par fusion, ajout de la solution de lyse de la protéinase k, traitement par DNase, ajout d'éthanol et passage sur colonne pour la récupération d'ARN total y compris les miARNs.

La qualité et la quantité d'ARN sont analysées à l'aide :

- Du spectrophotomètre : il est indispensable de mesurer l'absorbance à 280 nm pour apprécier le degré de pureté de l'échantillon d'ARN qui est défini par le rapport $R = \text{DO}_{260} / \text{DO}_{280}$ nm qui doit être $1,8 \leq R \leq 2,1$.
- Du Bioanalyseur 2100 par électrophorèse miniature avec le kit RNA 6000 Nano Kit (Agilent®), technique présentée en Annexe 1. Les ARN sont considérés comme non dégradés pour des valeurs de l'indicateur RNA Integrity Number (RIN), données par le logiciel 2100 Expert Software, comprises entre 7,5 et 10.

2. PCR quantitative

Un microgramme d'ARN total a été converti par transcription inverse en utilisant le kit RT miscript II (QIAGEN, France). Cette réaction de transcription inverse est réalisée selon le programme suivant : 60 minutes à 37°C, 5 minutes à 95°C. La PCR quantitative est ensuite réalisée en tripliquats sur 15 nanogrammes d'ADNc en utilisant un kit miscript syber Green PCR (QIAGEN, France) sur un système ABI7900HT et un système Applied Biosystems ViiA™ 7 Real-Time PCR. Une première étape de dénaturation de l'ADN est tout d'abord réalisée par chauffage à 94°C pendant 15 secondes. L'hybridation des amorces est ensuite effectuée pendant 30 secondes à 55 °C. Finalement, une polymérisation à 70°C pendant 30 secondes. Ces trois étapes sont répétées durant 40 cycles.

Les séquences des amorces 5' et 3' utilisées pour l'amplification réalisée par PCR sont les suivantes :

Les amorces de microARN sélectionnées ont été obtenues à partir de miScript Assay Primer (QIAGEN, France), comme le montre le tableau 9.

Les amorces pour le gène EGFR : 5'-TGGCATCTTTAAGGGCTCCA-3'

(sens) 5'-TGGCTAGTCGGTGTAACCGT-3' (anti-sens).

Pour le gène *BRCA1* : nous avons réalisé la PCR quantitative (en 3 fois) en présence du produit « Assay-on-Demand » d'expression de gène de TaqMan (*BRCA1* Hs00173233_m1, Applied Biosystems) et de TaqMan PCR Master mix dans les mêmes conditions qu'en présence de Syber Green et sur le même système d'appareil.

U6 (Hs-RNU6-2-1 Primer miscript Assay) et l'ARNr 18S ont été utilisés comme témoins endogènes.

Après acquisition des données, une valeur appelée Ct (Cycle Threshold), définie comme le nombre de cycles à partir duquel la fluorescence est supérieure au seuil du bruit de fond, est déterminée en utilisant les paramètres de base de l'appareil, et ce pour chaque miARN ou gène dans un échantillon. Tous les échantillons ont été normalisés à des contrôles internes et des ratios d'expression ont été calculés par la quantification relative $QR = 2^{-\Delta\Delta CT}$.

Avec $\Delta\Delta CT = (CtX - Ct_{\text{contrôle endogène}}) \text{ échantillon 1} - (CtX - Ct_{\text{contrôle endogène}}) \text{ échantillon 2}$.

Tableau 9. Liste des amorces de miARNs

Amorces (miScript Primer Assay)	QIAGEN cat no	séquence de miARN mature
Hs_miR-146a_1	MS00003535	UGAGAACUGAAUCCAUGGGUU
Hs_miR-146b_1	MS00003542	UGAGAACUGAAUCCAUAGGCU
Hs_miR-153_1	MS00008771	UUGCAUAGUCACAAAAGUGAUC
Hs_miR-132_1	MS00003458	UACAGUCUACAGCCAUGGUCG
Hs_miR-212_1	MS00003815	UACAGUCUCCAGUCACGGCC
Hs_miR-10b_3	MS00031269	UACCCUGUAGAACCGAAUUUGUG
Hs_miR-26a_2	MS00029239	UUCAAGUAAUCCAGGAUAGGCU
Hs_miR-15b_2	MS00008792	UAGCAGCACAUCAUGGUUUACA
Hs_miR-206_1	MS00003787	UGGAAUGUAAGGAAGUGUGUGG
Hs_miR-155_2	MS00031486	UUA AUGCUAAUCGUGAUAGGGGU
Hs_miR-485-5p_1	MS00006972	AGAGGCUGGCCGUGAUGAAUUC

3. miScript miRNA PCR Array

Cette méthode de miScript miRNA PCR Array du cancer du sein humain (MOIS-109ZE-4) profile l'expression de 84 miARNs (Figure 15) connus ou prévus pour modifier leur expression lors de l'initiation ou de la progression du cancer du sein. Elle est réalisée (en 3 fois) sur 250 nanogrammes d'ARN total qui ont été convertis par transcription inverse en utilisant le kit RT miscript II (QIAGEN, France).

Ce protocole permet le profilage de miARN en temps réel de PCR en utilisant le miScript miRNA PCR Array en combinaison avec le kit miScript SYBR Green PCR, qui contient l'amorce miScript universel (amorce inverse) et le QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix sur un système ABI7900HT.

Les données obtenues ont été traitées par un logiciel d'analyse gratuit pour miScript miRNA PCR array, disponible en ligne à <http://pcrdataanalysis.sabiosciences.com/mirna>. Ceci nous a permis d'effectuer automatiquement la normalisation et la quantification relative ($QR = 2^{-\Delta\Delta CT}$) de tous les échantillons.

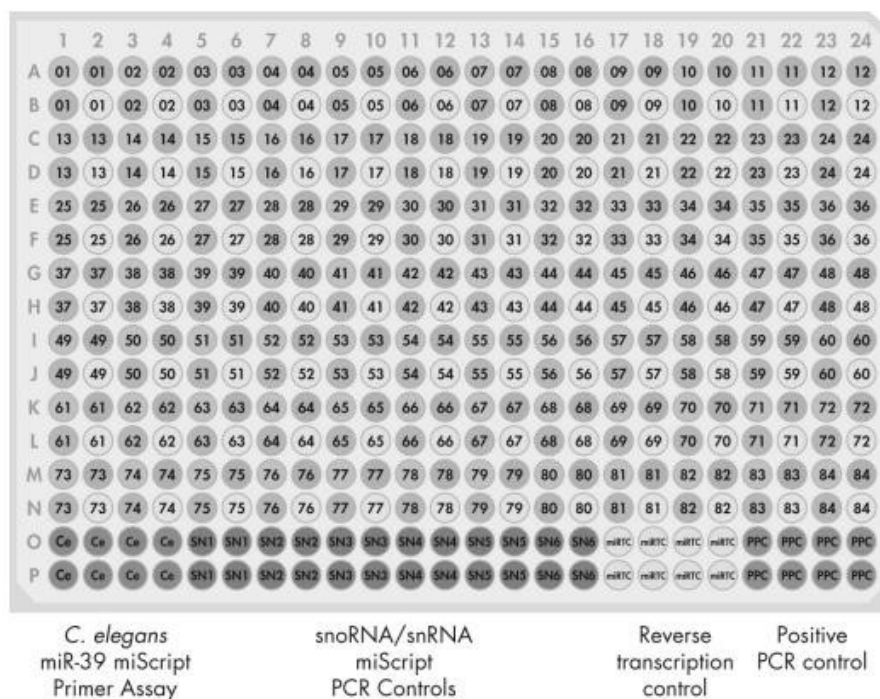


Figure 15. Disposition de la plaque miScript miRNA PCR Array

(miScript miRNA PCR Array Handbook 05/2012)

4. Transfection Cellulaire

La transfection est un processus au cours duquel on introduit du matériel génétique dans des cellules. Nous avons utilisé la méthode de transfection à la lipofectamine 2000 pour introduire des miARNs dans des cellules en culture et étudier leurs expressions et l'expression du gène *BRCA1*.

Les mimiques et les inhibiteurs de miARNs sélectionnés ont été obtenus à partir de miScript miARN Mimic et miScript miARN inhibiteur respectivement (QIAGEN, France), comme illustré dans le tableau 10. Le siRNA utilisé pour inhiber le gène BRCA1 (siBRCA1) est synthétisé par Dharmacon Thermo Scientific (M-003461-02-0005, siGENOME SMART pool, BRCA1 humain (672), 5 nmol).

Les cellules mammaires ont étéensemencées à 300 000 cellules par puits dans des plaques à six puits. Vingt-quatre heures plus tard, miARN et siARN sont transfectées en utilisant la Lipofectamine 2000 (Invitrogen, CA, USA) selon les instructions du fournisseur. Les cellules qui ont été transfectées avec seulement le réactif de transfection ont été utilisées comme témoin mock (T-mock). Trois jours après la transfection, les cellules ont été lavées avec du PBS 1X et récupérées.

Tableau10. Liste des mimiques et des inhibiteurs de miARN sélectionnés

Nom	QIAGEN Cat No	Séquence de miARN mature
Syn-hsa-miR-146a-5p miScript miRNA	MSY0000449	5' GAGAACUGAAUCCAUGGGUU
Anti-hsa-miR-146a-5p miScript miRNA	MIN0000449	5' GAGAACUGAAUCCAUGGGUU
Syn-hsa-miR-153 miScript miRNA	MSY0000439	5' UGCAUAGUCACAAAAGUGAUC
Anti-hsa-miR-153 miScript miRNA	MIN0000439	5' UGCAUAGUCACAAAAGUGAUC
Syn-hsa-miR-10b-5p miScript miRNA	MSY0000254	5'UACCCUGUAGAACCGAAUUUGUG
Anti-hsa-miR-10b-5p miScript miRNA	MIN0000254	5'UACCCUGUAGAACCGAAUUUGUG
Syn-hsa-miR-26a-5p miScript miRNA	MSY0000082	5' UUCAAGUAAUCCAGGAUAGGCU
Anti-hsa-miR-26a-5p miScript miRNA	MIN0000082	5' UUCAAGUAAUCCAGGAUAGGCU

5. Prolifération cellulaire

Dans notre étude les cellules MDA-MB-231 et MCF7 ont été trypsinées et remises en suspension. Ensuite, 3000 cellules par puits ont étéensemencées dans une plaque à 96 puits, cultivées dans un incubateur humidifié à 37 ° C contenant 5% de CO₂ pendant 24 heures. Ensuite, les cellules ont été transfectées par la lipofectamine seule (T-mock), siBRCA1, miR-146a, anti-miR-146, miR- 153, miR-10b et de miR-26a en utilisant la Lipofectamine 2000 (Invitrogen, CA, USA) selon les instructions du fournisseur. Après 48 heures, la prolifération in vitro des cellules a été évaluée en utilisant le kit CCK-8 (Cell Counting Kit-8, Sigma-Aldrich) en suivant les instructions du fabricant (Annexe 2). L'absorbance a été déterminée à 450 nm en utilisant un lecteur de microplaque. Toutes les expériences ont été réalisées en triplicat.

6. Analyse in silico de quatre miARN dans les données TCGA

Les données cliniques et de séquençage de microARN pour le cancer du sein invasif ont été téléchargées de la base de données du Cancer Genome Atlas (TCGA). 519 patientes avec des informations sur les récepteurs des œstrogènes (ER), le récepteur de la progestérone (PR) et le statut HER2 ont été sélectionnées pour comparer l'expression des quatre miARNs dans la tumeur (miR-153, miR-146a, miR-10b et de miR-26a). 88 patients avaient un statut négatif pour ER, PR et HER2: les phénotypes triple négatifs et 431 avaient au moins une séropositivité parmi les récepteurs.

Le test t de Student a été utilisé pour analyser les différences statistiques dans l'expression moyenne entre ces deux groupes.

7. Immunohistochimie

L'immunohistochimie est une technique de détection morphologique directe permettant la recherche de l'expression des protéines intra-tissulaires par des antisérums spécifiques souvent de lapin ou de souris (anticorps primaires). Ces anticorps peuvent être conjugués directement avec des enzymes (peroxydase, phosphatase alcaline) ou des marqueurs de fluorescence, ou reconnus par des anticorps secondaires (anticorps universels) conjugués avec des marqueurs de fluorescence ou avec des enzymes de révélation (peroxydase, phosphatase alcaline) capables de transformer un chromogène incolore (DAB, AEC...) et de créer une coloration révélée sous microscope optique. Elle se réalise sur des coupes tissulaires congelées ou déparaffinées.

Nous avons utilisé cette méthode pour déterminer l'expression de la protéine BRCA1 sur des tissus mammaires, inclus en paraffine, triple négatifs et non triple négatifs en utilisant un kit de détection de l'immunomarquage EnVision (EnVision™ FLEX, High pH, (Dako Autostainer/Autostainer Plus) Code K8010) et l'anticorps primaire anti-BRCA1 (Anti-

BRCA1 antibody [MS110] (ab16780), Epitope within the N-terminal 304 amino acids of BRCA1.).

Le protocole de cette technique comporte les étapes suivantes :

5 µm de tissu en paraffine ont été coupés, étalés sur des lames, déparaffinés et réhydratés. Ensuite, un démasquage antigénique a été réalisé pendant 40 minutes avec un tampon citrate à pH6 à 98°C. L'activité des peroxydases endogènes a été neutralisée en utilisant du réactif EnVision FLEXTM Peroxidase-Blocking Reagent pendant 5 minutes. Les lames ont été par la suite lavées dans un tampon de lavage EnVision FLEXTM Wash buffer (20X) dilué dans l'eau distillée à température ambiante. Ensuite les anticorps primaires spécifiques des antigènes à rechercher ont été appliqués à leurs dilutions adéquates et pendant une durée optimale comme indiqué : Incubation des lames toute la nuit en présence de l'anticorps primaire anti-BRCA1 (dilution 1:80) et incubation des lames pendant 15 min en présence EnVision FLEXTM+ Mouse (linker).

La révélation des anticorps primaires fixés à leur antigènes est réalisée par incubation pendant 20 minutes des lames avec le kit le EnVision FLEXTM /HRP suivie d'un lavage dans un tampon de lavage EnVision FLEXTM Wash buffer (20X) dilué dans l'eau distillée.

Le substrat chromogène (DAB : diamino-benzidine) est ajouté pour révéler l'activité peroxydasique. Il est appliqué pendant 5 à 15 minutes suivi d'un rinçage des coupes à l'eau distillée.

Enfin, les coupes ont été contre-colorées à l'hématoxyline déshydratée dans de l'OTTIX SHAPPER et puis dans de l'OTTIX PLUS. Montage des lames pour observation sous un microscope optique.

8. Analyse statistique

Des analyses statistiques ont été effectuées en utilisant le test de Student (EXCEL 2007). Une valeur de $p \leq 0,05$ a été considérée comme statistiquement significative. Des tests ont été effectués avec le logiciel SPSS 20 (SPSS, IBM). La relation entre l'expression des miARN analysés a été déterminée par le test de corrélation de Spearman.

RESULTATS

Partie I- Etude *in vitro* de l'expression de miARN et BRCA1 dans des lignées cellulaires de cancer du sein humain

I. miR-10b et de miR-26a sont préférentiellement exprimés dans les lignées cellulaires dérivées de cancer du sein triple négatif

Dans un premier temps, le profilage de miARN est mené par la méthode de miscript miRNA PCR Array qui permet l'analyse de l'expression de 84 miARNs, impliqués dans la tumorigenèse de cancer du sein, dans dix lignées cellulaires mammaires humaines.

Une lignée cellulaire bénigne (MCF10A), deux lignées cellulaires luminales (MCF7, T47D) et sept lignées cellulaires basal-like (MDA-MB-231, MDA-MB-436, HCC1937, SUM149PT, SUM1315MO2, SUM1315-BRCA1 et SUM1315-LXSN) ont été analysées.

Les caractéristiques des lignées cellulaires ont été étudiées par immuno-histochimie et sont présentées dans le tableau 10.

Nous nous sommes intéressés à mettre en évidence si certains miARNs sont spécifiquement exprimés dans des lignées cellulaires de cancer du sein de type triple négatif. Pour cela, nous avons comparé l'expression de miARNs entre les sous-groupes de lignées cellulaires et nous avons choisi six miARNs qui ont été exprimés différemment dans au moins deux sous-groupes de comparaison: miR-10b, miR-15b, miR-26a, miR-155, miR-206, miR-485-5p (Tableau 11 et Annexe 3).

Dans un second temps, nous avons utilisé la méthode de qRT-PCR afin de vérifier les résultats obtenus par la PCR Array et de déterminer le niveau d'expression de ces six miARNs dans les dix lignées cellulaires de cancer du sein humain. Seuls deux miARNs miR-10b et miR-26a ont été bien exprimés dans ces lignées cellulaires. Les autres ont été exprimés à des niveaux faibles ou ne sont pas exprimés.

Le résultat de PCR en temps réel a montré que miR-10b est plus exprimé dans trois lignées cellulaires : MDA-MB-231, MDA-MB-436 et SUM1315MO2 (Figure 16a) et significativement plus exprimé dans les lignées cellulaires triple négatives par rapport aux lignées cellulaires luminales ($p=0,0158$).

Pour le miR-26a, il a été exprimé dans les dix lignées cellulaires de cancer du sein humain et significativement plus exprimé dans les lignées cellulaires triple négatives ($p=0,003$) (Figure 16b).

II. miR-146a et miR-153 ciblant la région 3'-UTR de *BRCA1*

La protéine BRCA1 est souvent sous-exprimée dans les cancers du sein sporadiques triple négatifs. L'identification des miARNs ciblant alors le gène *BRCA1* pourrait potentiellement aider à trouver les miARNs impliqués dans la tumorigenèse de ce sous-type de cancers. Pour ce faire nous avons sélectionné, grâce aux cinq bases de données informatiques ou algorithmes disponibles : TargescanHuman, Tarbase, Miranda, MicroCosmTargets et PicTar, les différents miARNs pouvant cibler potentiellement le « 3' Untranslated Region » (3'UTR) de *BRCA1*. Pour tous les algorithmes, nous avons utilisé les paramètres par défaut et nous avons choisi des miARNs prédits de cibler BRCA1 par au moins trois algorithmes.

Parmi les miARNs obtenus (Tableau 12), nous avons choisi cinq miARNs: deux miARNs, miR146a et miR146b-5p qui avaient été précédemment identifiés comme étant surexprimés dans les tumeurs du sein triple négatif et régulant négativement BRCA1 (Garcia et al., 2011) et trois miARNs qui étaient les plus fréquemment prédits pour interagir avec le 3'UTR de BRCA1 (miR-132, miR-212, miR-153). Nous avons déterminé par la suite le niveau d'expression de ces cinq miARNs sélectionnés par qRT-PCR dans les dix lignées cellulaires de cancer du sein humain.

Le résultat a montré que le niveau de l'expression de miR-146a a été plus élevé dans 3 lignées cellulaires mammaires triple négatives: MDA-MB-231, MDA-MB-436 et SUM1315-BRCA1 et significativement plus exprimé dans les lignées cellulaires triple négatives par rapport aux lignées cellulaires lumineales ($p=0,031$) (Figure 16c).

Pour le miR-153, il a été plus exprimé dans quatre lignées de cellules de cancer du sein triple négatives: MDA-MB-436, SUM1315MO2, SUM149PT et HCC1937 et significativement plus exprimé dans les lignées cellulaires triple négatives par rapport aux lignées cellulaires lumineales ($p=0,020$) (Figure 16d).

miR-146b-5p, miR-132 et miR-212 ont été exprimés dans les dix lignées cellulaires de cancer du sein humain à différents niveaux (Figure 17). Mais on n'a pas trouvé de différence significative lorsque nous avons comparé le niveau d'expression des ces miARNs entre les lignées cellulaires triple négatives et lumineales.

En conséquence, des résultats suivants, nous avons choisi de poursuivre et de focaliser notre analyse sur le miR-146a et le miR-153.

Tableau 11. Le profilage de microARN par miScript miRNA PCR Array entre les sous-groupes de lignées cellulaires mammaires

miARN ($p < 0,05$)	TN BRCA1+ (MDA-MB-231, SUMI315- BRCA1) / Luminal (MCF7, T47D)	TN BRCA1- (HCC1937, MDA-MB- 436, SUMI49PT, SUMI315MO2, SUMI315-LXSN) / Luminal (MCF7, T47D)	Tumoral (MCF7, T47D, MDA-MB-231, SUMI315-BRCA1, HCC1937, MDA-MB- 436, SUMI49PT, SUMI315MO2, SUMI315-LXSN) / Benin (MCF10a)	TN BRCA1- (HCC1937, MDA-MB- 436, SUMI49PT, SUMI315MO2, SUMI315-LXSN) / Benin (MCF10a)	TN BRCA1+ (MDA-MB-231, SUMI315-BRCA1) / Benin (MCF10a)
Surexprimé	hsa-miR-206	hsa-miR-10b	hsa-miR-485-5p	hsa-miR-485-5p	hsa-miR-100
(Fold change >2)	hsa-miR-10b	hsa-miR-100			hsa-miR-148a
	hsa-miR-129-5p	hsa-miR-26a			hsa-miR-328
					hsa-miR-607
	hsa-miR-16	hsa-let-7e	hsa-let-7b	hsa-let-7f	hsa-miR-125b
	hsa-miR-31	hsa-miR-19a	hsa-let-7f	hsa-miR-140-5p	hsa-miR-128
	hsa-miR-203	hsa-miR-206	hsa-miR-140-5p	hsa-miR-155	hsa-miR-155
	hsa-miR-328	hsa-miR-429	hsa-miR-155	hsa-miR-15b	hsa-miR-193b
	hsa-miR-607	hsa-miR-485-5p	hsa-miR-193b	hsa-miR-210	hsa-miR-195
	hsa-miR-613	hsa-miR-497	hsa-miR-26a	hsa-miR-25	hsa-miR-199b-3p
Sous-exprimé			hsa-miR-26b	hsa-miR-26a	hsa-miR-199a-5p
(Fold change <0,5)			hsa-miR-29c	hsa-miR-26b	hsa-miR-19a
				hsa-miR-27a	hsa-miR-205
				hsa-miR-29c	hsa-miR-206
				hsa-miR-489	hsa-miR-20a
				hsa-miR-495	hsa-miR-214
					hsa-miR-25
					hsa-miR-26a
					hsa-miR-26b
					hsa-miR-27a
					hsa-miR-205
					hsa-miR-214
					hsa-miR-29a

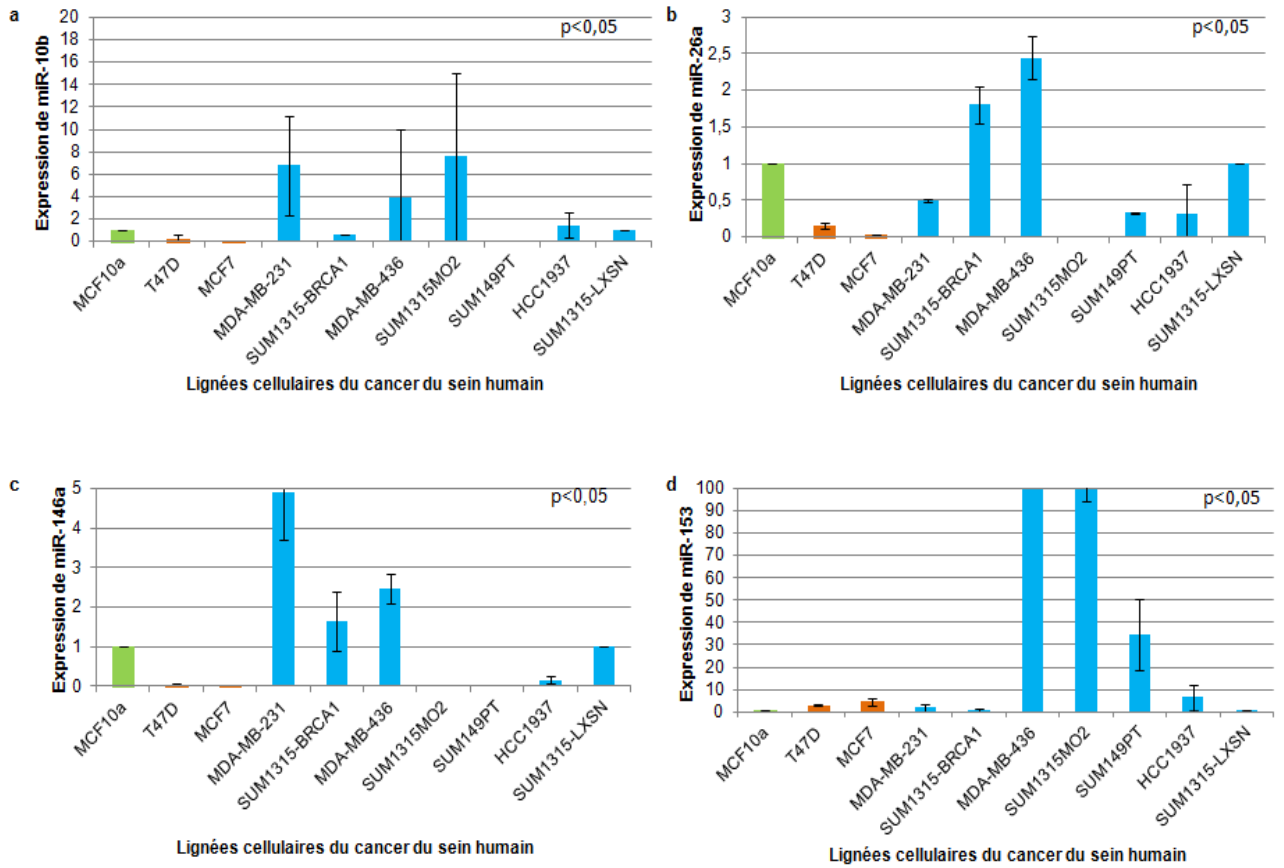


Figure 16. Taux d'expression de miR-10b, miR-26a, miR-146a et miR-153 dans les lignées cellulaires mammaires

Tableau 12. miARNs ciblant la région 3'UTR de *BRC41* prédits par cinq algorithmes

Algorithmes	<i>Miranda</i> (2008)	<i>Microcosm Targets</i> (2008)	<i>Pictar</i> (2005)	<i>Tarbase</i> (2009)	<i>TargescanHuman 6,1</i> (2012)	Vertébrés
miARNs					Mammaires	
hsa-miR-		30a-3p				105
hsa-miR-	1	17	132	16	122/122a	146ac/146-5p
hsa-miR-	7	20	140	21	125a-3p	17 / 17-5p
hsa-miR-	125a-3p	28	143	24	129-5p/129ab-5p	199ab-5p
hsa-miR-	132	32	154	192	132	205/205ab
hsa-miR-	141	92	185	212	150	20ab/20b-5p
hsa-miR-	153	99*	197	335	153	212/212-3p
hsa-miR-	186	122	205	146a	186	216b/216b-5p
hsa-miR-	190	146	370	15a	197	218/218a
hsa-miR-	206	153		193b	224	24/24ab/24-3p
hsa-miR-	212	187			294	26ab
hsa-miR-	218	200			295	28-5p
hsa-miR-	224	220			302	291a-3p
hsa-miR-	543	224			313	448-3p
hsa-miR-	613	333			372	518a-3p
hsa-miR-	146a	367			373	519a
hsa-miR-	146b-5p	373			411	519d
hsa-miR-	190b	378			427	520acd-3p
hsa-miR-	200a	464			428	520bc
hsa-miR-	216b	516			448	590-3p
hsa-miR-		518			708	7/7ab
hsa-miR-		526			758	9/9ab
hsa-miR-		540			1297	93/93a
hsa-miR-		701			1378	
hsa-miR-		760			1407	
hsa-miR-		125*			1653	
hsa-miR-		143*			4465	
hsa-miR-		20*			5127	
hsa-miR-					106a	
hsa-miR-					106ab	

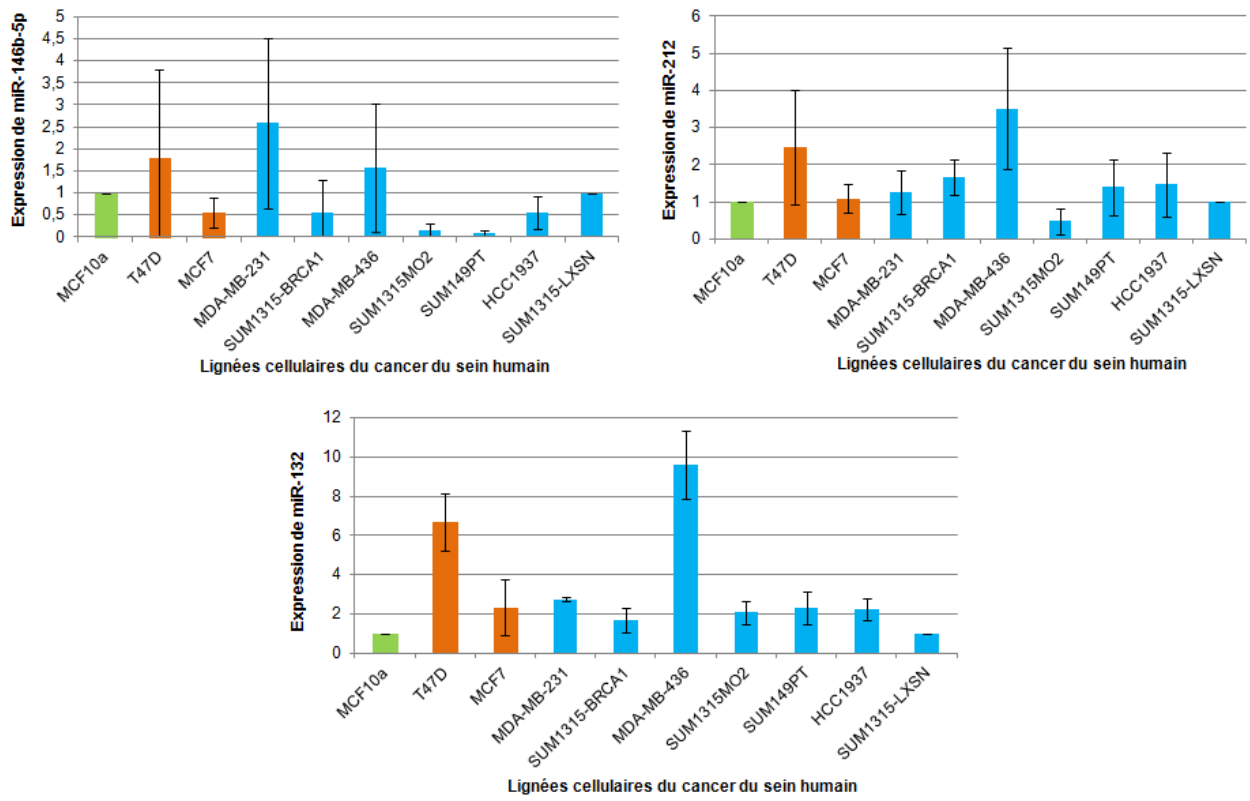


Figure 17. Taux d'expression de miR-146b-5p, miR-212 et miR-132 dans les lignées cellulaires mammaires

III. L'expression du gène *BRCA1* est régulée par miR-10b, miR-26a et miR-153

Le profilage des miARNs par PCR Array et qRT-PCR dans les dix lignées cellulaires de cancer du sein humain nous a permis de sélectionner quatre miARNs miR-146a, miR-153, miR-10b et miR-26a. Afin de déterminer l'effet de ces miARNs sur l'expression endogène de *BRCA1*, nous avons transfecté deux lignées cellulaires dont *BRCA1* est de type sauvage (cellules MDA-MB-231 et MCF7) avec les 4 miARNs sélectionnés (mimes de miARN) et anti-miARNs (inhibiteurs de miARN).

L'efficacité de l'expression exogène des mimes et des inhibiteurs de miARNs a été vérifiée par q-RT-PCR (Figure 18) et nous a permis d'utiliser uniquement miR-146a, anti-miR-146a, miR-153, miR-10b et miR-26a. L'efficacité de siARN de *BRCA1* a également été testée (Figure 19).

Les deux lignées cellulaires MCF-7 et MDA-MB-231 ont été choisies parce qu'elles expriment une protéine *BRCA1* de type sauvage. En outre, MCF7 est une lignée cellulaire luminaire alors que MDA-MB-231 est une lignée cellulaire triple négative; Nous serons ainsi en mesure de comprendre si le miARN a un effet différent sur *BRCA1* dans ces deux sous-types de cancer du sein.

- miR-146a: Pour déterminer si miR-146a affecte l'expression endogène de *BRCA1*, nous avons comparé le taux d'expression de *BRCA1* dans les cellules MDA-MB-231 et MCF7 après une transfection par miR-146a ou anti-miR-146a et par un contrôle Tmock (mock transfected cells, en anglais, les cellules ont été transfectées par le réactif de la transfection seulement). Ces résultats ont montré que miR-146a ne régule pas l'expression du gène *BRCA1* (Figure 20).
- miR-153: Nous avons testé les effets de miR-153 sur l'expression de *BRCA1*. Les résultats (Figure 20) montrent que miR-153 régule négativement l'expression du gène

BRCA1 dans des cellules MCF7. Dans MDA-MB-231, au contraire, miR-153 induit une régulation positive de *BRCA1*.

