



**HAL**  
open science

# Développement d'une bithérapie antitumorale basée sur une approche théranostique : applications aux cancers du cerveau et de la vessie

Audrey Guttin

## ► To cite this version:

Audrey Guttin. Développement d'une bithérapie antitumorale basée sur une approche théranostique : applications aux cancers du cerveau et de la vessie. Cancer. École pratique des hautes études - EPHE PARIS, 2016. Français. NNT : 2016EPHE3018 . tel-02101632

**HAL Id: tel-02101632**

**<https://theses.hal.science/tel-02101632>**

Submitted on 17 Apr 2019

**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.



École Pratique  
des Hautes Études

École Pratique des Hautes Études

Mention “Systèmes intégrés, environnement et biodiversité”

École doctorale de l'École Pratique des Hautes Études

*Laboratoire Reproduction et développement comparé, Lyon*

ET

l'Université Grenoble-Alpes

Grenoble Institut des Neurosciences

*Équipe NeuroImagerie Fonctionnelle et Perfusion Cérébrale*

---

## **Développement d'une bithérapie antitumorale basée sur une approche théranostique**

Applications aux cancers du cerveau et de la vessie

---

Par : Audrey GUTTIN

Thèse de doctorat de :

“Biologie cellulaire et moléculaire et sciences de la santé”

Sous la direction de :

de M. Jean-Marie Exbrayat, Directeur d'étude, EPHE

et de M. Jean-Paul Issartel, Directeur de recherche, CNRS

Soutenue le 27 janvier 2016

devant le jury composé de :

**Mme Sophie Park** (Professeur d'université - praticien hospitalier, UJF et CHU)

**M. François Estève** (Professeur d'université - praticien hospitalier, UJF et CHU)

**M. Emmanuel Belamie** (Directeur d'étude, EPHE)



---

# Remerciements

---

Je souhaite remercier l'EPHE qui m'a permis de réaliser ce projet de thèse. Je remercie plus particulièrement Monsieur Goosaert et Monsieur Paldi pour leur écoute, leur patience et leur sens de la diplomatie. J'en profite pour remercier Monsieur Ronot pour m'avoir accueillie en début de thèse. Enfin, je remercie sincèrement Monsieur Exbrayat d'avoir accepté d'être co-directeur de thèse EPHE.

Je remercie Madame Park, Monsieur Estève et Monsieur Belamie pour avoir accepté d'être membre du jury. Merci pour le temps que vous avez passé à lire et évaluer mon travail de thèse.

C'est avec un profond respect et beaucoup de reconnaissance que je vous remercie Jean-Paul Issartel, co-directeur de thèse UGA, pour m'avoir soutenue pendant ce projet de thèse. Merci pour votre écoute et nos discussions qui m'ont permis de mener à bien ce travail. Vous m'avez montré la voie, comme en aikido un maître partage avec son élève sa rigueur, son expérience et ses conseils.

Je tiens aussi à adresser mes sincères remerciements à Monsieur Boumendjel et Monsieur Defrancq pour leurs contributions importantes au projet. Ce projet était multidisciplinaire et sans votre aide, votre expertise en chimie, le projet n'aurait pas pu commencer et évoluer.

Je remercie les différents organismes qui ont financé une grande partie du projet, plus particulièrement la Ligue contre le Cancer et l'association Espoir. Merci également à l'Association pour la Recherche sur les Tumeurs Cérébrales pour son soutien.

Je veux aussi remercier Emmanuel Barbier et à toute "l'équipe 5" pour leur accueil au sein de l'Institut des Neurosciences qui a favorisé l'avancée de ce travail. Claire et Nora, plus particulièrement merci pour m'avoir fait une place en salle de culture, pour vos conseils et votre aide. Et je n'oublie pas Maud Barbado et Catherine Mouret qui ont été

---

mes collègues de bureau pendant un temps (trop court malheureusement). Je vous adresse mes joyeux remerciements pour votre très bonne humeur, votre gentillesse et votre écoute.

Mes remerciements vont aussi à Malika Dakir et Sule Erbek pour leur accueil chaleureux au laboratoire “CaCys”.

Je souhaite remercier toutes les personnes avec lesquelles j’échange sur des questions “transcriptomiques” pour leur gentillesse. Je remercie plus particulièrement Emmanuel Garcion et Sylvie Avril d’Angers pour les conseils en culture cellulaire des U87. Je tiens à remercier spécialement l’équipe Biotiela de Caen dirigée par Laurent Poulain pour leurs encouragements et leur confiance. Merci aussi aux collaborateurs grenoblois du CHU, merci Mathieu pour ta bonne humeur, tes blagues et le café qui sont les éléments indispensables pour les séries de RT-qPCR.

Didier, un grand merci ! Si tous les chercheurs avaient la même passion pour la science et la même modestie que toi alors il serait plus facile d’échanger des points de vue opposés et discuter de “paradigm shift”. Merci pour ton soutien et ton altruisme.

Hélène, je tiens à te remercier vivement. Merci pour tous ces bons moments passés par tant de bonne humeur communicative. Tu as toujours un mot plein d’espoir et/ou une délicate attention gastronomique réconfortante ! Merci pour ton aide précieuse, ta gentillesse et tes “bonnes ondes” m’ont permis d’aller jusqu’au bout de ce projet.

Opticafé, ça “fite” très bien... Loïc, je te remercie chaleureusement pour ta patience, ton soutien en particulier ces derniers mois et aussi ton aide en mathématique. Merci de me poser des questions pour comprendre mon travail, les discussions passionnantes qui en découlent, dépassent la biologie et arrête le temps...

Enfin, merci à mes parents et à mon grand petit frère Arnaud. C’est grâce à votre tendresse, votre soutien sans faille et vos encouragements pendant toutes ces années que j’ai pu surmonter les difficultés. “Quand tu reviendras, tu comprendras que tout l’or de la Terre est au creux de leurs bras”

---

*“Les plus grandes difficultés sont toujours là où nous ne les cherchons pas.”*

Johann Wolgan Von Goethe



---

# Table des matières

<b>Liste des figures</b>	<b>11</b>
<b>Liste des tableaux</b>	<b>15</b>
<b>Liste des abréviations</b>	<b>17</b>
<b>Introduction</b>	<b>23</b>
1 Introduction générale . . . . .	23
2 Les tumeurs de la vessie . . . . .	24
2.1 Caractéristiques cliniques . . . . .	24
2.1.1 Epidémiologie et diagnostic . . . . .	24
2.1.2 Facteurs de risque . . . . .	25
2.1.3 Classification des tumeurs . . . . .	26
2.1.4 Traitements . . . . .	27
2.2 Caractéristiques moléculaires . . . . .	29
3 Les tumeurs du cerveau . . . . .	31
3.1 Caractéristiques cliniques . . . . .	31
3.1.1 Epidémiologie et diagnostic . . . . .	32
3.1.2 Facteurs de risque . . . . .	33
3.1.3 Classification des tumeurs . . . . .	34
3.1.4 Traitements . . . . .	36
3.2 Caractéristiques moléculaires . . . . .	38
4 Les microARN . . . . .	39
4.1 Biogenèse . . . . .	40
4.2 Nomenclature . . . . .	41
4.3 Rôles et fonctions . . . . .	42
4.4 microARN et thérapie . . . . .	44
4.5 La galénique des microARN en thérapie ciblée . . . . .	45
5 Les chalcones . . . . .	47
5.1 Structure chimique . . . . .	47
5.2 Effet antitumoral . . . . .	49
6 Les objectifs de la thèse . . . . .	49



<b>Matériels et Méthodes</b>	<b>55</b>
1 Matériels . . . . .	55
1.1 Echantillons tissulaires . . . . .	55
1.2 Lignées cellulaires . . . . .	55
1.3 Molécules d'intérêt pharmacologique testées . . . . .	56
1.3.1 Les antimiR . . . . .	56
1.3.2 Les chalcones . . . . .	57
1.4 Données bioinformatiques . . . . .	58
1.4.1 Données transcriptomiques . . . . .	58
1.4.2 Données de structure des protéines . . . . .	59
2 Méthodes . . . . .	60
2.1 Transfection d'antimiR . . . . .	60
2.2 Préparations d'acides nucléiques . . . . .	60
2.2.1 A partir de tissus congelés ou de culots de cellules . . . . .	60
2.2.2 A partir de tissus FFPE . . . . .	61
2.2.3 Quantification des ARN . . . . .	62
2.3 Dosages des ARN . . . . .	63
2.3.1 RT-qPCR adaptée aux microARN . . . . .	63
2.3.2 Analyse par hybridation sur puces microARN . . . . .	65
2.3.3 Analyse des ARNm par hybridation sur puces HTA . . . . .	65
2.3.4 Dosage des microARN par la méthode QuantiGene . . . . .	66
2.3.5 digital droplet PCR . . . . .	67
2.4 Test MTT . . . . .	68
2.5 Cytométrie en flux . . . . .	69
2.5.1 Analyse du cycle cellulaire . . . . .	69
2.5.2 Evaluation du taux de mort cellulaire . . . . .	70
2.5.3 Evaluation de l'efficacité de transfection des cellules . . . . .	70
2.6 Traitement des données . . . . .	71
2.6.1 Normalisation des données Affymetrix . . . . .	71
2.6.2 Statistiques . . . . .	71
2.6.3 Calculs de score d'affinité . . . . .	72
<b>Résultats</b>	<b>75</b>
1 Explorations des profils transcriptomiques microARN dans les tumeurs . . . . .	75
1.1 Choix des échantillons cliniques et des méthodes d'extraction d'ARN compatibles avec l'exploration des profils microARN . . . . .	75

1.1.1	Les échantillons tissulaires congelés . . . . .	75
1.1.2	Les échantillons tissulaires fixés . . . . .	77
1.1.3	Les liquides biologiques . . . . .	81
1.2	Validation des modèles cellulaires . . . . .	84
1.3	Validation des méthodes de dosage des microARN et des méthodes de prétraitement des données . . . . .	87
1.3.1	Données acquises par hybridation sur puces . . . . .	87
1.3.2	Données acquises par les méthodes de RT-qPCR . . . . .	90
1.4	Recherche de biomarqueurs pour le diagnostic et le suivi théra- peutique . . . . .	94
1.5	Validation des méthodes d'analyse des données . . . . .	103
1.6	Choix des microARN qui permettront de synthétiser des conjugués pharmacologiques . . . . .	104
2	Import des antimicroARN dans les cellules et effets pharmacologiques . .	107
3	Choix de la chalcone permettant de synthétiser des conjugués pharmaco- logiques . . . . .	114
4	Le conjugué chalcone-antimiR . . . . .	125
<b>Discussion</b>		<b>131</b>
1	Peut on détecter correctement des microARN dans les tissus tumoraux ? .	131
2	Peut-on convertir les microARN biomarqueurs en un composé anti-tumoral ?	136
3	MicroARN et thérapies . . . . .	141
4	La chalcone est elle un bon choix pour la thérapie ? . . . . .	142
5	Le conjugué . . . . .	147
<b>Conclusion</b>		<b>155</b>
<b>Bibliographie</b>		<b>177</b>
<b>Annexes</b>		<b>180</b>
<b>Production scientifique</b>		<b>189</b>
<b>Résumé / Abstract</b>		<b>191</b>



---

## Liste des figures

1	Anatomie de la vessie . . . . .	26
2	Grades des tumeurs vésicales . . . . .	27
3	Rôle du gène CDKN2A dans le contrôle du cycle cellulaire . . . . .	30
4	Intérêt de la biologie moléculaire dans la prise en charge des patients atteints d'une tumeur de la vessie . . . . .	31
5	Détection d'un glioblastome par IRM . . . . .	33
6	Illustration du caractère infiltrant des gliomes de haut grades . . . . .	37
7	Les grandes étapes de maturation d'un microARN . . . . .	40
8	Rôles des microARN dans le cancer . . . . .	43
9	Exemple d'adressage d'un duplex nucléotidique aux hépatocytes . . . . .	45
10	Biosynthèse de flavonoïdes, exemple de la naringénine synthétisée dans les agrumes . . . . .	48
11	Synthèse chimique de chalcone . . . . .	49
12	Etapes d'un développement d'une approche théranostique et objectifs du projet de thèse . . . . .	50
13	Extraction des microARN avec des billes magnétiques recouvertes d'oligonucléotides . . . . .	62
14	Option technique pour l'étape de reverse transcription . . . . .	63
15	Principe du dosage QuantiGene . . . . .	67
16	Analyse globale des microARN dans les préparations d'ARN totaux ou d'ARN courts. . . . .	77
17	Evaluation des méthodes d'extraction d'ARN courts Macherey-Nagel et Qiagen à partir d'échantillons paraffinés . . . . .	79
18	Comparaison des taux de microARN dosés par qPCR et hybridation sur puces dans les préparations obtenues grâce aux méthodes d'extraction Macherey-Nagel et Qiagen . . . . .	81

---

19	<b>Comparaison des résultats d'analyse avec différentes versions de puces Genechip microARN Affymetrix.</b> . . . . .	82
20	<b>Comparaison des cellules U87 (glioblastomes) avec des tissus tumoraux d'oligodendrogliomes (ODG) et glioblastomes (GBM) sur la base des profils d'expression d'ARNm</b> . . . . .	86
21	<b>Images de deux puces Affymetrix GeneChip microARN</b> . . . . .	88
22	<b>Comparaison des données de deux puces après normalisation RMA (MvA plot)</b> . . . . .	90
23	<b>Impact des méthodes de normalisations sur la cohérence des données d'hybridation</b> . . . . .	91
24	<b>Comparaison des méthodes digital droplet PCR et qPCR</b> . . . . .	93
25	<b>Analyse de survie par groupes de tumeurs classées selon les trois méthodes</b> . . . . .	97
26	<b>Analyse de survie selon l'âge au diagnostic et le type de tumeur</b> . . . . .	98
27	<b>Distinction des échantillons de tissus de cerveaux tumoraux et normaux par leur profils microARN</b> . . . . .	99
28	<b>Comparaison des résultats d'analyse des microARN purifiés à partir de tissus congelés et tissus FFPE</b> . . . . .	101
29	<b>Evaluation des ratios de microARN pour le diagnostic</b> . . . . .	102
30	<b>Distinction des grades de tumeurs gliales grâce au dosage de 3 microARN dans des échantillons tissulaires fixés et paraffinés</b> . . . . .	103
31	<b>Les quantifications des microARN dans les tissus sont dépendantes des méthodes d'analyse</b> . . . . .	105
32	<b>Choix de microARN pour la thérapie</b> . . . . .	106
33	<b>Tests d'agents de transfections</b> . . . . .	108
34	<b>Contrôle de la transfection des microARN par cytométrie.</b> . . . . .	109
35	<b>Cinétique de transfection d'un microARN fluorescent par la lipofectamine dans des cellules RT112</b> . . . . .	110
36	<b>Impact de la transfection des antimicroARN sur le taux d'apoptose des cellules RT112. Analyse en cytométrie de flux</b> . . . . .	111
37	<b>Analyse de l'effet des antimicroARN utilisés en combinaison sur les cellules RT112</b> . . . . .	113

38	<b>Impact des chalcones sur la viabilité des cellules U87. Effets en fonction de la concentration des chalcones . . . . .</b>	115
39	<b>Courbes dose-réponse de l'effet des chalcones sur la viabilité des cellules U87 représentées en tracé semi-logarithmique . . . . .</b>	117
40	<b>Impact de la molécule A1 sur les cellules U87. Analyse du cycle cellulaire en cytométrie de flux . . . . .</b>	118
41	<b>Courbes "dose-réponse" de l'impact des chalcones sur le cycle cellulaire des cellules U87 . . . . .</b>	119
42	<b>Représentation schématique des structures des transcrits engendrées par le gène CYP1A1. . . . .</b>	120
43	<b>Représentation tridimensionnelle de l'interaction de la molécule chalcone A1 dans le site actif de la protéine CYP1A1 . . . . .</b>	122
44	<b>Séquences protéiques des isoformes de CYP1A1 produites en absence ou en présence de chalcone A1 . . . . .</b>	122
45	<b>Evaluation de l'efficacité d'un cotraitement . . . . .</b>	126
46	<b>Modes d'action envisagés de la molécule chalcone A1 . . . . .</b>	144
47	<b>Modélisation de la molécule chalcone A1 fixée dans p38 . . . . .</b>	149



# Liste des tableaux

1	<b>Classification OMS 2007 des principaux gliomes . . . . .</b>	35
2	<b>Molécules de chalcones testées . . . . .</b>	58
3	<b>Rendements d'extraction en ARN à partir de tissus congelés . . . . .</b>	76
4	<b>Rendements d'extraction des microARN à partir de tissus tumoraux fixés et paraffinés . . . . .</b>	78
5	<b>MicroARN extraits des sérums qui sont détectés avec la plus forte intensité par hybridation sur les Genechip microARN Affymetrix V4 .</b>	84
6	<b>Rendements d'extraction miRVana sur culots de cellules . . . . .</b>	85
7	<b>Mise en évidence des probesets produisant des signaux non spécifiques sur puces Genechip miRNA d'Affymetrix . . . . .</b>	87
8	<b>Classification d'un groupe de 112 tumeurs gliales par les méthodes de Li <i>et al</i>, Phillips <i>et al</i> et Verhaak <i>et al</i> . . . . .</b>	96
9	<b>Scores d'affinités entre les chalcones et leur cibles potentielles . . . . .</b>	124
10	<b>Algorithmes de prédiction de gènes cibles de microARN . . . . .</b>	138





---

# Liste des Abréviations

2-OMe : 2-OMéthyle

ADNc : Acide Désoxyribo Nucléique Complémentaire

AGO : Protéine Argonaute

AM : Astrocyte Medium

ARN : Acide Ribo Nucléique

ARNm : Acide Ribo Nucléique messenger

ATCC : American Type Culture Collection

BCG : Bacille de Calmette et Guérin

CDKN2A : Cyclin Dependent-Kinase Inhibitor 2A

Cq ou Ct : Quantification cycle ou Cycle Threshold

CRB : Centre de Ressources Biologiques

CYP1A1 : Cytochrome P450, family 1, subfamily A, polypeptide 1

DGCR8 : Di George Critical Region 8

DMEM : Dulbecco's Modified Eagle Medium

DMSO : Diméthylsulfoxyde

DO : Densité optique

dNTP : Désoxyribonucléotides

EDTA : Ethylène Diamine Tétra Acétique

EGF : Epidermal Growth Factor

FAM : Carboxyfluorescein

FFPE : Formalin Fixed Paraffin Embedded (tissue)

FGFR3 :Fibroblast Growth Factor Receptor 3

FITC : Fluorescein

FRET : Flurorescent Resonnance Energy Transfert

GBM ou G : Glioblastomes

GC : Protocole de chimiothérapie associant la Gemcitabine et la Cisplatine

GEO : Gene Expression Omnibus

HTA : Human Transcriptome Array

IARC : International Agency for Research on Cancer

IC50 : half maximal inhibitory concentration

IDH1/IDH2 : Isocitrate Déshydrogénase Cytosolique 1 ou 2

INCA : Institut National du Cancer  
INCHI : International Chemical Identifier  
IP : Iodure propidium  
IRM : Imagerie par Résonance Magnétique  
ISUP : International Society of Urological Pathology  
LNA : Locked Nucleic Acid  
LOESS : LOaclly WEighted Scatterplot Smoothing  
MES : Mesenchymateux (Tumeurs haut grade)  
MGB : Minor Groove Binder  
miARN : microARN  
miR : microARN  
MDM2 : Mouse Double Minute 2 homolog  
MTT : 3-(5,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium  
MVAC : Protocole de chimiothérapie associant le Méthotrexate, la Vinblastine, l'Adriamycine et le Cisplatine  
ODG ou O : Oligodendrogliomes  
OMS : Organisation Mondiale de la Santé  
PBS : Phosphate-Buffered Saline  
PCR : Polymerase Chain Reaction  
PDB : Protein Data Bank  
PFA : Paraformaldéhyde  
PN : Proneuraux (tumeurs bas grades)  
qPCR : Quantitative Polymerase Chain Reaction  
R : R CRAN, logiciel environnement libre pour les calculs et graphiques  
RB : Retinoblast protein  
REST : Relative Expression Software Tool  
RIN : RNA Integrity Number  
RISC : RNA Induced Silencing Complex  
RMA : Robust Multi-array Average  
ROS : Reactive Oxygen species ou DRO en français pour dérivé réactif de l'oxygène  
RPMI : Roswell Park Memorial Institute medium  
SVF : Sérum de Veau Fœtal

---

TCGA : The Cancer Genome Atlas

TNM : Tumor Node Metastasis

TVNIM : Tumeurs Vésicales Non Infiltrantes du Muscle

TVIM : Tumeurs Vésicales Infiltrantes du Muscle

WHO : World Health Organization



# Introduction



---

# Introduction

## 1 Introduction générale

Si aujourd’hui le cancer est la première cause de mortalité en France (près de 150 000 personnes décèdent chaque année tous cancers confondus), ce n’est pas pour autant une maladie récente. En effet, deux chercheurs de l’université de Durham et du British Museum, Michaela Binder et Neal Spencer, ont montré l’année passée qu’un homme ayant vécu il y a 3 200 ans souffrait déjà d’un cancer [1]. En médecine, Hippocrate comparait les tumeurs à un crabe, il leur donna le nom de “karkinoma”. Puis Galien (Ier siècle) à son tour a décrit les “tumeurs anormales” comme des crabes [2] donnant aujourd’hui le nom de cancer issu du grec *karkinos*. De manière générale, le cancer se caractérise par une multiplication incontrôlée de certaines cellules de l’organisme. Au cours, de ce développement les cellules dites tumorales acquièrent des modifications génomiques engendrant des spécificités favorisant la croissance tumorale décrites par Hanahan et Weinberg [3] (cf chapitre 2.2).

Le cancer est une maladie relativement ancienne, mais il faut attendre la Seconde Guerre mondiale pour découvrir par hasard l’utilisation de substances chimiques contre les cellules malignes. Après un bombardement en 1943, en Italie, dans le port de Bari, des marins américains ont été intoxiqués au gaz moutarde (encore appelé ypérite). Le suivi de ces militaires américains montra que les cellules de la moelle osseuse avaient été détruites suite à leur exposition à ce gaz. De ce constat naquit l’idée d’utiliser ce composé chimique pour détruire les cellules tumorales qui ont la particularité de se diviser très vite comme les cellules de la moelle se différencient pour donner les cellules sanguines. Ainsi Louis Goodman et ses collaborateurs, après avoir travaillé sur cette idée pour soigner des patients atteints de lymphomes, publieront en 1946 [4] leurs résultats positifs ouvrant la voie au développement de la chimiothérapie. En parallèle des développements de nouvelles chimiothérapies, les microARN (petits ARN non codants produits par les cellules) sont depuis une vingtaine d’année très étudiés afin d’appréhender leur rôle physiopathologique majeur. Actuellement, leur implication dans la croissance tumorale est avérée et l’intérêt de l’utilisation de ces petits ARN en thérapie est grandissant [5, 6].



Le cancer est toujours une maladie redoutée. Pour le patient, le traitement sera souvent long et difficile à supporter. Malgré des années de recherche dans ce domaine, il y a encore beaucoup de choses à comprendre et développer tant en matière de diagnostic que de traitement. De surcroît, certaines tumeurs sont naturellement résistantes aux traitements, d'autres le deviennent. Ainsi un diagnostic plus précis permettrait une meilleure prise en charge du patient par un traitement personnalisé mieux adapté et par conséquent plus efficace. C'est dans ce but que la Ligue Contre le Cancer a lancé un programme national de recherche pour établir les cartes d'identités des tumeurs et le gouvernement son troisième plan cancer. Les initiatives dans ce domaine restent importantes à développer. C'est dans ce cadre que s'inscrit ce projet de thèse.

## **2 Les tumeurs de la vessie**

### **2.1 Caractéristiques cliniques**

#### **2.1.1 Epidémiologie et diagnostic**

En 2013, le Centre International de Recherche sur le Cancer a publié les indicateurs épidémiologiques du cancer en Europe estimés dans 40 pays [7]. Pour l'Europe, l'estimation du nombre de nouveaux cas de cancer de la vessie en 2012 s'élève à 151 200 dont 118 300 nouveaux cas chez les hommes. Cette différence d'incidence entre les hommes et les femmes s'expliquerait en partie par une exposition différente aux risques environnementaux. Ce type de cancer touche généralement des personnes de plus de 50 ans, l'âge moyen étant de 65 ans. Il se situe au 7<sup>ème</sup> rang parmi les cancers les plus fréquents en France (donnée INCa, l'Institut National du Cancer). En 2010, l'INCa estimait le taux de mortalité chez les hommes à 5,2 pour 100 000 et par an. Au moment du diagnostic, un large nombre (70%) des tumeurs vésicales sont superficielles [8] mais l'évolution de ces tumeurs est imprévisible. Dans plus de la moitié des cas, il y a récurrence dans les 12 mois avec une évolution vers une tumeur plus agressive.

L'alerte la plus fréquente (80% des cas) révélant un cancer de la vessie est la présence de sang dans les urines (hématurie). Le saignement n'est pas continu, ne s'ac-

compagne pas obligatoirement d'autres symptômes et le patient ne ressent pas de douleur ou de fièvre. Bien que l'hématurie soit le signe le plus évocateur, le cancer de la vessie peut se manifester par d'autres symptômes tels que le besoin d'uriner plus fréquemment, des infections urinaires répétées ou encore des douleurs en bas du dos. Mais l'importance de tous ces symptômes ne permet pas d'évaluer la gravité de la maladie. Ces signes ne signalent pas forcément la présence d'une tumeur agressive mais peuvent être aussi la manifestation d'autres problèmes.