- miR-10b: Après la transfection de miR-10b dans des cellules MDA-MB-231 et MCF7, le niveau d'expression de *BRCA1* a diminué (Figure 20). Ces résultats suggèrent que miR-10b régule négativement l'expression du gène *BRCA1* dans des cellules MDA-MB-231 et MCF7.
- miR-26a: Le niveau d'expression de *BRCA1* a diminué après la transfection dans des cellules MDA-MB-231 et MCF7 par miR-26a (Figure 20). Ces résultats montrent que miR-26a régule négativement l'expression du gène *BRCA1* dans ces deux lignées cellulaires.

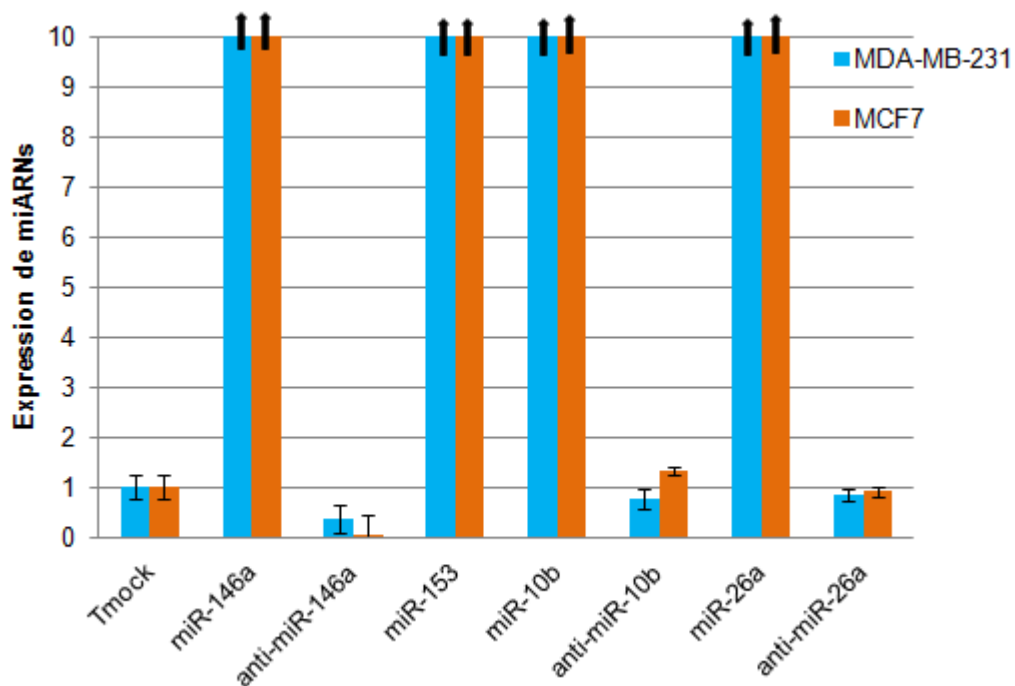


Figure 18. Taux d'expression de miARN et anti-miARN dans les lignées cellulaires MDA-MB-231 et MCF7

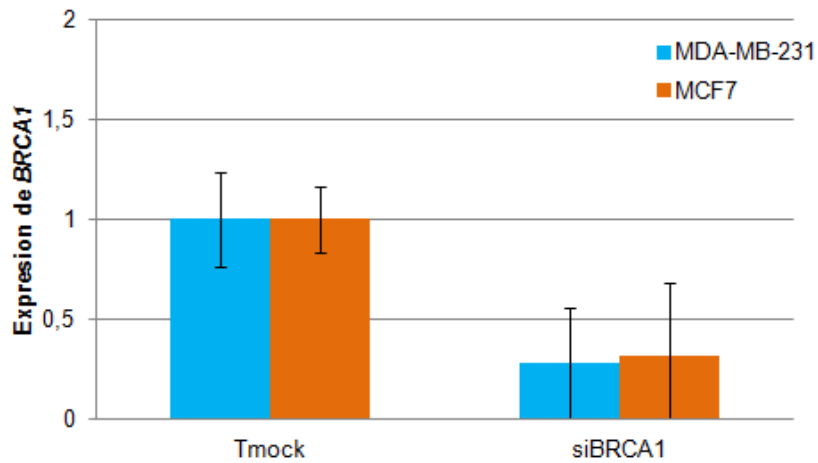


Figure 19. Inhibition de *BRCA1* par siARN

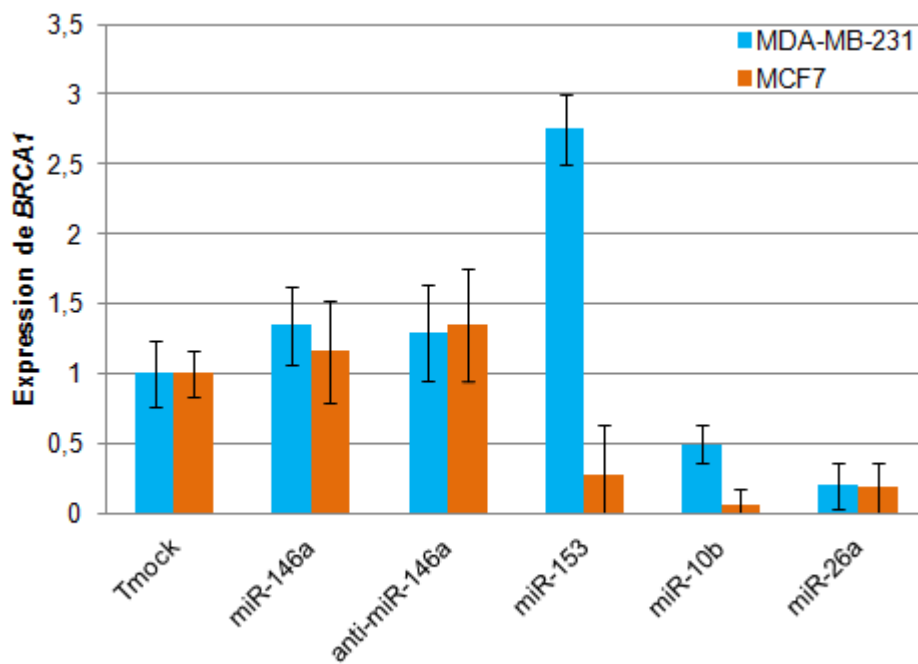


Figure 20. Taux d'expression de *BRCA1* dans les cellules MDA-MB-231 et MCF7 transfectées par les miARNs

IV. L'expression de l'*EGFR* n'est pas régulée par miR-146a dans les cellules MDA-MB-231 et MCF7

Kumaraswamy et al ont rapporté que BRCA1 pourrait induire l'expression de miR-146a qui va réprimer par la suite l'expression d'*EGFR* dans les cellules mammaires (Kumaraswamy et al., 2014). Pour déterminer si miR-146a affecte l'expression endogène de l'*EGFR* dans nos lignées cellulaires, nous avons comparé le niveau d'expression de l'*EGFR* dans les cellules MDA-MB-231 et MCF7 après transfection par miR-146a ou anti-miR-146a, avec un contrôle Tmock (transfection des cellules seulement par le réactif de transfection), et avec siBRCA1 (Figure 21). Ces résultats ont montré que dans nos lignées cellulaires, miR-146a ne régule pas l'expression de l'*EGFR*.

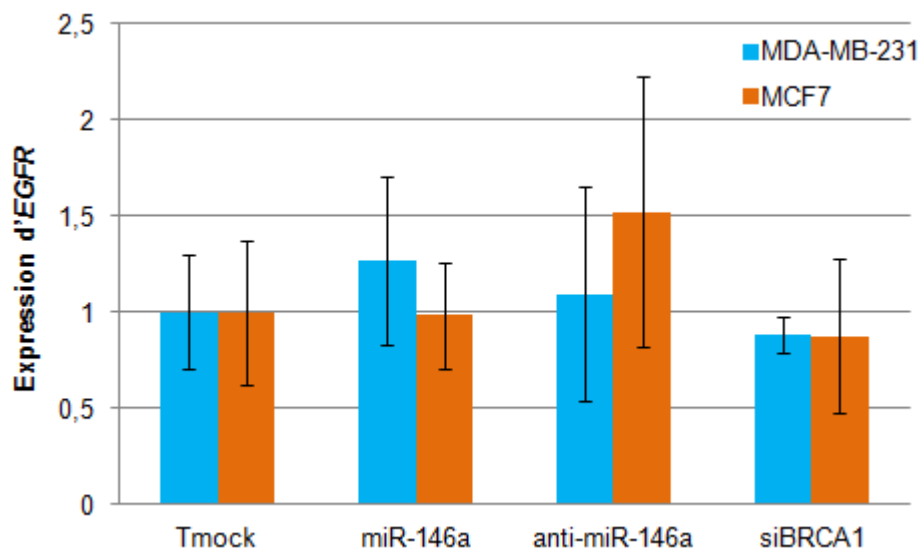


Figure 21. Taux d'expression d'*EGFR* dans les cellules MDA-MB-231 et MCF7 transfectées

V. Stimulation et Inhibition de la prolifération cellulaire par miARNs

Nous avons choisi le test CCK-8 pour déterminer la prolifération cellulaire des lignées MDA-MB-231 et MCF7 suite à une transfection par les miARN choisis (miR-153, miR146a, anti-miR-146a, miR-10b et de miR-26a), siBRCA1, et Tmock (réactif de transfection seulement) (Figure 22).

Dans MDA-MB-231, l'essai de prolifération cellulaire a démontré que miR-26a a stimulé de manière significative la prolifération cellulaire mais miR-146a l'a inhibé.

Dans MCF7, miR-153, miR-10b et miR-26a ont inhibé la prolifération cellulaire de manière significative par rapport aux cellules contrôles transfectées seulement par le réactif de la transfection.

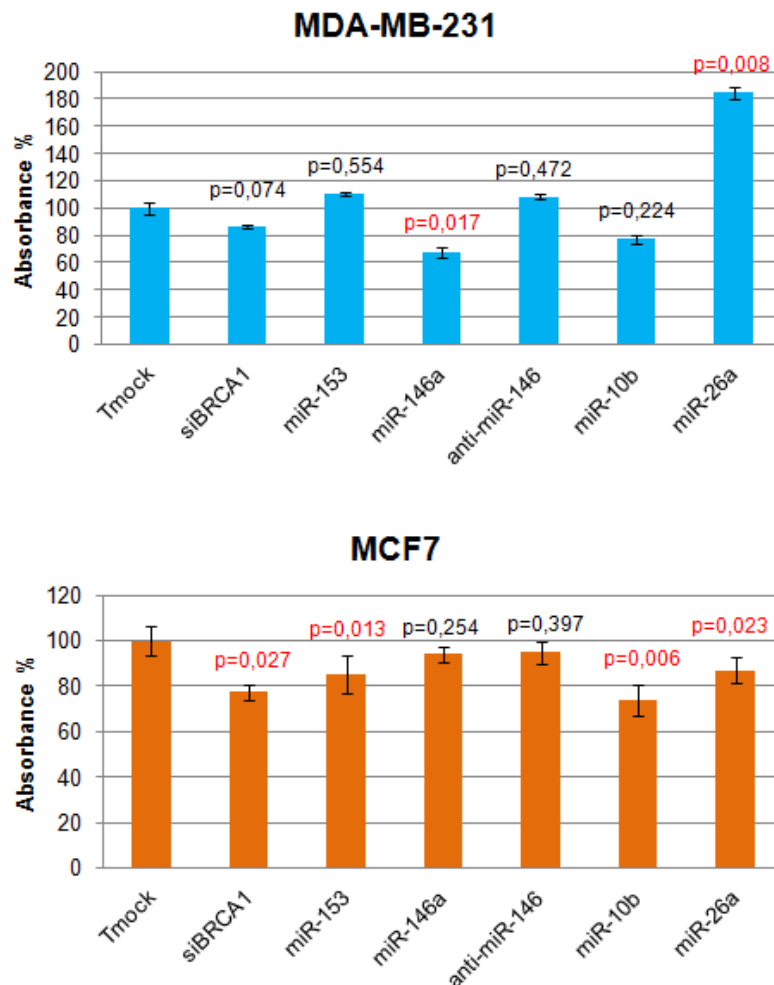


Figure 22. Test de la prolifération cellulaire de MDA-MB-231 et MCF7 transfectées par les miARNs

Partie II- Analyse de l'expression *in silico* de miARNs sélectionnés dans la base de données TCGA

I. L'expression différentielle de miR-10b, miR-26a, miR-146a et miR-153 dans TCGA

Comme le montre la figure 23 l'expression moyenne de miR-153 et miR-10b est nettement plus faible dans les tumeurs triple négatives ($p = 0,00045$ et $p = 0,00038$ respectivement) que dans les tumeurs luminales tandis que miR-146a est surexprimé de manière significative ($p = 0,000005$). Pour miR-26a, la différence d'expression moyenne est non significative ($p = 0,6234$).

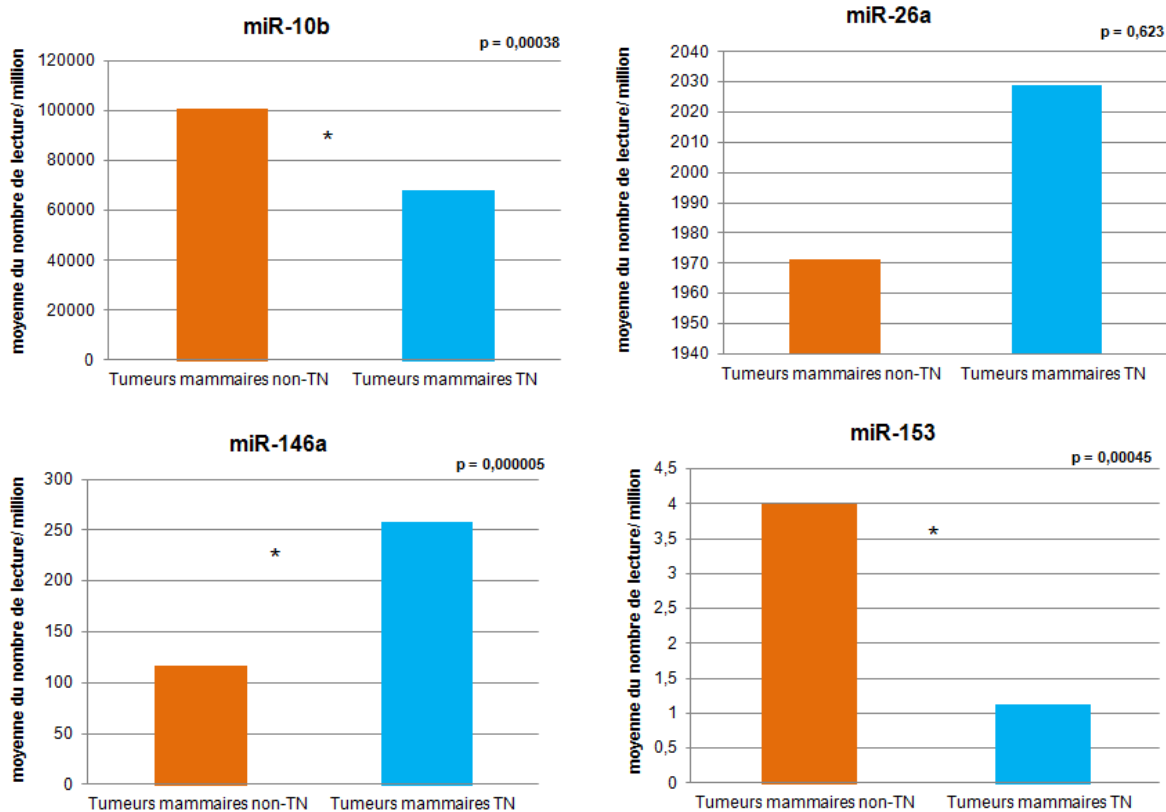


Figure 23. Analyse de l'expression *in silico* de quatre miARNs dans la base de données TCGA.

Conclusions des parties I et II

Partant des résultats du profilage de l'expression des miARNs, quatre miARNs candidats (miR-10b, miR-26a, miR-146a et miR-153) ont été choisis comme étant potentiellement impliqués dans le développement du cancer du sein triple négatif. Des essais d'expression exogènes ont révélé que miR-10b et miR-26a, mais pas miR-146a, peuvent réguler négativement l'expression du gène *BRCA1* dans les cellules cancéreuses triple négatives MDA-MB-231 et luminales MCF7, alors que miR-153 peut réguler négativement l'expression du gène *BRCA1* uniquement dans les cellules MCF7.

Le test CCK-8 a montré que les miARNs pourraient stimuler ou inhiber la prolifération des lignées cellulaires MDA-MB-231 et MCF7.

L'analyse *in silico* des données du Cancer Genome Atlas (TCGA) a confirmé que miR-146a est significativement plus exprimé dans les tumeurs du sein triple négatives par rapport à d'autres tumeurs mammaires (non triple négatives).

Ces résultats fournissent des preuves de l'implication des miARNs spécifiques dans le développement du cancer du sein triple négatif par régulation de l'expression du gène *BRCA1*.

Partie III- Etude *ex vivo* de l'expression de miARN et BRCA1 dans des tissus mammaires en paraffine

I. Données cliniques des patientes atteintes du cancer du sein

Notre étude a porté sur une série de 50 cas de cancer du sein chez des femmes tunisiennes, correspondant à des carcinomes canaux infiltrants pré-sélectionnés pour un profil triple négatif (TN) et quelques cas non triple négatif (non TN). Nous avons retenus 37 échantillons après l'extraction et le contrôle de la qualité de l'ARN pour la suite de notre analyse. Ces 37 cas ont été divisés en deux groupes: 24 patientes atteintes de carcinomes du sein triple négatifs et 13 patientes avec un profil non triple négatif de cancer du sein, comprenant les deux sous-types Luminal A et Luminal B.

Nous avons comparé tout d'abord les deux groupes étudiés en termes de données cliniques y compris l'âge au moment du diagnostic, le grade SBR, la taille tumorale, les métastases ganglionnaires.

Nous avons noté une différence significative dans les données analysées entre les deux groupes TN et non TN pour l'âge au moment du diagnostic, le grade SBR et la taille tumorale et une différence non significative pour les métastases ganglionnaires (Tableau 13). Nous avons observé que les jeunes femmes âgées de 49 ans ou moins au moment du diagnostic représentent 50% des cas de cancer du sein triple négatif et 61,54% chez les non triple négatif, avec une valeur de $p = 1,23 \text{ E-}07$.

Nous avons remarqué également que le grade 3 de SBR porte sur 50 % des patientes atteintes de cancer du sein triple négatif; cependant, il est présent dans seulement 15,38 % des patientes atteintes de cancer du sein non triple négatif avec une valeur de $p = 1,26 \text{ E-}12$.

37,5% des patientes avec un profil triple négatif ont présenté une taille tumorale supérieure à 3 cm versus 30,77% des patientes avec un cancer du sein non triple négatif, $p = 3,07 \text{ E-}07$.

Tableau 13. Comparaison de caractères clinico-pathologiques entre les patientes TN et non TN

		TN		non TN		Test T
		N=24	%	N=13	%	
Age Médiane : 49 ans	Age ≤49	12	50	8	61,54	1,23E-07
	Age > 49	12	50	5	38,46	
SBR	Grade 1	1	4,16	4	30,77	1,26E-12 (grade 1+2 /grade3)
	Grade 2	11	45,83	7	53,85	
	Grade 3	12	50	2	15,38	
Taille Médiane : 3 cm	Taille ≤3	15	62,5	9	69,23	3,07E-07
	Taille > 3	9	37,5	4	30,77	
LNM	1(oui)	13	54,16	8	61,53	0,72
	0 (non)	8	33,33	4	30,77	

SBR (Scarff, Bloom and Richardson) : grade histo-pronostique ; **LNM** (lymph Node Metastasis) : Métastases ganglionnaires.

II. Expression de BRCA1 chez les patientes atteintes du cancer du sein

L'expression de la protéine BRCA1 chez les patientes atteintes de cancer du sein triple négatif et non triple négatif a été évaluée en fonction de la présence ou de l'absence de la protéine BRCA1 dans les tissus mammaires par la technique de l'immuno-histochimie. La coloration positive a été marquée 1 et l'absence de la coloration a été marquée 0. Nous avons trouvé une différence proche de la significativité entre les deux sous groupes avec une valeur de $p = 0,068$. Les protéines BRCA1 étaient absentes dans 62,5 % des cas des patientes TN par rapport à 30,77 % de patientes non TN (Tableau 14).

Tableau 14. Expression de la protéine BRCA1 révélée par immuno-histochimie chez les patientes TN et non TN

Expression de la protéine BRCA1	Triple Négatif (TN)		non Triple Négatif (non TN)	
	N=24	%	N=13	%
Coloration positive	9	37,5	9	69,23
Coloration négative	15	62,5	4	30,77
Test F	0,952			
Test T (Student)	0,068			

III. Analyse du taux d'expression de miR-146a, miR-153, miR-10b et miR-26a dans les tissus mammaires inclus en paraffine

Après l'extraction des ARNs par le kit miRNeasy FFPE kit des 50 échantillons, nous avons retenu 37 échantillons (24 cas de cancer du sein triple négatif (TN) et 13 cas de cancer du sein non triple négatif (non TN)). La détermination du taux d'expression des miARNs dans ces 37 échantillons a été menée par la technique de qRT-PCR. Le nombre d'échantillons étant trop faible et comme le montre la figure 24 nous n'avons pas trouvé de différence significative entre l'expression de miARNs chez les patientes TN et non TN. Une seule valeur de $p = 0,07$ (proche du seuil de significativité, $p < 0,05$) a été trouvée entre l'expression de miR-146a chez les patientes TN et non TN.

Cependant, nous pouvons tout de même observer une tendance (Tableau 15) : nous avons constaté que miR-146 et miR-26a sont surexprimés 3 fois et 1,5 fois respectivement, chez les patientes TN par rapport aux patientes non TN.

Pour miR-153 et miR-10b, les niveaux d'expression se rapprochent entre les deux groupes TN et non TN.

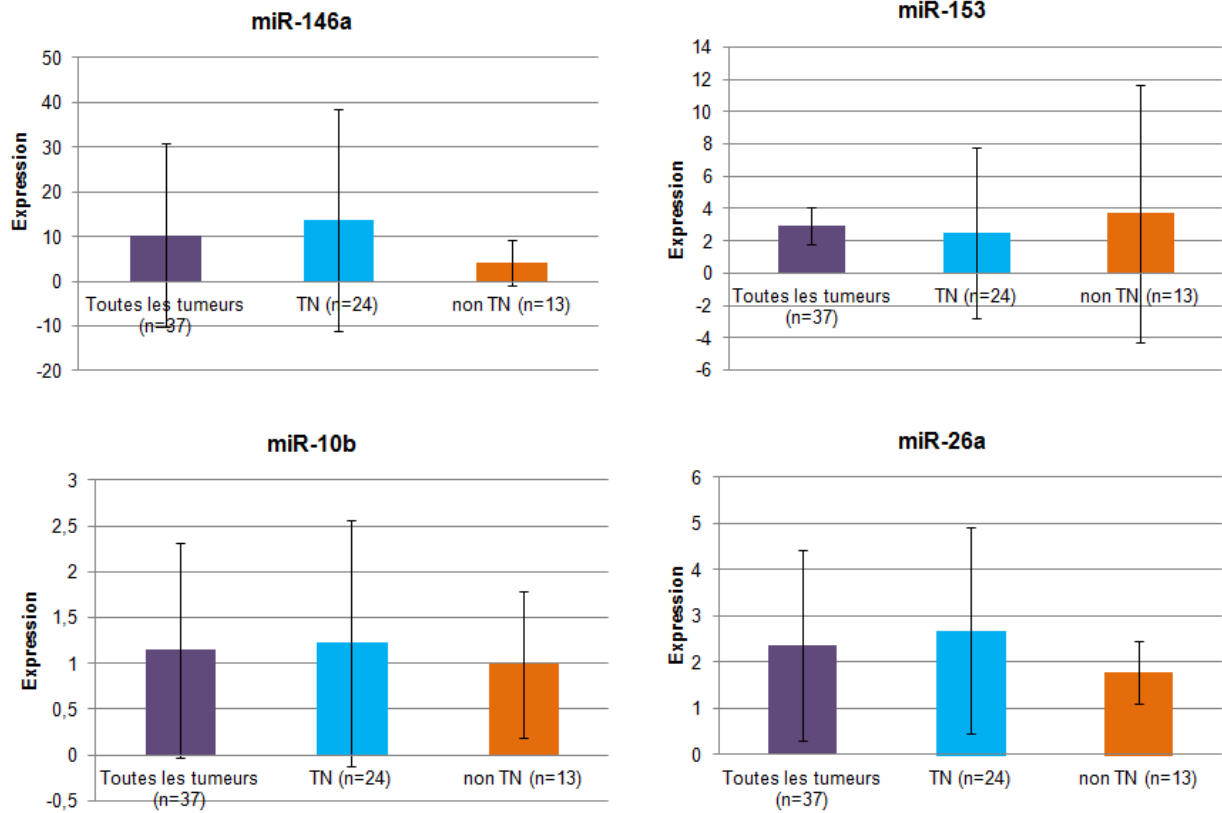


Figure 24. Taux d'expression de 4 miARNs chez des patientes TN et non TN

Tableau 15. Expression de miARNs chez des patientes TN et non TN

Moyenne	Expression			Toutes les tumeurs/TN	Test T	
	Toutes les tumeurs (n=37)	TN (n=24)	non TN (n=13)		Toutes les tumeurs/ nonTN	TN/ non TN
miR-146a	10,36	13,78	4,04	0,55	0,09	0,07
miR-153	2,93	2,51	3,71	0,78	0,72	0,58
miR-10b	1,14	1,22	0,99	0,79	0,66	0,56
miR-26a	2,35	2,67	1,77	0,57	0,36	0,21

IV. Relation entre les données clinico-pathologiques et l'expression de miARNs

Nous avons analysé la relation entre les caractéristiques clinico-pathologiques des patientes et l'expression de miARN dans les tissus mammaires TN et non TN.

Comme le montre la figure 25, nous n'avons pas trouvé d'effet significatif de l'âge, de la taille tumorale et du grade SBR sur l'expression des miARNs (miR-146a, miR-153, miR-10b et miR- 26a) chez les patientes TN et non TN.

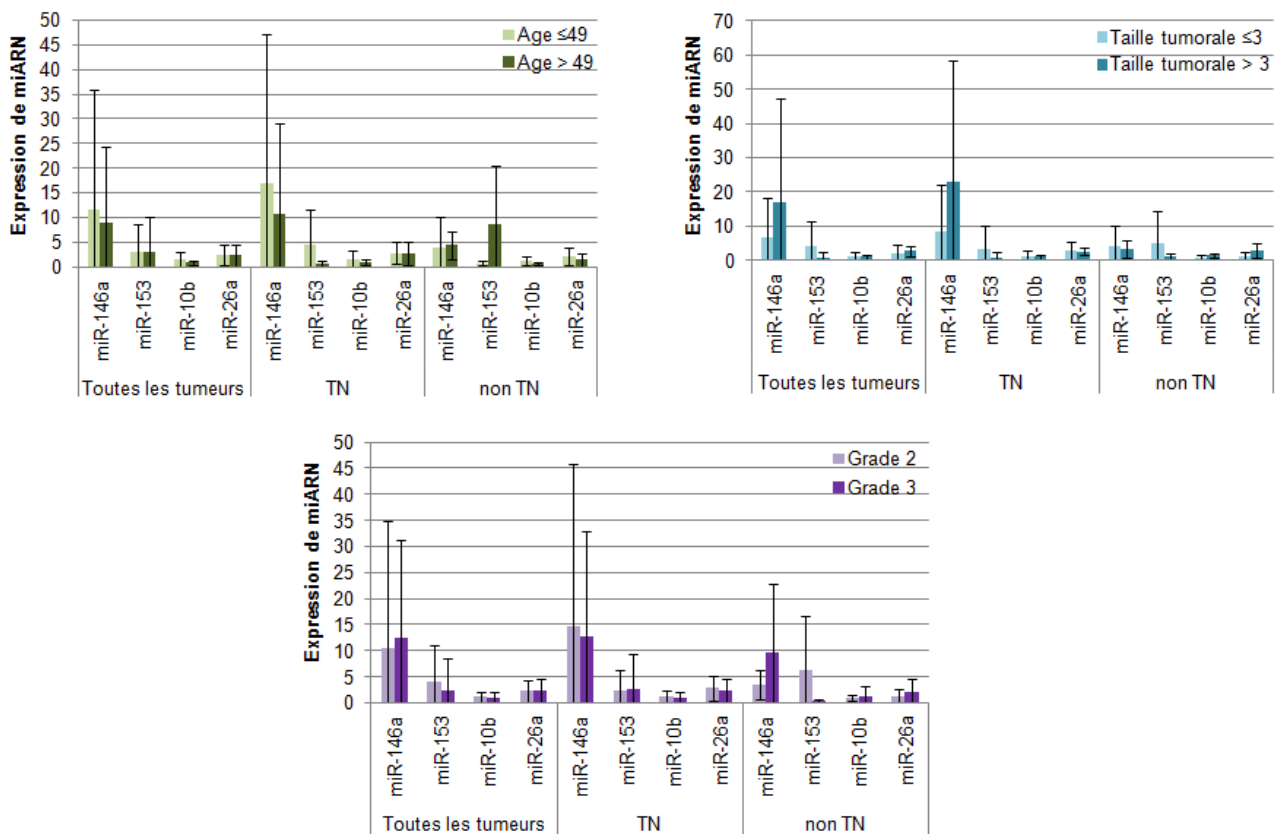


Figure 25. Expression des miARNs dans les TN et les non TN selon l'âge, la taille tumorale et le grade SBR.

Nous avons comparé l'expression de miARN en absence et en présence de métastases ganglionnaires chez les patientes TN et non TN. Seuls les résultats chez les patientes TN pour les deux miARNs : miR-146a et miR-26a ont été considérés, les autres n'étant pas significatifs.

Nous avons constaté que l'expression de miR-146a chez les patientes TN ne présentant pas de métastases ganglionnaires est supérieure à celle chez les patientes TN avec des métastases ganglionnaires. La différence est presque significative avec une valeur de $p = 0,056$ (Figure 26).

L'expression de miR-26a présente une différence significative avec $p = 0,028$ chez les patientes TN en absence de métastases ganglionnaires par rapport à celles en présence de métastases (Figure 27).

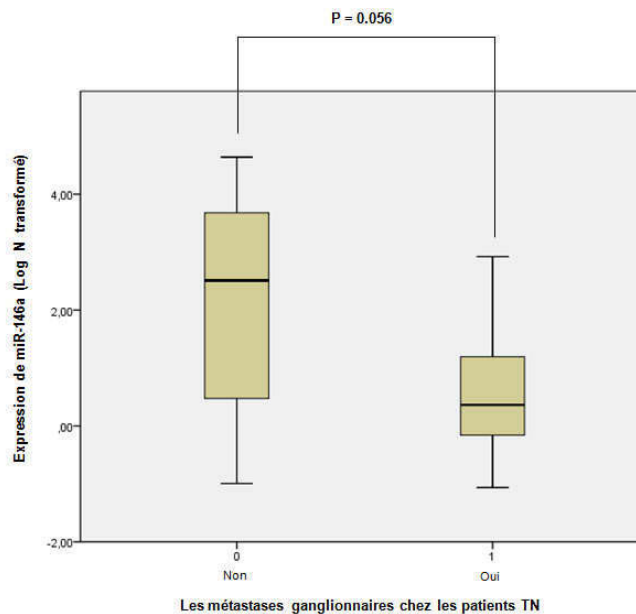


Figure 26. Expression de miR-146a selon la présence ou non de métastase ganglionnaire chez les patientes TN

Le test de Student a été calculé en tenant compte de la méthode des échantillons indépendant avec l'égalité des variances. $p < 0,05$ est considéré comme significatif.

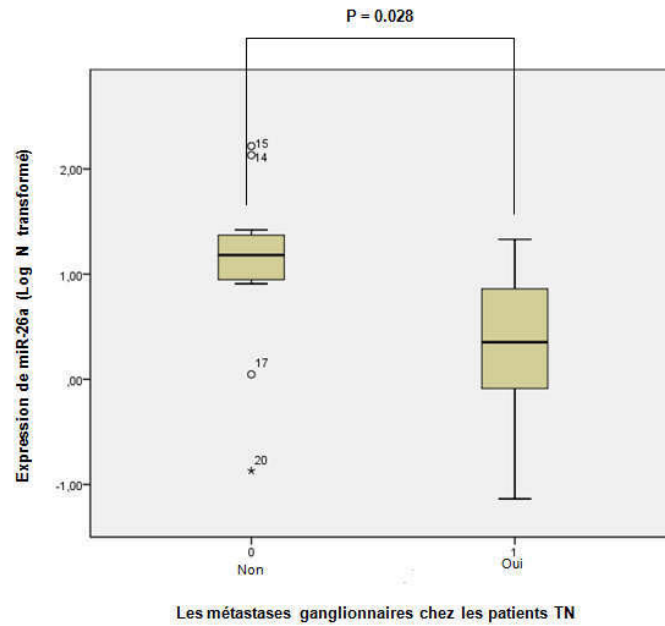


Figure 27. Expression de miR-26a selon la présence ou non de métastase ganglionnaire chez les patients TN

Le test de Student a été calculé en tenant compte de la méthode des échantillons indépendant avec l'égalité des variances. $p < 0,05$ est considéré comme significatif.

V. Pas de relation entre l'expression de miARNs et l'expression de BRCA1

Nous n'avons pas trouvé de différence significative entre l'expression de miARNs (Log N transformé) selon l'expression positive (1) ou négative (0) de BRCA1 chez toutes les patientes, les TN et les non TN comme le montre le tableau 16 ci-dessous.

Tableau 16. Expression de miARNs selon le statut de la protéine BRCA1

Log N transformé	BRCA1	N	Moyenne	Ecart-type	Test T		
Toutes les tumeurs	miR-146a	0	19	0,960	1,589	0,641	
		1	18	1,204	1,568		
	miR-153	0	19	-0,378	2,013	0,975	
		1	18	-0,397	1,559		
	miR-10b	0	19	-0,501	1,051	0,547	
		1	18	-0,269	1,258		
	miR-26a	0	19	0,502	0,861	0,846	
		1	18	0,439	1,070		
	TN	miR-146a	0	15	1,023	1,683	0,365
			1	9	1,685	1,725	
		miR-153	0	15	-0,608	2,209	0,805
			1	9	-0,812	1,363	
miR-10b		0	15	-0,582	1,137	0,337	
		1	9	-0,072	1,383		
miR-26a		0	15	0,518	0,895	0,34	
		1	9	0,879	0,842		
non TN		miR-146a	0	4	3,267	2,470	0,734
			1	9	4,378	6,042	
		miR-153	0	4	1,763	0,750	0,578
			1	9	4,585	9,598	
	miR-10b	0	4	0,960	0,560	0,931	
		1	9	1,004	0,907		
	miR-26a	0	4	1,979	1,451	0,785	
		1	9	1,689	1,813		

VI. Corrélation entre l'expression de miARNs analysés chez les patientes TN et non TN

Nous avons évalué la corrélation entre l'expression de miARN dans le cancer du sein triple négatif et non triple négatif en utilisant la méthode Rho de Spearman pour mieux comprendre leurs interactions (Tableaux 17 et 18).

Dans les tissus mammaires triple négatifs, nous avons trouvé des corrélations significatives entre 2 groupes de miARNs.

Le premier groupe est constitué des miR-146a, miR-10b et miR-26a. La corrélation la plus élevée est trouvée entre miR-10b et miR-26a (Rho de Spearman : 0,805, $p < 0,01$), ensuite la corrélation entre miR-146a et miR-26a (Rho de Spearman : 0,668, $p < 0,01$) puis entre miR-146a et miR-10b (Rho de Spearman : 0,462, $p < 0,05$).

Le deuxième groupe contient les 2 miARNs : miR-153 et miR-10b (Rho de Spearman : 0,523, $p < 0,01$).

Dans les tissus mammaires non triple négatifs, nous avons noté une corrélation significative ($p < 0,05$) entre miR-146a, miR-10b et miR-26a (Rho de Spearman : 0,654 ; 0,610 ; 0,615).

Tableau 17. Corrélation entre les miARNs analysés chez les patientes TN

		Corrélation				
Triple Négatif		miR-146	miR-153	miR-10b	miR-26a	
Rho de Spearman	miR-146a	Coefficient de corrélation	1,000	0,110	0,462*	0,668**
		Sig. (bilatérale)		0,610	0,023	0,000
		N	24	24	24	24
	miR-153	Coefficient de corrélation	0,110	1,000	0,523**	0,306
		Sig. (bilatérale)	0,610		0,009	0,146
		N	24	24	24	24
	miR-10b	Coefficient de corrélation	0,462*	0,523**	1,000	0,805**
		Sig. (bilatérale)	0,023	0,009		0,000
		N	24	24	24	24
	miR-26a	Coefficient de corrélation	0,668**	0,306	0,805**	1,000
		Sig. (bilatérale)	0,000	0,146	0,000	
		N	24	24	24	24

*. La corrélation est significative au niveau 0,05 (bilatéral).

**. La corrélation est significative au niveau 0,01 (bilatéral).

Tableau 18. Corrélation entre les miARNs analysés chez les patientes non TN

non Triple Négatif		Corrélation				
		miR-146	miR-153	miR-10b	miR-26a	
Rho de Spearman	miR-146a	Coefficient de corrélation	1,000	-0,011	0,654*	0,610*
		Sig. (bilatérale)		0,972	0,015	0,027
		N	13	13	13	13
	miR-153	Coefficient de corrélation	-0,011	1,000	-0,401	-0,445
		Sig. (bilatérale)	0,972		0,174	0,128
		N	13	13	13	13
	miR-10b	Coefficient de corrélation	0,654*	-0,401	1,000	0,615*
		Sig. (bilatérale)	0,015	0,174		0,025
		N	13	13	13	13
	miR-26a	Coefficient de corrélation	0,610*	-0,445	0,615*	1,000
		Sig. (bilatérale)	0,027	0,128	0,025	
		N	13	13	13	13

*. La corrélation est significative au niveau 0,05 (bilatéral).

VII. Les miARNs analysés et les voies de signalisation impliquées dans le cancer du sein triple négatif

Afin de déterminer les voies de signalisation et les gènes cibles des miARNs analysés, nous avons eu recours à la base de données DIANA-TarBase v.7 qui peut être consultée en ligne à <http://www.microrna.gr/tarbase>. En entrant les miARNs en question avec leurs nomenclatures exactes, cette base de données nous a permis de révéler les différentes voies de signalisation qui impliqueraient nos miARNs ainsi que les gènes cibles pour chaque miARN.

Comme le montre la figure 28, différentes voies de signalisation sont en commun entre les 4 miARNs analysés. L'intensité de couleur sur ce « heatmap » indique quel miARN est plus impliqué dans la voie de signalisation correspondante en tenant compte de la significativité de l'interaction entre le miARN en question et les gènes cibles impliqués dans cette voie.

Dans le tableau 19 nous avons sélectionné les différentes voies de signalisation qui pourraient être impliquées dans le cancer du sein triple négatif en se basant aussi sur la littérature :

- Dérèglement de la transcription dans le cancer (hsa05202)
- Voies dans le cancer (hsa05200)
- Voie de signalisation PI3K-Akt (hsa04151)
- Apoptose (hsa04210)
- Voie de signalisation NF-kappa B (hsa04064)
- Voie de signalisation TGF-beta (hsa04350)
- Voie de signalisation de p53 (hsa04115)

Pour chaque voie de signalisation, nous avons déterminé les miARNs qui sont les plus impliqués et leurs gènes cibles correspondants.

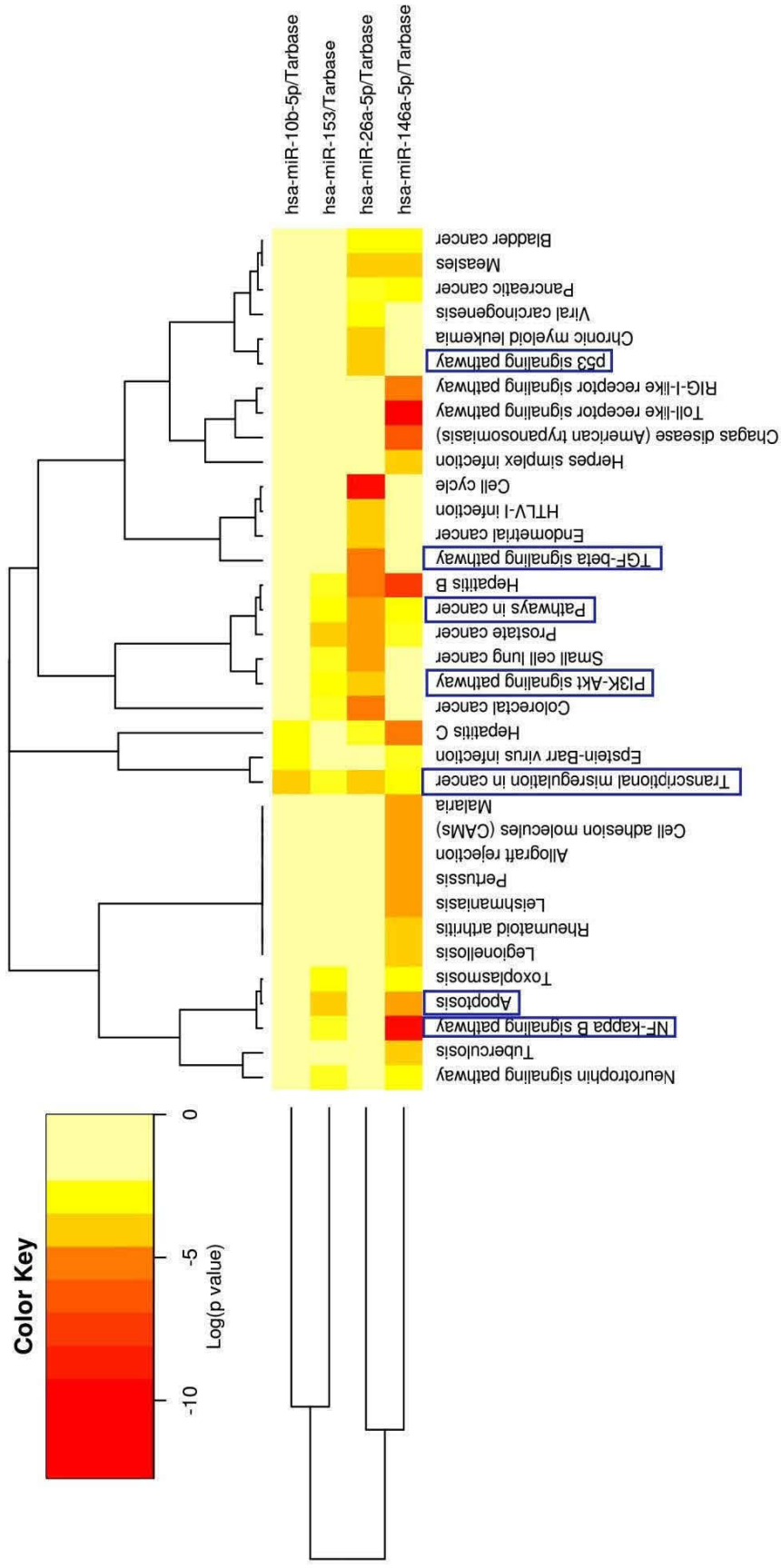


Figure 28. Heatmap des différentes voies de signalisation et pathologies entre les 4 miARNs (DIANA-TarBase v.7)

Tableau 19. Les différentes voies de signalisation et les gènes cibles pour les 4 miARNs (DIANA-TarBase v.7)

DIANA-TarBase v.7	Voies de signalisation impliquées dans le cancer du sein triple négatif																								
	Dérèglement de la transcription dans le cancer (hsa05202)			Voies dans le cancer (hsa05200)			Voie de signalisation PI3K-Akt (hsa04151)			Apoptose (hsa04210)			Voie de signalisation NF-kappa B (hsa04064)			Voie de signalisation TGF-beta (hsa04350)			voie de signalisation de p53 (hsa04115)						
miARN	Gène	id Ensembl	Gène	id Ensembl	Gène	id Ensembl	Gène	id Ensembl	Gène	id Ensembl	Gène	id Ensembl	Gène	id Ensembl	Gène	id Ensembl	Gène	id Ensembl	Gène	id Ensembl	Gène	id Ensembl			
hsa-miR-146a-5p	NFKB1	ENSG00000109320	NFKB1	ENSG00000109320	BRCA1	ENSG00000120448	NFKB1	ENSG00000109320	NFKB1	ENSG00000109320	NFKB1	ENSG00000109320	NFKB1	ENSG00000109320											
	CXCL8	ENSG00000169429	CXCL8	ENSG00000169429			FADD	ENSG00000168040	FADD	ENSG00000168040	CXCL8	ENSG00000168040	CXCL8	ENSG00000169429											
	LMO2	ENSG00000135363	BRCA2	ENSG00000139618	BRCA2	ENSG00000139618	FAS	ENSG000002026103	FAS	ENSG000002026103	CD40LG	ENSG00000102245	CD40LG	ENSG00000102245											
	CD86	ENSG00000114013	EGFR	ENSG00000146648			IRAK2	ENSG00000134070	IRAK2	ENSG00000134070	TRAF6	ENSG00000175104	TRAF6	ENSG00000175104											
	BCL2A1	ENSG00000140379	FADD	ENSG00000168040	FADD	ENSG00000168040	IRAK1	ENSG00000184216	IRAK1	ENSG00000184216	BCL2A1	ENSG00000140379	BCL2A1	ENSG00000140379											
	CDKN1A	ENSG00000124762	TRAF6	ENSG00000175104			IRAK1	ENSG00000184216	IRAK1	ENSG00000184216	IRAK1	ENSG00000184216	IRAK1	ENSG00000184216											
hsa-miR-26a-5p	KIT	ENSG00000157404																							
	FAS	ENSG000002026103																							
	CDKN1A	ENSG00000124762																							
	HMGA2	ENSG00000149948	GSK3B	ENSG00000082701	GSK3B	ENSG00000082701													SMAD4	ENSG00000141646	SMAD4	ENSG00000141646	CCND2	ENSG00000118971	
	CCND2	ENSG00000118971	SMAD4	ENSG00000141646	CCND2	ENSG00000118971																	CCNE2	ENSG00000175305	
	MYC	ENSG00000136997	CCNE2	ENSG00000175305	IFNB1	ENSG00000171855	IFNB1	ENSG00000171855															MYC	ENSG00000136997	PTEN
SMAD1	ENSG00000170365	MYC	ENSG00000136997	CCNE2	ENSG00000175305	CCNE2	ENSG00000175305															SMAD1	ENSG00000170365		
hsa-miR-153			RB1	ENSG00000139687	MYC	ENSG00000136997	MYC	ENSG00000136997																	
			PTEN	ENSG00000171862	PTEN	ENSG00000171862																			
	FOXO1	ENSG00000150907	BCL2	ENSG00000171791	MCL1	ENSG00000143384	BCL2	ENSG00000171791	BCL2	ENSG00000171791	BCL2	ENSG00000171791	BCL2	ENSG00000171791											
			FOXO1	ENSG00000150907	BCL2	ENSG00000171791																			
hsa-miR-10b-5p	NR4A3	ENSG00000119508																							

Conclusions de la partie III

D'après notre étude, les données clinico-pathologiques des patientes atteintes du cancer du sein triple négatif confirment celles reportées par la littérature. Ce type de cancer survient souvent chez les femmes jeunes < 50 ans, avec un grade histologique élevé (grade 3) et une augmentation de la taille tumorale.

L'immuno-histochimie a révélée que l'expression de la protéine BRCA1 était absente dans 62.5 % des cas des patientes TN par rapport à 30.77 % de patientes non TN.

Les miR-146 et miR-26a sont surexprimé chez les patientes TN par rapport aux patientes non TN.

Nous avons constaté que l'expression de miR-146a et miR-26a chez les patientes TN ne présentant pas de métastases ganglionnaires était supérieure à celle chez les patientes TN avec des métastases ganglionnaires.

Le test de Student (test T) a montré une différence non significative entre l'expression de miARNs et l'expression de BRCA1.

Dans les tissus mammaires triple négatifs, nous avons trouvé des corrélations significatives entre l'expression des miARNs : d'une part entre miR-146a, miR-10b et miR-26a et d'autre part entre miR-153 et miR-10b.

Dans les tissus mammaires non triple négatifs, nous avons noté des corrélations significatives entre l'expression de miR-146a, miR-10b et miR-26a.

Différentes voies de signalisation seraient communs aux 4 miARNs analysés et pourraient être impliquées dans le cancer du sein triple négatif.

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Le cancer du sein est une maladie hétérogène sur le plan clinique, morphologique et moléculaire. Les cancers du sein triple négatifs, représentant ~ 10 à 15% de tous les cancers du sein humains, ont acquis un intérêt croissant au cours des dernières années afin d'améliorer la prise en charge des patients atteints par ce type de cancer extrêmement agressif (Arnedos et al 2012). En outre, le rôle des microARNs (miARNs) dans la régulation épigénétique de nombreux processus cellulaires est de plus en plus reconnu comme un moyen important pour affiner l'expression des gènes (Liu, 2012).

Notre travail de thèse, comportant trois études *in vitro*, *in silico* et *ex vivo*, nous a permis de d'identifier 4 miARNs comme de biomarqueurs potentiels dans le cancer du sein triple négatif à savoir, miR-10b, miR-26a, miR-146a et miR-153.

I. Les miARNs comme biomarqueurs potentiels dans le cancer du sein triple négatif

Notre travail est en faveur l'implication de miARN spécifiques dans le développement du cancer du sein triple négatif. Ceci pourrait se faire entre autre à travers la régulation de l'expression du gène *BRCA1*.

1. miR-10b

Nous avons trouvé que miR-10b était plus exprimé dans les lignées cellulaires de cancer du sein triple négatif par rapport à des lignées cellulaires de cancer du sein luminal. Néanmoins, la base de données TCGA, a indiqué que l'expression moyenne de miR-10b était significativement plus faible dans les tumeurs triple négatives que dans les tumeurs non triple négatives. O'Day et Lal ont rapporté que miR-10b était surexprimé uniquement dans les cellules cancéreuses métastatiques, et qu'il favoriserait la migration des cellules tumorales, l'invasion cellulaire et la métastase *in vivo* (O'Day et Lal, 2010). Bien que miR-10b était soit trouvé fortement exprimé dans plusieurs cancers humains (Han et al., 2014), Biagioni et ses collègues ont toutefois constaté que miR-10b était sous-exprimé dans les tissus

tumoraux comparé à leurs homologues normaux et ceci en raison de l'hyperméthylation des îlots CpG en amont du locus miR-10b / 10b * (Biagioni et al., 2012). Notre étude ex vivo à partir de tissus humains tumoraux en paraffine a montré que le niveau d'expression de miR-10b était comparable entre les deux groupes triple négatif et non triple négatif et qu'il n'y avait pas de corrélation significative entre l'expression de miR-10b et l'expression de la protéine BRCA1. L'immuno-histochimie a révélé que l'expression de la protéine BRCA1 était absente dans 62.5 % des cas de tumeurs triple négatives et chez 30.77 % des tumeurs non triple négatives. Par contre, nous avons constaté que miR-10b peut réguler négativement l'expression du gène BRCA1 dans les cellules MDA-MB-231 et MCF7.

Récemment, il a été signalé que miR-10b peut également jouer un rôle critique dans la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) induite par le TGF dans le cancer du sein et, qu'à ce titre, il pourrait constituer une cible thérapeutique possible (Liao et al., 2014). En outre, miR-10b a été montré d'être capable de promouvoir l'invasion et la métastase des cellules tumorales par régulation post-transcriptionnelle de HOXD10 (Gabriely et al., 2011). Tous ces résultats indiquent que miR-10b pourrait agir comme un miARN oncogène dans les cellules cancéreuses du sein. Cependant, Biagioni et ses collaborateurs ont rapporté que l'expression exogène de miR-10b réduit à la fois in vitro et in vivo les capacités prolifératives des cellules MCF7 et MDA-MB-468 (Biagioni et al., 2012). Nos résultats sont en accord avec ceux de Biagioni et al. En effet, nous avons trouvé que miR-10b inhibait significativement inhibé la prolifération des cellules MCF7 ($p = 0,006$). Ainsi, la restauration de l'expression de miR-10b pourrait constituer une cible thérapeutique pour le traitement du cancer du sein.

Ces résultats, à priori contradictoire, pourrait s'expliquer par le fait que miR-10b pourrait agir tantôt comme un suppresseur de tumeur dans un contexte cellulaire et comme un oncogène dans un autre. L'expression de miR-10b pourrait être spécifique d'un tissu donné et aussi du stade d'évolution de la maladie. Ainsi, la distribution tissu spécifique de miR-10b et son implication probable dans les processus liés à la cancérogenèse pourrait en faire un biomarqueur voire une cible thérapeutique prometteuse.

2. miR-26a

Un autre biomarqueur potentiel du cancer du sein triple négatif que nous avons identifié est le miR-26a. Nos résultats montrent que miR-26a régulait négativement l'expression du gène BRCA1 dans les cellules MDA-MB-231 et MCF7. Ce résultat suggère une fonction oncogénique pour miR-26a dans le cancer du sein. En revanche, Gao et al. ont rapporté que miR-26a peut inhiber la prolifération et la migration des cellules de cancer du sein par la répression de MCL-1 et que miR-26a pourrait augmenter la sensibilité des cellules de cancer du sein au paclitaxel (Gao et al., 2013). D'autres travaux réalisés sur des cellules de l'ovaire ont trouvé que miR-26a peut favoriser la prolifération en ciblant ER α (Shen et al., 2014). Dans le même sens, nous avons trouvé que miR-26a stimulait de manière significative la prolifération des cellules MDA-MB- 231 et inhibait la prolifération des cellules MCF7. En utilisant la base de données TCGA, nous avons également constaté que l'expression moyenne de miR-26a n'a pas été significativement différente entre les tumeurs du sein triple négatif et non triple négatif. Par contre, notre étude sur les tissus humains tumoraux en paraffine montre que miR-26a est exprimé 1,5 fois plus chez les tumeurs triple négatives par rapport aux tumeurs non triple négatives et que l'expression de miR-26a chez les patientes avec un profil de cancer du sein triple négatif ne présentant pas des métastases ganglionnaires est supérieure à celle chez les patientes avec des métastases ganglionnaires (avec $p = 0,028$).

Il a été rapporté récemment dans une étude en 2015 que le niveau d'expression de miR-26a est associé à la formation de métastase ganglionnaire et à la survie globale chez les triple négatifs et que l'expression ectopique de miR-26a inhiberait la prolifération cellulaire chez le cancer du sein triple négatif et la formation de métastase *in vitro* et *in vivo* par la régulation négative de l'ARNm du gène MTDH. Cette étude suggère que miR-26a fonctionnerait comme un suppresseur de tumeur dans le développement de cancer du sein triple négatif (Liu et al., 2015).

Le rôle de miR-26a apparaît donc complexe et pourrait dépendre du tissu et / ou du contexte de la tumeur.

3. miR-146a

Notre étude sur les lignées cellulaires, nos analyses des données TCGA comme notre étude *ex vivo* sur des tissus humains tumoraux en paraffine montraient que miR-146a est significativement surexprimé dans les cancers du sein triple négatif. Des résultats similaires ont été rapportés par d'autres équipes (Garcia et al., 2011 ; Kumaraswamy et al., 2014). L'étude *ex vivo* a révélé aussi que l'expression de miR-146a chez les patientes avec un profil de cancer du sein triple négatif ne présentant pas de métastases ganglionnaires est supérieure à celle chez les patientes avec des métastases ganglionnaires. Nos résultats sont en accord avec ceux trouvés par Stuckrath et ses collaborateurs en 2015 (Stuckrath et al., 2015).

Nous avons également constaté que miR-146a ne modifie pas l'expression du gène *BRCA1* dans les cellules MDA-MB-231 et MCF7. En revanche, Gracia et al. ont rapporté que miR-146a pourrait réguler négativement l'expression du gène *BRCA1* dans les cancers du sein sporadiques triple négatif (Gracia et al., 2011). Cette différence pourrait être due aux différentes lignées cellulaires utilisées pour les essais d'expression exogènes.

En effet, Gracia et al. ont utilisé des lignées cellulaires, différentes de celle que nous avons utilisé, à savoir HeLa et trois lignées de cellules mammaires (MDA-MB-468, MDA-MB-157 et MDA-MB-436).

Une autre étude a rapporté que miR-146a pourrait inhiber l'invasion et la migration de la lignée cellulaire de cancer du sein humain hautement métastatique MDA-MB-231 (Bhaumik et al., 2008). Ces données confirment nos résultats, à savoir que miR-146a pourrait inhiber la prolifération des cellules MDA-MB-231. Dans une étude récente sur les cellules cancéreuses du sein (HCC1937), Kumaraswamy et al ont émis l'hypothèse que BRCA1 pourrait réguler négativement l'expression du gène de l'EGFR en augmentant le niveau d'expression de miR-146a (Kumaraswamy et al., 2014). Nos résultats sont compatibles avec cette hypothèse, nous avons trouvé que miR-146a était surexprimé dans les cellules SUM1315-BRCA1 dont *BRCA1* est de type sauvage par rapport aux cellules SUM1315-LXSN dont *BRCA1* est muté. Nous avons également constaté que l'expression exogène de miR-146a diminuait la prolifération des cellules MDA-MB-231 qui expriment l'EGFR, mais pas dans les cellules MCF7 qui n'expriment pas l'EGFR. Toutefois, l'évaluation de l'expression de l'*EGFR* par q-RT-PCR dans les cellules MDA-MB-231 et MCF7 exprimant de façon exogène miR-146a a révélé que l'expression du gène *EGFR* n'était pas significativement réguler par miR-146a dans nos conditions.

Tous ces résultats montrent que le rôle de miR-146a est complexe, et que notamment l'interaction miR-146a et BRCA1 reste à préciser et qu'elle dépendrait probablement du type et du contexte cellulaire.

4. miR-153

Grâce aux outils bioinformatiques, nous avons identifié un site de liaison pour miR-153 à l'extrémité 3'UTR du gène *BRCA1*.

Par la suite, nous avons trouvé que miR-153 pourrait induire une régulation négative de *BRCAl* dans les cellules MCF7 et une up-régulation dans les cellules MDA-MB-231. Ces effets contradictoires sont également rapportés dans la littérature. D'une part, Anaya-Ruiz et al. ont rapporté que l'inhibition de l'expression de miR-153 engendrait un arrêt de la croissance, une réduction de la prolifération et une induction de l'apoptose dans la lignée cellulaire de cancer du sein sporadique triple négatif MDA-MB-231. Ces résultats indiqueraient que miR-153 pourrait fonctionner comme un miARN oncogénique, dont la dérégulation pourrait être impliquée dans l'initiation et / ou le développement de cancer du sein (Anaya-Ruiz et al., 2013). Dans une autre étude, Wu et al. ont suggéré que miR-153 pourrait jouer un rôle important dans la promotion de la prolifération des cellules cancéreuses humaines de la prostate. Ceci se ferait à travers l'inactivation de PTEN dans des cellules cancéreuses de la prostate (Wu et al., 2013). Ces données sont compatibles avec nos résultats où la surexpression de *BRCAl* par miR-153 n'a eu aucun effet sur la prolifération des cellules MDA-MB-231.

D'autre part, Zhao et al. ont constaté que la transfection transitoire de miR-153 dans les cellules souches de glioblastome (GBM-SC) pourrait inhiber leurs propriétés de caractère souche, réprimer leur potentiel de croissance et induire l'apoptose (Zhao et al., 2013). Ces dernières données sont conformes à nos résultats dans les cellules MCF7: une inhibition de la prolifération bien que *BRCAl* ait été régulée négativement par miR-153. Cette différence dans la réponse observée entre MDA-MB-231 et les cellules MCF7 pourrait être expliquée par les différences dans le niveau d'expression endogène de miR-153, à savoir, plus élevé dans les cellules MCF7 luminales et plus faible dans les cellules triple négatives MDA-MB-231. L'analyse des données TCGA montre également que la moyenne de l'expression de miR-153 est nettement plus faible dans les cancers du sein triple négatif. Notre étude *ex vivo* sur des tissus humains tumoraux en paraffine n'a pas révélé de différence significative de l'expression de miR-153 entre les deux groupes triple négatif et non triple négatif.

Ainsi, la fonction de miR-153 apparaîtrait complexe. Une éventuelle identification des cibles de miR-153 serait un moyen intéressant pour mieux comprendre son rôle dans la prolifération cellulaire et les processus liés à la cancérogenèse.

Concernant les 3 approches (*in vitro*, *in silico* et *ex vivo*) suivies lors de nos travaux, approches qui semblent à priori sur certains aspects contradictoires, sont complémentaires. Chaque approche possède ses avantages et ses inconvénients. En effet, la base de données TCGA inclut plusieurs types de données telles que l'expression de gène, l'expression de miARN, la méthylation de l'ADN et les sous types de mutations. Cette base présente quelques limites concernant le profilage de miARN plus particulièrement dans le cancer du sein triple négatif à savoir l'hétérogénéité du profil triple négatif comprenant le type basal-like et le non basal-like. En outre, dans cette base TCGA, différentes techniques étaient utilisées pour l'extraction de l'ARN ou de miARN et l'analyse de données.

Dans le même sens, notre approche *ex vivo* présentait l'hétérogénéité dans les tissus mammaires triple négatifs inclus en paraffine. En effet, la proportion de cellules malignes dans les coupes histologiques dépasse 50%.

II. Gènes cibles des miARNs « biomarqueurs » et voies de signalisations impliquées dans le cancer du sein triple négatif

L'identification des gènes cibles des miARNs et des voies de signalisations impliquées dans le cancer du sein triple négatif pourraient augmenter le potentiel de miARNs en tant que de biomarqueurs.

D'après notre étude *ex vivo*, il est vrai sur un échantillon relativement réduit, nous avons trouvé des corrélations significatives entre l'expression des miARNs dans les tissus mammaires triple négatifs: d'une part entre miR- 146a, miR-10b et miR-26a et d'autre part entre miR-153 et miR-10b.

Grâce à la base de données DIANA-TarBase v.7, nous avons pu déceler les gènes qui seraient la cible de ces miARNs ainsi que les différentes voies de signalisation qui seraient communes à ces 4 miARNs.

Parmi les voies de signalisation, nous avons trouvé la voie de signalisation PI3K-Akt. Trois miARNs seraient impliqués dans cette voie : miR-146a-5p ciblant le gène *BRCA1*, miR-26a-5p ciblant les gènes (*GSK3B*, *CCND2*, *IFNB1*, *CCNE2*, *MYC* et *PTEN*) et miR-153 ciblant les gènes *MCL1*, *BCL2*.

L'activation de la voie PI3K-AKT par des mutations de *PIK3CA* et l'inhibition de *PTEN* sont des caractéristiques moléculaires déjà décrits dans le cancer du sein triple négatif (Gonçalves et al., 2013).

Une autre voie qui serait impliquée est la voie de signalisation (NF)- κ B. Elle impliquerait deux miARNs : miR-146a-5p ciblant un ensemble des gènes (*NFKB1*, *CXCL8*, *CD40LG*, *TRAF6*, *BCL2A1*, *IRAK1*) et miR-153 ciblant le gène *BCL2*.

La voie de signalisation (NF)- κ B apparait comme un régulateur important dans le cancer du sein triple négatif, et serait impliquée aussi dans de nombreux autres cancers. Elle serait responsable du contrôle de l'angiogénèse, de l'apoptose et du cycle cellulaire ainsi que d'autres processus cellulaires (Gyparaki et al., 2014).

Les 4 miARNs seraient également impliqués dans une voie de dérèglement de la transcription qui pourrait contribuer au cancer du sein triple négatif.

Dans cette voie miR-10b-5p ciblerait le gène *NR4A3*. Ce gène est connu pour son rôle central dans la régulation de la prolifération cellulaire, la différenciation, le métabolisme et l'apoptose.

D'après le tableau 19 (dans le chapitre Résultats), nous avons noté qu'un même miARN pourrait être impliqué dans plusieurs voies de signalisation. Par exemple le miR- 26a, ciblant le gène *PTEN*, est impliqué dans 3 voies : voies dans le cancer (hsa05200), voie de signalisation PI3K-Akt (hsa04151) et la voie de signalisation de p53 (hsa04115). Le miR-153 en ciblant le gène *BCL2*, il est impliqué dans 4 voies : Voies dans le cancer (hsa05200), voie de signalisation PI3K-Akt (hsa04151), Apoptose (hsa04210) et la voie de signalisation NF-kappa B (hsa04064). Le miR-146a est impliqué aussi dans 4 voies en ciblant le gène *NFKB1* : Dérèglement de la transcription dans le cancer (hsa05202), voies dans le cancer (hsa05200), Apoptose (hsa04210) et la voie de signalisation NF-kappa B (hsa04064).

Ainsi, l'étude de l'effet de miARNs sur l'expression de ces gènes cibles (ARNm) par qPCR, Western blot et l'étude de l'impact sur les processus biologiques liés à la cancérogenèse serait une piste intéressante pour mieux comprendre le rôle de ces miARNs. En outre, nous pourrions étudier aussi l'effet de ces miARNs au niveau protéique dans des lignées cellulaires de cancers du sein mammaires par une méthode plus performante, la méthode SILAC (Stable isotope labelling with amino acids in cell culture) (Baek et al., 2008).

Plusieurs autres études *in vivo*, visant à poursuivre notre travail, pourraient évaluer les rôles potentiels de ces miARNs sélectionnés :

D'autres études *in vivo* pourraient être réalisées dans des souris immunodéprimées, par xénogreffes sous-cutanées ou orthotopiques. On pourrait également envisager l'utilisation des lignées stables sur-exprimant les miARN établies par une approche lentivirale permettant ainsi que la Green Fluorescent Protein (GFP) présente dans la construction lentivirale. Ainsi les propriétés tumorales pourront être caractérisées *in vivo* en mesurant la croissance des tumeurs (taille et vitesse), leur vascularisation et leur capacité à former des métastases.

Une autre étude pourrait être envisagée sur un modèle murin de cancer du sein triple négatif, les miARN sélectionnés pourraient être testés sur ce modèle. Ils pourraient être injectés en solution saline dans la veine de la queue de souris comme traitement. Les propriétés anti-tumorales pourraient être alors évaluées : croissance des tumeurs (taille et vitesse), vascularisation et capacité à former des métastases. L'expression des miARN et des gènes cibles seraient également évaluée par hybridation *in situ* et par immuno-histochimie respectivement.