### 2.1.2 Facteurs de risque

Aujourd'hui un grand nombre de substances de la fumée de tabac telles que le benzo(a)pyrène, l'anthracène sont reconnues comme dangereuses pour la santé. Le tabagisme (actif ou passif) n'est pas seulement la principale cause du cancer du poumon, c'est également le 1<sup>er</sup> facteur de risque du cancer de la vessie [9]. Chez les hommes, le tabagisme actif est considéré comme responsable du développement tumoral vésical dans 53% des cas contre 39% chez les femmes. Mais l'augmentation du tabagisme chez les femmes pourrait entraîner la réduction de cette différence d'incidence homme/femme.

De même que les composés de la fumée, l'exposition prolongée à certains composés chimiques (amines aromatiques) de l'industrie peut entraîner le développement de ce type de tumeurs. Pour cette raison, les tumeurs vésicales peuvent être considérées comme maladie professionnelle. Les amines sont des dérivés d'ammoniac qui peuvent contenir un ou plusieurs cycles aromatiques (2-naphtylamine, 4-aminobiphényle et benzidine). Ces composés chimiques sont très présents par exemple dans les teintures. L'utilisation de la benzidine en particulier est en étroite corrélation avec le développement du cancer de la vessie depuis le début des années 1900 [10]. Une autre cause de cancer de la vessie provient de la contamination par l'arsenic à une concentration élevée (supérieure à 200 µg/l) dans l'eau que l'on boit [11]. En 2002, Moore et ses collaborateurs ont montré un lien entre le taux d'exposition à l'arsenic et des altérations chromosomiques chez des patients ayant un cancer de la vessie [12].

### 2.1.3 Classification des tumeurs

La vessie est un organe creux qui a une fonction de réservoir. La paroi de cet organe est constitué de quatre couches (figure 1) : la muqueuse (urothélium), la sous-muqueuse (lamina propria), le muscle et sur sa face extérieure, la couche séreuse (péritoine) faite de cellules épithéliales. Par conséquent, les cancers de la vessie s'organisent en 2 grandes catégories : les tumeurs superficielles n'infiltrant pas le muscle (TVNIM) et celles (TVIM) qui l'envahissent allant parfois jusqu'à atteindre les tissus avoisinants. Dans la plupart des cas, le premier diagnostic révèle des tumeurs superficielles avec néanmoins un fort taux de récurrence après traitement à un an (15% à 61%) [13] et un risque de développer des métastases élevé.

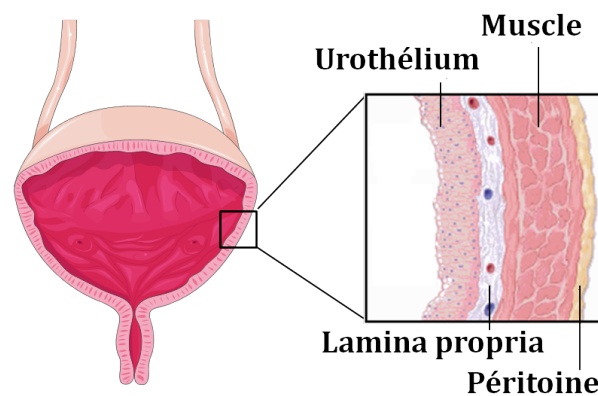
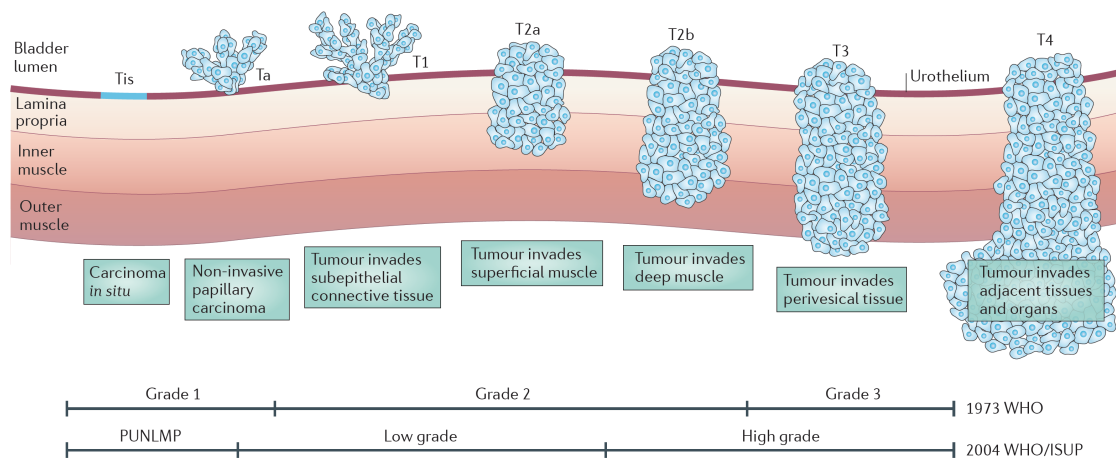


FIGURE 1 – Anatomie de la vessie

Actuellement deux systèmes de classification de l'OMS (WHO 1973 et 2004) sont utilisés pour classer les tumeurs en différents grades. La dernière classification, dix ans après sa publication, ne fait pas l'unanimité et fait l'objet de plusieurs papiers récents pour évaluer sa pertinence [14–17]. Cela corrobore la difficulté du diagnostic et par conséquent le besoin de marqueurs moléculaires pour renforcer la classification anatomopathologique. Aussi les tumeurs vésicales sont classées par un système de classification internationale appelée TNM (Tumor Node Metastasis). Ce type de classification est utilisé pour d'autres types de cancers et permet par les lettres T (tumeur), N (ganglion lymphatique) ou M (métastase) de renseigner sur la propagation de la tumeur. Après plusieurs examens, l'oncologue définit le grade de la tumeur en lui attribuant une valeur de 1 à 4 correspondant à des tumeurs superficielles (Tis, Ta et T1) jusqu'aux plus invasives (T2, T3 et T4).

La correspondance entre la classification TNM et celles de l’OMS est représentée figure 2.



**FIGURE 2 – Grades des tumeurs vésicales**  
Figure issue de la revue (Knowles *et al*, 2015) [29]

A des stades plus agressifs encore, la tumeur peut envahir plus ou moins les ganglions lymphatiques, ces tumeurs seront classées selon le système TNM dans la catégorie N (Nx, N0, N1, N2 ou N3). Avec la même logique, les tumeurs de la catégorie M (M0 ou M1) seront classées en fonction de l’importance des métastases.

#### 2.1.4 Traitements

Suite au diagnostic, pour traiter un cancer de la vessie, la principale action est la chirurgie : on parle de cystectomie. A l’aide d’un cystoscope le chirurgien va enlever une partie de la vessie en fonction de la gravité de la tumeur. Souvent la chirurgie est associée à un autre traitement tel que la chimiothérapie ou l’immunothérapie afin de limiter les risques de récurrences. Depuis ces dernières années, la “tri-thérapie” associant trois approches thérapeutiques différentes est mise en œuvre pour traiter les tumeurs de la vessie. Ces associations sont rendues possibles car les dommages potentiels liés au cumul des thérapies sont réduits grâce aux améliorations de chaque type de traitement [18].

Dans le cas des tumeurs superficielles, l’immunothérapie est privilégiée. Plusieurs développements de nouvelles thérapies visent à stimuler le système immunitaire. Cependant, pour traiter les tumeurs vésicales, le traitement le plus couramment préconisé repose

sur l'utilisation du BCG (vaccin Bilié de Calmette et Guérin bien connu comme le vaccin contre la tuberculose). L'effet bénéfique du BCG contre la récurrence du cancer de la vessie a été montré sur 9 patients par Morales et ses collègues en 1976 [19]. Depuis ce traitement est administré au patient par injections intra-vésicales régulières pour une durée de 6 semaines à 3 ans. Bien que cette thérapie soit couramment recommandée dans les tumeurs de bon pronostic, ses mécanismes d'action sont encore mal compris et font l'objet de nombreuses publications. Kawai et ses collaborateurs font un bilan et concluent que l'efficacité de ce traitement peut être encore améliorée en administrant le BCG après avoir inactivé le bacille [20]. Mais d'autres options sont également envisagées pour renforcer l'effet du BCG comme l'association avec l'acide hyaluronique qui fait l'objet d'un essai clinique [21] ou la vitamine D [22].

Pour les tumeurs bénignes l'immunothérapie va être privilégiée mais assez couramment, une des alternatives sera un traitement par l'administration de mitomycine C. Pour les tumeurs les plus agressives et métastatiques, c'est la chimiothérapie qui sera envisagée pour limiter les risques de récurrence. La chimiothérapie est commencée avant la cystectomie. Deux protocoles sont recommandés : soit l'association de la gemcitabine et du cisplatine (GC) soit une combinaison de méthotrexate, de vinblastine, de doxorubicine (ou adriamycine) et de cisplatine (MVAC) [23]. L'inconvénient du protocole MVAC est de provoquer un plus grand nombre d'effets secondaires. D'autres co-traitements [23] comme le paclitaxel ou le docétaxel avec le cisplatine sont étudiés dans le but d'améliorer l'efficacité de la chimiothérapie tout en essayant de réduire les effets secondaires.

Une autre alternative pour traiter les tumeurs vésicales est la radiothérapie. Celle-ci peut être préférée lorsque la tumeur est invasive. La radiothérapie associée à la chimiothérapie évite une intervention chirurgicale trop importante dans un premier temps. Dans certains cas, le double traitement n'est pas forcément suffisant et une cystectomie peut devenir inévitable.

## 2.2 Caractéristiques moléculaires

Depuis une quinzaine d'années, Hanahan et Weinberg soulignent le fait que "le cancer est une pathologie impliquant des modifications génomiques" [3,24]. Il est maintenant établi que chaque type de cancer peut développer ses propres particularités moléculaires. Dès 1993, d'importantes altérations du chromosome 9 sont mises en évidence et plusieurs publications paraissent sur le sujet pour tenter de comprendre le rôle de ce chromosome où les altérations sont présentes dans 54% des cas [25] de patients ayant un cancer de la vessie [26]. Plus tard, Gu et ses collaborateurs ont montré une corrélation entre la présence d'altérations du chromosome 9 et l'exposition au benzopyrène [27]. Cette molécule présente dans les goudrons de fumées de cigarette pourrait altérer préférentiellement la région 9p21 (perte d'hétérozygotie, mutation ou méthylation). Cette région contient un gène tumeur suppresseur (CDKN2A) impliqué dans le cycle cellulaire. Les altérations de cette partie du chromosome ont des conséquences importantes expliquant le développement tumoral [28]. En effet, le gène CDKN2A (Cyclin Dependent-Kinase Inhibitor 2A) code pour deux transcripts alternatifs permettant l'expression des protéines : p14ARF et p16INK4A. Dans une situation "normale", ces deux protéines vont induire l'arrêt du cycle cellulaire par interaction avec les protéines p53 et pRB (protéine du rétinoblastome) respectivement (figure 3). L'expression aberrante du gène CDKN2A liée aux altérations de la région chromosomique 9p21 conduit donc à une dérégulation du cycle cellulaire et participe de ce fait au développement du cancer.

Parmi les altérations les plus fréquentes pour le cancer de la vessie décrites dans les revues de Knowles *et al* (2015) et Massari *et al* (2015), une mutation du gène FGFR3 est détectée à 80% dans les tumeurs superficielles (Ta) [29,30]. L'activité de ce récepteur consiste notamment à réguler la prolifération et la migration cellulaire. Cette mutation étant présente plutôt dans les tumeurs de bas grades, elle est de bon pronostic contrairement à la mutation du gène p53 qui est détectée le plus souvent dans les tumeurs invasives [30]. Cette mutation du gène FGFR3 active la voie RAS-MAPK conduisant à la survie et prolifération des cellules, amplifiant ainsi le phénomène de développement tumoral. Dans le cas où FGFR3 n'est pas muté, l'activation de cette voie reste forte puisque les gènes HRAS ou KRAS peuvent être mutés dans les cancers de la vessie. Les mutations de RAS et de FGFR3 sont toutefois exclusives, un patient n'aura que l'un ou l'autre des gènes

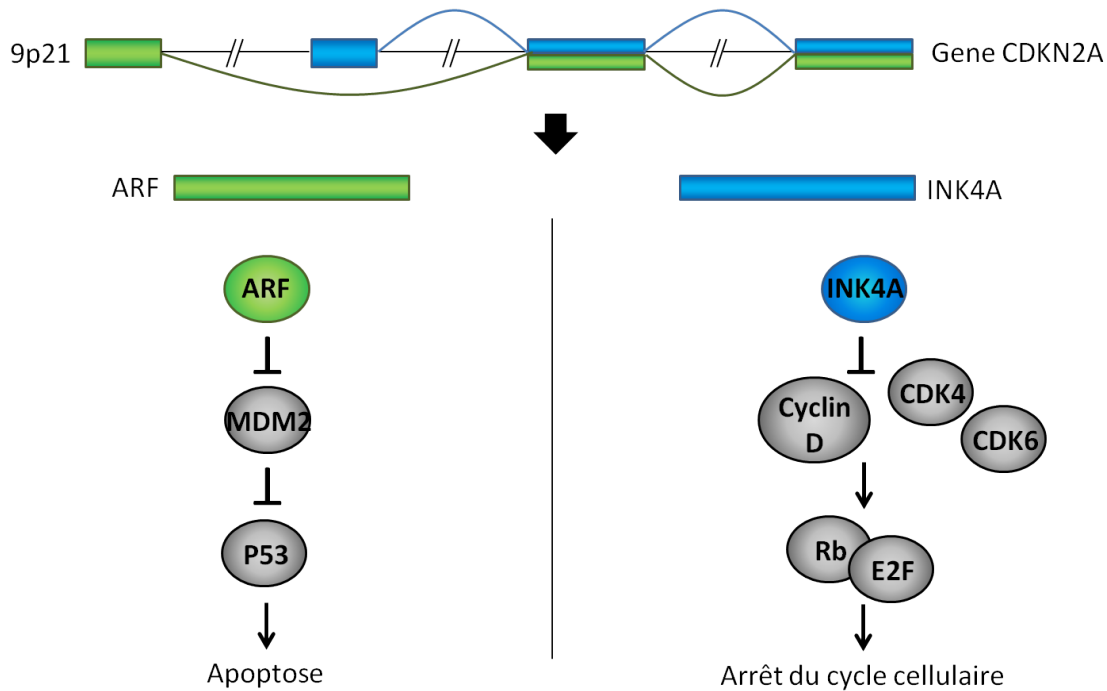


FIGURE 3 – Rôle du gène CDKN2A dans le contrôle du cycle cellulaire

sous une forme mutée. Des travaux récents ont été réalisés avec une cohorte de patients (pas uniquement des tumeurs urothéliales) montrant une résistance aux traitements par le cisplatine. Cette étude montre que dans un tiers des cas, pour les patients présentant une mutation FGFR3 ou RAS le traitement cisplatine s'avérera inefficace [31]. De plus, l'expression du gène FGFR3 peut être perturbée par l'expression du microARN miR-100. Ce petit ARN pourrait provoquer une réduction de l'expression de FGFR3 et intervenir dans la régulation de la chimiosensibilité [32, 33].

Après leur découverte dans les années 1990, les microARN (ou miR) suscitent un grand intérêt et leur étude devrait aider à la compréhension du développement tumoral. Braicu et son équipe ont fait un point sur ce sujet dans le cadre du cancer de la vessie [34]. Dans ce bilan, on retrouve comme dans une grande majorité de cancer, le microARN miR-21 fortement surexprimé dans les tissus tumoraux. Il a été montré qu'un ensemble de 4 microARN (miR-137, miR-124-2, miR-124-3 et miR-9-3) pouvaient avoir un rôle de biomarqueurs pour ces tumeurs. L'expression de ces microARN serait réprimée dans les tumeurs urothéliales par la méthylation de leur région promotrice [35]. Mais le bilan des microARN dans les tumeurs n'est pas simple à faire tel que le montre l'exemple du microARN miR-9. En effet, si la production de ce microARN est censée être abaissée par

la méthylation d'une région chromosomique, ce microARN n'est pas pour autant absent des tumeurs vésicales. Deux équipes au moins [36, 37] ont montré que miR-9 est plus abondant dans les tumeurs (et dans les cellules T24 modèles de cancer de la vessie) et en particulier dans les tumeurs invasives, que dans les cellules et tissus sains. D'après l'équipe de Xie, la surexpression de miR-9 favoriserait l'invasion en régulant l'expression de CBX7 [36].

Actuellement, les microARN sont encore beaucoup moins étudiés dans le cadre du diagnostic et de la thérapie des cancers de la vessie que dans d'autres types de cancers. Les données issues des différentes technologies de dosages (à plus ou moins haut débit) des petits ARN permettent le développement de cet axe recherche associant le diagnostic et la thérapie. C'est ce qu'illustre Braicu dans sa revue par la figure 4.

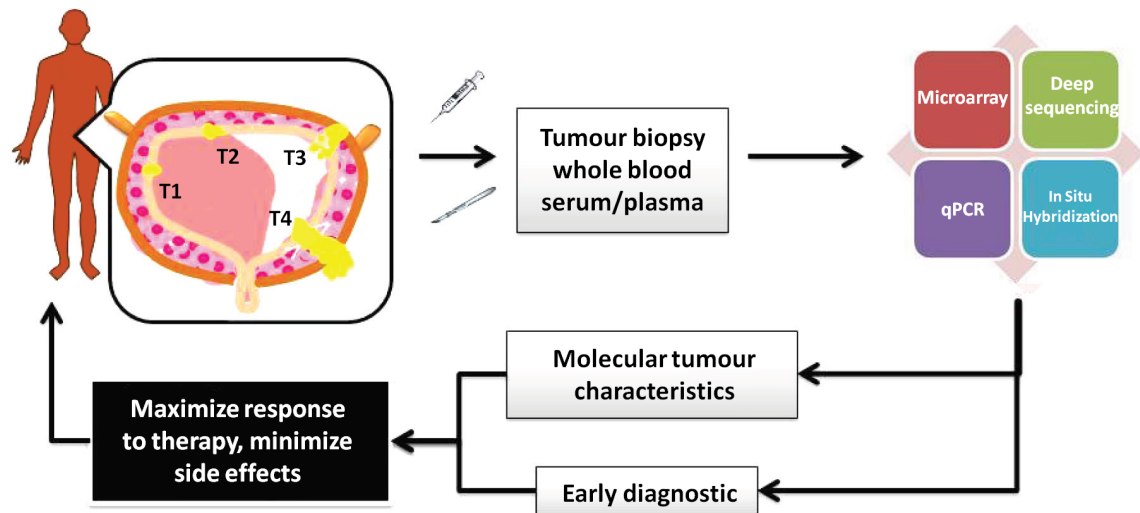


FIGURE 4 – Intérêt de la biologie moléculaire dans la prise en charge des patients atteints d'une tumeur de la vessie

Figure issue de la revue de Braicu *et al.* (2015) [34]

### 3 Les tumeurs du cerveau

#### 3.1 Caractéristiques cliniques

Le cerveau est le principal régulateur des autres organes. Il est organisé en plusieurs régions où chacune gère une fonction bien particulière. C'est pourquoi, l'apparition d'une



tumeur dans le cerveau va, en fonction de la localisation et de la taille de la tumeur, induire des symptômes très différents. Deux grands types cellulaires constituent cet organe : les neurones et les cellules gliales (macroglie et microglie). On considère généralement que les neurones assurent la fonction de gestion de l'information alors que les cellules macrogliales, joueraient un rôle de soutien et d'apport de nutriments aux neurones. Toutefois, un rôle de ces dernières dans la communication synaptique est à présent reconnu. Les cellules microgliales, mobiles, sont douées d'activité de phagocytose. Il existe plusieurs types de tumeurs cérébrales, certaines pouvant être bénignes ou peu agressives comme les méningiomes (qui affectent les tissus enveloppant le cerveau) et d'autres bien plus fulgurantes telles que les glioblastomes (qui affectent des cellules gliales).

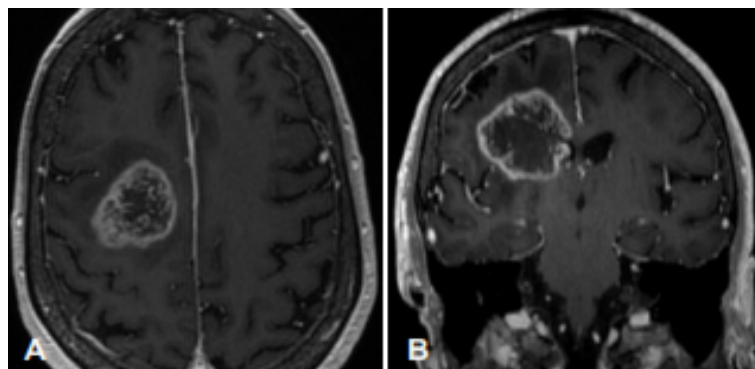
### **3.1.1 Epidémiologie et diagnostic**

Les tumeurs cérébrales sont peu fréquentes. En France, d'après des données de l'Institut National du Cancer (INCa) et IARC, ce type de cancer représente un peu moins de 2% de l'ensemble des cancers. Soit une incidence en France (en 2012, données Globocan IARC) de 7,5 cas pour 100 000 habitants et par an (7,7 cas pour l'Europe). Bien que ces tumeurs soient rares par rapport à d'autres cancers, elles n'en sont pas moins agressives. De ce fait, elles sont la troisième cause de mortalité chez l'adulte jeune (moins de 35 ans) et la deuxième chez l'enfant (moins de 15 ans). Parmi les tumeurs cérébrales, ce sont les tumeurs affectant les cellules gliales qui sont les plus fréquentes. Les gliomes qui sont des tumeurs gliales, représentent 70% des tumeurs primaires malignes chez l'adulte [38]. Ces tumeurs sont très hétérogènes [39] et par conséquent la survie des patients est très variable. La survie des patients à qui l'on diagnostique un gliome de grade II est supérieure à 5 ans. Alors qu'un patient avec une tumeur de grade III peut espérer une survie de deux ans seulement et cet espoir se réduit encore pour les patients ayant un gliome de grade IV (appelé encore glioblastome) [40].

La manifestation de ces tumeurs dépend de la localisation et du développement de la masse tumorale. La prolifération non contrôlée des cellules tumorales va entraîner une augmentation de pression intracrânienne conduisant à des symptômes tels que des maux de têtes, vertiges, troubles visuels, crises d'épilepsie [41]. Lorsque le médecin suspecte

une tumeur au cerveau, après un bilan complet, c'est par imagerie que l'on pourra avoir confirmation ou non de la présence d'une tumeur. L'imagerie peut permettre un diagnostic (souvent en complément d'analyse par un anatomopathologiste). Elle permet aussi un suivi du patient peu invasif au cours de son traitement [42].

L'imagerie peut être réalisée par deux méthodes, soit par CT-scanner (tomodensitométrie) soit par IRM (Imagerie par Résonance Magnétique) [43]. Afin de mieux distinguer le volume de la tumeur, on administre aux patients des agents de contraste tels que des produits iodés pour le CT-scanner et des agents paramagnétiques en IRM (sels de gadolinium par exemple). L'avantage de l'imagerie par résonance magnétique c'est une meilleure sensibilité permettant de mieux préciser la localisation et le contour de la tumeur (exemple figure 5).



**FIGURE 5 – Détection d'un glioblastome par IRM**

Figure issue de la revue de Mabray *et al* (2015) [42], (A) plan de coupe axiale, (B) plan de coupe coronale

### 3.1.2 Facteurs de risque

On peut se demander si des facteurs environnementaux favorisent le développement de cancers du cerveau (comme par exemple l'utilisation quotidienne du téléphone portable). Nous manquons certainement encore de recul sur la question et les avis sont controversés. Cette question est abordée de manière épidémiologique à partir de données recueillies ou de manière plus pratique par différentes mesures. L'équipe de Larjavaara par exemple a essayé d'évaluer la corrélation entre la position du téléphone portable près de l'oreille par rapport à la localisation des gliomes et arrive à la conclusion que l'exposition au téléphone portable n'a pas de conséquences nocives sur le cerveau [44, 45].

En revanche, d'autres équipes confirment (en mai 2011, l'IARC avait évoqué un possible effet carcinogène) qu'il peut y avoir un lien entre l'utilisation du téléphone portable et le développement tumoral [46, 47].

En revanche, contrairement aux tumeurs de la vessie, le tabagisme n'est pas un facteur de risque majeur pour le cancer du cerveau [48]. Parmi les liens évoqués avec le développement de tumeurs cérébrales, le diabète pourrait être aussi une piste mais l'étude menée par Kitahara et ses collègues doit être approfondie [49].

### 3.1.3 Classification des tumeurs

Le cancer du cerveau regroupe de nombreuses formes de tumeurs. Les tumeurs cérébrales sont classées selon l'OMS en fonction du type cellulaire prédominant dans la tumeur [40]. Les tumeurs les plus fréquentes étant les tumeurs gliales, un focus ici est fait sur ce type de tumeur uniquement. C'est en 1926 que Bailey et Cushing établissent une classification qui fut la première à trier les tumeurs sur la base de leur morphologie. Par la suite, le développement des techniques de cytologie et histologie a conduit à l'élaboration de plusieurs classifications : en 1938, et en 1949 puis les classifications de l'OMS en 1979, 1993, 2000 et 2007. Comme pour les tumeurs de la vessie, plusieurs systèmes de classification existent. En parallèle de la classification de l'OMS qui est la plus utilisée, la classification dite de Saint-Anne (Paris) [50] a la particularité de combiner l'histologie avec l'imagerie IRM.