III. Les miARNs pourraient constituer des outils thérapeutiques pour le cancer du sein triple négatif

En raison relativement de leur faible poids moléculaire (~ 6000) (Liu, 2012), de la puissance endogène de cibler un large spectre de gènes et vu leur rôle de régulateurs d'un grand nombre de voies moléculaires, les miARNs (mais plus généralement les oligonucléotides), semblent être des outils thérapeutiques prometteurs dans un certain nombre de pathologies et notamment dans le cancer du sein triple négatif.

L'utilisation des miARN pour le développement de nouvelles stratégies thérapeutiques pourrait être basée sur deux approches:

- 1- Utiliser des miARN comme molécules médicamenteuses. En fonction de leur effet, on chercherait à augmenter ou diminuer les niveaux d'expression de miARN dans le cancer du sein triple négatif.
- 2- Moduler l'activité de miARN par l'utilisation de traitement comme la chimiothérapie (Bertoli et al, 2015).

Pour la première approche, elle se base sur le développement des oligonucléotides antagonistes ou mimiques. Les miARNs antagonistes sont générés pour inhiber un miARN qui a acquis un gain de fonction dans le cancer du sein triple négatif (un miARN oncogène ou oncomiR).

Par contre les miARNs mimiques sont utilisés pour restaurer un miARN qui montre une perte de fonction (un miARN suppresseur de tumeur), comme dans la thérapie génique traditionnelle. Ce qui fournit une nouvelle occasion pour exploiter thérapeutiquement des suppresseurs de tumeurs dans le cancer du sein triple négatif.

La stratégie la plus commune pour l'abolition de la fonction de miARN est réalisée par des modifications apportées à des oligonucléotides simple brin complémentaires au miARN.

Ces modifications permettraient une stabilité des molécules, une forte spécificité d'interaction avec le miARN ciblé et la résistance aux RNases. Deux types de modifications sont connus, les LNA-antimiR et les 2'-O-Me-antimiR.

Les LNA-antimiR sont des oligonucléotides constitués de LNA (locked nucleic acid), qui sont des analogues des ARN dont le ribose est bloqué par un pont méthylène entre le 2'O et le 4'C (Vester et Wengel, 2004).

Les 2'-O-Me-antimiR sont des oligonucléotides dont les bases sont modifiées en 2' par des groupements O-méthyle (Krutzfeldt et al., 2005).

Des modifications relativement similaires mais avec un cholestérol en 3' ou des hybrides comme 2'-O-methoxyethyl-4-thioRNA (MOE-SRNA) ont également été testés (Bertoli et al, 2015).

Une autre méthode récemment décrite pour inhiber la fonction d'un miARN consiste à l'utilisation des ARNs synthétiques contenant plusieurs sites d'hybridation de miARN spécifique appelé « miRNA sponges » ou éponges à miARN. Cette méthode a été validée dans des modèles cellulaires mammaires xéno greffés dans un modèle murin conduisant à une inhibition de la prolifération cellulaire et la réduction de la masse tumorale (Bertoli et al, 2015). Quant à la surexpression de miARN, elle est possible par la transfection des miARNs mimiques. Ces derniers, par rapport aux anti-miRs, sont moins stables car peu de modifications sont possibles pour qu'ils puissent être fonctionnels. Pour cela des techniques sont développées pour surmonter les inconvénients de la dégradation par des RNases ou l'immunogénicité de l'ARN introduit et augmenter aussi la stabilité. Parmi ces techniques, on peut citer les vecteurs viraux, des liposomes les nanoparticules de polymères ou récemment les nanoparticules d'or (Wang et Wu, 2009, Bertoli et al, 2015).

Pour la deuxième approche, les miARNs peuvent être utilisés pour augmenter la réponse du cancer du sein à une intervention thérapeutique. Par exemple le cancer du sein a été révélé résistant à la chimiothérapie lorsque certains miARNs sont dérégulés (ex : miR-125). Les miARNs mimiques peuvent être combinés avec la thérapie conventionnelle pour obtenir un avantage accru chez les patients. Comme exemple, la régulation positive de miR-195, obtenue par des oligonucléotides mimiques, dans des cellules MCF7 résistantes à l'ADR (doxorubicine) augmente la sensibilité au traitement de ces cellules, conduisant à l'apoptose par régulation négative de Raf-1 et Bcl-2 (Bertoli et al, 2015).

Concernant nos 4 miARNs sélectionnés, suite à nos travaux, on pourrait envisager de les étudier en combinaison avec l'irradiation, ou en présence des molécules antitumorales telque la doxorubicine.

En conclusion, Nous avons montré tout au long de ce travail que les miR-10b, miR-26a, miR-146a et miR-153 pourraient être exploités comme des biomarqueurs potentiels du cancer de sein triple négatif.

Cependant, le chemin reste long, et les recherches futures devraient viser le potentiel thérapeutique intéressant de miARNs contre ce type du cancer par modulation de leur expression cellulaire. A cet égard, certains miARN ont déjà montré des résultats prometteurs, soit par le développement et la livraison de médicament à base de miARN tout en gardant à l'esprit une optimisation de leur stabilité, ainsi que l'amélioration de la prestation de miARN et le contrôle des effets hors-cible de miARNs.

REFERENCES

- Adams, Brian D., Henry Furneaux, et Bruce A. White. 2007. « The Micro-Ribonucleic Acid (miRNA) miR-206 Targets the Human Estrogen Receptor-Alpha (ERalpha) and Represses ERalpha Messenger RNA and Protein Expression in Breast Cancer Cell Lines. » *Molecular Endocrinology (Baltimore, Md.)* 21 (5): 1132-47. doi:10.1210/me.2007-0022.
- Almeida, Maria Inês, Rui M. Reis, et George A. Calin. 2011. « BRCA1, microRNAs and Cancer Predisposition: Challenging the Dogma. » *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)* 10 (3): 377.
- Amat, Sophie, Frederique Penault-Llorca, Hervew Cure, Guillaume Le Bouedéc, Jean-Louis Achard, Isabelle Van Praagh, Viviane Feillel, Marie-Ange Mouret-Reynier, Jacques Dauplat, et Philippe Chollet. 2002. « Scarff-Bloom-Richardson (SBR) Grading: A Pleiotropic Marker of Chemosensitivity in Invasive Ductal Breast Carcinomas Treated by Neoadjuvant Chemotherapy. » *International Journal of Oncology* 20 (4): 791-96.
- Ambros, Victor. 2004. « The Functions of Animal microRNAs. » *Nature* 431 (7006): 350-55. doi:10.1038/nature02871.
- Ameres, Stefan L., et Phillip D. Zamore. 2013. « Diversifying microRNA Sequence and Function. » *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 14 (8): 475-88. doi:10.1038/nrm3611.
- Anaya-Ruiz, Maricruz, Jorge Cebada, Guadalupe Delgado-López, María Luisa Sánchez-Vázquez, et José Luis Martín Pérez-Santos. 2013. « miR-153 Silencing Induces Apoptosis in the MDA-MB-231 Breast Cancer Cell Line. » *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention: APJCP* 14 (5): 2983-86.
- Anderson, S. F., B. P. Schlegel, T. Nakajima, E. S. Wolpin, et J. D. Parvin. 1998. « BRCA1 Protein Is Linked to the RNA Polymerase II Holoenzyme Complex via RNA Helicase A. » *Nature Genetics* 19 (3): 254-56. doi:10.1038/930.
- Antoniou, A., P. D. P. Pharoah, S. Narod, H. A. Risch, J. E. Eyfjord, J. L. Hopper, N. Loman, et al. 2003. « Average Risks of Breast and Ovarian Cancer Associated with BRCA1 or BRCA2 Mutations Detected in Case Series Unselected for Family History: A Combined Analysis of 22 Studies. » *American Journal of Human Genetics* 72 (5): 1117-30. doi:10.1086/375033.
- Aravin, A. A., N. M. Naumova, A. V. Tulin, V. V. Vagin, Y. M. Rozovsky, et V. A. Gvozdev. 2001. « Double-Stranded RNA-Mediated Silencing of Genomic Tandem Repeats and Transposable Elements in the D. Melanogaster Germline. » *Current Biology: CB* 11 (13): 1017-27.
- Arnedos, Monica, Celine Bihan, Suzette Delalogue, et Fabrice Andre. 2012. « Triple-Negative Breast Cancer: Are We Making Headway at Least? » *Therapeutic Advances in Medical Oncology* 4 (4): 195-210. doi:10.1177/1758834012444711.
- Babak, Tomas, Wen Zhang, Quaid Morris, Benjamin J. Blencowe, et Timothy R. Hughes. 2004. « Probing microRNAs with Microarrays: Tissue Specificity and Functional Inference. » *RNA (New York, N.Y.)* 10 (11): 1813-19. doi:10.1261/rna.7119904.
- Baek, Daehyun, Judit Villén, Chanseok Shin, Fernando D. Camargo, Steven P. Gygi, et David P. Bartel. 2008. « The Impact of microRNAs on Protein Output. » *Nature* 455 (7209): 64-71. doi:10.1038/nature07242.
- Bartel, David P. 2004. « MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. » *Cell* 116 (2): 281-97.
- . 2009. « MicroRNAs: Target Recognition and Regulatory Functions. » *Cell* 136 (2): 215-33. doi:10.1016/j.cell.2009.01.002.
- Baskerville, Scott, et David P. Bartel. 2005. « Microarray Profiling of microRNAs Reveals Frequent Coexpression with Neighboring miRNAs and Host Genes. » *RNA (New*

- York, N.Y.) 11 (3): 241-47. doi:10.1261/rna.7240905.
- Beger, C., L. N. Pierce, M. Kruger, E. G. Marcusson, J. M. Robbins, P. Welch, P. J. Welch, et al. 2001. « Identification of Id4 as a Regulator of BRCA1 Expression by Using a Ribozyme-Library-Based Inverse Genomics Approach. » *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98 (1): 130-35. doi:10.1073/pnas.98.1.130.
- Berezikov, Eugene, Wei-Jen Chung, Jason Willis, Edwin Cuppen, et Eric C. Lai. 2007. «Mammalian Mirtron Genes. » *Molecular Cell* 28 (2): 328-36. doi:10.1016/j.molcel.2007.09.028.
- Bernstein, E., A. A. Caudy, S. M. Hammond, et G. J. Hannon. 2001. « Role for a Bidentate Ribonuclease in the Initiation Step of RNA Interference. » *Nature* 409 (6818): 363-66. doi:10.1038/35053110.
- Bertoli, Gloria, Claudia Cava, et Isabella Castiglioni. 2015. « MicroRNAs: New Biomarkers for Diagnosis, Prognosis, Therapy Prediction and Therapeutic Tools for Breast Cancer. » *Theranostics* 5 (10): 1122-43. doi:10.7150/thno.11543.
- Betel, Doron, Manda Wilson, Aaron Gabow, Debora S. Marks, et Chris Sander. 2008. « The microRNA.org Resource: Targets and Expression. » *Nucleic Acids Research* 36 (Database issue): D149-53. doi:10.1093/nar/gkm995.
- Beuvink, Iwan, Fabrice A. Kolb, Wolfgang Budach, Arlette Garnier, Joerg Lange, Francois Natt, Uwe Dengler, Jonathan Hall, Witold Filipowicz, et Jan Weiler. 2007. « A Novel Microarray Approach Reveals New Tissue-Specific Signatures of Known and Predicted Mammalian microRNAs. » *Nucleic Acids Research* 35 (7): e52. doi:10.1093/nar/gkl1118.
- Bhat-Nakshatri, Poornima, Guohua Wang, Nikail R. Collins, Michael J. Thomson, Tim R. Geistlinger, Jason S. Carroll, Myles Brown, et al. 2009. « Estradiol-Regulated microRNAs Control Estradiol Response in Breast Cancer Cells. » *Nucleic Acids Research* 37 (14): 4850-61. doi:10.1093/nar/gkp500.
- Bhaumik, D., G. K. Scott, S. Schokrpur, C. K. Patil, J. Campisi, et C. C. Benz. 2008. « Expression of microRNA-146 Suppresses NF-kappaB Activity with Reduction of Metastatic Potential in Breast Cancer Cells. » *Oncogene* 27 (42): 5643-47. doi:10.1038/onc.2008.171.
- Biagioni, Francesca, Noa Bossel Ben-Moshe, Giulia Fontemaggi, Valeria Canu, Federica Mori, Barbara Antoniani, Anna Di Benedetto, et al. 2012. « miR-10b*, a Master Inhibitor of the Cell Cycle, Is down-Regulated in Human Breast Tumours. » *EMBO Molecular Medicine* 4 (11): 1214-29. doi:10.1002/emmm.201201483.
- Bièche, I., A. Khodja, et R. Lidereau. 1999. « Deletion Mapping of Chromosomal Region 1p32- Pter in Primary Breast Cancer. » *Genes, Chromosomes & Cancer* 24 (3): 255-63.
- Bièche, I., et R. Lidereau. 1995. « Genetic Alterations in Breast Cancer. » *Genes, Chromosomes & Cancer* 14 (4): 227-51.
- Billard, Lise-Marie, Frédérique Magdinier, Gilbert M. Lenoir, Lucien Frappart, et Robert Dante. 2002. « MeCP2 and MBD2 Expression during Normal and Pathological Growth of the Human Mammary Gland. » *Oncogene* 21 (17): 2704-12. doi:10.1038/sj.onc.1205357.
- Bochar, D. A., L. Wang, H. Beniya, A. Kinev, Y. Xue, W. S. Lane, W. Wang, F. Kashanchi, et R. Shiekhattar. 2000. « BRCA1 Is Associated with a Human SWI/SNF-Related Complex: Linking Chromatin Remodeling to Breast Cancer. » *Cell* 102 (2): 257-65.
- Bohnsack, Markus T., Kevin Czaplinski, et Dirk Gorlich. 2004. « Exportin 5 Is a RanGTP-Dependent dsRNA-Binding Protein That Mediates Nuclear Export of Pre-miRNAs. » *RNA (New York, N.Y.)* 10 (2): 185-91.
- Boice, J. D. 1996. « Cancer Following Irradiation in Childhood and Adolescence. » *Medical and Pediatric Oncology. Supplement* 1: 29-34.

- Boisserie-Lacroix, M., G. Hurtevent-Labrot, S. Ferron, N. Lippa, H. Bonnefoi, et G. Mac Grogan. 2013. « Correlation between Imaging and Molecular Classification of Breast Cancers. » *Diagnostic and Interventional Imaging* 94 (11): 1069-80. doi:10.1016/j.diii.2013.04.010.
- Boominathan, Lakshmanane. 2010. « The Tumor Suppressors p53, p63, and p73 Are Regulators of microRNA Processing Complex. » *PloS One* 5 (5): e10615. doi:10.1371/journal.pone.0010615.
- Bouasker, Samir, et Martin J. Simard. 2012. « The Slicing Activity of miRNA-Specific Argonautes Is Essential for the miRNA Pathway in *C. Elegans*. » *Nucleic Acids Research* 40 (20): 10452-62. doi:10.1093/nar/gks748.
- Boyd, N. F., G. A. Lockwood, J. W. Byng, D. L. Trichler, et M. J. Yaffe. 1998. « Mammographic Densities and Breast Cancer Risk. » *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention: A Publication of the American Association for Cancer Research, Cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* 7 (12): 1133-44.
- Brady-West, Doreen C., et Donovan A. McGrowder. 2011. « Triple Negative Breast Cancer: Therapeutic and Prognostic Implications. » *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention: APJCP* 12 (8): 2139-43.
- Bueno, María J., Marta Gómez de Cedrón, Usua Laresgoiti, José Fernández-Piqueras, Ana M. Zubiaga, et Marcos Malumbres. 2010. « Multiple E2F-Induced microRNAs Prevent Replicative Stress in Response to Mitogenic Signaling. » *Molecular and Cellular Biology* 30 (12): 2983-95. doi:10.1128/MCB.01372-09.
- Cai, Xuezhong, Curt H. Hagedorn, et Bryan R. Cullen. 2004. « Human microRNAs Are Processed from Capped, Polyadenylated Transcripts That Can Also Function as mRNAs. » *RNA (New York, N.Y.)* 10 (12): 1957-66. doi:10.1261/rna.7135204.
- Calin, George Adrian, Cinzia Sevignani, Calin Dan Dumitru, Terry Hyslop, Evan Noch, Sai Yendamuri, Masayoshi Shimizu, et al. 2004. « Human microRNA Genes Are Frequently Located at Fragile Sites and Genomic Regions Involved in Cancers. » *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (9): 2999-3004. doi:10.1073/pnas.0307323101.
- Callebaut, I., et J. P. Mornon. 1997. « From BRCA1 to RAP1: A Widespread BRCT Module Closely Associated with DNA Repair. » *FEBS Letters* 400 (1): 25-30.
- Carter, C. L., C. Allen, et D. E. Henson. 1989. « Relation of Tumor Size, Lymph Node Status, and Survival in 24,740 Breast Cancer Cases. » *Cancer* 63 (1): 181-87.
- Cascione, Luciano, Pierluigi Gasparini, Francesca Lovat, Stefania Carasi, Alfredo Pulvirenti, Alfredo Ferro, Hansjuerg Alder, et al. 2013. « Integrated microRNA and mRNA Signatures Associated with Survival in Triple Negative Breast Cancer. » *PloS One* 8 (2): e55910. doi:10.1371/journal.pone.0055910.
- Chang, Suhwan, et Shyam K. Sharan. 2012. « BRCA1 and microRNAs: Emerging Networks and Potential Therapeutic Targets. » *Molecules and Cells* 34 (5): 425-32. doi:10.1007/s10059-012-0118-y.
- Chang, Suhwan, Rui-Hong Wang, Keiko Akagi, Kyung-Ae Kim, Betty K. Martin, Luca Cavallone, Kathleen Cuninghame Foundation Consortium for Research into Familial Breast Cancer (kConFab), et al. 2011. « Tumor Suppressor BRCA1 Epigenetically Controls Oncogenic microRNA-155. » *Nature Medicine* 17 (10): 1275-82. doi:10.1038/nm.2459.
- Chan, Shih-Peng, et Frank J. Slack. 2007. « And Now Introducing Mammalian Mirtrons. » *Developmental Cell* 13 (5): 605-7. doi:10.1016/j.devcel.2007.10.010.
- Chen, C. F., S. Li, Y. Chen, P. L. Chen, Z. D. Sharp, et W. H. Lee. 1996. « The Nuclear Localization Sequences of the BRCA1 Protein Interact with the Importin-Alpha Subunit of the Nuclear Transport Signal Receptor. » *The Journal of Biological*

- Chemistry* 271 (51): 32863-68.
- Chendrimada, Thimmaiah P., Kenneth J. Finn, Xinjun Ji, David Baillat, Richard I. Gregory, Stephen A. Liebhaber, Amy E. Pasquinelli, et Ramin Shiekhattar. 2007. « MicroRNA Silencing through RISC Recruitment of eIF6. » *Nature* 447 (7146): 823-28. doi:10.1038/nature05841.
- Chen, Y., W. Thompson, R. Semenciw, et Y. Mao. 1999. « Epidemiology of Contralateral Breast Cancer. » *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention: A Publication of the American Association for Cancer Research, Cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* 8 (10): 855-61.
- Clark, Serena L., Ana M. Rodriguez, Russell R. Snyder, Gary D. V. Hankins, et Darren Boehning. 2012. « Structure-Function Of The Tumor Suppressor BRCA1. » *Computational and Structural Biotechnology Journal* 1 (1). doi:10.5936/csbj.201204005.
- Corcoran, David L., Kusum V. Pandit, Ben Gordon, Arindam Bhattacharjee, Naftali Kaminski, et Panayiotis V. Benos. 2009. « Features of Mammalian microRNA Promoters Emerge from Polymerase II Chromatin Immunoprecipitation Data. » *PLoS One* 4 (4): e5279. doi:10.1371/journal.pone.0005279.
- Cornelis, R. S., S. L. Neuhausen, O. Johansson, A. Arason, D. Kelsell, B. A. Ponder, P. Tonin, U. Hamann, A. Lindblom, et P. Lalle. 1995. « High Allele Loss Rates at 17q12-q21 in Breast and Ovarian Tumors from BRCA1-Linked Families. The Breast Cancer Linkage Consortium. » *Genes, Chromosomes & Cancer* 13 (3): 203-10.
- Czech, Benjamin, et Gregory J. Hannon. 2011. « Small RNA Sorting: Matchmaking for Argonautes. » *Nature Reviews. Genetics* 12 (1): 19-31. doi:10.1038/nrg2916.
- Denli, Ahmet M., Bastiaan B. J. Tops, Ronald H. A. Plasterk, René F. Ketting, et Gregory J. Hannon. 2004. « Processing of Primary microRNAs by the Microprocessor Complex. » *Nature* 432 (7014): 231-35. doi:10.1038/nature03049.
- Deo, Monika, Jenn-Yah Yu, Kwan-Ho Chung, Melissa Tippens, et David L. Turner. 2006. « Detection of Mammalian microRNA Expression by in Situ Hybridization with RNA Oligonucleotides. » *Developmental Dynamics: An Official Publication of the American Association of Anatomists* 235 (9): 2538-48. doi:10.1002/dvdy.20847.
- Di Leva, Gianpiero, George A. Calin, et Carlo M. Croce. 2006. « MicroRNAs: Fundamental Facts and Involvement in Human Diseases. » *Birth Defects Research. Part C, Embryo Today: Reviews* 78 (2): 180-89. doi:10.1002/bdrc.20073.
- Dinesh, Kada Peela Bheeman, Halagowder Devaraj, Vadivel Murugan, Ramamurthy Rajaraman, et Sivasidhambaram Niranjali. 2006. « Analysis of Loss of Heterozygosity and Immunohistochemistry in BRCA1 Gene in Sporadic Breast Cancers. » *Molecular and Cellular Biochemistry* 287 (1-2): 177-83. doi:10.1007/s11010-005-9097-z.
- Ding, Lei, Andrew Spencer, Kiyokazu Morita, et Min Han. 2005. « The Developmental Timing Regulator AIN-1 Interacts with miRISCs and May Target the Argonaute Protein ALG-1 to Cytoplasmic P Bodies in *C. Elegans*. » *Molecular Cell* 19 (4): 437-47. doi:10.1016/j.molcel.2005.07.013.
- D'Ippolito, Elvira, et Marilena V. Iorio. 2013. « MicroRNAs and Triple Negative Breast Cancer. » *International Journal of Molecular Sciences* 14 (11): 22202-20. doi:10.3390/ijms141122202.
- Dostie, Josée, Zissimos Mourelatos, Michael Yang, Anup Sharma, et Gideon Dreyfuss. 2003. « Numerous microRNPs in Neuronal Cells Containing Novel microRNAs. » *RNA (New York, N.Y.)* 9 (2): 180-86.
- Duan, Ranhui, Changhui Pak, et Peng Jin. 2007. « Single Nucleotide Polymorphism Associated with Mature miR-125a Alters the Processing of Pri-miRNA. » *Human Molecular Genetics* 16 (9): 1124-31. doi:10.1093/hmg/ddm062.

- Duursma, Anja M., Martijn Kedde, Mariette Schrier, Carlos le Sage, et Reuven Agami. 2008. « miR-148 Targets Human DNMT3b Protein Coding Region. » *RNA (New York, N.Y.)* 14 (5): 872-77. doi:10.1261/rna.972008.
- Eisinger, F., J. Jacquemier, E. Charafe-Jauffret, M. C. Rio, D. Birnbaum, et H. Sobol. 1999. « More about: Multifactorial Analysis of Differences between Sporadic Breast Cancers and Cancers Involving BRCA1 and BRCA2 Mutations. » *Journal of the National Cancer Institute* 91 (16): 1421-22.
- Eulalio, Ana, Isabelle Behm-Ansmant, et Elisa Izaurralde. 2007. « P Bodies: At the Crossroads of Post-Transcriptional Pathways. » *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 8 (1): 9-22. doi:10.1038/nrm2080.
- Farh, Kyle Kai-How, Andrew Grimson, Calvin Jan, Benjamin P. Lewis, Wendy K. Johnston, Lee P. Lim, Christopher B. Burge, et David P. Bartel. 2005. « The Widespread Impact of Mammalian MicroRNAs on mRNA Repression and Evolution. » *Science (New York, N.Y.)* 310 (5755): 1817-21. doi:10.1126/science.1121158.
- Farmer, Pierre, Herve Bonnefoi, Veronique Becette, Michele Tubiana-Hulin, Pierre Fumoleau, Denis Larsimont, Gaetan Macgrogan, et al. 2005. « Identification of Molecular Apocrine Breast Tumours by Microarray Analysis. » *Oncogene* 24 (29): 4660-71. doi:10.1038/sj.onc.1208561.
- Feigelson, H. S., E. E. Calle, A. S. Robertson, P. A. Wingo, et M. J. Thun. 2001. « Alcohol Consumption Increases the Risk of Fatal Breast Cancer (United States). » *Cancer Causes & Control: CCC* 12 (10): 895-902.
- Ferla, R., V. Calò, S. Cascio, G. Rinaldi, G. Badalamenti, I. Carreca, E. Surmacz, G. Colucci, V. Bazan, et A. Russo. 2007. « Founder Mutations in BRCA1 and BRCA2 Genes. » *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* 18 Suppl 6 (juin): vi93-98. doi:10.1093/annonc/mdm234.
- Feunteun, J. 1998. « [Is hereditary predisposition to breast cancer linked to BRCA1 a disease of response to genotoxic lesions?]. » *Comptes Rendus Des Séances De La Société De Biologie Et De Ses Filiales* 192 (2): 235-40.
- Filipowicz, Witold, Suvendra N. Bhattacharyya, et Nahum Sonenberg. 2008. « Mechanisms of Post-Transcriptional Regulation by microRNAs: Are the Answers in Sight? » *Nature Reviews. Genetics* 9 (2): 102-14. doi:10.1038/nrg2290.
- Fontana, Laura, Micol E. Fiori, Sonia Albini, Loredana Cifaldi, Serena Giovinnazzi, Matteo Forloni, Renata Boldrini, et al. 2008. « Antagomir-17-5p Abolishes the Growth of Therapy-Resistant Neuroblastoma through p21 and BIM. » *PloS One* 3 (5): e2236. doi:10.1371/journal.pone.0002236.
- Ford, D., D. F. Easton, et J. Peto. 1995. « Estimates of the Gene Frequency of BRCA1 and Its Contribution to Breast and Ovarian Cancer Incidence. » *American Journal of Human Genetics* 57 (6): 1457-62.
- Ford, D., D. F. Easton, M. Stratton, S. Narod, D. Goldgar, P. Devilee, D. T. Bishop, et al. 1998. « Genetic Heterogeneity and Penetrance Analysis of the BRCA1 and BRCA2 Genes in Breast Cancer Families. The Breast Cancer Linkage Consortium. » *American Journal of Human Genetics* 62 (3): 676-89.
- Foulkes, William D., Ingunn M. Stefansson, Pierre O. Chappuis, Louis R. Bégin, John R. Goffin, Nora Wong, Michel Trudel, et Lars A. Akslen. 2003. « Germline BRCA1 Mutations and a Basal Epithelial Phenotype in Breast Cancer. » *Journal of the National Cancer Institute* 95 (19): 1482-85.
- Frebouurg, T., A. Abel, C. Bonaiti-Pellie, L. Brugières, P. Berthet, B. Bressac-de Paillerets, A. Chevrier, et al. 2001. « [Li-Fraumeni syndrome: update, new data and guidelines for clinical management]. » *Bulletin Du Cancer* 88 (6): 581-87.
- Freres, P., J. Collignon, C. Gennigens, I. Scagnol, A. Rorive, A. Barbeaux, P. A. Coucke, et

- G. Jérusalem. 2010. « [—Triple negative breast cancer] ». *Revue Médicale De Liège* 65 (3): 120-26.
- Friedenreich, C. M., K. S. Courneya, et H. E. Bryant. 2001. « Influence of Physical Activity in Different Age and Life Periods on the Risk of Breast Cancer. » *Epidemiology (Cambridge, Mass.)* 12 (6): 604-12.
- Friedman, Robin C., Kyle Kai-How Farh, Christopher B. Burge, et David P. Bartel. 2009. « Most Mammalian mRNAs Are Conserved Targets of microRNAs. » *Genome Research* 19 (1): 92-105. doi:10.1101/gr.082701.108.
- Friend, S., A. L. Borresen, L. Brody, G. Casey, P. Devilee, S. Gayther, D. Goldgar, P. Murphy, B. L. Weber, et R. Wiseman. 1995. « Breast Cancer Information on the Web. » *Nature Genetics* 11 (3): 238-39. doi:10.1038/ng1195-238.
- Fulci, Valerio, Sabina Chiaretti, Marina Goldoni, Gianluca Azzalin, Nicoletta Carucci, Simona Tavolaro, Leandro Castellano, et al. 2007. « Quantitative Technologies Establish a Novel microRNA Profile of Chronic Lymphocytic Leukemia. » *Blood* 109 (11): 4944-51. doi:10.1182/blood-2006-12-062398.
- Gabriely, Galina, Nadiya M. Teplyuk, et Anna M. Krichevsky. 2011. « Context Effect: microRNA-10b in Cancer Cell Proliferation, Spread and Death. » *Autophagy* 7 (11): 1384-86. doi:10.4161/auto.7.11.17371.
- Gao, Jie, Laisheng Li, Mingqing Wu, Min Liu, Xinhua Xie, Jiaoli Guo, Hailin Tang, et Xiaoming Xie. 2013. « MiR-26a Inhibits Proliferation and Migration of Breast Cancer through Repression of MCL-1. » *PloS One* 8 (6): e65138. doi:10.1371/journal.pone.0065138.
- Gao, Ping, Irina Tchernyshyov, Tsung-Cheng Chang, Yun-Sil Lee, Kayoko Kita, Takafumi Ochi, Karen I. Zeller, et al. 2009. « C-Myc Suppression of miR-23a/b Enhances Mitochondrial Glutaminase Expression and Glutamine Metabolism. » *Nature* 458 (7239): 762-65. doi:10.1038/nature07823.
- Garcia, Amandine I., Monique Buisson, Pascale Bertrand, Ruth Rimokh, Etienne Rouleau, Bernard S. Lopez, Rosette Lidereau, Ivan Mikaélian, et Sylvie Mazoyer. 2011. « Down-regulation of BRCA1 Expression by miR-146a and miR-146b-5p in Triple Negative Sporadic Breast Cancers. » *EMBO Molecular Medicine* 3 (5): 279-90. doi:10.1002/emmm.201100136.
- Garzon, Ramiro, Guido Marcucci, et Carlo M. Croce. 2010. « Targeting microRNAs in Cancer: Rationale, Strategies and Challenges. » *Nature Reviews. Drug Discovery* 9 (10): 775-89. doi:10.1038/nrd3179.
- Gonçalves, Anthony, Renaud Sabatier, Emmanuelle Charafe-Jauffret, Marine Gilabert, Magali Provansal, Carole Tarpin, Jean-Marc Extra, Patrice Viens, et François Bertucci. 2013. « [Triple-negative breast cancer: histoclinical and molecular features, therapeutic management and perspectives]. » *Bulletin Du Cancer* 100 (5): 453-64. doi:10.1684/bdc.2013.1740.
- Gonçalves, A., P. Viens, H. Sobol, D. Maraninchi, et F. Bertucci. 2005. « [Molecular alterations in breast cancer: clinical implications and new analytical tools]. » *La Revue De Médecine Interne / Fondée ... Par La Société Nationale Française De Médecine Interne* 26 (6): 470-78. doi:10.1016/j.revmed.2004.11.012.
- Griffiths-Jones, Sam, Harpreet Kaur Saini, Stijn van Dongen, et Anton J. Enright. 2008. « miRBase: Tools for microRNA Genomics. » *Nucleic Acids Research* 36 (Database issue): D154-58. doi:10.1093/nar/gkm952.
- Grimson, Andrew, Kyle Kai-How Farh, Wendy K. Johnston, Philip Garrett-Engele, Lee P. Lim, et David P. Bartel. 2007. « MicroRNA Targeting Specificity in Mammals: Determinants beyond Seed Pairing. » *Molecular Cell* 27 (1): 91-105. doi:10.1016/j.molcel.2007.06.017.