Chaque tumeur, en plus du type cellulaire majoritaire, est classée par l'OMS en fonction d'un grade reflétant sa gravité en fonction des critères morphologiques (différenciation, nécrose, présence de micro-vaisseaux...). Les grades sont organisés de la manière suivante :

- ✓ grade I : Tumeurs bénignes, croissance lente, bien localisées
- ✓ grade II : Tumeurs pré-malignes, croissance lente, bordure diffuse
- ✓ grade III : Tumeurs malignes, croissance modérée
- ✓ grade IV : Tumeurs très malignes, croissance très rapide, plusieurs types cellulaires

Le grade est important dans la prise en charge du patient afin de déterminer la thérapie appropriée. Par exemple, une tumeur de grade I, non infiltrante, pourra être traitée uniquement par exérèse. A l’opposé, une tumeur de grade IV doit rapidement être traitée. Dans ce cas, la radiothérapie et /ou la chimiothérapie seront mises en place.

Le tableau suivant présente les grades des gliomes les plus fréquents selon la classification de l’OMS :

Type de tumeurs	Grade
Astrocytome pilocytique	I
Astrocytome diffus	II
Astrocytome anaplasique	III
Ependymome	II
Glioblastome	IV
Gliosarcome	IV
Oligodendrogliome	II
Oligodendrogliome anaplasique	III

TABLE 1 – Classification OMS 2007 des principaux gliomes

Malheureusement, cette classification ne permet pas de poser les diagnostics avec une parfaite reproductibilité. En effet, en 1996 la publication de Mittler et ses collègues montre cette difficulté de diagnostic en particulier pour les astrocytomes anaplasiques [51]. La classification de l’OMS est uniquement basée sur des données histologiques de tumeurs très hétérogènes. Ceci ayant pour conséquence une très grande variabilité dans les relectures pour confirmer un même cas par le même anatomopathologiste ou son collègue. Le diagnostic et la thérapie étant liés, ce défaut de classification est une limitation à l’efficacité du traitement [52].

Pour pallier ce problème, le Docteur Daumas Duport a établi une nouvelle approche appelée la classification de “Saint Anne”. Cette classification repose sur l’analyse de la structure histologique de la tumeur mais aussi elle intègre des données cliniques et les résultats de l’imagerie par résonance magnétique [53–55]. L’imagerie permet une observation plus large du tissu tumoral permettant de situer l’observation histologique afin d’en

évaluer sa représentativité par rapport à la tumeur. Ainsi trois types de structures sont définies : solide, infiltrante ou mixte. Ces structures se différencient par leur vascularisation qui va permettre une prise de contraste plus ou moins importante en IRM et la localisation groupée ou dispersée des cellules tumorales par rapport au tissu sain. On parle d'hyperplasie endothéliale à partir d'une observation microscopique où les noyaux des cellules endothéliales se touchent. De cette manière, les gliomes sont classés essentiellement en trois classes :

- ✓ oligodendrogliomes et oligoastrocytomes grade A (prise de contraste en IRM, pas d'hyperplasie, médiane de survie 11 ans)
- ✓ oligodendrogliomes et oligoastrocytomes grade B (prise de contraste modérée en IRM, hyperplasie, médiane de survie 3,5 ans)
- ✓ glioblastomes (prise de contraste en IRM, composante astrocytaire)

### **3.1.4 Traitements**

Les tumeurs gliales, dans une grande majorité des cas (75%), l'oncologue proposera au patient la chirurgie en première intention thérapeutique. Le neurochirurgien effectuera l'exérèse de la tumeur en fonction de la localisation de celle-ci pour ne pas endommager une région fonctionnelle du cerveau. La résection de la masse tumorale visible en imagerie (certaines sont diffuses et l'exérèse totale difficile) permet la diminution de l'hypertension intracrânienne améliorant donc l'état du patient. Si pour les tumeurs de bas grades, la chirurgie est un espoir et permet d'augmenter la durée de vie ; ce n'est pas le cas pour des tumeurs de haut grades pour lesquelles les patients ont une survie de quelques mois seulement. En effet, les lésions de plus haut grades, sont plus invasives, moins localisées et l'intervention du neurochirurgien ne permet pas d'éliminer toutes les cellules tumorales comme l'illustre la figure 6 (page suivante). Il a été estimé à partir de coupes anatomiques qu'une cellule sur dix peut être maligne dans une zone de 2 cm autour de la masse tumorale et une cellule sur cent entre 2 cm et 4 cm autour de la masse tumorale qui devraient être enlevées. Ainsi la tumeur peut récidiver par le développement de ces cellules qui ont envahi le parenchyme cérébral au-delà des marges de la tumeur observée en IRM. C'est pour lutter contre cette réalité que la chirurgie est associée très souvent à d'autres solutions thérapeutiques. Enfin une intervention chirurgicale est indispensable pour établir un diagnostic anatomopathologique de la tumeur et adapter le traitement. Dans les cas où l'exérèse est impossible, il y a au moins une biopsie qui est pratiquée.

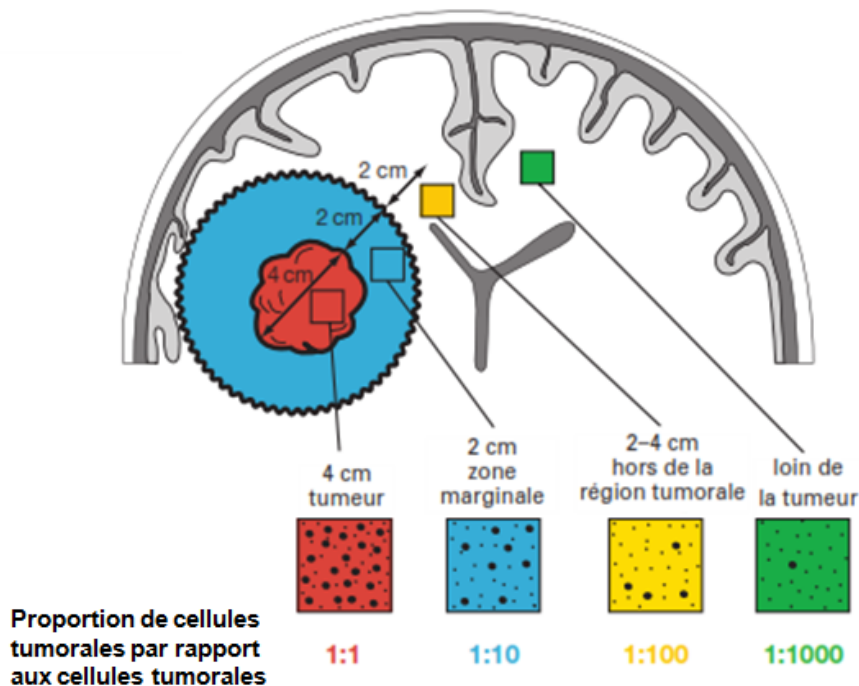


FIGURE 6 – **Illustration du caractère infiltrant des gliomes de haut grades**

Figure extraite de la revue de Hofer S et Merlo A (2002) [56]

La radiothérapie fait partie des thérapies généralement associées à la chirurgie pour traiter une tumeur du cerveau. Cette technique thérapeutique consiste à irradier la tumeur par des rayonnements ionisants (rayons X). En 1895 le professeur Röntgen découvre un rayonnement qu'il appela "Rayons X". Peu de temps après cette découverte, des essais thérapeutiques de ces rayonnements ont été réalisés par un médecin français Victor Despeignes pour soigner un cancer de l'estomac (1896) et par un médecin suédois Thor Stenbeck pour traiter un cancer de la peau (1899). Dans le même temps, le phénomène de radioactivité, caractérisé par l'émission d'un rayonnement ionisant par des métaux aux noyaux instables (uranium, radium) est découvert par Henri Becquerel (1896) puis par le couple Pierre et Marie Curie (1898). Ces découvertes déboucheront sur le concept de curiethérapie aux multiples applications médicales. Il faudra attendre 1950 pour que les rayons X permettent le traitement de tumeurs plus profondes. Au niveau du tissu biologique irradié, les photons émis vont ioniser les molécules d'eau et produire des radicaux libres. Ces radicaux vont alors interagir avec les molécules d'ADN provoquant des lésions. Les cellules qui ont leur contenu en ADN lésé vont à terme entrer dans un processus de mort cellulaire. Ce traitement type permet de cibler essentiellement les cellules tumorales.

En effet ces cellules ont une moins bonne capacité à réparer leur ADN que des cellules normales. Dans le cadre des gliomes, les tumeurs de haut grades sont plus résistantes que les bas grades à la radiothérapie et cela se traduit par une différence de survie après traitement du patient.

L'autre type de traitement associé à la chirurgie ou à la radiothérapie est la chimiothérapie. Ce terme (chimiothérapie) englobe toutes les thérapies utilisant des molécules chimiques visant à réduire le développement tumoral. Si certaines molécules sont utilisées pour de nombreux types de cancer comme le cisplatine, la chimiothérapie des tumeurs du système nerveux central est différente de celle des tumeurs urothéliales. Dans le traitement des tumeurs gliales, les agents thérapeutiques les plus couramment utilisés sont le témozolomide, la carmustine ou la lomustine. Ces molécules agissent sur la réplication de l'ADN et empêchent ainsi la division cellulaire des cellules tumorales. L'avantage du témozolomide est de passer la barrière hémato-encéphalique tout en étant moins toxique que certaines autres molécules et il peut-être administré par voie orale. De plus, cette molécule (témozolomide) combinée à la radiothérapie permet d'augmenter l'efficacité de la thérapie pour les gliomes de haut grades particulièrement résistants aux traitements. La survie à 2 ans des patients avec un glioblastome est augmentée de 15% par cette approche thérapeutique par rapport aux autres solutions de traitement [57].

### **3.2 Caractéristiques moléculaires**

Comme pour les tumeurs de la vessie, le développement anarchique des cellules peut être lié à des altérations génétiques dérégulant le cycle cellulaire. La région chromosomique 9p est aussi altérée dans les tumeurs du cerveau. Pour les tumeurs cérébrales, il a été montré que la perte d'hétérozygotie de la partie 10q est une caractéristique des glioblastomes [58] et à l'inverse, il peut y avoir un gain du chromosome 7. Ces altérations sont retrouvées dans 36% à 75% des tumeurs de grade IV [59]. En ce qui concerne les oligodendrogliomes, ils se définissent par une co-délétion (perte d'hétérozygotie) sur les chromosomes en 1p et 19q pour 61 à 89% des patients ayant un oligodendrogliome de grade II ou III [60].

D'autres altérations, plus ciblées, sont retrouvées fréquemment dans les tumeurs cérébrales. C'est le cas par exemple, du récepteur à l'EGF (EGFR) qui est surexprimé dans

plus de 60% des cas des glioblastomes primaires. Cette surexpression entraîne une prolifération cellulaire incontrôlée en activant la voie de signalisation PIK3/AKT. Cette voie de signalisation inhibe l'apoptose et favorise la prolifération cellulaire. Pour caractériser les glioblastomes et en particulier les glioblastomes secondaires, en clinique, on s'intéresse au taux de méthylation du gène de la méthylguanine méthyltransférase (MGMT). Le promoteur de ce gène est hyperméthylé dans 75% des glioblastomes secondaires (glioblastomes qui s'installent chez les patients par évolution de tumeurs de bas grades) et 35% des glioblastomes primaires (tumeurs qui se développent d'emblée comme des glioblastomes chez les patients) [61]. Enfin les oligodendrogliomes se démarquent des autres gliomes par une mutation du gène de l'Isocitrate DésHydrogénase cytosolique 1 (IDH1). Cette mutation est très peu fréquente dans les glioblastomes primaires alors qu'elle est retrouvée dans 50% des glioblastomes secondaires et 70% des oligodendrogliomes. La mutation majoritaire porte sur le codon 132 et conduit à un changement de l'arginine en une histidine. La protéine mitochondriale équivalente (IDH2) peut elle aussi être mutée dans ce type de tumeur. Les deux enzymes lorsqu'elles sont mutées ne sont plus actives entraînant une accumulation de 2-hydroxyglutarate. Le risque de développer un cancer du cerveau est alors plus grand.

Parmi les altérations moléculaires qui caractérisent les gliomes, l'expression de certains microARN est aussi corrélée à l'histologie des tumeurs. Plusieurs équipes montrent des profils de microARN dérégulés dans les oligodendrogliomes et astrocytomes de différents grades [62–65]. Mais la sélection de marqueurs permettant un diagnostic sans ambiguïté permettant de distinguer un glioblastome d'un oligodendrogliome reste encore à établir pour ces tumeurs extrêmement proches.