- Gudmundsdottir, K., et A. Ashworth. 2006. « The Roles of BRCA1 and BRCA2 and Associated Proteins in the Maintenance of Genomic Stability. » *Oncogene* 25 (43): 5864-74. doi:10.1038/sj.onc.1209874.
- Guo, Huili, Nicholas T. Ingolia, Jonathan S. Weissman, et David P. Bartel. 2010. « Mammalian microRNAs Predominantly Act to Decrease Target mRNA Levels. » *Nature* 466 (7308): 835-40. doi:10.1038/nature09267.
- Gyparaki, Melina-Theoni, Efthimia K. Basdra, et Athanasios G. Papavassiliou. 2014. « MicroRNAs as Regulatory Elements in Triple Negative Breast Cancer. » *Cancer letters* 354 (1): 1-4. doi:10.1016/j.canlet.2014.07.036.
- Haitian, Zhang, Lu Yunfei, Zeng Jian, Lin Jian, Liao Qinghua, et Wan Fuqiang. 2008. « Mutation Screening of the BRCA1 Gene in Sporadic Breast Cancer in Southern Chinese Populations. » *Breast (Edinburgh, Scotland)* 17 (6): 563-67. doi:10.1016/j.breast.2008.08.003.
- Hamajima, N., K. Hirose, K. Tajima, T. Rohan, E. E. Calle, C. W. Heath, R. J. Coates, et al. 2002. « Alcohol, Tobacco and Breast Cancer--Collaborative Reanalysis of Individual Data from 53 Epidemiological Studies, Including 58,515 Women with Breast Cancer and 95,067 Women without the Disease. » *British Journal of Cancer* 87 (11): 1234-45. doi:10.1038/sj.bjc.6600596.
- Han, Xu, Sun Yan, Zhang Weijie, Wang Feng, Wang Liuxing, Li Mengquan, et Fan Qingxia. 2014. « Critical Role of miR-10b in Transforming Growth Factor- β 1-Induced Epithelial- Mesenchymal Transition in Breast Cancer. » *Cancer Gene Therapy* 21 (2): 60-67. doi:10.1038/cgt.2013.82.
- Harkin, D. P., J. M. Bean, D. Miklos, Y. H. Song, V. B. Truong, C. Englert, F. C. Christians, et al. 1999. « Induction of GADD45 and JNK/SAPK-Dependent Apoptosis Following Inducible Expression of BRCA1. » *Cell* 97 (5): 575-86.
- Hennessy, Bryan T., Ana-Maria Gonzalez-Angulo, Katherine Stemke-Hale, Michael Z. Gilcrease, Savitri Krishnamurthy, Ju-Seog Lee, Jane Fridlyand, et al. 2009. « Characterization of a Naturally Occurring Breast Cancer Subset Enriched in Epithelial- to-Mesenchymal Transition and Stem Cell Characteristics. » *Cancer Research* 69 (10): 4116-24. doi:10.1158/0008-5472.CAN-08-3441.
- Höck, Julia, et Gunter Meister. 2008. « The Argonaute Protein Family. » *Genome Biology* 9 (2): 210. doi:10.1186/gb-2008-9-2-210.
- Horwitz, Andrew A., El Bachir Affar, George F. Heine, Yang Shi, et Jeffrey D. Parvin. 2007. « A Mechanism for Transcriptional Repression Dependent on the BRCA1 E3 Ubiquitin Ligase. » *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (16): 6614-19. doi:10.1073/pnas.0610481104.
- Hosking, L., J. Trowsdale, H. Nicolai, E. Solomon, W. Foulkes, G. Stamp, E. Signer, et A. Jeffreys. 1995. « A Somatic BRCA1 Mutation in an Ovarian Tumour. » *Nature Genetics* 9 (4): 343-44. doi:10.1038/ng0495-343.
- Houbaviy, Hristo B., Michael F. Murray, et Phillip A. Sharp. 2003. « Embryonic Stem Cell-Specific MicroRNAs. » *Developmental Cell* 5 (2): 351-58.
- Huang, Guan-Li, Xiao-Hua Zhang, Gui-Long Guo, Ka-Te Huang, Kai-Yan Yang, Xian Shen, Jie You, et Xiao-Qu Hu. 2009. « Clinical Significance of miR-21 Expression in Breast Cancer: SYBR-Green I-Based Real-Time RT-PCR Study of Invasive Ductal Carcinoma. » *Oncology Reports* 21 (3): 673-79.
- Humphreys, David T., Belinda J. Westman, David I. K. Martin, et Thomas Preiss. 2005. « MicroRNAs Control Translation Initiation by Inhibiting Eukaryotic Initiation Factor 4E/cap and poly(A) Tail Function. » *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (47): 16961-66. doi:10.1073/pnas.0506482102.

- Huntzinger, Eric, et Elisa Izaurralde. 2011. « Gene Silencing by microRNAs: Contributions of Translational Repression and mRNA Decay. » *Nature Reviews. Genetics* 12 (2): 99-110. doi:10.1038/nrg2936.
- Hutvagner, G., J. McLachlan, A. E. Pasquinelli, E. Bálint, T. Tuschl, et P. D. Zamore. 2001. « A Cellular Function for the RNA-Interference Enzyme Dicer in the Maturation of the Let-7 Small Temporal RNA. » *Science (New York, N.Y.)* 293 (5531): 834-38. doi:10.1126/science.1062961.
- Huyton, T., P. A. Bates, X. Zhang, M. J. Sternberg, et P. S. Freemont. 2000. « The BRCA1 C-Terminal Domain: Structure and Function. » *Mutation Research* 460 (3-4): 319-32.
- Hu, Zhiyuan, Cheng Fan, Daniel S. Oh, J. S. Marron, Xiaping He, Bahjat F. Qaqish, Chad Livasy, et al. 2006. « The Molecular Portraits of Breast Tumors Are Conserved across Microarray Platforms. » *BMC Genomics* 7: 96. doi:10.1186/1471-2164-7-96.
- Inomata, Mika, Hiroyuki Tagawa, Yong-Mei Guo, Yoshihiro Kameoka, Naoto Takahashi, et Kenichi Sawada. 2009. « MicroRNA-17-92 down-Regulates Expression of Distinct Targets in Different B-Cell Lymphoma Subtypes. » *Blood* 113 (2): 396-402. doi:10.1182/blood-2008-07-163907.
- Ivanovska, Irena, Alexey S. Ball, Robert L. Diaz, Jill F. Magnus, Miho Kibukawa, Janell M. Schelter, Sumire V. Kobayashi, et al. 2008. « MicroRNAs in the miR-106b Family Regulate p21/CDKN1A and Promote Cell Cycle Progression. » *Molecular and Cellular Biology* 28 (7): 2167-74. doi:10.1128/MCB.01977-07.
- Jackson, Richard J., Christopher U. T. Hellen, et Tatyana V. Pestova. 2010. « The Mechanism of Eukaryotic Translation Initiation and Principles of Its Regulation. » *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 11 (2): 113-27. doi:10.1038/nrm2838.
- Jakóbisiak, Marek, Witold Lasek, et Jakub Gołab. 2003. « Natural Mechanisms Protecting against Cancer. » *Immunology Letters* 90 (2-3): 103-22.
- Jin, S., H. Zhao, F. Fan, P. Blanck, W. Fan, A. B. Colchagie, A. J. Fornace, et Q. Zhan. 2000. « BRCA1 Activation of the GADD45 Promoter. » *Oncogene* 19 (35): 4050-57.
- Jones-Rhoades, Matthew W., David P. Bartel, et Bonnie Bartel. 2006. « MicroRNAs and Their Regulatory Roles in Plants. » *Annual Review of Plant Biology* 57: 19-53. doi:10.1146/annurev.arplant.57.032905.105218.
- Jopling, Catherine L., Sylvia Schütz, et Peter Sarnow. 2008. « Position-Dependent Function for a Tandem microRNA miR-122-Binding Site Located in the Hepatitis C Virus RNA Genome. » *Cell Host & Microbe* 4 (1): 77-85. doi:10.1016/j.chom.2008.05.013.
- Joseph, Antony, et Kefah Mokbel. 2004. « Male Breast Cancer. » *International Journal of Fertility and Women's Medicine* 49 (5): 198-99.
- Kertesz, Michael, Nicola Iovino, Ulrich Unnerstall, Ulrike Gaul, et Eran Segal. 2007. « The Role of Site Accessibility in microRNA Target Recognition. » *Nature Genetics* 39 (10): 1278-84. doi:10.1038/ng2135.
- Key, Timothy J., Arthur Schatzkin, Walter C. Willett, Naomi E. Allen, Elizabeth A. Spencer, et Ruth C. Travis. 2004. « Diet, Nutrition and the Prevention of Cancer. » *Public Health Nutrition* 7 (1A): 187-200.
- Key, T. J., P. K. Verkasalo, et E. Banks. 2001. « Epidemiology of Breast Cancer. » *The Lancet. Oncology* 2 (3): 133-40. doi:10.1016/S1470-2045(00)00254-0.
- Khoo, U. S., H. Ozcelik, A. N. Cheung, L. W. Chow, H. Y. Ngan, S. J. Done, A. C. Liang, et al. 1999. « Somatic Mutations in the BRCA1 Gene in Chinese Sporadic Breast and Ovarian Cancer. » *Oncogene* 18 (32): 4643-46. doi:10.1038/sj.onc.1202847.
- Kim, V. Narry, Jinju Han, et Mikiko C. Siomi. 2009. « Biogenesis of Small RNAs in Animals. » *Nature Reviews. Molecular Cell Biology* 10 (2): 126-39. doi:10.1038/nrm2632.
- Kim, Young-Kook, et V. Narry Kim. 2007. « Processing of Intronic microRNAs. » *The EMBO Journal* 26 (3): 775-83. doi:10.1038/sj.emboj.7601512.

- Kiriakidou, Marianthi, Grace S. Tan, Styliani Lamprinaki, Mariangels De Planell-Saguer, Peter T. Nelson, et Zissimos Mourelatos. 2007. « An mRNA m7G Cap Binding-like Motif within Human Ago2 Represses Translation. » *Cell* 129 (6): 1141-51. doi:10.1016/j.cell.2007.05.016.
- Kloosterman, Wigard P., Erno Wienholds, René F. Ketting, et Ronald H. A. Plasterk. 2004. « Substrate Requirements for Let-7 Function in the Developing Zebrafish Embryo. » *Nucleic Acids Research* 32 (21): 6284-91. doi:10.1093/nar/gkh968.
- Kozomara, Ana, et Sam Griffiths-Jones. 2014. « miRBase: Annotating High Confidence microRNAs Using Deep Sequencing Data. » *Nucleic Acids Research* 42 (Database issue): D68-73. doi:10.1093/nar/gkt1181.
- Krek, Azra, Dominic Grün, Matthew N. Poy, Rachel Wolf, Lauren Rosenberg, Eric J. Epstein, Philip MacMenamin, et al. 2005. « Combinatorial microRNA Target Predictions. » *Nature Genetics* 37 (5): 495-500. doi:10.1038/ng1536.
- Krützfeldt, Jan, Nikolaus Rajewsky, Ravi Braich, Kallanthottathil G. Rajeev, Thomas Tuschl, Muthiah Manoharan, et Markus Stoffel. 2005. « Silencing of microRNAs in Vivo with-Antagomirs. » *Nature* 438 (7068): 685-89. doi:10.1038/nature04303.
- Kumaraswamy, E., K. L. Wendt, L. A. Augustine, S. R. Stecklein, E. C. Sibala, D. Li, S. Gunewardena, et R. A. Jensen. 2014. « BRCA1 Regulation of Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) Expression in Human Breast Cancer Cells Involves microRNA-146a and Is Critical for Its Tumor Suppressor Function. » *Oncogene*, novembre. doi:10.1038/onc.2014.363.
- LaCroix, A. Z., et W. Burke. 1997. « Breast Cancer and Hormone Replacement Therapy. » *Lancet* 350 (9084): 1042-43. doi:10.1016/S0140-6736(97)22041-6.
- Lagos-Quintana, Mariana, Reinhard Rauhut, Jutta Meyer, Arndt Borkhardt, et Thomas Tuschl. 2003. « New microRNAs from Mouse and Human. » *RNA (New York, N.Y.)* 9 (2): 175-79.
- Lagos-Quintana, Mariana, Reinhard Rauhut, Abdullah Yalcin, Jutta Meyer, Winfried Lendeckel, et Thomas Tuschl. 2002. « Identification of Tissue-Specific microRNAs from Mouse. » *Current Biology: CB* 12 (9): 735-39.
- Lagos-Quintana, M., R. Rauhut, W. Lendeckel, et T. Tuschl. 2001. « Identification of Novel Genes Coding for Small Expressed RNAs. » *Science (New York, N.Y.)* 294 (5543): 853-58. doi:10.1126/science.1064921.
- Lai, Eric C. 2002. « Micro RNAs Are Complementary to 3' UTR Sequence Motifs That Mediate Negative Post-Transcriptional Regulation. » *Nature Genetics* 30 (4): 363-64. doi:10.1038/ng865.
- Landgraf, Pablo, Mirabela Rusu, Robert Sheridan, Alain Sewer, Nicola Iovino, Alexei Aravin, Sébastien Pfeffer, et al. 2007. « A Mammalian microRNA Expression Atlas Based on Small RNA Library Sequencing. » *Cell* 129 (7): 1401-14. doi:10.1016/j.cell.2007.04.040.
- Layde, P. M., L. A. Webster, A. L. Baughman, P. A. Wingo, G. L. Rubin, et H. W. Ory. 1989. « The Independent Associations of Parity, Age at First Full Term Pregnancy, and Duration of Breastfeeding with the Risk of Breast Cancer. Cancer and Steroid Hormone Study Group. » *Journal of Clinical Epidemiology* 42 (10): 963-73.
- Lee, Yoontae, Kipyong Jeon, Jun-Tae Lee, Sunyoung Kim, et V. Narry Kim. 2002. « MicroRNA Maturation: Stepwise Processing and Subcellular Localization. » *The EMBO Journal* 21 (17): 4663-70.
- Lehmann, U., B. Hasemeier, M. Christgen, M. Müller, D. Römermann, F. Länger, et H. Kreipe. 2008. « Epigenetic Inactivation of microRNA Gene Hsa-Mir-9-1 in Human Breast Cancer. » *The Journal of Pathology* 214 (1): 17-24. doi:10.1002/path.2251.

- Lewis, Benjamin P., Christopher B. Burge, et David P. Bartel. 2005. « Conserved Seed Pairing, Often Flanked by Adenosines, Indicates That Thousands of Human Genes Are microRNA Targets. » *Cell* 120 (1): 15-20. doi:10.1016/j.cell.2004.12.035.
- Lewis, Benjamin P., I-hung Shih, Matthew W. Jones-Rhoades, David P. Bartel, et Christopher B. Burge. 2003. « Prediction of Mammalian microRNA Targets. » *Cell* 115 (7): 787-98.
- Liao, Cheng-gong, Ling-min Kong, Ping Zhou, Xiu-li Yang, Jian-guo Huang, He-long Zhang, et Ning Lu. 2014. « miR-10b Is Overexpressed in Hepatocellular Carcinoma and Promotes Cell Proliferation, Migration and Invasion through RhoC, uPAR and MMPs. » *Journal of Translational Medicine* 12: 234. doi:10.1186/s12967-014-0234-x.
- Lim, Lee P., Margaret E. Glasner, Soraya Yekta, Christopher B. Burge, et David P. Bartel. 2003. « Vertebrate microRNA Genes. » *Science (New York, N.Y.)* 299 (5612): 1540. doi:10.1126/science.1080372.
- Lim, Lee P., Nelson C. Lau, Philip Garrett-Engele, Andrew Grimson, Janell M. Schelter, John Castle, David P. Bartel, Peter S. Linsley, et Jason M. Johnson. 2005. « Microarray Analysis Shows That Some microRNAs Downregulate Large Numbers of Target mRNAs. » *Nature* 433 (7027): 769-73. doi:10.1038/nature03315.
- Li, S., P. L. Chen, T. Subramanian, G. Chinnadurai, G. Tomlinson, C. K. Osborne, Z. D. Sharp, et W. H. Lee. 1999. « Binding of CtIP to the BRCT Repeats of BRCA1 Involved in the Transcription Regulation of p21 Is Disrupted upon DNA Damage. » *The Journal of Biological Chemistry* 274 (16): 11334-38.
- Little, M. P., C. R. Muirhead, R. G. Haylock, et J. M. Thomas. 1999. « Relative Risks of Radiation-Associated Cancer: Comparison of Second Cancer in Therapeutically Irradiated Populations with the Japanese Atomic Bomb Survivors. » *Radiation and Environmental Biophysics* 38 (4): 267-83.
- Liu, Huiping. 2012. « MicroRNAs in Breast Cancer Initiation and Progression. » *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS* 69 (21): 3587-99. doi:10.1007/s00018-012-1128-9.
- Liu, Peng, Hailin Tang, Bo Chen, Zhimin He, Min Deng, Mingqing Wu, Xiaoping Liu, Lu Yang, Feng Ye, et Xiaoming Xie. 2015. « miR-26a Suppresses Tumour Proliferation and Metastasis by Targeting Metadherin in Triple Negative Breast Cancer. » *Cancer Letters* 357 (1): 384-92. doi:10.1016/j.canlet.2014.11.050.
- Li, W., R. Duan, F. Kooy, S. L. Sherman, W. Zhou, et P. Jin. 2009. « Germline Mutation of microRNA-125a Is Associated with Breast Cancer. » *Journal of Medical Genetics* 46 (5): 358-60. doi:10.1136/jmg.2008.063123.
- Li, Xin, Justin J. Cassidy, Catherine A. Reinke, Stephen Fischboeck, et Richard W. Carthew. 2009. « A microRNA Imparts Robustness against Environmental Fluctuation during Development. » *Cell* 137 (2): 273-82. doi:10.1016/j.cell.2009.01.058.
- Lovering, R., I. M. Hanson, K. L. Borden, S. Martin, N. J. O'Reilly, G. I. Evan, D. Rahman, D. J. Pappin, J. Trowsdale, et P. S. Freemont. 1993. « Identification and Preliminary Characterization of a Protein Motif Related to the Zinc Finger. » *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 90 (6): 2112-16.
- Lu, M., S. D. Conzen, C. N. Cole, et B. A. Arrick. 1996. « Characterization of Functional Messenger RNA Splice Variants of BRCA1 Expressed in Nonmalignant and Tumor-Derived Breast Cells. » *Cancer Research* 56 (20): 4578-81.
- Lund, Elsebet, Stephan Güttinger, Angelo Calado, James E. Dahlberg, et Ulrike Kutay. 2004. « Nuclear Export of microRNA Precursors. » *Science (New York, N.Y.)* 303 (5654): 95-98. doi:10.1126/science.1090599.
- Lytle, J. Robin, Therese A. Yario, et Joan A. Steitz. 2007. « Target mRNAs Are Repressed as Efficiently by microRNA-Binding Sites in the 5' UTR as in the 3' UTR. » *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (23): 9667-72. doi:10.1073/pnas.0703820104.

- Magdinier, F., L. M. Billard, G. Wittmann, L. Frappart, M. Benchaïb, G. M. Lenoir, J. F. Guérin, et R. Dante. 2000. « Regional Methylation of the 5' End CpG Island of BRCA1 Is Associated with Reduced Gene Expression in Human Somatic Cells. » *FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 14 (11): 1585-94.
- Magdinier, F., S. Ribieras, G. M. Lenoir, L. Frappart, et R. Dante. 1998. « Down-Regulation of BRCA1 in Human Sporadic Breast Cancer; Analysis of DNA Methylation Patterns of the Putative Promoter Region. » *Oncogene* 17 (24): 3169-76. doi:10.1038/sj.onc.1202248.
- Mahfoudh, Wijden, Noureddine Bouaouina, Slim Ben Ahmed, Sallouha Gabbouj, Jingxuan Shan, Rebecca Mathew, Nancy Uhrhammer, et al. 2012. « Hereditary Breast Cancer in Middle Eastern and North African (MENA) Populations: Identification of Novel, Recurrent and Founder BRCA1 Mutations in the Tunisian Population. » *Molecular Biology Reports* 39 (2): 1037-46. doi:10.1007/s11033-011-0829-8.
- Makeyev, Eugene V., Jiangwen Zhang, Monica A. Carrasco, et Tom Maniatis. 2007. « The MicroRNA miR-124 Promotes Neuronal Differentiation by Triggering Brain-Specific Alternative Pre-mRNA Splicing. » *Molecular Cell* 27 (3): 435-48. doi:10.1016/j.molcel.2007.07.015.
- Ma, Li, Julie Teruya-Feldstein, et Robert A. Weinberg. 2007. « Tumour Invasion and Metastasis Initiated by microRNA-10b in Breast Cancer. » *Nature* 449 (7163): 682-88. doi:10.1038/nature06174.
- Matranga, Christian, Yukihide Tomari, Chanseok Shin, David P. Bartel, et Phillip D. Zamore. 2005. « Passenger-Strand Cleavage Facilitates Assembly of siRNA into Ago2-Containing RNAi Enzyme Complexes. » *Cell* 123 (4): 607-20. doi:10.1016/j.cell.2005.08.044.
- Matros, Evan, Zhigang C. Wang, Gabriela Lodeiro, Alexander Miron, J. Dirk Iglehart, et Andrea Richardson. 2005. « BRCA1 Promoter Methylation in Sporadic Breast Tumors: Relationship to Gene Expression Profiles. » *Breast Cancer Research and Treatment* 91 (2): 179-86. doi:10.1007/s10549-004-7603-8.
- Mayr, Christine, Michael T. Hemann, et David P. Bartel. 2007. « Disrupting the Pairing between Let-7 and Hmga2 Enhances Oncogenic Transformation. » *Science (New York, N.Y.)* 315 (5818): 1576-79. doi:10.1126/science.1137999.
- McPherson, K., C. M. Steel, et J. M. Dixon. 2000. « ABC of Breast Diseases. Breast Cancer-Epidemiology, Risk Factors, and Genetics. » *BMJ (Clinical Research Ed.)* 321 (7261): 624-28.
- Medina, Daniel. 2005. « Mammary Developmental Fate and Breast Cancer Risk. » *Endocrine-Related Cancer* 12 (3): 483-95. doi:10.1677/erc.1.00804.
- Merajver, S. D., T. M. Pham, R. F. Caduff, M. Chen, E. L. Poy, K. A. Cooney, B. L. Weber, F. S. Collins, C. Johnston, et T. S. Frank. 1995. « Somatic Mutations in the BRCA1 Gene in Sporadic Ovarian Tumours. » *Nature Genetics* 9 (4): 439-43. doi:10.1038/ng0495-439.
- Merviel, P., O. Jouvance, P. Naepels, R. Fauvet, R. Cabry-Goubet, O. Gagneur, et J. Gondry. 2011. « [Do there still exist risk factors for breast cancer?]. » *Gynécologie, Obstétrique & Fertilité* 39 (9): 486-90. doi:10.1016/j.gyobfe.2010.10.015.
- Mestiri, S., K. Monastiri, S. Ben Ahmed, N. Bouaouina, N. Presneau, Y. J. Bignon, H. Khairi, et L. Chouchane. 2000. « [Mutational analysis of breast/ovarian cancer hereditary predisposition gene BRCA1 in Tunisian women]. » *Archives De l'Institut Pasteur De Tunis* 77 (1-4): 11-15.
- Michels, Karin B., et Anders Ekblom. 2004. « Caloric Restriction and Incidence of Breast Cancer. » *JAMA* 291 (10): 1226-30. doi:10.1001/jama.291.10.1226.

- Miki, Y., J. Swensen, D. Shattuck-Eidens, P. A. Futreal, K. Harshman, S. Tavtigian, Q. Liu, C. Cochran, L. M. Bennett, et W. Ding. 1994. « A Strong Candidate for the Breast and Ovarian Cancer Susceptibility Gene BRCA1. » *Science (New York, N.Y.)* 266 (5182): 66-71.
- Miranda, Kevin C., Tien Huynh, Yvonne Tay, Yen-Sin Ang, Wai-Leong Tam, Andrew M. Thomson, Bing Lim, et Isidore Rigoutsos. 2006. « A Pattern-Based Method for the Identification of MicroRNA Binding Sites and Their Corresponding Heteroduplexes. » *Cell* 126 (6): 1203-17. doi:10.1016/j.cell.2006.07.031.
- Missaoui, Nabiha, Lilia Jaidene, Soumaya Ben Abdelkrim, Atef Ben Abdelkader, Nadia Beizig, Lilia Ben Yaacoub, Mohamed Tahar Yaacoubi, et Sihem Hmissa. 2011. « Breast Cancer in Tunisia: Clinical and Pathological Findings. » *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention: APJCP* 12 (1): 169-72.
- Monteys, Alex Mas, Ryan M. Spengler, Ji Wan, Luis Tecedor, Kimberly A. Lennox, Yi Xing, et Beverly L. Davidson. 2010. « Structure and Activity of Putative Intronic miRNA Promoters. » *RNA (New York, N.Y.)* 16 (3): 495-505. doi:10.1261/rna.1731910.
- Moskwa, Patryk, Francesca M. Buffa, Yunfeng Pan, Rohit Panchakshari, Ponnari Gottipati, Ruth J. Muschel, John Beech, et al. 2011. « miR-182-Mediated Downregulation of BRCA1 Impacts DNA Repair and Sensitivity to PARP Inhibitors. » *Molecular Cell* 41 (2): 210-20. doi:10.1016/j.molcel.2010.12.005.
- Mueller, Christopher R., et Calvin D. Roskelley. 2003. « Regulation of BRCA1 Expression and Its Relationship to Sporadic Breast Cancer. » *Breast Cancer Research: BCR* 5 (1): 45-52.
- Naguibneva, Irina, Maya Ameyar-Zazoua, Anna Polesskaya, Slimane Ait-Si-Ali, Reguina Groisman, Mouloud Souidi, Sylvain Cuvellier, et Annick Harel-Bellan. 2006. « The microRNA miR-181 Targets the Homeobox Protein Hox-A11 during Mammalian Myoblast Differentiation. » *Nature Cell Biology* 8 (3): 278-84. doi:10.1038/ncb1373.
- Newman, B., R. C. Millikan, et M. C. King. 1997. « Genetic Epidemiology of Breast and Ovarian Cancers. » *Epidemiologic Reviews* 19 (1): 69-79.
- Nissan, Xavier, Jérôme Alexandre Denis, Manoubia Saidani, Gilles Lemaitre, Marc Peschanski, et Christine Baldeschi. 2011. « miR-203 Modulates Epithelial Differentiation of Human Embryonic Stem Cells towards Epidermal Stratification. » *Developmental Biology* 356 (2): 506-15. doi:10.1016/j.ydbio.2011.06.004.
- Nkondjock, André, et Parviz Ghadirian. 2005. « [Risk factors and risk reduction of breast cancer]. » *Médecine Sciences: M/S* 21 (2): 175-80. doi:10.1051/medsci/2005212175.
- Nottrott, Stephanie, Martin J. Simard, et Joel D. Richter. 2006. « Human Let-7a miRNA Blocks Protein Production on Actively Translating Polyribosomes. » *Nature Structural & Molecular Biology* 13 (12): 1108-14. doi:10.1038/nsmb1173.
- O'Day, Elizabeth, et Ashish Lal. 2010. « MicroRNAs and Their Target Gene Networks in Breast Cancer. » *Breast Cancer Research: BCR* 12 (2): 201. doi:10.1186/bcr2484.
- O'Donnell, Kathryn A., Erik A. Wentzel, Karen I. Zeller, Chi V. Dang, et Joshua T. Mendell. 2005. « C-Myc-Regulated microRNAs Modulate E2F1 Expression. » *Nature* 435 (7043): 839-43. doi:10.1038/nature03677.
- O'Donovan, Peter J., et David M. Livingston. 2010. « BRCA1 and BRCA2: Breast/ovarian Cancer Susceptibility Gene Products and Participants in DNA Double-Strand Break Repair. » *Carcinogenesis* 31 (6): 961-67. doi:10.1093/carcin/bgq069.
- Okamura, Katsutomo, Joshua W. Hagen, Hong Duan, David M. Tyler, et Eric C. Lai. 2007. « The Mirtron Pathway Generates microRNA-Class Regulatory RNAs in *Drosophila*. » *Cell* 130 (1): 89-100. doi:10.1016/j.cell.2007.06.028.

- Olsen, P. H., et V. Ambros. 1999. « The Lin-4 Regulatory RNA Controls Developmental Timing in *Caenorhabditis Elegans* by Blocking LIN-14 Protein Synthesis after the Initiation of Translation. » *Developmental Biology* 216 (2): 671-80. doi:10.1006/dbio.1999.9523.
- Orban, T. I., et E. Olah. 2003. « Emerging Roles of BRCA1 Alternative Splicing. » *Molecular Pathology: MP* 56 (4): 191-97.
- Ørom, Ulf Andersson, Finn Cilius Nielsen, et Anders H. Lund. 2008. « MicroRNA-10a Binds the 5'UTR of Ribosomal Protein mRNAs and Enhances Their Translation. » *Molecular Cell* 30 (4): 460-71. doi:10.1016/j.molcel.2008.05.001.
- Ozçelik, H., M. D. To, J. Couture, S. B. Bull, et I. L. Andrulis. 1998. « Preferential Allelic Expression Can Lead to Reduced Expression of BRCA1 in Sporadic Breast Cancers. » *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer* 77 (1): 1-6.
- Ozsolak, Fatih, Laura L. Poling, Zhengxin Wang, Hui Liu, X. Shirley Liu, Robert G. Roeder, Xinmin Zhang, Jun S. Song, et David E. Fisher. 2008. « Chromatin Structure Analyses Identify miRNA Promoters. » *Genes & Development* 22 (22): 3172-83. doi:10.1101/gad.1706508.
- Pao, G. M., R. Janknecht, H. Ruffner, T. Hunter, et I. M. Verma. 2000. « CBP/p300 Interact with and Function as Transcriptional Coactivators of BRCA1. » *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97 (3): 1020-25.
- Papadopoulos, Giorgos L., Martin Reczko, Victor A. Simossis, Praveen Sethupathy, et Artemis G. Hatzigeorgiou. 2009. « The Database of Experimentally Supported Targets: A Functional Update of TarBase. » *Nucleic Acids Research* 37 (Database issue): D155-58. doi:10.1093/nar/gkn809.
- Parker, Roy, et Haiwei Song. 2004. « The Enzymes and Control of Eukaryotic mRNA Turnover. » *Nature Structural & Molecular Biology* 11 (2): 121-27. doi:10.1038/nsmb724.
- Pasquinelli, A. E., B. J. Reinhart, F. Slack, M. Q. Martindale, M. I. Kuroda, B. Maller, D. C. Hayward, et al. 2000. « Conservation of the Sequence and Temporal Expression of Let-7 Heterochronic Regulatory RNA. » *Nature* 408 (6808): 86-89. doi:10.1038/35040556.
- Pasquinelli, Amy E. 2012. « MicroRNAs and Their Targets: Recognition, Regulation and an Emerging Reciprocal Relationship. » *Nature Reviews. Genetics* 13 (4): 271-82. doi:10.1038/nrg3162.
- Perou, C. M., T. Sørlie, M. B. Eisen, M. van de Rijn, S. S. Jeffrey, C. A. Rees, J. R. Pollack, et al. 2000. « Molecular Portraits of Human Breast Tumours. » *Nature* 406 (6797): 747-52. doi:10.1038/35021093.
- Perrin-Vidoz, Laure, Olga M. Sinilnikova, Dominique Stoppa-Lyonnet, Gilbert M. Lenoir, et Sylvie Mazoyer. 2002. « The Nonsense-Mediated mRNA Decay Pathway Triggers Degradation of Most BRCA1 mRNAs Bearing Premature Termination Codons. » *Human Molecular Genetics* 11 (23): 2805-14.
- Petersen, Christian P., Marie-Eve Bordeleau, Jerry Pelletier, et Phillip A. Sharp. 2006. « Short RNAs Repress Translation after Initiation in Mammalian Cells. » *Molecular Cell* 21 (4): 533-42. doi:10.1016/j.molcel.2006.01.031.
- Petrakis, N. L., M. R. Wrensch, V. L. Ernster, R. Miike, J. Murai, N. Simberg, et P. K. Siiteri. 1987. « Influence of Pregnancy and Lactation on Serum and Breast Fluid Estrogen Levels: Implications for Breast Cancer Risk. » *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer* 40 (5): 587-91.
- Pharoah, P. D., N. E. Day, S. Duffy, D. F. Easton, et B. A. Ponder. 1997. « Family History and the Risk of Breast Cancer: A Systematic Review and Meta-Analysis. » *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer* 71 (5): 800-809.

- Pillai, Ramesh S., Suvendra N. Bhattacharyya, Caroline G. Artus, Tabea Zoller, Nicolas Cougot, Eugenia Basyuk, Edouard Bertrand, et Witold Filipowicz. 2005. « Inhibition of Translational Initiation by Let-7 MicroRNA in Human Cells. » *Science (New York, N.Y.)* 309 (5740): 1573-76. doi:10.1126/science.1115079.
- Poy, Matthew N., Lena Eliasson, Jan Krutzfeldt, Satoru Kuwajima, Xiaosong Ma, Patrick E. Macdonald, Sébastien Pfeffer, et al. 2004. « A Pancreatic Islet-Specific microRNA Regulates Insulin Secretion. » *Nature* 432 (7014): 226-30. doi:10.1038/nature03076.
- Privat, Maud, Corinne Aubel, Stéphanie Arnould, Yves Communal, Marc Ferrara, et Yves-Jean Bignon. 2009. « Breast Cancer Cell Response to Genistein Is Conditioned by BRCA1 Mutations. » *Biochemical and Biophysical Research Communications* 379 (3): 785-89. doi:10.1016/j.bbrc.2008.12.151.
- Rakha, Emad A., Somaia E. El-Sheikh, Mona A. Kandil, Maysa E. El-Sayed, Andrew R. Green, et Ian O. Ellis. 2008. « Expression of BRCA1 Protein in Breast Cancer and Its Prognostic Significance. » *Human Pathology* 39 (6): 857-65. doi:10.1016/j.humpath.2007.10.011.
- Reynolds, Peggy, Debbie Goldberg, Susan Hurley, David O. Nelson, Joan Largent, Katherine D. Henderson, et Leslie Bernstein. 2009. « Passive Smoking and Risk of Breast Cancer in the California Teachers Study. » *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention: A Publication of the American Association for Cancer Research, Cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* 18 (12): 3389-98. doi:10.1158/1055-9965.EPI-09-0936.
- Riaz, Muhammad, Marijn T. M. van Jaarsveld, Antoinette Hollestelle, Wendy J. C. Prager-van der Smissen, Anouk A. J. Heine, Antonius W. M. Boersma, Jingjing Liu, et al. 2013.
« miRNA Expression Profiling of 51 Human Breast Cancer Cell Lines Reveals Subtype and Driver Mutation-Specific miRNAs. » *Breast Cancer Research: BCR* 15 (2): R33. doi:10.1186/bcr3415.
- Roa, B. B., A. A. Boyd, K. Volcik, et C. S. Richards. 1996. « Ashkenazi Jewish Population Frequencies for Common Mutations in BRCA1 and BRCA2. » *Nature Genetics* 14 (2): 185-87. doi:10.1038/ng1096-185.
- Rodriguez, Antony, Sam Griffiths-Jones, Jennifer L. Ashurst, et Allan Bradley. 2004. « Identification of Mammalian microRNA Host Genes and Transcription Units. » *Genome Research* 14 (10A): 1902-10. doi:10.1101/gr.2722704.
- Rodríguez, J. A., et B. R. Henderson. 2000. « Identification of a Functional Nuclear Export Sequence in BRCA1. » *The Journal of Biological Chemistry* 275 (49): 38589-96. doi:10.1074/jbc.M003851200.
- Rohlf, E. M., N. Puget, M. L. Graham, B. L. Weber, J. E. Garber, C. Skrzynia, J. L. Halperin, G. M. Lenoir, L. M. Silverman, et S. Mazoyer. 2000. « An Alu-Mediated 7.1 Kb Deletion of BRCA1 Exons 8 and 9 in Breast and Ovarian Cancer Families That Results in Alternative Splicing of Exon 10. » *Genes, Chromosomes & Cancer* 28 (3): 300-307.
- Roldán, Gloria, Lucía Delgado, et Ignacio Miguel Musé. 2006. « Tumoral Expression of BRCA1, Estrogen Receptor Alpha and ID4 Protein in Patients with Sporadic Breast Cancer. » *Cancer Biology & Therapy* 5 (5): 505-10.
- Ronckers, Cécile M., Christine A. Erdmann, et Charles E. Land. 2005. « Radiation and Breast Cancer: A Review of Current Evidence. » *Breast Cancer Research: BCR* 7 (1): 21-32. doi:10.1186/bcr970.
- Rosa, Alessandro, et Ali H. Brivanlou. 2011. « A Regulatory Circuitry Comprised of miR-302 and the Transcription Factors OCT4 and NR2F2 Regulates Human Embryonic Stem Cell Differentiation. » *The EMBO Journal* 30 (2): 237-48. doi:10.1038/emboj.2010.319.

- Ruby, J. Graham, Calvin H. Jan, et David P. Bartel. 2007. « Intronic microRNA Precursors That Bypass Drosha Processing. » *Nature* 448 (7149): 83-86. doi:10.1038/nature05983.
- Rybak, Agnieszka, Heiko Fuchs, Lena Smirnova, Christine Brandt, Elena E. Pohl, Robert Nitsch, et F. Gregory Wulczyn. 2008. « A Feedback Loop Comprising Lin-28 and Let-7 Controls Pre-Let-7 Maturation during Neural Stem-Cell Commitment. » *Nature Cell Biology* 10 (8): 987-93. doi:10.1038/ncb1759.
- Saini, Harpreet Kaur, Sam Griffiths-Jones, et Anton James Enright. 2007. « Genomic Analysis of Human microRNA Transcripts. » *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104 (45): 17719-24. doi:10.1073/pnas.0703890104.
- Schmidt, M. E., J. Chang-Claude, T. Slinger, N. Obi, D. Flesch-Janys, et Karen Steindorf. 2009. « Physical Activity and Postmenopausal Breast Cancer: Effect Modification by Other Breast Cancer Risk Factors. » *Methods of Information in Medicine* 48 (5): 444-50. doi:10.3414/ME9239.
- Scully, R., S. F. Anderson, D. M. Chao, W. Wei, L. Ye, R. A. Young, D. M. Livingston, et J. D. Parvin. 1997. « BRCA1 Is a Component of the RNA Polymerase II Holoenzyme. » *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94 (11): 5605-10.
- Sekine, Shigeki, Reiko Ogawa, Rie Ito, Nobuyoshi Hiraoka, Michael T. McManus, Yae Kanai, et Matthias Hebrok. 2009. « Disruption of Dicer1 Induces Dysregulated Fetal Gene Expression and Promotes Hepatocarcinogenesis. » *Gastroenterology* 136 (7): 2304-15.e1-4. doi:10.1053/j.gastro.2009.02.067.
- Sempere, Lorenzo F., Sarah Freemantle, Ian Pitha-Rowe, Eric Moss, Ethan Dmitrovsky, et Victor Ambros. 2004. « Expression Profiling of Mammalian microRNAs Uncovers a Subset of Brain-Expressed microRNAs with Possible Roles in Murine and Human Neuronal Differentiation. » *Genome Biology* 5 (3): R13. doi:10.1186/gb-2004-5-3-r13.
- Seo, Jae Hong, Dae-Yeon Cho, Se-Hyun Ahn, Kyung-Sik Yoon, Chang-Soo Kang, Hyun Mi Cho, Hyeon Sook Lee, et al. 2004. « BRCA1 and BRCA2 Germline Mutations in Korean Patients with Sporadic Breast Cancer. » *Human Mutation* 24 (4): 350. doi:10.1002/humu.9275.
- Shen, Jie, Christine B. Ambrosone, Richard A. DiCioccio, Kunle Odunsi, Shashikant B. Lele, et Hua Zhao. 2008. « A Functional Polymorphism in the miR-146a Gene and Age of Familial Breast/ovarian Cancer Diagnosis. » *Carcinogenesis* 29 (10): 1963-66. doi:10.1093/carcin/bgn172.
- Shen, Wenjing, Min Song, Jie Liu, Guangrong Qiu, Tianren Li, Yanjie Hu, et Hongbo Liu. 2014. « MiR-26a Promotes Ovarian Cancer Proliferation and Tumorigenesis. » *PLoS One* 9 (1): e86871. doi:10.1371/journal.pone.0086871.
- Sheth, Ujwal, et Roy Parker. 2003. « Decapping and Decay of Messenger RNA Occur in Cytoplasmic Processing Bodies. » *Science (New York, N.Y.)* 300 (5620): 805-8. doi:10.1126/science.1082320.
- Silver, Daniel P., et David M. Livingston. 2012. « Mechanisms of BRCA1 Tumor Suppression. » *Cancer Discovery* 2 (8): 679-84. doi:10.1158/2159-8290.CD-12-0221.
- Simon, Ronald, Soti Panussis, Robert Maurer, Hanspeter Spichtin, Kathrin Glatz, Coya Tapia, Martina Mirlacher, Alex Ruffle, Joachim Torhorst, et Guido Sauter. 2004. « KIT (CD117)- Positive Breast Cancers Are Infrequent and Lack KIT Gene Mutations. » *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 10 (1 Pt 1): 178-83.
- Smith, T. M., M. K. Lee, C. I. Szabo, N. Jerome, M. McEuen, M. Taylor, L. Hood, et M. C. King. 1996. « Complete Genomic Sequence and Analysis of 117 Kb of Human DNA Containing the Gene BRCA1. » *Genome Research* 6 (11): 1029-49.

- Sobin, L. H. 2001. « TNM Classification: Clarification of Number of Regional Lymph Nodes for pN0. » *British Journal of Cancer* 85 (5): 780. doi:10.1054/bjoc.2001.1996.
- Sood, Pranidhi, Azra Krek, Mihaela Zavolan, Giuseppe Macino, et Nikolaus Rajewsky. 2006. « Cell-Type-Specific Signatures of microRNAs on Target mRNA Expression. » *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (8): 2746-51. doi:10.1073/pnas.0511045103.
- Sørli, T., C. M. Perou, R. Tibshirani, T. Aas, S. Geisler, H. Johnsen, T. Hastie, et al. 2001. « Gene Expression Patterns of Breast Carcinomas Distinguish Tumor Subclasses with Clinical Implications. » *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98 (19): 10869-74. doi:10.1073/pnas.191367098.
- Stark, Alexander, Julius Brennecke, Natascha Bushati, Robert B. Russell, et Stephen M. Cohen. 2005. « Animal MicroRNAs Confer Robustness to Gene Expression and Have a Significant Impact on 3'UTR Evolution. » *Cell* 123 (6): 1133-46. doi:10.1016/j.cell.2005.11.023.
- Strauss, William M., Caifu Chen, Chung-Tien Lee, et Dana Ridzon. 2006. « Nonrestrictive Developmental Regulation of microRNA Gene Expression. » *Mammalian Genome: Official Journal of the International Mammalian Genome Society* 17 (8): 833-40. doi:10.1007/s00335-006-0025-7.
- Stückrath, Isabel, Brigitte Rack, Wolfgang Janni, Bernadette Jäger, Klaus Pantel, et Heidi Schwarzenbach. 2015. « Aberrant Plasma Levels of Circulating miR-16, miR-107, miR-130a and miR-146a Are Associated with Lymph Node Metastasis and Receptor Status of Breast Cancer Patients. » *Oncotarget* 6 (15): 13387-401.
- Sugito, Nobuyoshi, Hideyuki Ishiguro, Yoshiyuki Kuwabara, Masahiro Kimura, Akira Mitsui, Hiroki Kurehara, Takuya Ando, et al. 2006. « RNASEN Regulates Cell Proliferation and Affects Survival in Esophageal Cancer Patients. » *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research* 12 (24): 7322-28. doi:10.1158/1078-0432.CCR-06-0515.
- Sylvestre, Yannick, Vincent De Guire, Emmanuelle Querido, Utpal K. Mukhopadhyay, Véronique Bourdeau, François Major, Gerardo Ferbeyre, et Pascal Chartrand. 2007. « An E2F/miR-20a Autoregulatory Feedback Loop. » *The Journal of Biological Chemistry* 282 (4): 2135-43. doi:10.1074/jbc.M608939200.
- Takahashi, Ryou-U., Hiroaki Miyazaki, et Takahiro Ochiya. 2015. « The Roles of MicroRNAs in Breast Cancer. » *Cancers* 7 (2): 598-616. doi:10.3390/cancers7020598.
- Thakur, S., H. B. Zhang, Y. Peng, H. Le, B. Carroll, T. Ward, J. Yao, et al. 1997. « Localization of BRCA1 and a Splice Variant Identifies the Nuclear Localization Signal. » *Molecular and Cellular Biology* 17 (1): 444-52.
- Thompson, Deborah, et Douglas Easton. 2004. « The Genetic Epidemiology of Breast Cancer Genes. » *Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia* 9 (3): 221-36. doi:10.1023/B:JOMG.0000048770.90334.3b.
- Thompson, M. E., R. A. Jensen, P. S. Obermiller, D. L. Page, et J. T. Holt. 1995. « Decreased Expression of BRCA1 Accelerates Growth and Is Often Present during Sporadic Breast Cancer Progression. » *Nature Genetics* 9 (4): 444-50. doi:10.1038/ng0495-444.
- Tubiana, M., et S. Koscielny. 1987. « [Natural history of human cancer and prognostic factors. The example of breast cancer]. » *Bulletin Du Cancer* 74 (1): 43-57.
- . 1990. « The Natural History of Breast Cancer: Implications for a Screening Strategy. » *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics* 19 (5): 1117-20.
- Turnbull, Clare, et Nazneen Rahman. 2008. « Genetic Predisposition to Breast Cancer: Past, Present, and Future. » *Annual Review of Genomics and Human Genetics* 9: 321-45. doi:10.1146/annurev.genom.9.081307.164339.

- Turner, N. C., et J. S. Reis-Filho. 2006. « Basal-like Breast Cancer and the BRCA1 Phenotype. » *Oncogene* 25 (43): 5846-53. doi:10.1038/sj.onc.1209876.
- Turner, N. C., J. S. Reis-Filho, A. M. Russell, R. J. Springall, K. Ryder, D. Steele, K. Savage, et al. 2007. « BRCA1 Dysfunction in Sporadic Basal-like Breast Cancer. » *Oncogene* 26 (14): 2126-32. doi:10.1038/sj.onc.1210014.
- Valentin, Mev Dominguez, Sabrina Daniela da Silva, Maud Privat, Moulay Alaoui-Jamali, et Yves-Jean Bignon. 2012. « Molecular Insights on Basal-like Breast Cancer. » *Breast Cancer Research and Treatment* 134 (1): 21-30. doi:10.1007/s10549-011-1934-z.
- Vasudevan, Shobha, Yingchun Tong, et Joan A. Steitz. 2007. « Switching from Repression to Activation: microRNAs Can up-Regulate Translation. » *Science (New York, N.Y.)* 318 (5858): 1931-34. doi:10.1126/science.1149460.
- Venkitaraman, A. R. 2001. « Functions of BRCA1 and BRCA2 in the Biological Response to DNA Damage. » *Journal of Cell Science* 114 (Pt 20): 3591-98.
- Vester, Birte, et Jesper Wengel. 2004. « LNA (locked Nucleic Acid): High-Affinity Targeting of Complementary RNA and DNA. » *Biochemistry* 43 (42): 13233-41. doi:10.1021/bi0485732.
- Vincent-Salomon, A., G. Macgrogan, E. Charaffe-Jauffret, J. Jacquemier, et L. Arnaud. 2010. « [Identification of basal-like carcinomas in clinical practice: —triple zero/BRCA1-likel carcinomas]». *Bulletin Du Cancer* 97 (3): 357-63. doi:10.1684/bdc.2010.1062.
- Visvanathan, Jaya, Seunghye Lee, Bora Lee, Jae W. Lee, et Soo-Kyung Lee. 2007. « The microRNA miR-124 Antagonizes the Anti-Neural REST/SCP1 Pathway during Embryonic CNS Development. » *Genes & Development* 21 (7): 744-49. doi:10.1101/gad.1519107.
- Wakeford, Richard. 2004. « The Cancer Epidemiology of Radiation. » *Oncogene* 23 (38): 6404-28. doi:10.1038/sj.onc.1207896.
- Wang, Vivien, et Wei Wu. 2009. « MicroRNA-Based Therapeutics for Cancer. » *BioDrugs: Clinical Immunotherapeutics, Biopharmaceuticals and Gene Therapy* 23 (1): 15-23.
- Wang, Wei, et Yun-ping Luo. 2015. « MicroRNAs in Breast Cancer: Oncogene and Tumor Suppressors with Clinical Potential. » *Journal of Zhejiang University. Science. B* 16 (1):18-31. doi:10.1631/jzus.B1400184.
- Wang, Y., D. Cortez, P. Yazdi, N. Neff, S. J. Elledge, et J. Qin. 2000. « BASC, a Super Complex of BRCA1-Associated Proteins Involved in the Recognition and Repair of Aberrant DNA Structures. » *Genes & Development* 14 (8): 927-39.
- Welsh, P. L., et M. C. King. 2001. « BRCA1 and BRCA2 and the Genetics of Breast and Ovarian Cancer. » *Human Molecular Genetics* 10 (7): 705-13.
- Wenten, Madé, Frank D. Gilliland, Kathy Baumgartner, et Jonathan M. Samet. 2002. « Associations of Weight, Weight Change, and Body Mass with Breast Cancer Risk in Hispanic and Non-Hispanic White Women. » *Annals of Epidemiology* 12 (6): 435-434.
- Wen, Yong Hannah, Alice Ho, Sujata Patil, Muzaffar Akram, Jeff Catalano, Anne Eaton, Larry Norton, Robert Benezra, et Edi Brogi. 2012. « Id4 Protein Is Highly Expressed in Triple- Negative Breast Carcinomas: Possible Implications for BRCA1 Downregulation. » *Breast Cancer Research and Treatment* 135 (1): 93-102. doi:10.1007/s10549-012-2070-0.
- Wickramasinghe, Nalinie S., Tissa T. Manavalan, Susan M. Dougherty, Krista A. Riggs, Yong Li, et Carolyn M. Klinge. 2009. « Estradiol Downregulates miR-21 Expression and Increases miR-21 Target Gene Expression in MCF-7 Breast Cancer Cells. » *Nucleic Acids Research* 37 (8): 2584-95. doi:10.1093/nar/gkp117.
- Wiestner, Adrian, Mahsa Tehrani, Michael Chiorazzi, George Wright, Federica Gibellini,





- Kazutaka Nakayama, Hui Liu, et al. 2007. « Point Mutations and Genomic Deletions in CCND1 Create Stable Truncated Cyclin D1 mRNAs That Are Associated with Increased Proliferation Rate and Shorter Survival. » *Blood* 109 (11): 4599-4606. doi:10.1182/blood-2006-08-039859.
- Wilson, C. A., M. N. Payton, G. S. Elliott, F. W. Buaas, E. E. Cajulis, D. Grosshans, L. Ramos, D. M. Reese, D. J. Slamon, et F. J. Calzone. 1997. « Differential Subcellular Localization, Expression and Biological Toxicity of BRCA1 and the Splice Variant BRCA1-delta11b. » *Oncogene* 14 (1): 1-16. doi:10.1038/sj.onc.1200924.
- Wolpert, N., E. Warner, M. F. Seminsky, A. Futreal, et S. A. Narod. 2000. « Prevalence of BRCA1 and BRCA2 Mutations in Male Breast Cancer Patients in Canada. » *Clinical Breast Cancer* 1 (1): 57-63; discussion 64-65. doi:10.3816/CBC.2000.n.005.
- Wong, Piu, Masayuki Iwasaki, Tim C. P. Somerville, Francesca Ficara, Christine Carico, Christopher Arnold, Chang-Zheng Chen, et Michael L. Cleary. 2010. « The miR-17-92 microRNA Polycistron Regulates MLL Leukemia Stem Cell Potential by Modulating p21 Expression. » *Cancer Research* 70 (9): 3833-42. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-3268.
- Woods, Keith, J. Michael Thomson, et Scott M. Hammond. 2007. « Direct Regulation of an Oncogenic Micro-RNA Cluster by E2F Transcription Factors. » *The Journal of Biological Chemistry* 282 (4): 2130-34. doi:10.1074/jbc.C600252200.
- Wooster, R., G. Bignell, J. Lancaster, S. Swift, S. Seal, J. Mangion, N. Collins, S. Gregory, C. Gumbs, et G. Micklem. 1995. « Identification of the Breast Cancer Susceptibility Gene BRCA2. » *Nature* 378 (6559): 789-92. doi:10.1038/378789a0.
- Wooster, Richard, et Barbara L. Weber. 2003. « Breast and Ovarian Cancer. » *The New England Journal of Medicine* 348 (23): 2339-47. doi:10.1056/NEJMra012284.
- Wu, Ligang, Jihua Fan, et Joel G. Belasco. 2006. « MicroRNAs Direct Rapid Deadenylation of mRNA. » *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 103 (11): 4034-39. doi:10.1073/pnas.0510928103.
- Wu, Ziqing, Benfu He, Jincan He, et Xiangming Mao. 2013. « Upregulation of miR-153 Promotes Cell Proliferation via Downregulation of the PTEN Tumor Suppressor Gene in Human Prostate Cancer. » *The Prostate* 73 (6): 596-604. doi:10.1002/pros.22600.
- Xu, Teng, Ying Zhu, Qing-Kun Wei, Yunfei Yuan, Fan Zhou, Yi-Yuan Ge, Jian-Rong Yang, Hang Su, et Shi-Mei Zhuang. 2008. « A Functional Polymorphism in the miR-146a Gene Is Associated with the Risk for Hepatocellular Carcinoma. » *Carcinogenesis* 29 (11): 2126-31. doi:10.1093/carcin/bgn195.
- Xu, X., Z. Weaver, S. P. Linke, C. Li, J. Gotay, X. W. Wang, C. C. Harris, T. Ried, et C. X. Deng. 1999. « Centrosome Amplification and a Defective G2-M Cell Cycle Checkpoint Induce Genetic Instability in BRCA1 Exon 11 Isoform-Deficient Cells. » *Molecular Cell* 3 (3): 389-95.
- Yang, X., et M. E. Lippman. 1999. « BRCA1 and BRCA2 in Breast Cancer. » *Breast Cancer Research and Treatment* 54 (1): 1-10.
- Yarden, R. I., et L. C. Brody. 1999. « BRCA1 Interacts with Components of the Histone Deacetylase Complex. » *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96 (9): 4983-88.
- Yi, Rui, Dónal O'Carroll, Hilda A. Pasolli, Zhihong Zhang, Fred S. Dietrich, Alexander Tarakhovsky, et Elaine Fuchs. 2006. « Morphogenesis in Skin Is Governed by Discrete Sets of Differentially Expressed microRNAs. » *Nature Genetics* 38 (3): 356-62. doi:10.1038/ng1744.
- Yi, Rui, Yi Qin, Ian G. Macara, et Bryan R. Cullen. 2003. « Exportin-5 Mediates the Nuclear Export of Pre-microRNAs and Short Hairpin RNAs. » *Genes & Development* 17 (24):

- 3011-16. doi:10.1101/gad.1158803.
- Yoshida, Kiyotsugu, et Yoshio Miki. 2004. « Role of BRCA1 and BRCA2 as Regulators of DNA Repair, Transcription, and Cell Cycle in Response to DNA Damage. » *Cancer Science* 95 (11): 866-71.
- Yu, H. 1998. « Alcohol Consumption and Breast Cancer Risk. » *JAMA* 280 (13): 1138-39.
- Yu, Zhenbao, Zhen Li, Normand Jolicoeur, Linhua Zhang, Yves Fortin, Edwin Wang, Meiqun Wu, et Shi-Hsiang Shen. 2007. « Aberrant Allele Frequencies of the SNPs Located in microRNA Target Sites Are Potentially Associated with Human Cancers. » *Nucleic Acids Research* 35 (13): 4535-41. doi:10.1093/nar/gkm480.
- Zhang, Baohong, Xiaoping Pan, Charles H. Cannon, George P. Cobb, et Todd A. Anderson. 2006. « Conservation and Divergence of Plant microRNA Genes. » *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology* 46 (2): 243-59. doi:10.1111/j.1365-313X.2006.02697.x.
- Zhao, Shiguang, Yifan Deng, Yaohua Liu, Xin Chen, Guang Yang, Yulong Mu, Daming Zhang, Jianhao Kang, et Zhaoli Wu. 2013. « MicroRNA-153 Is Tumor Suppressive in Glioblastoma Stem Cells. » *Molecular Biology Reports* 40 (4): 2789-98. doi:10.1007/s11033-012-2278-4.

ANNEXES

Annexe 1: Protocole de l'électrophorèse miniature sur puce Agilent Nano 6000

Le kit utilisé est le RNA 6000 Nano kit (Agilent)

- Equilibrer le RNA 6000 Nano dye à température ambiante (30 min),
- Nettoyage du bioanalyser :
 - Remplir une puce cleanser avec 350 µl de RNase ZAP, la placer dans le bioanalyser, fermer et attendre 1 min
 - Remplir la puce cleanser avec 350 µl d'H₂O DEPC, la placer dans le bioanalyser, fermer et attendre 1 min
 - Retirer la puce cleanser et laisser sécher pendant 1 min,
- Filtrer 550µl de RNA 6000 Nano gel par centrifugation à 1500g pendant 10 minutes
- Mélanger 65µl de gel filtré avec 1 µl de dye (colorant bleu) et homogénéiser
- Centrifuger ce mélange à 13000g pendant 10 minutes
- Déposer 9µl dans le puits  de la puce RNA 6000 Nano chip puis placer la puce dans la station « chip priming »
- Une fois la station fermée, exercer une pression avec la seringue en la poussant de 1mL jusqu'à la position clip et la laisser dans cette position pendant 30 secondes
- Lâcher la seringue remonter jusqu'à 1 mL
- Ouvrir la station et déposer 9µl dans chacun des deux autres puits ,
- Déposer 5µl de RNA 6000 Nano marker dans chacun des 12 puits « échantillons » et le puits ,
- Dénaturer les échantillons et le marqueur de taille (ladder) à 72°C pendant 2 minutes puis laisser à 4°C pendant 5 minutes
- Déposer 1µl d'échantillon dans chacun des 12 puits « échantillons » et 1µl de ladder dans le puits ,

- Vortexer la puce pendant 1 minute à 2200 rpm
- Placer la puce dans le bioanalyseur 2100 et lancer l'analyse

Annexe 2 : Protocole de test de prolifération CCK-8 (Cell Counting Kit-8, Sigma-Aldrich)

- Ensemencer 100 ul de la suspension cellulaire (3000 cellules) par puits dans une plaque de 96 puits,
- Pré-incuber la plaque dans un incubateur humidifié (par exemple, à 37 ° C, 5% CO₂),
- Décongeler le CCK-8 sur la paillasse ou dans un bain d'eau à 37 ° C si elle est gelée,
Remarque: Il faut environ 30 minutes sur la paillasse à 25 ° C ou 5 minutes dans un bain d'eau à 37 ° C,
- Ajouter 10 ul de la solution CCK-8 dans chaque puits de la plaque,
Remarque: Veillez à ne pas introduire de bulles d'air dans les puits, car ils interfèrent avec la lecture de DO,
- Incuber la plaque pendant 1 à 4 heures dans l'incubateur,
- Mesurer l'absorbance à 450 nm en utilisant un lecteur de microplaques, Préparer une courbe d'étalonnage en utilisant les données obtenue à partir des puits contenant des nombres connus de cellules viables.

Annexe 3: Tableau A1. Profilage de microARN impliqués dans des lignées cellulaires de cancer du sein humain par miScript-miRNA PCR array**lors de la comparaison des sous-groupes de lignées de cellules**

P o s i t i o n	miARN	SUM1315-LXSN / SUM1315-BRCA1		Basal BRCA1+/ Luminal		Basal BRCA1- / Luminal		Tumoral / Benin		Basal BRCA1- / Benin		Basal BRCA1+ / Benin	
		P-value	Fold Change	P-value	Fold Change	P-value	Fold Change	P-value	Fold Change	P-value	Fold Change	P-value	Fold Change
A01	hsa-let-7a	0,469253	1,2454	0,451748	1,1716	0,465739	1,1461	0,332273	1,2693	0,271989	1,398	0,342044	1,2768
A02	hsa-let-7b	0,400036	1,4581	0,276644	1,8753	0,011316	2,3619	0,049674	0,6215	0,00895	0,7217	0,146702	0,6051
A03	hsa-let-7c	0,131373	1,7569	0,273363	1,5853	0,033661	2,5104	0,171181	0,588	0,415024	0,7358	0,097511	0,5356
A04	hsa-let-7d	0,519456	1,3574	0,05843	7,0823	0,08087	6,1314	0,813039	0,7335	0,78608	0,924	0,434712	1,3368
A05	hsa-let-7e	0,832377	1,09	0,001074	0,2282	0,720027	0,4832	0,494518	1,5286	0,441067	1,8101	0,876171	0,7366
A06	hsa-let-7f	0,754349	1,1444	0,819956	6,4894	0,681191	5,883	0,049675	0,1797	0,068761	0,1911	0,079019	0,2821
A07	hsa-let-7g	0,401202	0,4536	0,107909	2,7472	0,383246	1,5082	0,261246	2,3501	0,260056	2,9129	0,133258	3,6023
A08	hsa-let-7i	0,220154	0,3626	0,307287	2,6645	0,623206	0,7735	0,61639	0,7509	0,727939	0,4269	0,338909	1,9028
A09	hsa-miR-100	0,234795	0,2913	0,454356	3,9889	0,734902	3,4055	0,478102	0,3366	0,615838	0,368	0,442542	0,6344
A10	hsa-miR-100	0,050458	0,3506	0,001755	6,8781	0,089255	2,3552	0,083607	3,9718	0,079619	4,156	0,016105	10,7799
A11	hsa-miR-107	0,088762	0,4442	0,29817	0,6287	0,207663	0,5752	0,936822	0,6421	0,706626	0,5518	0,585885	0,5886
A12	hsa-miR-10a	0,07997	0,2722	0,940159	3,4479	0,852	2,612	0,73643	0,6049	0,817643	0,6805	0,805493	0,8916
B01	hsa-miR-10b	0,011425	3,2233	0,007324	12,9602	0,101812	8,793	0,362882	3,4673	0,287624	4,8273	0,051559	9,5911
B02	hsa-miR-125b	0,639155	0,958	0,401507	27,6063	0,06997	49,389	0,115709	0,2446	0,426421	0,6752	0,000497	0,3244
B03	hsa-miR-125b-1*	0,194125	1,5046	0,493866	0,8862	0,970605	1,036	0,984631	0,9589	0,762864	0,9128	0,627365	0,8769
B04	hsa-miR-128	0,196314	2,1778	0,198812	0,6192	0,674585	1,1542	0,502332	0,597	0,706964	0,6055	0,013267	0,377
B05	hsa-miR-129-5p	0,034735	3,5341	0,439516	1,3659	0,251175	1,7661	0,214975	1,9479	0,267896	1,9406	0,22106	2,0826
B06	hsa-miR-130a	0,711652	1,2636	0,064341	0,1058	0,447349	0,2819	0,416946	7,2707	0,47711	5,1394	0,381591	2,7698
B07	hsa-miR-130b	0,137661	0,4231	0,388706	2,5094	0,599461	0,2927	0,391644	88,1397	0,480983	31,9807	0,370133	281,5547
B08	hsa-miR-132	0,406709	0,4408	0,132892	0,5987	0,136735	1,4989	0,392595	0,2986	0,518551	0,3246	0,54822	0,1944
B09	hsa-miR-140-5p	0,206494	0,245	0,22215	5,173	0,236613	1,4842	0,0091	0,0462	0	0,0281	0,274647	0,1439
B10	hsa-miR-141	0,383899	0,2326	0,150868	79,4607	0,330206	9,3667	0,158092	5,5684	0,149696	8,9658	0,186156	43,9233
B11	hsa-miR-145	0,336048	0,6805	0,222411	3,6652	0,059637	6,5288	0,895238	0,1456	0,54594	0,2072	0,780475	0,1469
B12	hsa-miR-148a	0,083871	0,2138	0,669094	7,8709	0,225063	1,0125	0,144133	11,5739	0,22712	8,2421	0,033442	54,5418
C01	hsa-miR-152	0,906046	1,2645	0,330944	0,2451	0,423747	0,5771	0,302759	0,0572	0,182401	0,0459	0,143721	0,0323
C02	hsa-miR-155	0,762532	1,1446	0,823646	1,1223	0,155566	1,5881	0,0008	0,404	0,010293	0,4489	0,002207	0,3286
C03	hsa-miR-15a	0,152132	0,5705	0,56079	0,7811	0,113665	0,3536	0,345066	0,4777	0,180679	0,2869	0,521669	0,7282