## 4 Les microARN

Il y a maintenant plus de trente ans qu'une nouvelle famille de petits ARN non codants était mise en évidence. Pour la première fois décrits par Kennedy et ses collaborateurs en 1974, ces petits ARN étaient appelés "translational control RNA" [66]. Ces petits ARN non-codants ne seront étudiés en détail qu'à partir des années 90. Ils ont été redécouverts grâce à l'équipe de Richard Jorgensen, après avoir introduit un gène responsable de la coloration des pétales dans les cellules de pétunias. L'introduction du



gène CHS (Chalcone Synthase) devait permettre d'intensifier la couleur des pétunias. Cependant l'équipe obtint 42% de fleurs blanches ou pâles . Ce phénomène appelé "co-suppression" [67] résulte de la production dans les cellules de pétunias surexprimant le gène de la chalcone synthase d'ARN courts interférents conduisant à la dégradation de l'ARN codant la chalcone synthase [68]. Il faudra attendre 2001 pour définir mieux la catégorie de "microARN", sous-groupe d'ARN interférents [69], qui présentent une taille moyenne de 20 bases, sont monocaténaire et sont produits de manière endogène par les cellules. Ils représentent environ 2% des ARN totaux. On les appellent couramment miARN ou encore miR. La grande majorité (80%) de ces microARN sont issus d'introns de gènes. Il a été mis en évidence une coexpression des gènes contenant les microARN et les microARN mature [65, 70], mais cela n'est pas systématique [65]. L'ensemble de ces microARN est référencé dans une base de donnée gérée par l'Université de Manchester au Royaume-Uni. Cette base est appelée miRBase (<http://www.mirbase.org/>), elle recense actuellement 2 588 microARN matures humains dans sa version 21 (juin 2014).

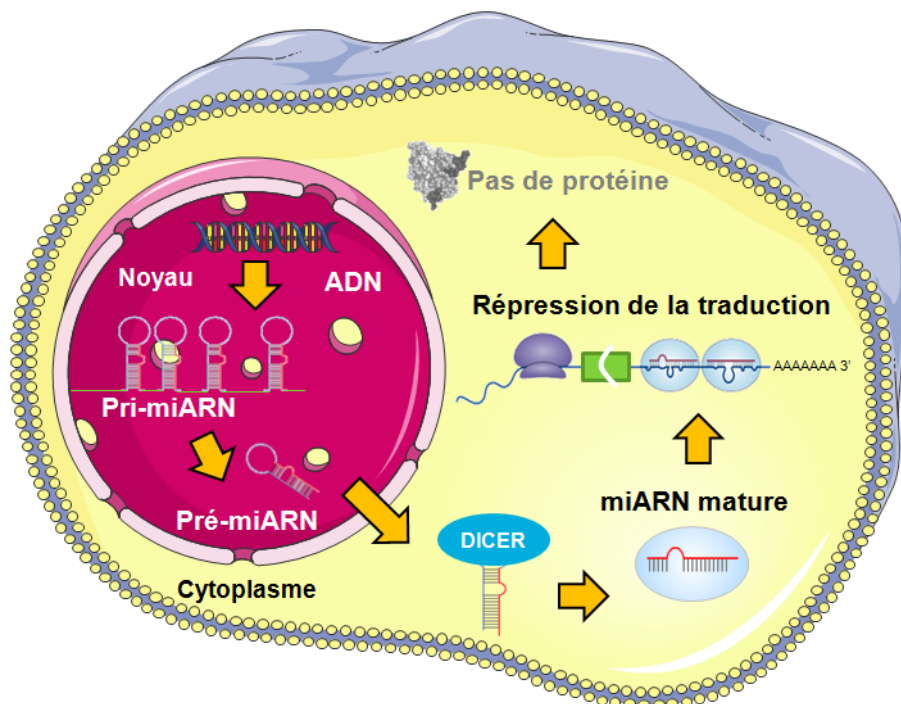


FIGURE 7 – Les grandes étapes de maturation d'un microARN

#### 4.1 Biogenèse

Les gènes des microARN sont d'abord exprimés sous forme de longs précurseurs de quelques kilobases et appelés pri-microARN [71]. Ces pri-microARN contiennent une

coiffé, une queue polyA [72], leur transcription est réalisée par une polymérase II ou III. Ensuite la première étape de maturation des microARN dans le noyau est la coupure des pri-microARN par l'enzyme Drosha (endonucléase de masse moléculaire de 650kDa nécessitant pour son activité un cofacteur, la protéine DGCR8 (DiGeorge syndrome critical region 8)). Un ARN de 60 à 100 nucléotides ayant une structure en épingle à cheveux est alors généré : le pré-microARN [73]. Ce pré-microARN est ensuite exporté du noyau grâce à une interaction avec l'exportine 5 vers le cytoplasme. Le pré-microARN est ensuite clivé par la ribonucléase Dicer qui permet l'hydrolyse de la structure en boucle pour libérer un petit ARN double-brin d'une vingtaine de nucléotides (cf figure 7). Puis une protéine de la famille Argonaute (Ago1 ou Ago2) en association avec Dicer et d'autres protéines vont former le complexe RISC (RNA-induced Silencing Complex) prenant en charge le double brin. Une hélicase va aider à la séparation des deux brins d'ARN pour ne garder plus qu'un seul brin. Ce brin sera appelé microARN mature [74].

De plus, pour un microARN donné le processus de biogenèse conduira à la production d'un ensemble de plusieurs variants, en terme de longueur du microARN mature (quelques bases en plus ou en moins au niveau des extrémités). Ces différentes formes sont appelées "isomiR".

## 4.2 Nomenclature

Les microARN ayant des séquences très proches, il a été nécessaire de mettre en place un système d'annotation pour nommer les différents microARN répertoriés dans miRBase. Des microARN homologues peuvent être retrouvés dans plusieurs organismes et la nomenclature des microARN permet de bien les identifier. Les microARN sont identifiés par un numéro précédé de l'abréviation "miR" ou "mir" permettant respectivement la distinction entre le microARN mature (miR) et la boucle précurseur (épingle à cheveux) du microARN (mir). A cette manière de nommer le microARN correspond respectivement un numéro d'accèsion MIMAT (pour le mature) et MI (pour le précurseur). Par exemple pour le miR-21 chez l'homme, le précurseur est noté MI0000077 et le microARN mature MIMAT0000076. De plus, un préfixe de trois ou quatre lettres est utilisé pour faire la distinction entre espèces comme par exemple hsa-miR-101 et mmu-miR-101 pour faire la différence entre le microARN chez l'Homme (hsa : *Homo sapiens*) et chez la Souris

(mmu : *Mus musculus*) [75]. D'autre part, deux microARN différents peuvent provenir d'une même boucle précurseur. Le système d'annotation permet la distinction de ces deux microARN : le microARN synthétisé à partir du côté 5' de la boucle est noté 5p et le microARN du côté 3' est noté 3p. Cette annotation 3p et 5p cohabite encore avec une annotation basée sur l'abondance relative des deux formes dans un organisme. La forme majoritaire est nommée miR et la forme minoritaire miR\* [76].

Dans certains cas, plusieurs régions chromosomiques différentes peuvent conduire à la synthèse du même miR. Pour ces microARN, il faut donc distinguer leurs précurseurs qui seront annotés 1, 2, 3... selon le nombre de régions chromosomiques concernées ; comme dans l'exemple suivant où le microARN mature miR-128 provient de deux régions chromosomiques différentes et l'on notera les précurseurs de cette manière : hsa-mir-128-1 (dont le gène est localisé sur le chromosome 2q21.3) et hsa-mir-128-2 (dont le gène est localisé sur le chromosome 3p22.3). Il existe des cas où les microARN matures sont très similaires (une à quelques bases de différence seulement). Dans ces cas là, les numéros des microARN sont suivis de a, b, c. . . Par exemple hsa-mir-517a, hsa-mir-517b, hsa-mir-517c sont des microARN dont la séquence mature présente quelques petites variations. Certains microARN font exception et ne suivent pas cette nomenclature, c'est le cas de la famille des microARN hsa-let-7 (hsa-let-7a à hsa-let-7g et hsa-let-7i).

Actuellement, la base de données qui recense les microARN (miRBase v21.0) identifie 1 881 précurseurs de microARN pour l'espèce humaine et 2 588 microARN matures. Le nombre de microARN répertorié, toutes espèces confondues, est en très forte évolution depuis la découverte des microARN et coïncide avec le développement du séquençage de nouvelle génération.

### 4.3 Rôles et fonctions

Un ARNm cible peut être chargé au sein du complexe RISC et le microARN interagira avec la région UTR en 3' (région non codante) de l'ARNm. Deux voies de "Silencing" sont alors possibles, soit la dégradation de l'ARNm cible, soit la répression de la traduction de ce dernier, en fonction de la force de complémentarité microARN-ARN messenger [77].

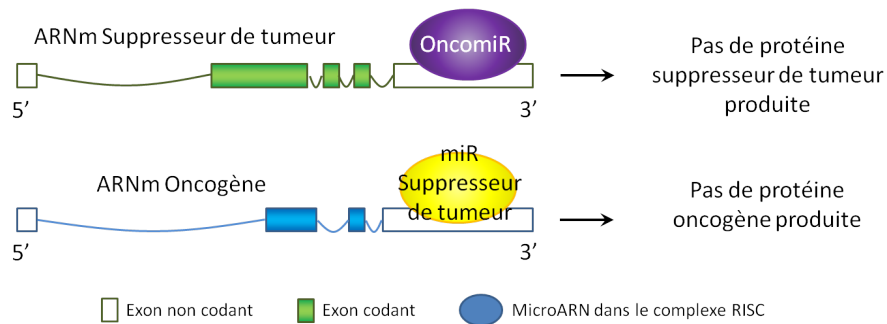


FIGURE 8 – Rôles des microARN dans le cancer

Il a été montré que dans certains cancers, les régions chromosomiques avec des modifications génétiques contiennent plus de 50% des microARN [78] menant à des dérégulations d'expression de ces microARN notamment dans les gliomes [79]. Or, certains microARN dérégulés semblent être à l'origine d'un grand nombre de tumeurs. En effet, un microARN peut jouer le rôle d'oncogène (dit "oncomiR") ou de suppresseur de tumeur (voir figure 8). Suivant le type de cancer, un même microARN peut être oncogène ou au contraire contribuer à la suppression tumorale, c'est le cas par exemple du microARN miR-125b qui serait oncogène dans le cancer du poumon alors qu'il pourrait être suppresseur de tumeur dans le cancer du sein [80]. Ces microARN (oncomiR et miR suppresseurs de tumeur) jouent un rôle important dans la tumorigenèse par leur fonction de régulation de voies cellulaires majeures telles que le contrôle du cycle cellulaire ou de la mort cellulaire.

C'est une étude sur le microARN miR-155 chez la souris qui a permis de faire le lien direct de cause à effet entre microARN et cancer pour la première fois. L'équipe de Croce a montré par la surexpression du miR-155 chez des souris transgéniques l'induction de la prolifération de cellules préleucémiques dans la rate et la moelle osseuse [81]. Actuellement, le microARN miR-21 est l'un des oncomiR qui est reconnu comme surexprimé dans une majorité de tissus tumoraux [82]. Un exemple inverse, miR-15a et miR-16 sont sous-exprimés dans environ 70% des cas de leucémies lymphoïdes chroniques [83]. Ils sont considérés comme suppresseurs de tumeur. Ces deux microARN conduisent à la mort cellulaire en ciblant l'ARNm qui code pour la protéine anti-apoptotique BCL2 (B Cell Lymphoma 2) [84].

Dans certaines situations, en particulier dans le cancer, une combinaison de plusieurs miR peut être produite par un même pri-miARN (long précurseur), on appelle cela

un “cluster de microARN”. Le cluster de miR-17-92 étudié pour son rôle favorisant la progression tumorale est constitué de 6 microARN : miR-17, miR-18a, miR-19a, miR-20a, miR-19b-1 et miR-92a-1. C’est un cluster oncogène, la co-expression de ces microARN induit une répression importante de protéines tumeurs supprimeurs telles que PTEN [85]. La régulation de l’expression de ce cluster de microARN est induite par l’intermédiaire de l’oncoprotéine MYC, qui est un facteur de transcription.

### **4.4 microARN et thérapie**

Depuis ces dernières années, l’intérêt pour l’étude des microARN en cancérologie est considérable [86]. Les études qui portent sur ces petits ARN ont pour objectifs soit de comprendre leur rôle dans la progression tumorale soit de développer des solutions pour la clinique afin d’améliorer encore la classification des tumeurs ou bien la thérapie ciblée. Ces idées sont issues du fait que l’on observe des dérégulations des taux de microARN dans les cellules tumorales par rapport aux cellules saines. Ainsi pour le diagnostic ces dérégulations peuvent servir de “signature” d’un type tumoral et pour la thérapie permettre l’identification de nouvelles cibles thérapeutiques.

On peut imaginer utiliser les microARN pour des actions thérapeutiques afin de rétablir une situation de déséquilibre de la concentration de certains microARN dans des cellules pathologiques et ceci tout en espérant pouvoir limiter les effets secondaires de cette thérapie puisque la molécule active serait de ce fait composée par un microARN tout à fait identique au microARN naturellement produit par les cellules. En d’autres termes, le microARN administré comme molécule thérapeutique permettrait de combler un déficit de production d’un miR ou de cibler un gène responsable d’une maladie. A l’inverse, pour les microARN surabondants dans les cellules pathologiques l’utilisation d’antagonistes de ces microARN permettrait d’inhiber leur action et de rétablir si possible une situation normale. De plus, l’action de cette thérapie serait limitée dans le temps et parfaitement ciblée afin de rétablir un équilibre sans modifier durablement le patrimoine génétique. Ce qui est un point positif d’un point de vue éthique par rapport à d’autres thérapies géniques.

Cette approche devient concrète avec des essais déjà bien avancés dans plusieurs pathologies. Un premier exemple en train de se développer consiste à contrôler l’angio-

genèse par l'intermédiaire de microARN pour lutter contre la dégénérescence maculaire liée à l'âge [87, 88]. Mais l'exemple le plus abouti est certainement le développement de l'antimiR-122 (antagoniste du microARN miR-122) destiné à lutter contre l'hépatite C et prévenir surtout les risques ultérieurs de développement d'hépatocarcinomes. En effet, ce microARN miR-122 est exprimé spécifiquement dans le foie, il représente 70% des microARN exprimés dans le foie [89]. Or le virus de l'hépatite C utilise ce microARN pour assurer sa réplication. En 2010, la société Santaris Pharma au Danemark validait un essai clinique sur des chimpanzés avec le Miravirsén un oligonucléotide complémentaire du miR-122 [90]. Depuis cet été, une autre entreprise pharmaceutique, Regulus aux Etats Unis, a commencé un essai clinique en phase II de l'antimiR miR-122 conjugué à une autre molécule (GalNac) ciblant les "récepteurs des asialoglycoprotéines" très présents à la surface des cellules hépatiques (voir figure 9).

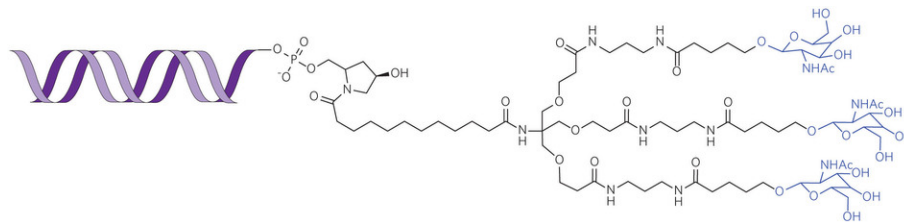


FIGURE 9 – Exemple d'adressage d'un duplex nucléotidique aux hépatocytes  
Figure extraite de la revue de Kanasty *et al* (2013) [91]

#### 4.5 La galénique des microARN en thérapie ciblée

Bien que la preuve de concept soit réalisée, la thérapie basée sur les microARN se heurte à différents obstacles pour être élargie à d'autres maladies. Une des difficultés concerne la stabilité d'une séquence d'ARN *in vivo*. En effet, une séquence de ribonucléotides est susceptible d'être rapidement dégradée par les RNases. Diverses modifications chimiques apportées aux bases ou à la structure des oligonucléotides ARN vont renforcer la stabilité pour la thérapie. C'est pourquoi le Miravirsén (cité dans l'exemple précédent) est un oligonucléotide modifié chimiquement, il s'agit d'un LNA (Locked Nucleic Acid voir Annexe microARN) [90] plus résistant aux dégradations *in vivo*. Les formes les plus couramment utilisées de microARN modifiés chimiquement sont présentées en Annexe microARN.

Au delà des modifications chimiques des microARN, leur distribution est tout aussi importante puisque les microARN n'ont pas la capacité de pénétrer spontanément dans les cellules. Ces petites séquences nucléiques doivent être délivrées dans les cellules pathologiques et en particulier tumorales, de façon plutôt spécifique. Dans certains cas particuliers, on peut facilement accroître la spécificité de distribution par des molécules ayant une forte affinité pour certains récepteurs comme pour le conjugué miR-122/GalNac ciblant les hépatocytes. Précédemment à ces travaux, des essais basés sur l'utilisation d'un antimicroARN du microARN miR-122 couplé à du cholestérol avait été réalisés chez la souris [92].

Une autre solution actuellement très développée consiste à associer les antagonistes ou les agonistes de microARN dans des structures de type nanoparticules. Par exemple les nanoparticules lipidiques sont capables d'incorporer des petites molécules chargées, ce qui est le cas des microARN. Les particules lipidiques ont l'avantage de passer facilement la barrière hémato encéphalique favorisant l'efficacité d'un traitement. Sur des lignées de cellules tumorales (U87, gliome) en culture, il a été montré qu'un antimicroARN contre miR-21 (modifié chimiquement, LNA) apporté par des nanocapsules lipidiques abaisse de manière significative la concentration cellulaire du microARN ciblé [93]. D'autres nanoparticules de compositions chimiques variées constituent des espoirs pour permettre un import facilité dans les cellules [94]. Il en est de même de l'utilisation possible des exosomes (particules naturelles de 100 nm de diamètre environ, ceintes d'une membrane cytoplasmique) qui sont produites par les cellules elles-mêmes [95].

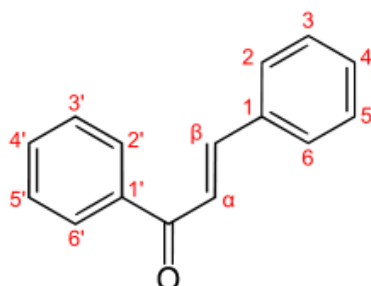
Enfin une piste de thérapie serait d'utiliser des vecteurs d'expression (virus, plasmides) capables de produire un ARN messager codant une protéine cytotoxique et contenant dans sa séquence 3'UTR un site de fixation pour un miR donné. Dans les cellules contenant ledit "microARN donné", l'expression de la protéine cytotoxique serait réprimée. Ainsi par le choix judicieux d'un "microARN donné" qui est exprimé dans les cellules normales mais fortement sous-exprimé dans les cellules cancéreuses par rapport aux cellules normales, le vecteur d'expression ne pourrait exprimer la protéine cytotoxique

que dans les cellules tumorales. De cette manière, si l'adressage de la thérapie n'est pas spécifique, son expression le sera grâce à la régulation par le microARN donné absent des cellules cancéreuses que l'on veut éliminer. Un exemple de ce type de thérapie a été testé sur des cellules du cancer de la vessie, où l'expression de TRAIL (protéine induisant l'apoptose) est régulée en fonction de l'expression du microARN miR-133 [96].

## 5 Les chalcones

Les chalcones font partie du grand groupe des flavonoïdes qui sont des molécules que l'on retrouve naturellement dans certaines plantes. Certaines de ces molécules sont responsables de la couleur de fruits et de fleurs. Les chalcones se caractérisent par une couleur jaune et sont retrouvées souvent dans les agrumes comme d'autres sous-groupes des flavonoïdes tels que les aurones qui sont aussi responsables d'une couleur jaune. Outre les agrumes, on trouve les chalcones dans de nombreux produits alimentaires comme les épices, le thé, le chocolat, la bière, le vin... Depuis longtemps ces molécules sont reconnues pour leur impact positif sur la santé et sont parmi les principes actifs de plantes médicinales. Les flavonoïdes font l'objet de nombreuses recherches associant nutrition et santé. Par exemple il a été noté récemment que ces molécules permettent d'expliquer le «French Paradox» [97] qui souligne la contradiction entre le fait que les français consomment un excès d'aliments gras et ont pourtant une incidence d'accidents cardiovasculaires relativement limitée.

### 5.1 Structure chimique



Les chalcones sont des molécules dérivées de plantes. Ce sont des composés aromatiques (composés avec des structures cycliques), qui contiennent deux cycles et une fonction cétone associée à une double liaison comme illustré ci-contre. Le nom chalcone a été donné en 1921 par Kostanecki et Tambor [98]. En chimie la structure de base est décrite comme “1, 3-diphényl-2-propène-1-one” et peut aussi être nommée benzalacétophénone ou benzylidène acétophénone [98].



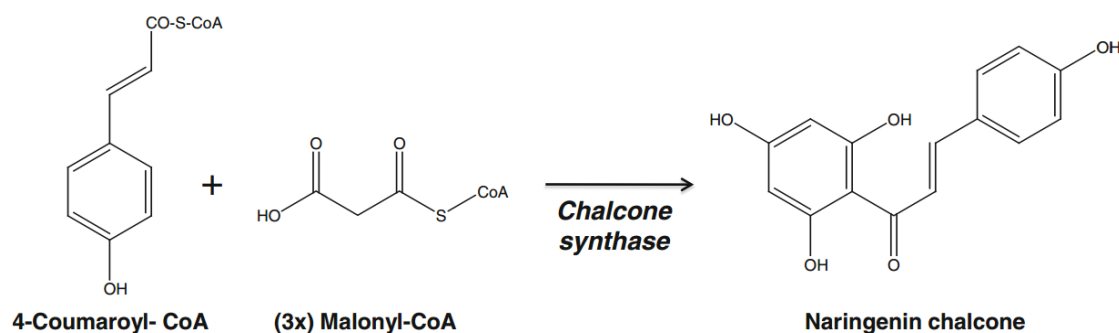


FIGURE 10 – Biosynthèse de flavonoïdes, exemple de la naringénine synthétisée dans les agrumes

(Orlikova *et al.*, 2011) [99]

Ces molécules sont les précurseurs d'autres membres des flavonoïdes. La formation des flavonoïdes réside dans la condensation de trois molécules de malonyl-CoA et d'une molécule acide coumarique-CoA (cf figure 10 [99]). Dans la nature, les chalcones sont synthétisées grâce à une enzyme, la chalcone synthase. Parmi les chalcones les plus connues de cette grande famille, on trouve la naringénine dont la synthèse chimique peut être réalisée comme représentée en figure 10. Si son nom n'est pas évocateur, en revanche son action est beaucoup plus médiatisée. En effet ces dernières années, on a souvent entendu parler d'effets indésirables observés chez des patients traités par certains médicaments et consommant du jus de pamplemousse. La naringénine et la bergamottine, présentes dans le jus de pamplemousse, ont la particularité de bloquer les cytochromes p450. Cela va réduire l'élimination du médicament et donc augmenter la concentration de celui-ci dans l'organisme ce qui pourra ainsi amplifier la toxicité du médicament. Globalement, les chalcones présentent une large palette d'activités biologiques (anti-inflammatoire, antibactérienne...) [100] et notamment une activité antitumorale [101].

Les chalcones peuvent être aussi synthétisées au laboratoire par la réaction de condensation de Claisen-Schmidt décrite figure 11. Cette réaction est basée sur la condensation d'un dérivé acétophénone condensé avec un benzaldéhyde en présence d'hydroxyde de potassium dans un mélange d'eau et méthanol [102].