C04	hsa-miR-15b	0,283092	0,6381	0,365442	0,6663	0,002104	0,3133	0,188548	0,4498	0,006806	0,2578	0,47072	0,6561
C05	hsa-miR-16	0,021205	0,4883	0,249481	0,7741	0,018619	0,389	0,579982	0,6476	0,209927	0,429	0,987053	0,9484
C06	hsa-miR-17	0,460655	1,3071	0,483963	0,8794	0,493439	0,6375	0,358817	1,845	0,538589	1,0944	0,363264	2,6012
C07	hsa-miR-181a	0,154729	0,29	0,282546	3,6491	0,027765	0,3799	0,536072	1,878	0,712017	0,6481	0,356875	6,2744
C08	hsa-miR-181b	0,291721	0,2439	0,368888	1,6382	0,884094	0,7124	0,467689	0,9326	0,752849	0,5973	0,340852	1,725
C09	hsa-miR-181c	0,370257	0,3666	0,325741	1,9559	0,603413	2,2121	0,10154	110,3344	0,091344	332,4333	0,208147	84,0685
C10	hsa-miR-181d	0,601881	0,6408	0,360575	0,2221	0,233516	1,986	0,850268	0,0242	0,469693	0,0235	0,601622	0,0051
C11	hsa-miR-182	0,478556	0,5725	0,416928	0,9716	0,60816	0,8693	0,96461	0,5391	0,869506	0,4442	0,5223	0,5668
C12	hsa-miR-186	0,461058	0,6497	0,42272	0,541	0,810164	0,6754	0,934304	0,5632	0,969198	0,4777	0,621338	0,4342
D01	hsa-miR-18a	0,540006	1,0865	0,449859	3,6853	0,4221	1,6177	0,234719	124,9598	0,256128	157,7433	0,289658	208,0168
D02	hsa-miR-193b	0,390447	1,3069	0,623935	1,1859	0,048065	2,0229	0,02047	0,4637	0,126616	0,5759	0,001132	0,354
D03	hsa-miR-195	0,499477	1,3143	0,470529	1,2456	0,036352	2,591	0,549694	0,6518	0,87054	0,908	0,010839	0,4262
D04	hsa-miR-199b-3p	0,111151	2,2692	0,010171	0,0018	0,077262	0,0095	0,545812	0,0331	0,467835	0,0161	0,000012	0,002
D05	hsa-miR-199a-5p	0,617542	1,6453	0,00413	0,0031	0,23485	0,015	0,552305	0,0458	0,647071	0,0241	0,000001	0,0032
D06	hsa-miR-19a	0,590382	1,3931	0,002482	0,0223	0,577777	0,1175	0,913586	0,2124	0,815983	0,1439	0,000235	0,032
D07	hsa-miR-19b	0,474861	0,46	0,684759	0,7242	0,698541	0,115	0,404637	56,8953	0,481029	28,0364	0,372187	93,2699
D08	hsa-miR-200a	0,063425	0,6542	0,059845	0,0109	0,013379	0,0593	0,500598	14,8467	0,479197	14,067	0,10352	1,6625
D09	hsa-miR-200b	0,43229	0,9022	0,013378	0,0251	0,042209	0,0317	0,287583	0,7927	0,390843	0,19	0,569904	0,2581
D10	hsa-miR-200c	0,407907	1,0381	0,491997	0,281	0,417578	0,4298	0,938565	0,2497	0,725703	0,1586	0,746001	0,1396
D11	hsa-miR-202	0,483687	0,4866	0,27315	2,8408	0,596867	1,4596	0,161982	134,6975	0,183105	240,3853	0,122913	194,3654
D12	hsa-miR-203	0,010841	0,5723	0,045323	0,2936	0,517595	0,7677	0,507851	3,3503	0,448069	4,4262	0,226658	1,6181
E01	hsa-miR-204	0,227354	0,5228	0,371369	1,3492	0,44212	2,0208	0,479526	0,0039	0,113713	0,0019	0,955669	0,0033
E02	hsa-miR-205	0,140759	1,7041	0,257555	1,7457	0,067869	2,9439	0,23335	0,477	0,593337	0,6343	0,011241	0,4268
E03	hsa-miR-206	0,014389	4,4807	0,001196	0,3735	0,986186	0,8074	0,471136	0,7013	0,581031	0,6964	0,001707	0,3929
E04	hsa-miR-20a	0,4298	1,1991	0,014781	0,3414	0,947259	0,7457	0,685477	0,5269	0,952524	0,5869	0,000064	0,2448
E05	hsa-miR-20b	0,264255	1,4673	0,011795	0,3422	0,416338	0,5973	0,184409	1,7482	0,290386	1,677	0,550439	1,1021
E06	hsa-miR-21	0,763083	1,0273	0,293824	6,6427	0,369923	1,2406	0,144538	62,6266	0,139161	100,6191	0,133975	192,9737
E07	hsa-miR-210	0,114294	0,245	0,013935	40,4232	0,019922	11,1123	0,522755	0,2719	0,012176	0,2966	0,436758	1,2335
E08	hsa-miR-212	0,133809	0,0001	0,241133	261592	0,126867	58,7772	0,588194	1927,7515	0,172775	882,3522	0,373531	1410341
E09	hsa-miR-214	0,146047	0,3618	0,060457	0,0788	0,42215	0,3051	0,586949	0,7613	0,481683	0,8375	0,001095	0,1447
E10	hsa-miR-22	0,106475	0,5304	0,261676	1,018	0,964339	0,0733	0,539003	56,7584	0,481413	14,5349	0,373897	128,7592
E11	hsa-miR-222	0,466236	0,5721	0,981617	0,2082	0,623623	1,2687	0,2485	0,0011	0,418722	0,0007	0,120749	0,0003
E12	hsa-miR-223	0,073881	0,4282	0,03811	2,338	0,318406	1,4496	0,373951	1,4428	0,36384	1,5862	0,140318	2,029
F01	hsa-miR-25	0,644243	1,3701	0,002985	0,1634	0,001676	0,2936	0,215991	0,4249	0,029041	0,3478	0,00033	0,1878
F02	hsa-miR-26a	0,135969	1,8372	0,001667	7,6693	0,004885	10,0705	0,015589	0,3296	0,043122	0,5218	0,012046	0,466
F03	hsa-miR-26b	0,10626	1,9566	0,28623	1,7335	0,032691	2,9249	0,004468	0,3604	0,04033	0,4647	0,001027	0,2984
F04	hsa-miR-27a	0,09464	2,2183	0,293603	1,1245	0,492191	1,6024	0,106726	0,4236	0,012294	0,4431	0,007305	0,3622
F05	hsa-miR-27b	0,142492	1,6041	0,062118	218,2051	0,021747	1718,6649	0,830538	0,037	0,491623	0,354	0,840375	0,066
F06	hsa-miR-29a	0,833361	0,7	0,34789	0,7113	0,983621	1,7416	0,138083	0,0401	0,238396	0,0425	0,023089	0,0283
F07	hsa-miR-29b	0,101773	0,5291	0,103239	0,416	0,033075	0,6055	0,86313	0,4644	0,614604	0,4702	0,165825	0,3098
F08	hsa-miR-29c	0,614969	0,0236	0,580236	0,7927	0,760509	0,2494	0,04403	0,023	0,008878	0,0078	0,315031	0,0545

F09	hsa-miR-31	0,000931	0,4987	0,087094	9,1877	0,012151	13,1578	0,562748	0,5057	0,482316	1,1053	0,574516	0,7326
F10	hsa-miR-328	0,004233	0,5144	0,005365	0,3768	0,000036	0,2827	0,30473	1,6477	0,357346	1,1756	0,040355	1,4693
F11	hsa-miR-340	0,567209	0,6311	0,619011	0,6189	0,745333	0,6703	0,75512	0,4068	0,994503	0,2647	0,672312	0,3672
F12	hsa-miR-424	0,340829	0,3507	0,057056	3,9618	0,133012	1,761	0,145946	4,4278	0,096081	5,8301	0,127699	8,3036
G01	hsa-miR-429	0,300652	0,6137	0,000134	0,0648	0,40497	0,099	0,456907	0,8243	0,575216	0,4005	0,46761	0,2519
G02	hsa-miR-485-5p	0,7366	0,9263	0,004716	0,3224	0,026302	0,4658	0,039434	3,4267	0,049025	3,1811	0,149457	1,8099
G03	hsa-miR-489	0,36887	0,7306	0,043032	0,6521	0,000541	0,5161	0,327518	0,7269	0,016185	0,5595	0,405062	0,7764
G04	hsa-miR-495	0,93886	1,3248	0,842543	0,7061	0,306362	0,5014	0,151699	0,4597	0,012346	0,2955	0,499997	0,5347
G05	hsa-miR-497	0,091555	2,5543	0,000028	0,2295	0,797524	0,5693	0,380853	1,7364	0,37718	1,6757	0,460118	0,7286
G06	hsa-miR-548c-3p	0,622605	1,1746	0,025928	0,0271	0,00254	0,0324	0,389968	0,9443	0,228851	0,8399	0,520505	0,2845
G07	hsa-miR-607	0,006152	0,2242	0,967755	0,9146	0,388084	0,0959	0,10221	3,1351	0,285478	1,1444	0,043534	10,5568
G08	hsa-miR-613	0,006874	0,2304	0,437628	0,8391	0,264278	0,3769	0,502481	0,4989	0,442758	0,3496	0,298887	0,732
G09	hsa-miR-7	0,355029	0,5569	0,077829	6,5304	0,324229	1,0485	0,309827	36,4571	0,312311	41,4747	0,162463	133,7477
G10	hsa-miR-93	0,316455	0,4698	0,777679	0,4518	0,253746	1,111	0,325764	0,0434	0,056959	0,0347	0,526678	0,0226
G11	hsa-miR-96	0,443686	0,3356	0,712408	0,9139	0,201963	0,2023	0,073528	9,5262	0,145595	5,8007	0,08046	19,2974
G12	hsa-miR-98	0,702742	0,5844	0,067456	0,3121	0,042553	0,3994	0,49985	0,4132	0,581791	0,2798	0,457251	0,3102
H01	cel-miR-39	0,488732	0,5845	0,33601	0,1482	0,262164	0,5936	0,370556	0,0028	0,203107	0,0015	0,200132	0,001
H02	cel-miR-39	0,408702	1,5477	0,521749	0,6441	0,334744	1,2376	0,51696	0,7004	0,794116	0,7855	0,166034	0,4452
H03	SNORD61	0,803037	1,0886	0,163031	0,5865	0,680534	0,9993	0,107427	0,5094	0,292989	0,5498	0,016908	0,3409
H04	SNORD68	0,06804	2,2196	0,164338	0,6291	0,331418	1,0922	0,716634	0,7483	0,989905	0,7738	0,092594	0,5087
H05	SNORD72	0,606773	0,8918	0,843742	1,0474	0,86144	1,0396	0,233322	0,6418	0,198328	0,6062	0,190527	0,6445
H06	SNORD95	0,97562	0,8899	0,50374	4,2857	0,934487	0,919	0,118052	105,5162	0,126895	141,2458	0,127929	287,7905
H07	SNORD96A	0,58128	0,6632	0,57541	0,7403	0,345883	0,9151	0,139658	0,2418	0,029043	0,2042	0,213832	0,2064
H08	RNU6-2	0,325273	0,6567	0,630915	1,3436	0,707738	0,9873	0,109722	0,5992	0,022726	0,5308	0,353448	0,8156
H09	miRTC	0,264305	0,4744	0,329091	6,6142	0,93581	0,7955	0,144349	208,8246	0,178838	288,4283	0,197104	937,2365
H10	miRTC	0,457798	0,5673	0,122856	0,1055	0,071324	0,4741	0,990633	0,003	0,588466	0,0015	0,21516	0,0009
H11	PPC	0,334376	1,2217	0,151228	0,6724	0,96426	1,1289	0,298073	2,7822	0,34295	2,9743	0,046452	2,1053
H12	PPC	0,159271	1,4963	0,01215	0,4427	0,781375	0,7492	0,261077	1,5654	0,274705	1,6461	0,765472	0,9039
A01	hsa-let-7a	0,469253	1,2454	0,451748	1,1716	0,465739	1,1461	0,332273	1,2693	0,271989	1,398	0,342044	1,2768

Les valeurs de p inférieure à 0,05 sont indiquées en rouge, $P \leq 0,05$ a été considérée comme statistiquement significatif,

Fold-Change ($2^{\Delta\Delta Ct}$) est l'expression normalisée de gène ($2^{\Delta Ct}$ (- Delta Ct)) dans l'échantillon d'essai divisé par l'expression normalisée de gène ($2^{\Delta Ct}$ (- Delta Ct)) dans l'échantillon de contrôle.

Fold-Change supérieure à 2 indique une surexpression.

Fold-change inférieure à 0,5 indique une sous-expression.

Publications

Identification of miR-10b, miR-26a, miR-146a and miR-153 as potential triple-negative breast cancer biomarkers

Insaf Fkih M'hamed^{1,2,3} & Maud Privat^{1,2} & Flora Ponelle^{1,2} & Frédérique Penault-Llorca² & Abderraouf Kenani³ & Yves-Jean Bignon^{1,2}

Accepted: 13 August 2015

The Author(s) 2015. This article is published with open access at Springerlink.com

Abstract

Background Familial triple-negative breast cancers are often linked to mutations in the *BRCA1* tumor suppressor gene. In sporadic triple-negative breast cancers *BRCA1* is frequently inactivated at the transcriptional level, and it has been reported that this inactivation may be brought about by promoter methylation. More recently, it was found that *BRCA1* may also be regulated at the post-transcriptional level by miRNAs. Here, we explored the expression of putative *BRCA1*-regulating miRNAs in sporadic human triple-negative breast cancer cells. **Methods** Nine sporadic human breast cancer-derived cell lines and one benign breast epithelium-derived cell line were assessed for their hormone receptor, growth factor receptor and cytokeratin status by immunocytochemistry. The expression of 5 selected miRNAs predicted to target *BRCA1* was assessed using qRT-PCR in the 10 cell lines. In addition, expression profiles of 84 known breast cancer-associated miRNAs were established in these 10 cell lines using PCR Array and qRT-PCR, respectively. The putative role of pre-selected candidate miRNAs in breast cancer development was

assessed through exogenous expression of these miRNAs and their anti-miRNAs ('antagomirs') in MDA-MB-231 and MCF7 breast cancer-derived cells.

Results Based on our expression profiling results, four candidate miRNAs (miR-10b, miR-26a, miR-146a and miR-153) were selected as being potentially involved in triple-negative breast cancer development. Exogenous expression assays revealed that miR-10b and miR-26a, but not miR-146a, can down-regulate the expression of *BRCA1* in both triple-negative MDA-MB-231 and luminal epithelial MCF7 breast cancer-derived cells, whereas miR-153 could down-regulate *BRCA1* expression only in MCF7 cells. *In silico* analysis of The Cancer Genome Atlas (TCGA) data confirmed that miR-146a is significantly higher expressed in triple-negative breast tumors compared to other (non triple-negative) breast tumors. **Conclusion** Our work provides evidence for the involvement of specific miRNAs in triple-negative breast cancer development through regulating *BRCA1* expression.

Keywords MicroRNAs · Human triple-negative breast cancer cells · *BRCA1* · Regulation

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s13402-015-0239-3) contains supplementary material, which is available to authorized users.

* Yves-Jean Bignon
Yves-Jean.Bignon@cjp.fr

¹ Département d'Oncogénétique, Centre Jean Perrin, BP 392, 63011 Clermont-Ferrand, France

² EA4677 ERTICA, Université d'Auvergne, Clermont-Ferrand, France

³ Faculté de médecine de Monastir, Laboratoire de Biochimie, Unité de recherche UR 12ES08 ^BSignalisation Cellulaire et Pathologies^A, 5019 Monastir, Tunisie

1 Introduction

Breast cancer is the most commonly diagnosed cancer in women (23 % of all cancers), with an estimated diagnosis of 1.38 million new cases each year worldwide [1–4]. At the molecular level, breast cancers can be classified in four main subtypes, depending on the expression of hormone and growth factor receptors. The luminal subtypes A and B express both the estrogen receptor (ER) and the progesterone receptor (PR), the HER2-enriched subtype shows amplification and over-expression of the human epidermal growth factor receptor 2 (HER2), and the triple-negative subtype does

not express any of these receptors. This classification correlates well with the prognosis, ranging from good for luminal A tumors to poor for the triple-negative tumors [5, 6]. The latter category, representing ~10 to 15 % of all breast cancers, is generally considered aggressive [7, 8].

Triple-negative breast cancers are often linked to inactivation of the *BRCA1* tumor suppressor gene. In familial breast cancer, 85 % of the *BRCA1* mutated tumors are triple-negative [9, 10]. In sporadic triple-negative breast cancers, *BRCA1* is frequently inactivated at the transcriptional level, and it has been shown that *BRCA1* inactivation may be due to methylation of its promoter brought about by ID4 [11, 12]. More recently it has been found that *BRCA1* may also be regulated at the post-transcriptional level by microRNAs [13].

MicroRNAs (miRNAs) are small non-coding 19–25 nucleotide-long RNAs that can post-transcriptionally regulate gene expression by binding to the 3'untranslated regions (3'-UTR) of target messenger RNAs (mRNAs), thereby leading to mRNA degradation or translational repression [14–16]. miRNAs have been shown to be involved in diverse biological processes [17–19]. In human breast cancer it has been shown that they can act either as tumor suppressors (i.e., miR-206, miR-17-5p, miR-125a, miR-125b, miR-200, let-7, miR-34 and miR-31) or as oncogenes (i.e., miR-21, miR-155, miR-10b, miR-373 and miR-520 c) [20]. Previously, it has been shown that *BRCA1* gene expression is relatively low in ER-negative and high-grade breast cancers [21] and that *BRCA1* gene expression is significantly down-regulated in triple-negative breast cancers [22]. The number of miRNAs that may regulate the expression of *BRCA1* or that may serve as transcriptional targets of *BRCA1* is rapidly increasing. Considering the tumor-suppressive role of *BRCA1*, any perturbation in this regulatory function is likely to have an effect on *BRCA1*-mediated tumor development [23]. Moskwa et al. reported that miR-182-mediated down-regulation of *BRCA1* can impede DNA repair and, as such, affect breast cancer therapy [24]. It has also been shown that miR-146a and miR-146b-5p can down-regulate the expression of the *BRCA1* gene in triple-negative sporadic breast cancers [18]. In contrast, a recent study reported that miR-146a expression levels increased simultaneously with *BRCA1* expression levels. In addition, it was suggested that post-transcriptional regulation of epidermal growth factor receptor (*EGFR*) expression by *BRCA1* may be mediated by miR-146a [25].

Here, we investigated miRNA expression profiles in nine human breast cancer-derived cell lines and one benign breast epithelium-derived cell line. By doing so, we identified a set of miRNAs putatively involved in *BRCA1* gene expression regulation and breast cancer development.

2 Materials and methods

2.1 Cell culture

Nine selected human breast cancer-derived cell lines and one benign breast epithelium-derived cell line (Table 1) were cultured in a humidified incubator at 37 °C containing 5 % CO₂. Cell line MCF10a was obtained from the American Type Culture Collection (ATCC; Manassas, VA, USA) and was cultured in DMEM/F12 medium (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) supplemented with 10 % horse serum, 20 ng/ml EGF, 100 ng/ml cholera toxin, 500 ng/ml hydrocortisone, 2 mM L-glutamine and 20 ng/ml gentamicin.

Cell lines MCF7, T47D, MDA-MB-231, HCC1937 and MDA-MB-436 were also obtained from the ATCC and were cultured in RPMI-1640 medium (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) supplemented with 10 % fetal bovine serum (FBS), 2 mM L-glutamine and 20 ng/ml gentamicin. Cell lines SUM149PT and SUM1315MO2 were obtained from Asterand (Royston, Hertfordshire, UK) and were grown in Ham's F12 medium according to the supplier's instructions. Cell lines SUM1315-LXSN and SUM1315-BRCA1 were derived from the *BRCA1* mutated (185delAG) SUM1315MO2 cell line, stably transfected with empty LXSN or LXSN-BRCA1 plasmids, respectively. The *BRCA1* mutation status of the other cell lines has previously been reported by Elstrodt et al. [26].

2.2 Immunocytochemistry

Cells were fixed in Preservcyt solution (Thinprep) and cytoblocks were prepared using a Shandon Cytoblock kit (Thermo Scientific). The estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR), human epidermal growth factor receptor 2 (HER2), cytokeratin5/6, cytokeratin14, epidermal growth factor receptor (EGFR) and tyrosine kinase receptor cKIT protein status was determined by immunocytochemistry on 3 µm-thick sections. Immunostainings were performed in a BenchmarkXT fully automatized stainer (Ventana Medical Systems) and scored semi-quantitatively by an expert pathologist under a light microscope.

2.3 MiRNA target prediction algorithms

Five available algorithms predicting miRNA-mRNA interactions were used to select miRNAs targeting the 3'-UTR of the *BRCA1* gene transcript: TargescanHuman (http://www.targetscan.org/vert_61/), Tarbase (<http://diana.imis.athenainnovation.gr/DianaTools/index.php?r=tarbase/index>), Miranda (<http://www.microrna.org/microrna/home.do>), MicroCosmTargets (<http://www.ebi.ac.uk/enright-srv/>

Table 1 Human breast cancer cell lines and their characteristics

Cell lines				Immunocytochemistry						
	BRCA1 status	ER	PR	HER2	ck5/6	CK14	EGFR	cKIT		
MCF10A	Non-tumoral	Benign	wild-type	-	-	-	+ (90%)	+ (80%)	+ (100%)	-
MCF7	Tumoral	Luminal	wild-type	90 % (1+)	40 % (1/2+)	-	-	-	-	-
T47D	Tumoral	Luminal	wild-type	50 % (1/2+)	80 % (1/2+)	-	-	-	+ (40%)	-
MDA-MB-231	Tumoral	TN	wild-type	-	-	-	-	-	+ (100%)	-
HCC1937	Tumoral	TN	5382insC	-	-	-	+ (25%)	+ (20%)	+ (100%)	-
MDA-MB-436	Tumoral	TN	5396+1G>A	-	-	-	-	-	+ (90%)	-
SUM149PT	Tumoral	TN	2288delT	-	-	-	+ (25%)	+ (<1%)	+ (100%)	-
SUM1315MO2	Tumoral	TN	185delAG	-	-	-	-	-	+ (90%)	-
SUM1315-LXSN	Tumoral	TN	185delAG	-	-	-	-	-	+ (60%)	-
SUM1315-BRCA1	Tumoral	TN	185delAG+WT	-	-	-	-	-	+ (80%)	-

TN: Triple-Negative. The BRCA1 mutational status as also the Estrogen Receptor (ER), Progesterone Receptor (PR), HER2 protein, Cytokeratin5/6 (ck5/6), Cytokeratin14 (ck14), Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) and cKIT protein expression status are indicated

[microcosm/htdocs/targets/v5/](http://microcosm.htdocs/targets/v5/)) and PicTar (http://pictar.mdc-berlin.de/cgi-bin/PicTar_vertebrate.cgi).

For all algorithms we used the default parameters and we selected miRNAs that putatively target *BRCA1* by at least three algorithms.

2.4 RNA extraction, reverse transcription and quantitative real-time PCR

Total cell RNA was extracted using QIAzol reagent (Qiagen miRNeasy mini kit) according to the manufacturer's instructions. The RNA quality and yields were assessed using an Agilent Bioanalyzer 2100 (Kit Agilent RNA 6000 nano) in conjunction with a spectrophotometer. One microgram of total RNA was reverse-transcribed using a miscript II RT kit (Qiagen, France). 15 nanograms of cDNA was used in triplicate for quantitative real-time PCR using a miscript SYBER Green PCR kit (Qiagen, France) on an ABI7900HT system and an Applied Biosystems ViiA™ 7 Real-Time PCR system. Selected miRNA primers were obtained from miScript Primer Assay (Qiagen, France) and are listed in supplementary Table S1. U6 (Hs-RNU6-2-1 miscript Primer Assay) and 18S rRNA were used as internal controls. All samples were normalized to the internal controls and fold changes were calculated through relative quantification ($RQ = 2^{-\Delta\Delta CT}$).

2.5 PCR array-based profiling

The Human Breast Cancer miScript miRNA PCR Array (MTHS-109ZE-4) was used according to the manufacturer's protocol (Qiagen, France) for the profiling of 84 miRNAs known or predicted to alter in expression during breast cancer

initiation and/or progression. The protocol enables real-time PCR profiling of mature miRNA on an ABI7900HT system in combination with a miScript SYBR Green PCR kit, which contains a miScript Universal Primer (reverse primer), and a QuantiTect SYBR Green PCR Master Mix. 250 nanogram of total RNA was reverse-transcribed using a miscript II RT kit (Qiagen).

2.6 Transfection assays

Selected miRNA mimics and miRNA inhibitors ('antagomirs') were obtained from miScript miRNA Mimic and miScript miRNA Inhibitor, respectively (Qiagen, France) and are listed in supplementary Table S2. The siRNA used for inhibiting *BRCA1* gene expression (siBRCA1) was synthesized by Thermo Scientific, Dharmacon (M-003,461-02-0005, siGENOME SMART pool, Human BRCA1 (672), 5 nmol). Cells were seeded at a density of 300,000 cells per well in 6-well plates. Twenty-four hours later, miRNAs and siRNAs were transfected using Lipofectamine 2000 reagent (Invitrogen, CA, USA) following the manufacturer's instructions. As a mock control, cells were transfected with transfection reagent alone (Tmock). Three days after transfection, the cells were washed with PBS and recovered for further analysis.

2.7 Cell proliferation assay

MDA-MB-231 cells and MCF7 cells were collected, seeded at a density of 3000 cells per well into a 96-well plate and cultured in a humidified incubator at 37 °C containing 5 % CO₂ for 24 h. Subsequently, the cells were transfected with Tmock (transfection reagent alone), siBRCA1, miR-146a, anti-miR-

146, miR-153, miR-10b and miR-26a using Lipofectamine 2000 reagent (Invitrogen, CA, USA) according to the manufacturer's protocol. After 48 h *in vitro* cell proliferation was evaluated using CCK-8 (Cell Counting Kit-8, Sigma-Aldrich) according to the manufacturer's instructions. The absorbance was determined at 450 nm using a microplate reader. All experiments were performed in triplicate.

2.8 *In silico* analysis of miRNAs using TCGA

Both clinical and miRNA sequencing data of invasive breast cancers were downloaded from The Cancer Genome Atlas (TCGA) database. A total of 519 patients with information on ER, PR and HER2 status were selected to compare the expression profiles of four selected miRNAs (miR-10b, miR-26a, miR-146a and miR-153) in the respective tumors. 88 cases were found to have a negative ER, PR and HER2 (i.e., triple-negative) phenotype, whereas 431 cases were positive for at least one of these receptors.

2.9 Statistical analysis

Student's *t*-test was used to assess statistical differences in mean expression between groups. A *p*-value ≤ 0.05 was considered statistically significant.

3 Results

3.1 miR-10b and miR-26a are preferentially expressed in triple-negative breast cancer-derived cell lines

In order to identify miRNAs implicated in triple-negative breast cancer, we used a miScript miRNA PCR Array to profile the expression of 84 miRNAs considered to be involved in breast tumorigenesis. Ten cell lines were analyzed: one benign breast epithelium-derived cell line (MCF10a), two luminal breast cancer-derived cell lines (MCF7, T47D) and seven triple-negative breast cancer-derived cell lines (MDA-MB-231, MDA-MB-436, HCC1937, SUM149PT, SUM1315MO2, SUM1315-BRCA1 and SUM1315-LXSN). The cell lines were characterized by immunocytochemistry as presented in Table 1. In order to reveal whether particular miRNAs are specifically involved in triple-negative breast cancers, we compared their expression in the respective cell line subgroups. For this analysis we focused on six miRNAs that were found to be differently expressed in at least two subgroups by PCR Array, i.e., miR-10b, miR-15b, miR-26a, miR-155, miR-206 and miR-485-5p (Table 2, Table S3). To validate the PCR Array results, we performed qRT-PCR analysis of the six selected miRNAs in the 10 cell lines. Only two of these miRNAs (i.e., miR-10b and miR-26a) were found to

be well-expressed in these cell lines. The other miRNAs were expressed at low levels or were not detectable at all. miR-10b was highly expressed in 3 triple-negative breast cancer cell lines (MDA-MB-231, MDA-MB-436 and SUM1315MO2) (Fig. 1a). miR-26a was found to be expressed in all 10 cell lines, and to be higher expressed in the triple-negative cell lines than the luminal cell lines (MCF7, T47D) (Fig. 1b).

3.2 miR-146a and miR-153 target the 3'-UTR of *BRCA1*

BRCA1 gene expression is frequently down-regulated in triple-negative breast cancers. We hypothesized that the identification of miRNAs targeting the 3'-UTR of *BRCA1* might be used to uncover miRNAs involved in the development of triple-negative breast cancers. To this end, we performed an *in silico* computational search using five available algorithms: TargescanHuman [27], Tarbase [28], Miranda [29], MicroCosmTargets [30] and PicTar [31].

For all algorithms we used default parameters, and we selected miRNAs predicted to target *BRCA1* by at least three algorithms. From the selected miRNAs (listed in Table S4), we chose five miRNAs, i.e., two miRNAs (miR-146a and miR-146b-5p) that were previously found to be over-expressed in breast tumors and to down-regulate *BRCA1* expression [18] and three miRNAs (miR-132, miR-212, miR-153) that were most frequently predicted to interact with the 3'-UTR of *BRCA1*. We validated the expression of these five selected miRNAs by qRT-PCR in the 10 cell lines and found that miR-146a was higher expressed in 3 triple-negative breast cancer cell lines: MDA-MB-231, MDA-MB-436 and SUM1315-BRCA1 (Fig. 1c), that miR-153 was higher expressed in 4 triple-negative breast cancer cell lines: MDA-MB-436, SUM1315MO2, SUM149PT and HCC1937 (Fig. 1d), and that miR-146b-5p, miR-132 and miR-212 were expressed in all 10 cell lines at different levels (Fig. S1) without a significant difference between the triple-negative, luminal or benign cell lines. Based on these results we focused our further analyses, next to miR-10b and miR-26a, on miR-146a and miR-153.

3.3 *BRCA1* expression is regulated by miR-10b, miR-26a and miR-153

The above expression profiling and *in silico* analyses allowed us to select 4 miRNAs, miR-10b, miR-26a, miR-146a and miR-153 for further analysis. To determine the effect of these miRNAs on endogenous *BRCA1* expression, we transfected two *BRCA1* wild-type cell lines (MDA-MB-231 and MCF7) with the respective miRNAs (miRNA mimics) and anti-miRNAs (inhibitors or 'antagomirs'). The efficiency of the miRNA mimics and inhibitors was verified by miRNA quantification using qRT-PCR (Fig. S2), revealing sufficient efficiencies only for miR-10b, miR-26a, miR-146a, anti-miR-

Table 2 Profiling of miRNAs in human breast cancer cell lines by miScript miRNA PCR Array. Subgroups of cell lines are compared

miRNA (<i>p</i> <0.05)	SUM1315-LXSN/ SUM1315-BRCA1	Basal BRCA1+/ Luminal	Basal BRCA1-/ Luminal	Tumoral/ Benign	Basal BRCA1-/ Benign	Basal BRCA1+/ Benign
Over-Expressed (Fold change >2)	hsa-miR-206	hsa-miR-10b	hsa-miR-26a	hsa-miR-485-5p	hsa-miR-485-5p	hsa-miR-100
	hsa-miR-10b	hsa-miR-100				hsa-miR-148a
	hsa-miR-129-5p	hsa-miR-26a				hsa-miR-328
Under-Expressed (Fold change <0.5)	hsa-miR-16	hsa-let-7e	hsa-miR-15b	hsa-let-7b	hsa-let-7f	hsa-miR-125b
	hsa-miR-31	hsa-miR-19a	hsa-miR-328	hsa-let-7f	hsa-miR-140-5p	hsa-miR-128
	hsa-miR-203	hsa-miR-206	hsa-miR-485-5p	hsa-miR-140-5p	hsa-miR-155	hsa-miR-155
	hsa-miR-328	hsa-miR-429	hsa-miR-489	hsa-miR-155	hsa-miR-15b	hsa-miR-193b
	hsa-miR-607	hsa-miR-485-5p	hsa-miR-548c-3p	hsa-miR-193b	hsa-miR-210	hsa-miR-195
	hsa-miR-613	hsa-miR-497		hsa-miR-26a	hsa-miR-25	hsa-miR-199b-3p
				hsa-miR-26b	hsa-miR-26a	hsa-miR-199a-5p
				hsa-miR-29c	hsa-miR-26b	hsa-miR-19a
					hsa-miR-27a	hsa-miR-205
					hsa-miR-29c	hsa-miR-206
					hsa-miR-489	hsa-miR-20a
					hsa-miR-495	hsa-miR-214
						hsa-miR-25
					hsa-miR-26a	
					hsa-miR-26b	
					hsa-miR-27a	
					hsa-miR-29a	

Bold entries are miRNAs that were found to be differently expressed in at least two subgroups by PCR Array

146a and miR-153. The *BRCA1* siRNA efficiency was also tested and found to be sufficient (Fig. S3). Since MCF7 is a luminal cell line and MDA-MB-231 a triple-negative cell line, our data can potentially reveal whether the miRNAs tested may have a different effect on *BRCA1* in these two subtypes of breast cancer.

To determine whether miR-146a affects endogenous *BRCA1* expression, we compared the expression level in MDA-MB-231 and MCF7 cells after transfection with miR-146a, anti-miR-146a and a mock control (transfection reagent alone). By doing so, we found that miR-146a does not appear to regulate the expression of *BRCA1* (Fig. 2). Next, we tested the effect of miR-153 on the expression of *BRCA1*. The results obtained (Fig. 2) indicate that miR-153 can down-regulate the expression of *BRCA1* in MCF7 cells. In contrast, we found that in MDA-MB-231 cells miR-153 induced *BRCA1* up-regulation. After miR-10b transfection into MDA-MB-231 and MCF7, the *BRCA1* expression level was found to be decreased in both of them (Fig. 2). These results suggest that miR-10b can down-regulate the expression of *BRCA1* in MDA-MB-231 and MCF7 cells. After miR-26a transfection into MDA-MB-231 and MCF7 cells, the expression level of *BRCA1* was again found to be decreased in both of them (Fig. 2), indicating that also miR-26a can down-regulate the expression of *BRCA1* in MDA-MB-231 and MCF7 cells.

3.4 *EGFR* expression is not regulated by miR-146a in MDA-MB-231 and MCF7 cells

Kumaraswamy et al. reported that *BRCA1* can induce miR-146a expression which, in turn, can repress *EGFR* expression in mammary cells [25]. To determine whether miR-146a can affect endogenous *EGFR* expression in our cell lines, we compared its expression level in MDA-MB-231 and MCF7 cells after transfection with miR-146a, anti-miR-146a, Tmock (transfection reagent alone) and siBRCA1 (Fig. S4). After doing so, we found that in these cell lines miR-146a had no effect on the expression of *EGFR*.

3.5 Stimulation and inhibition of cell proliferation by miRNAs

To assess the effect of miR-10b, miR-26a, miR146a, anti-miR-146a and miR-153 on MDA-MB-231 and MCF7 cell proliferation, the cells were transfected with the respective (anti-) miRNAs, as also siBRCA1 and Tmock (transfection reagent alone). In MDA-MB-231 cells, the proliferation assay (see materials and methods) showed that miR-26a significantly stimulated and that miR-146a inhibited proliferation compared to mock-transfected cells. In MCF7

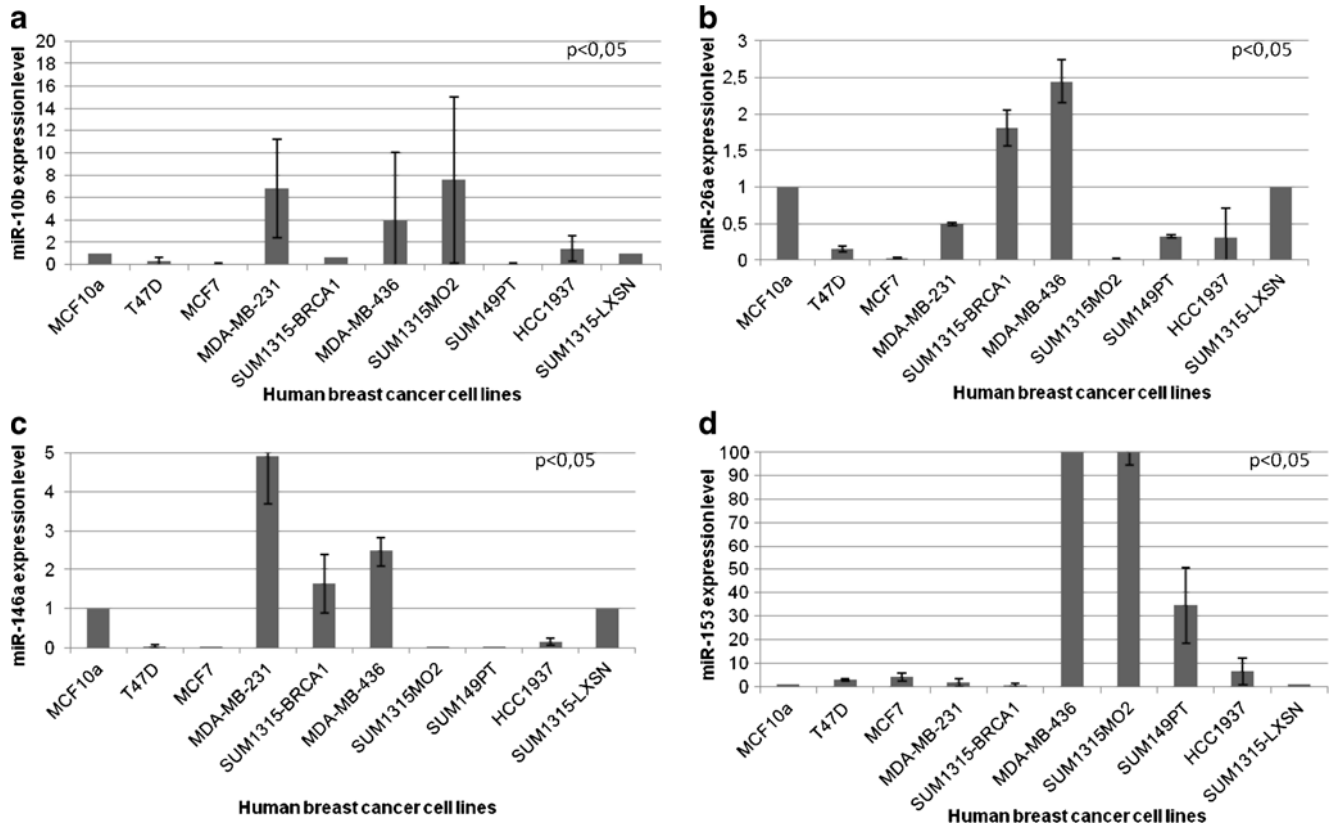


Fig. 1 Expression of miRNAs in mammary cell lines. (a) miR-10b expression level, (b) miR-26a expression level, (c) miR-146a expression level and (d) miR-153 expression level. miRNA expression was determined by qRT-PCR in one benign mammary epithelium cell line (MCF10a) and nine tumor cell lines (two luminal cell lines: MCF7 and

T47D and seven triple-negative cell lines: MDA-MB-231, SUM1315MO2, SUM1315-LXSN, SUM1315-BRCA1, MDA-MB-436, SUM149PT and HCC1937). Expression of miRNA was normalized using U6. A p -value < 0.05 is considered significant (between triple-negative and luminal cell lines)

cells, miR-153, miR-10b and miR-26a significantly inhibited proliferation compared to mock-transfected cells (Fig. 3).

3.6 Differential expression of miR-10b, miR-26a, miR-146a and miR-153 in TCGA

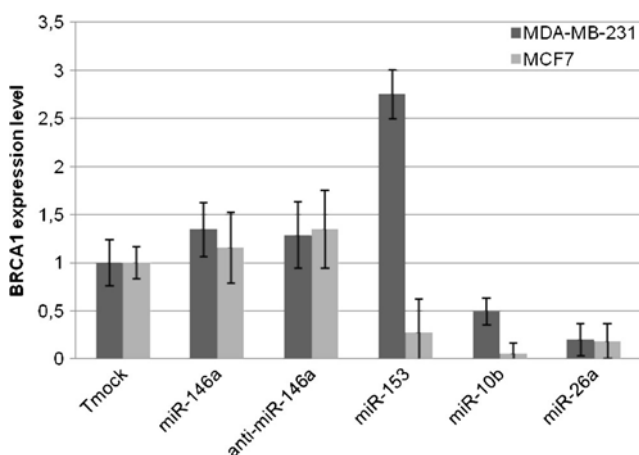


Fig. 2 *BRCA1* expression after miRNA mimic and miRNA inhibitor transfection in MDA-MB-231 and MCF7 cells. Expression of *BRCA1* was determined by qRT-PCR in MDA-MB-231 and MCF7 cells transfected with Tmock (transfection reagent only), miR-146a, anti-miR-146a, miR-153, miR-10b and miR-26a. *BRCA1* expression was normalized using 18S

TCGA was queried for the expression of miR-10b, miR-26a, miR-146a and miR-153 in different primary breast cancer tissues. As shown in Fig. 4 the average expression of miR-153 and miR-10b was found to be significantly lower in triple-negative tumors ($p = 0.00045$ and $p = 0.00038$, respectively) than in luminal tumors, while the expression of miR-146a was found to be significantly higher in triple-negative tumors ($p = 0.000005$). For miR-26a, the difference in average expression was not found to be significant in these tumors ($p = 0.6234$).

4 Discussion

Triple-negative breast cancers, representing ~10 to 15 % of all human breast cancers, have gained growing interest in recent years [32]. In addition, the role of microRNAs (miRNAs) in the epigenetic regulation of many cellular processes has increasingly become recognized as an important way to fine-tune gene expression [33]. Here, expression profiling,

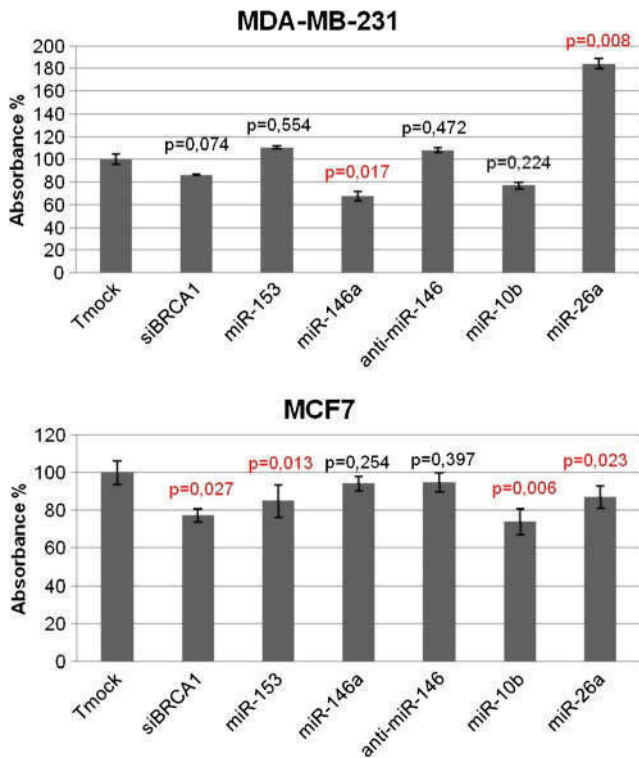
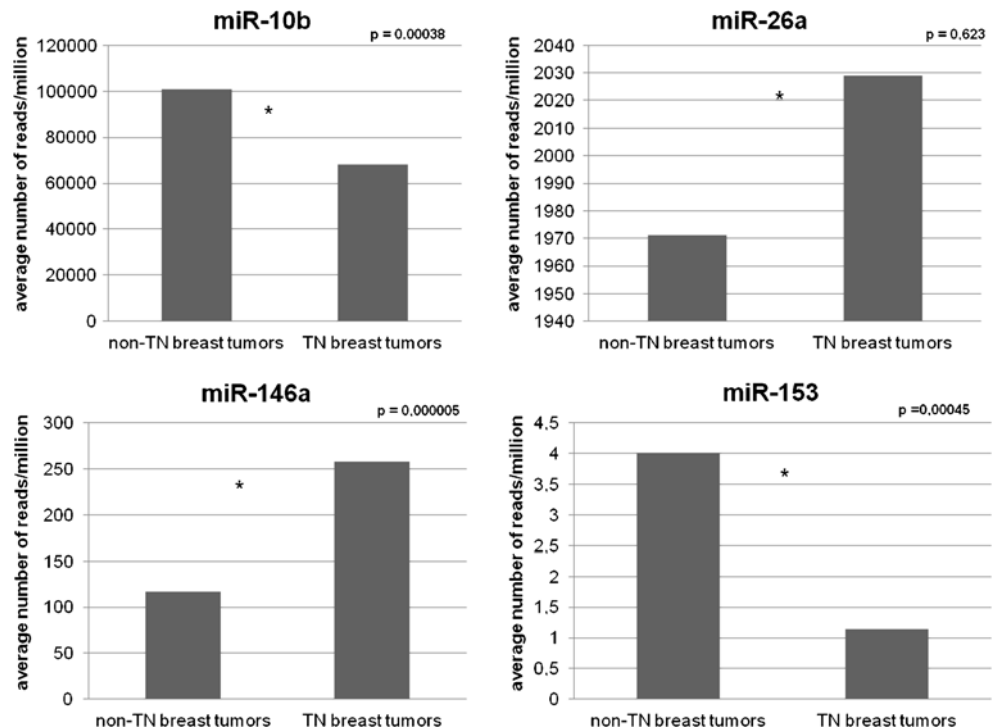


Fig. 3 Proliferation assay after siBRCA1, miRNA mimic and inhibitor transfection in MDA-MB-231 and MCF7 cells. Cells were transfected with Tmock (transfection reagent only), siBRCA1, miR-146a, anti-miR-146, miR-153, miR-10b and miR-26a. After 48 h, *in vitro* cell proliferation was evaluated using CCK-8. The absorbance was determined at 450 nm. All experiments were performed in triplicate

transfection and *in silico* assays were performed to identify potential triple-negative breast cancer miRNA biomarkers, i.e., miR-10b, miR-26a, miR-146a and miR-153.

We found that miR-10b was higher expressed in triple-negative breast cancer-derived cell lines compared to luminal breast cancer-derived cell lines. TCGA data, however, indicated that the average expression of miR-10b was significantly lower in triple-negative tumors than in non triple-negative tumors. O’Day and Lal reported that miR-10b was over-expressed only in metastatic cancer cells, and was found to promote tumor cell migration, invasion and metastasis *in vivo* [20]. Whereas miR-10b has been found to be highly expressed in several human cancers [34], Biagioni et al. found that miRNA-10b was down-regulated in tumor tissues compared to their normal matched counterparts due to hypermethylation of CpG islands upstream from the miR-10b/10b* locus [35]. We found that miR-10b can down-regulate the expression of *BRCA1* in MDA-MB-231 and MCF7 cells. High miR-10b expression may thus be a way to silence *BRCA1* expression in *BRCA1* wild-type cells. Recently, it was reported that miR-10b may also play a critical role in TGF-induced epithelial-mesenchymal transition (EMT) in breast cancer and, as such, may be considered as a possible therapeutic target [36]. Moreover, miR-10b was shown to be able to promote the invasion and metastasis of tumor cells through post-transcriptional regulation of *HOXD10* [37]. Overall, these results indicate that miR-10b may act as an oncogenic miRNA in breast cancer cells. Nevertheless, Biagioni et al. reported that exogenous miR-10b expression reduced both

Fig. 4 *In silico* expression analysis of miRNAs using TCGA data. Clinical and miRNA expression data for breast cancer were downloaded from The Cancer Genome Atlas (TCGA) database. The expression of four miRNAs (miR-10b, miR-26a, miR-146a and miR-153) was compared in 88 breast tumors with a negative ER, PR and HER2 status (i.e., triple negative phenotype) and in 431 breast tumors that were positive for at least one of the receptors. Student’s *t*-test was used to assess statistical differences in mean expression levels between these two groups



the *in vitro* and *in vivo* proliferative capacities of MCF7 and MDA-MB-468 cells [35]. Our results are compatible with those of Biagioni et al., as we found that miR-10b significantly inhibited the proliferation of MCF7 cells ($p = 0.006$). Thus, restoration of miR-10b expression may hold a therapeutic promise for breast cancer treatment.

Another potential biomarker of triple-negative breast cancer that we identified is miR-26a, and we found that miR-26a can down-regulate the expression of *BRCA1* in MDA-MB-231 and MCF7 cells. These results suggest an oncogenic function of this miRNA in breast cancer. In contrast, Gao et al. reported that miR-26a could inhibit the proliferation and migration of breast cancer cells through repression of *MCL-1*, and that miR-26a could increase the sensitivity of breast cancer cells to paclitaxel [38]. Others found that miR-26a can promote ovarian cancer cell proliferation by targeting *ER α* [39]. We found that miR-26a significantly stimulated the proliferation of MDA-MB-231 cells and inhibited the proliferation of MCF7 cells. We also found that the average expression of miR-26a was not significantly different between triple-negative and non triple-negative breast tumors in the TCGA database. The role of miR-26a thus appears to be complex and may dependent on the tissue and/or tumor context.

Our cell line and TCGA data analyses show that miR-146a is significantly over-expressed in triple-negative breast cancers. Similar results were reported by others [18, 25]. We also found that miR-146a does not affect the expression of *BRCA1* in MDA-MB-231 and MCF7 cells. In contrast, Gracia et al. reported that miR-146a can down-regulate the expression of *BRCA1* in triple-negative sporadic breast cancers [18]. This discrepancy may be due to the different cell lines used for the exogenous expression assays, i.e., Gracia et al. used HeLa cells and three mammary cell lines (MDA-MB-468, MDA-MB-157 and MDA-MB-436). Another study reported that miR-146a can inhibit the invasion and migration of the highly metastatic human breast cancer cell line MDA-MB-231 [40]. These data are in line with our results showing that miR-146a can inhibit the proliferation of MDA-MB-231 cells. In a recent study it was hypothesized that *BRCA1* may down-regulate the expression of the *EGFR* gene by increasing the miR-146a level in breast cancer-derived cells (HCC1937) [25]. Our results are compatible with this hypothesis, as we found an increase in miR-146a expression in *BRCA1* wild-type SUM1315-*BRCA1* cells compared to *BRCA1* mutated SUM1315-LXSN cells. We also found that exogenous expression of miR-146a decreased the proliferation of MDA-MB-231 cells that highly express *EGFR*, but not in MCF7 cells that do not express *EGFR*. qRT-PCR assessment of *EGFR* expression in exogenous miR-146a expressing MDA-MB-231 and MCF7 cells revealed that the *EGFR* gene was not significantly regulated by this miRNA. Taken together, these results suggest a complex feedback regulation between miR-146a and *BRCA1*, which again most likely depends on the cellular context.

Using bioinformatic tools, we identified a binding site for miR-153 in the 3'-UTR of *BRCA1*. Subsequently, we found that miR-153 can induce *BRCA1* down-regulation in MCF7 cells and up-regulation in MDA-MB-231 cells. These contradictory results reflect those reported in the literature. On one hand, Anaya-Ruiz et al. reported that silencing of miR-153 significantly inhibited the growth, reduced the proliferation and induced apoptosis in the triple-negative sporadic breast cancer-derived cell line MDA-MB-231. These results indicate that miR-153 may function as an oncogenic miRNA, whose deregulation could be involved in the initiation and/or development of human breast cancer [41]. In another report, Wu et al. suggested that miR-153 may play an important role in promoting the proliferation of human prostate cancer cells and, as such, may represent a novel mechanism of miRNA-mediated *PTEN* silencing in prostate cancer cells [42]. These data are compatible with our finding that *BRCA1* up-regulation by miR-153 had no effect on the proliferation of MDA-MB-231 cells. On the other hand, Zhao et al. found that transient transfection of miR-153 into glioblastoma multiforme stem cells (GBM-SCs) can inhibit their stemness properties, repress their growth potential and induce apoptosis [43]. These latter data are consistent with our results in MCF7 cells: although *BRCA1* was down-regulated by miR-153, it inhibit proliferation. This difference in response observed between MDA-MB-231 and MCF7 cells may be explained by differences in the endogenous levels of miR-153, i.e., higher in luminal MCF7 cells and lower in triple-negative MDA-MB-231 cells. TCGA data analysis also indicated that the average expression of miR-153 is significantly lower in triple-negative breast cancers. We conclude that also the function of miR-153 is complex, and identifying targets of miR-153 would be an interesting means to better understand its role in cell proliferation and carcinogenesis-related processes.

In conclusion, we identified miR-10b, miR-26a, miR-146a and miR-153 as potential triple-negative breast cancer biomarkers. These miRNAs may be instrumental for the future design of novel targeted treatment options of these breast cancers. This 'from bench-top to bed-side' translation remains, however, challenging [44] and additional research is required to better understand the function(s) of these miRNAs.

Acknowledgments This research was funded by grants from the ministry of Higher Education and Scientific Research in Tunisia, the Laboratory of Biochemistry Research unit UR 12ES08 Cell Signaling and Disease, Faculty of Medicine of Monastir, the Molecular Oncology Laboratory at Center Jean Perrin in Clermont-Ferrand and the Fuda (Founding of the University of Auvergne).

Compliance with ethical standards We wish to confirm that there are no known conflicts of interest associated with this publication and that there has been no significant financial support for this work that could have influenced its outcome.

Open Access This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made.

References

1. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. GLOBOCAN 2008 v1.2, cancer incidence and mortality worldwide: IARC cancer base no. 10 [internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer, 2010. Available from: <http://globocan.iarc.fr>. Accessed May 2011.
2. G. Rawat, R. Gopisetty, Thangarajan, E4BP4 is a repressor of epigenetically regulated SOSTDC1 expression in breast cancer cells. *Cell. Oncol.* 37, 409–419 (2014)
3. S. Wan, Y. Liu, Y. Weng, W. Wang, W. Ren, C. Fei, Y. Chen, Z. Zhang, T. Wang, J. Wang, Y. Jiang, L. Zhou, T. He, Y. Zhang, BMP9 regulates cross-talk between breast cancer cells and bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Cell. Oncol.* 37, 363–375 (2014)
4. S. Tabarestani, S.M.H. Ghaderian, H. Rezvani, R. Mirfakhraie, A. Ebrahimi, H. Attarian, J. Rafat, M. Ghadyani, H.A. Alavi, N. Kamalian, A. Rakhsha, E. Azargashb, Prognostic and predictive value of copy number alterations in invasive breast cancer as determined by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Cell. Oncol.* 37, 107–118 (2014)
5. C.M. Perou, T. Sørlie, M.B. Eisen, M. van de Rijn, S.S. Jeffrey, C.A. Rees, J.R. Pollack, D.T. Ross, H. Johnsen, L.A. Akslen, O. Fluge, A. Pergamenschikov, C. Williams, S.X. Zhu, P.E. Lønning, A.L. Borresen-Dale, P.O. Brown, D. Botstein, Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 406, 747–752 (2000)
6. T. Sørlie, C.M. Perou, R. Tibshirani, T. Aas, S. Geisler, H. Johnsen, T. Hastie, M.B. Eisen, M. van de Rijn, S.S. Jeffrey, T. Thorsen, H. Quist, J.C. Matese, P.O. Brown, D. Botstein, P.E. Lønning, A.L. Borresen-Dale, Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 10869–10874 (2001)
7. G. Viale, L. Bottiglieri, Pathological definition of triple negative breast cancer. *Eur. J. Cancer* 45(Suppl 1), 5–10 (2009)
8. R.R.L. Bastien, Á. Rodríguez-Lescure, M.T.W. Ebbert, A. Prat, B. Munárriz, L. Rowe, P. Miller, M. Ruiz-Borrego, D. Anderson, B. Lyons, I. Álvarez, T. Dowell, D. Wall, M.Á. Seguí, L. Barley, K.M. Boucher, E. Alba, L. Pappas, C.A. Davis, I. Aranda, C. Fauron, I.J. Stijleman, J. Palacios, A. Antón, E. Carrasco, R. Caballero, M.J. Ellis, T.O. Nielsen, C.M. Perou, M. Astill, P.S. Bernard, M. Martín, PAM50 breast cancer subtyping by RT-qPCR and concordance with standard clinical molecular markers. *BMC Med. Genet.* 5, 44 (2012)
9. R. Dent, M. Trudeau, K.I. Pritchard, W.M. Hanna, H.K. Kahn, C.A. Sawka, L.A. Lickley, E. Rawlinson, P. Sun, S.A. Narod, Triple-negative breast cancer: clinical features and patterns of recurrence. *Clin. Cancer Res.* 13, 4429–4434 (2007)
10. E. Yiannakopoulou, Etiology of familial breast cancer with undetected BRCA1 and BRCA2 mutations: clinical implications. *Cell. Oncol.* 37, 1–8 (2014)
11. W.D. Foulkes, I.M. Stefansson, P.O. Chappuis, L.R. Bégin, J.R. Goffin, N. Wong, M. Trudel, L.A. Akslen, Germline BRCA1 mutations and a basal epithelial phenotype in breast cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 95, 1482–1485 (2003)
12. C.R. Mueller, C.D. Roskelley, Regulation of BRCA1 expression and its relationship to sporadic breast cancer. *Breast Cancer Res.* 5, 45–52 (2003)
13. M.V. Iorio, M. Ferracin, C.-G. Liu, A. Veronese, R. Spizzo, S. Sabbioni, E. Magri, M. Pedriali, M. Fabbri, M. Campiglio, S. Ménard, J.P. Palazzo, A. Rosenberg, P. Musiani, S. Volinia, I. Nenci, G.A. Calin, P. Querzoli, M. Negrini, C.M. Croce, MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. *Cancer Res.* 65, 7065–7070 (2005)
14. C. Salazar, R. Nagadia, P. Pandit, J. Cooper-White, N. Banerjee, N. Dimitrova, W.B. Coman, C. Punyadeera, A novel saliva-based microRNA biomarker panel to detect head and neck cancers. *Cell. Oncol.* 37, 331–338 (2014)
15. L. Rask, E. Balslev, R. Søkilde, E. Høgdaal, H. Flyger, J. Eriksen, T. Litman, Differential expression of miR-139, miR-486 and miR-21 in breast cancer patients sub-classified according to lymph node status. *Cell. Oncol.* 37, 215–227 (2014)
16. R. Nagadia, P. Pandit, W.B. Coman, J. Cooper-White, C. Punyadeera, miRNAs in head and neck cancer revisited. *Cell. Oncol.* 36, 1–7 (2013)
17. D.P. Bartel, MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116, 281 (2004)
18. A.I. Garcia, M. Buisson, P. Bertrand, R. Rimokh, E. Rouleau, B.S. Lopez, R. Lidereau, I. Mikaelian, S. Mazoyer, Down-regulation of BRCA1 expression by miR-146a and miR-146b-5p in triple negative sporadic breast cancers. *EMBO Mol. Med.* 3, 279–290 (2011)
19. M.I. Almeida, R.M. Reis, G.A. Calin, BRCA1, microRNAs and cancer predisposition: challenging the dogma. *Cell Cycle* 10, 377 (2011)
20. E. O'Day, A. Lal, MicroRNAs and their target gene networks in breast cancer. *Breast Cancer Res.* 12, 201 (2010)
21. N.C. Turner, J.S. Reis-Filho, Basal-like breast cancer and the BRCA1 phenotype. *Oncogene* 25, 5846–5853 (2006)
22. N.C. Turner, J.S. Reis-Filho, A.M. Russell, R.J. Springall, K. Ryder, D. Steele, K. Savage, C.E. Gillett, F.C. Schmitt, A. Ashworth, A.N. Tutt, BRCA1 dysfunction in sporadic basal-like breast cancer. *Oncogene* 26, 2126–2132 (2007)
23. S. Chang, S.K. Sharan, BRCA1 and microRNAs: emerging networks and potential therapeutic targets. *Mol. Cells* 34, 425–432 (2012)
24. P. Moskwa, F.M. Buffa, Y. Pan, R. Panchakshari, P. Gottipati, R.J. Muschel, J. Beech, R. Kulshrestha, K. Abdelmohsen, D.M. Weinstock, M. Gorospe, A.L. Harris, T. Helleday, D. Chowdhury, miR-182-mediated downregulation of BRCA1 impacts DNA repair and sensitivity to PARP inhibitors. *Mol. Cell* 41, 210–220 (2011)
25. E. Kumaraswamy, K. L. Wendt, L. A. Augustine, S. R. Stecklein, E. C. Sibala, D. Li, S. Gunewardena, R. A. Jensen, BRCA1 regulation of epidermal growth factor receptor (EGFR) expression in human breast cancer cells involves microRNA-146a and is critical for its tumor suppressor function. *Oncogene* 34, 4333–4346 (2014)
26. F. Elstrodt, A. Hollestelle, J.H.A. Nagel, M. Gorin, M. Wasielewski, A. van den Ouweland, S.D. Merajver, S.P. Ethier, M. Schutte, BRCA1 mutation analysis of 41 human breast cancer cell lines reveals three new deleterious mutants. *Cancer Res.* 66, 41–45 (2006)
27. R.C. Friedman, K.K.-H. Farh, C.B. Burge, D.P. Bartel, Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res.* 19, 92–105 (2009)
28. G.L. Papadopoulos, M. Reczko, V.A. Simossis, P. Sethupathy, A.G. Hatzigeorgiou, The database of experimentally supported targets: a functional update of TarBase. *Nucleic Acids Res.* 37, D155–D158 (2009)
29. D. Betel, M. Wilson, A. Gabow, D.S. Marks, C. Sander, The microRNA.org resource: targets and expression. *Nucleic Acids Res.* 36, D149–D153 (2008)

30. S. Griffiths-Jones, H.K. Saini, S. van Dongen, A.J. Enright, miRBase: tools for microRNA genomics. *Nucleic Acids Res* 36, 154–158 (2008)
31. A. Krek, D. Grün, M.N. Poy, R. Wolf, L. Rosenberg, E.J. Epstein, P. MacMenamin, I. da Piedade, K.C. Gunsalus, M. Stoffel, N. Rajewsky, Combinatorial microRNA target predictions. *Nat. Genet.* 37, 495–500 (2005)
32. M. Arnedos, C. Bihan, S. Delalogue, F. Andre, Triple-negative breast cancer: are we making headway at Least? *Ther. Adv. Med. Oncol.* 4, 195–210 (2012)
33. H. Liu, MicroRNAs in breast cancer initiation and progression. *Cell. Mol. Life Sci.* 69, 3587–3599 (2012)
34. X. Han, S. Yan, Z. Weijie, W. Feng, W. Liuxing, L. Mengquan, F. Qingxia, Critical role of miR-10b in transforming growth factor- β 1-induced epithelial-mesenchymal transition in breast cancer. *Cancer Gene Ther.* 21, 60–67 (2014)
35. F. Biagioni, N. Bossel Ben-Moshe, G. Fontemaggi, V. Canu, F. Mori, B. Antoniani, A. Di Benedetto, R. Santoro, S. Germoni, F. De Angelis, A. Cambria, R. Avraham, G. Grasso, S. Strano, P. Muti, M. Mottolese, Y. Yarden, E. Domany, G. Blandino, miR-10b*, a master inhibitor of the cell cycle, is down-regulated in human breast tumours. *EMBO. Mol. Med.* 4, 1214–1229 (2012)
36. C.-G. Liao, L.-M. Kong, P. Zhou, X.-L. Yang, J.-G. Huang, H.-L. Zhang, N. Lu, miR-10b is overexpressed in hepatocellular carcinoma and promotes cell proliferation, migration and invasion through RhoC, uPAR and MMPs. *J. Transl. Med.* 12, 234 (2014)
37. G. Gabriely, N.M. Teplyuk, A.M. Krichevsky, Context effect: microRNA-10b in cancer cell proliferation, spread and death. *Autophagy* 7, 1384–1386 (2011)
38. J. Gao, L. Li, M. Wu, M. Liu, X. Xie, J. Guo, H. Tang, X. Xie, MiR-26a inhibits proliferation and migration of breast cancer through repression of MCL-1. *PLoS One* 8, e65138 (2013)
39. W. Shen, M. Song, J. Liu, G. Qiu, T. Li, Y. Hu, H. Liu, MiR-26a promotes ovarian cancer proliferation and tumorigenesis. *PLoS One* 9, e86871 (2014)
40. D. Bhaumik, G.K. Scott, S. Schokrpur, C.K. Patil, J. Campisi, C.C. Benz, Expression of microRNA-146 suppresses NF-kappaB activity with reduction of metastatic potential in breast cancer cells. *Oncogene* 27, 5643–5647 (2008)
41. M. Anaya-Ruiz, J. Cebada, G. Delgado-López, M. L. Sánchez-Vázquez, J. L. M. Pérez-Santos, miR-153 silencing induces apoptosis in the MDA-MB-231 breast cancer cell line. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* 14, 2983–2986 (2013)
42. Z. Wu, B. He, J. He, X. Mao, Upregulation of miR-153 promotes cell proliferation via downregulation of the PTEN tumor suppressor gene in human prostate cancer. *Prostate* 73, 596–604 (2013)
43. S. Zhao, Y. Deng, Y. Liu, X. Chen, G. Yang, Y. Mu, D. Zhang, J. Kang, Z. Wu, MicroRNA-153 is tumor suppressive in glioblastoma stem cells. *Mol. Biol. Rep.* 40, 2789–2798 (2013)
44. F. Bagheri, S. Safarian, M.B. Eslaminejad, N. Sheibani, siRNA-mediated knock-down of DFF45 amplifies doxorubicin therapeutic effects in breast cancer cells. *Cell. Oncol.* 36, 515–526 (2013)

Résumé

Dans les cancers du sein triple négatif sporadiques, *BRCA1* est fréquemment inactivé au niveau transcriptionnel, et il a été rapporté que cette inactivation peut être réalisée par une méthylation du promoteur. Plus récemment, il a été constaté que *BRCA1* peut également être régulée au niveau post-transcriptionnel par les microARNs. L'accumulation de preuves indique que les miARNs ont un rôle causal dans la tumorigenèse. Nos travaux se sont axés sur l'étude de l'expression et des fonctions des microARN *in vitro*, *in silico* et *ex vivo*.

Basé sur nos résultats de profilage de l'expression, quatre miARN candidats (miR-10b, miR-26a, miR-146a et miR-153) ont été choisis comme étant potentiellement impliqués dans le développement du cancer du sein triple négatif. Des essais d'expression exogènes ont révélé que miR-10b et miR-26a, mais pas miR-146a, peuvent réguler négativement l'expression du gène *BRCA1* dans les cellules cancéreuses triple négatif MDA-MB-231 et luminales MCF7, alors que miR-153 pourrait réguler négativement l'expression du gène *BRCA1* uniquement dans les cellules MCF7. L'analyse *in silico* des données de Cancer Genome Atlas (TCGA) a confirmé que miR-146a est significativement plus exprimé dans les tumeurs du sein triple négatif par rapport à d'autres tumeurs (non triple négatif) mammaires. L'étude *ex vivo* a montré que le niveau élevé d'expression de miR-146a et de miR-26 est associé à l'absence des métastases ganglionnaires dans le cancer du sein triple négatif. Aussi une corrélation entre l'expression de 4 miARNs est révélée permettant l'identification de différentes voies de signalisations impliquées dans le cancer du sein triple négatif.

Nos travaux fournissent des preuves de l'implication des miARNs spécifiques comme des biomarqueurs potentiels dans le développement du cancer de sein triple négatif.

Mots clés: miARNs, Cellules/Tissus humaines du cancer du sein triple négatif, *BRCA1*, Régulation.

Abstract

In sporadic triple-negative breast cancers *BRCA1* is frequently inactivated at the transcriptional level, and it has been reported that this inactivation may be brought about by promoter methylation. More recently, it was found that *BRCA1* may also be regulated at the post-transcriptional level by miRNAs. Accumulating evidence indicates that miRNAs have a causal role in tumorigenesis. Our work focused on the study of microRNAs expression and functions *in vitro*, *in silico* and *ex vivo*.

Based on our expression profiling results, four candidate miRNAs (miR-10b, miR-26a, miR-146a and miR-153) were selected as being potentially involved in triple-negative breast cancer development. Exogenous expression assays revealed that miR-10b and miR-26a, but not miR-146a, can down-regulate the expression of *BRCA1* in both triple-negative MDA-MB-231 and luminal epithelial MCF7 breast cancer-derived cells, whereas miR-153 could down-regulate *BRCA1* expression only in MCF7 cells. *In silico* analysis of The Cancer Genome Atlas (TCGA) data confirmed that miR-146a is significantly higher expressed in triple-negative breast tumors compared to other (non triple-negative) breast tumors.

The *ex vivo* study showed that the high level expression of miR-146a and miR-26 is associated with the absence of lymph node metastasis in triple negative breast cancer. Also a correlation between the expression of the 4 miRNAs was revealed, allowing the identification of different signaling pathways involved in the triple negative breast cancer.

Our work provides evidence of the involvement of specific miRNAs as potential biomarkers in breast cancer triple negative development.

keywords: MicroRNAs, human triple-negative breast cancer cells/tissus, *BRCA1*, Regulation.