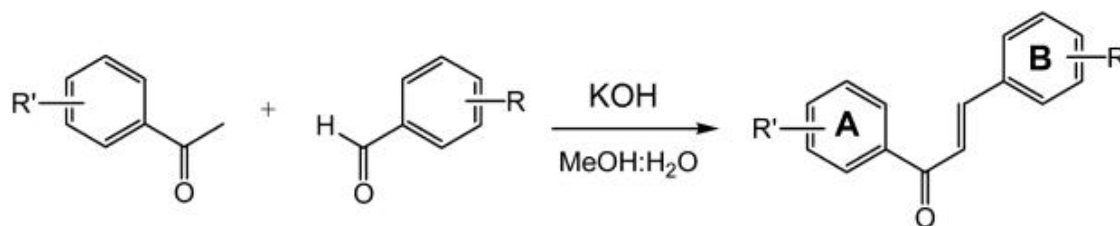


FIGURE 11 – Synthèse chimique de chalcone

## 5.2 Effet antitumoral

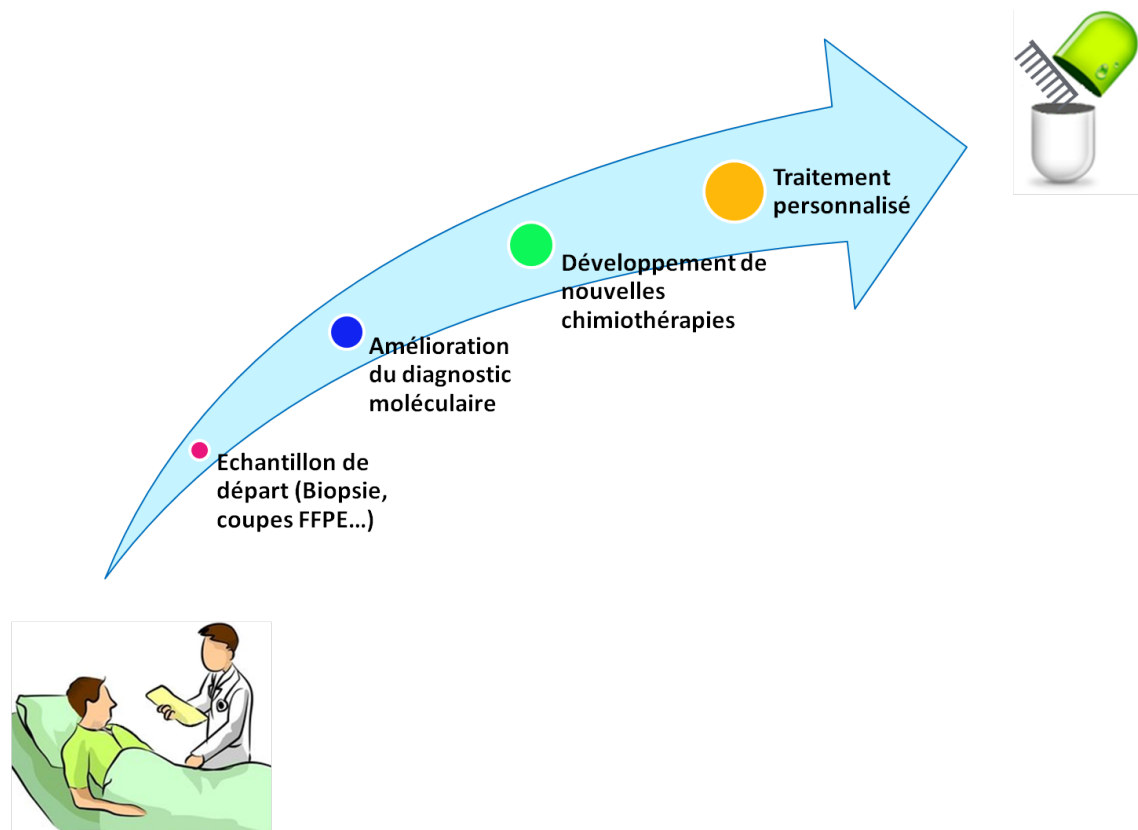
Les chalcones représentent une classe importante des flavonoïdes et diverses activités biologiques leur sont reconnues. Parmi ces propriétés, une activité antitumorale des chalcones est avérée. Cette activité se caractérise par différentes actions telles que l'induction de l'apoptose, la réduction de la prolifération... Zhang et ses collègues rapportent l'activité antitumorale d'au moins une cinquantaine de molécules de type chalcone testées sur un ou plusieurs modèles cellulaires [103].

Les effets sur le cycle cellulaire par des chalcones ont été largement mis en évidence. Plus particulièrement, l'arrêt en G2/M est un des effets fréquemment observés pour plusieurs chalcones [104–106], ce qui peut représenter un atout notamment pour traiter des cellules tumorales de glioblastome [107] et de cancer de la vessie [108].

## 6 Les objectifs de la thèse

Ce projet de thèse, basé sur une approche théranostique, fait appel à différents domaines scientifiques : la biologie cellulaire, la biologie moléculaire et la chimie dans un contexte clinique de la cancérologie. Les deux modèles de cancer étudiés pour cette approche sont complémentaires. En effet, ces deux types de cancers particulièrement agressifs permettent de soulever des questions différentes d'un point de vue clinique. Les tumeurs du cerveau sont difficiles à soigner du fait d'un diagnostic médiocre, de l'absence de traitement adapté et efficace et de la difficulté fréquente pour les molécules thérapeutiques de parvenir à franchir la barrière hémato-encéphalique. Quant aux tumeurs de la vessie, la difficulté de traitement réside dans la capacité de ces tumeurs à évoluer et développer des phénomènes de résistance aux traitements.

Partant des besoins en clinique d'améliorer le diagnostic et la thérapie, une approche théranostique liant les deux paraît très attractive à concevoir afin de pouvoir mettre au point une approche thérapeutique reposant sur les résultats d'un diagnostic qui serait porté grâce au dosage des microARN dérégulés dans les tumeurs. Pour tenter d'avancer par rapport à cette problématique, plusieurs questions intermédiaires se posent selon les deux axes que l'on souhaite améliorer.



**FIGURE 12 – Etapes d'un développement d'une approche théranostique et objectifs du projet de thèse**

Le point de départ étant le diagnostic sur lequel reposera la thérapie (figure 12), il est important de trouver des solutions pour l'améliorer tout en gardant en tête un transfert cohérent vers les laboratoires d'analyse clinique à plus long terme. Il faut donc évaluer différents points :

- ✓ Quels types de tissus étudier (tissus congelés, fixés, liquides biologiques) ?
- ✓ Quelle technique est la plus sensible, la plus fiable et facile à appliquer en routine ?
- ✓ Quel est le nombre minimum de marqueurs indispensables ?

A ces questions très pratiques, s'ajoutent des questions plus techniques qui révèlent parfois des difficultés qu'il faudra surmonter pour répondre aux questions précédentes. Par exemple, instinctivement nous pensons qu'il est préférable pour le patient que le diagnostic soit fait de la manière la moins invasive possible. Pour cela, un dosage de biomarqueurs par simple prise de sang serait l'idéal. Mais à l'heure actuelle même si l'on sait que des microARN sont présents dans le sang (en particulier dans le sérum), les doser avec précision pour établir un diagnostic fiable est un problème car nous nous trouvons en limites de détection des techniques de dosages. Des améliorations techniques sont donc absolument nécessaires. Une autre façon d'aborder le problème du diagnostic est de comparer ce que l'on fait en recherche (souvent un travail sur tissus congelés) par rapport à ce qui se fait en clinique en routine (diagnostic des anatomopathologistes sur tissus fixés). **Un premier objectif est donc d'évaluer et mieux cerner ce que chaque type d'échantillon présente comme avantages et inconvénients.**

L'étape d'évaluation des différents échantillons de départ réalisée, une sélection des biomarqueurs (microARN) est envisagée. Il faut recueillir un maximum d'informations des différents types d'échantillons pour atteindre l'objectif de **choisir les marqueurs les plus fiables, les plus robustes pour le diagnostic.** L'étape suivante consiste à trouver le nombre minimum de microARN informatifs. A l'évidence un seul marqueur n'est pas suffisant pour faire ressortir des nuances entre plusieurs types de tumeurs très proches ; il émerge que l'on doit trouver un compromis pour au final aboutir à un protocole de diagnostic qui serait dans l'idéal : fiable, rapide et peu onéreux.

La deuxième partie du projet, consiste à se servir du diagnostic afin de personnaliser le traitement du patient. Le but ultime étant de disposer d'un traitement mieux accepté par l'organisme tout en complétant les traitements actuels. Avant d'aborder cet axe là du projet, il y a quelques questions de galénique qui orientent cette réflexion :

- ✓ Sous quelle forme utiliser les microARN en thérapie ?
- ✓ Comment les acheminer jusqu'à la tumeur ?

Outre les effets secondaires qui sont à craindre pour le patient, lors du développement d'un nouveau composé thérapeutique basé sur les microARN, il faut faire face à plusieurs difficultés liées à la réaction des cellules réceptrices vis-à-vis de ce composé. En

effet, on se heurte à l'éventualité que les microARN, bien que naturellement présents dans les cellules, risquent d'être dégradés avant même d'avoir eu un effet. Si on les protège de la dégradation de manière excessive, l'organisme est susceptible de les reconnaître comme du non soi, engendrant par exemple une réponse immunitaire. De même, la chimie des microARN pourrait influencer leur biodisponibilité et donc l'efficacité avec laquelle ils vont atteindre leurs cibles. Toujours d'un point de vue pharmacologique, on peut se demander quel sera l'effet si l'on combine ces microARN "thérapeutiques" avec une autre thérapie. Et si en répondant de manière optimiste à cette question, on trouvait un moyen original de distribuer les microARN à la tumeur ? Cette idée repose sur la connaissance de certaines molécules anticancéreuses pouvant pénétrer spontanément à l'intérieur des cellules telles que certaines chalcones. De plus, l'équipe de Maltese a montré que les chalcones pouvaient passer la barrière hémato-encéphalique [109]. Cela est un avantage pour un traitement d'une pathologie dans le cerveau. L'idée ici est donc de se baser sur les propriétés des microARN et des chalcones pour développer une nouvelle stratégie thérapeutique. On espère une synergie des effets des deux molécules tout en utilisant la chalcone pour amener les microARN jusque dans la cellule. Cet objectif nécessite des étapes intermédiaires. **Un des objectifs consiste à définir comment modifier chimiquement le microARN pour le conjuguer à une chalcone. Le second objectif lié au précédent concerne la chalcone, il faut choisir un dérivé actif permettant l'association, voire le couplage, avec le microARN. L'objectif final serait d'évaluer le conjugué sur différents paramètres, l'améliorer pour arriver jusqu'à une phase préclinique qui consiste à tester *in vivo* l'effet d'un nouveau traitement.**

# Matériels et méthodes



---

# Matériels et Méthodes

## 1 Matériels

### 1.1 Echantillons tissulaires

Deux types d'échantillons tissulaires ont été étudiés : des tissus congelés et des tissus inclus en paraffine (tissus FFPE ; FFPE pour formalin-fixed paraffin-embedded). Ces échantillons obtenus par l'intermédiaire du Centre de Ressources Biologiques du Centre Hospitalier Universitaire (CHU) de Grenoble sont des échantillons normaux ou tumoraux de cerveau. Ils ont été obtenus après exérèse ou biopsie au bloc opératoire du Département de Neurochirurgie. Ils sont conservés à  $-80^{\circ}\text{C}$  ou fixés et déshydratés et inclus dans un bloc de paraffine. A partir des échantillons en paraffine, les anatomopathologistes réalisent des coupes fines et établissent un diagnostic des tissus tumoraux après coloration pour observations histologiques et cytologiques et après marquages immuno-histochimiques. Chaque patient a signé un consentement écrit permettant l'utilisation anonyme des échantillons pour des projets de recherche.

### 1.2 Lignées cellulaires

Plusieurs lignées cellulaires ont été utilisées comme modèles dans ce projet. Elles ont été obtenues soit à l'ATCC (American Type Culture Collection) soit auprès de sociétés commerciales notamment ScienCell.

Les cellules U87 MG (modèle de cancer du cerveau : tumeur gliale de type glioblastome) sont cultivées en milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) contenant 4,5 g/l de glucose complété avec 10% de sérum de veau fœtal. Des antibiotiques (100 U/ml de pénicilline et 100 mg/ml de streptomycine) et des acides aminés (GlutaMAX 1X de Gibco : L-alanine et L-glutamine) sont ajoutés à ce milieu permettant de meilleures conditions de cultures aux cellules. Ce sont des cellules adhérentes.



Les cultures primaires d'astrocytes humains (cellules HA) sont réalisées en milieu AM (Astrocyte Medium de ScienCell) contenant aussi 10% de sérum de veau fœtal et des antibiotiques (cf ci-dessus). Des suppléments de croissance pour astrocytes (ScienCell) sont ajoutés. Ces cellules sont adhérentes mais nécessitent un pré-coating des boîtes de cultures avec de la poly-D-lysine (Sigma).

Les cellules RT112 (modèle de cancer de la vessie) et RT112CP (lignée devenue résistante au cisplatine par culture prolongée dans un milieu contenant des doses sublétales de cisplatine) sont elles cultivées en milieu RPMI (Roswell Park Memorial Institute medium) avec, comme pour les autres milieux, 10% de sérum de veau fœtal et des antibiotiques. Les RT112 et RT112CP [110] sont des cellules adhérentes.

Pour leur croissance, toutes ces lignées cellulaires sont maintenues dans un incubateur à 37° C et 5% de CO<sub>2</sub>. Lorsque les cellules sont à confluence, après avoir enlevé le milieu de culture, elles sont lavées au PBS pour éliminer le sérum. Puis le tapis cellulaire est traité à la trypsine-EDTA pendant 2 minutes à 37° C et les cellules sont ensuite reprises dans du milieu de culture pour être réensemencées au 1/10<sup>ème</sup>. Dans le cadre de traitements (chalcone ou antimir), les cellules sontensemencées en plaque 96 puits ou 6 puits et sont ensuite traitées avec les molécules étudiées pendant 16 h, 24 h, 48 h ou 72 h. Quant aux extractions d'ARN sur cellules, elles sont faites à partir d'un culot d'environ un million de cellules.

### **1.3 Molécules d'intérêt pharmacologique testées**

#### **1.3.1 Les antimir**

Les antagonistes de microARN (antimir) sont de petites molécules simple brin ressemblant aux microARN. Elles présentent quelques différences par rapport aux oligonucléotides naturels pour leur assurer une stabilité dans la cellule lors de la transfection. La séquence est complémentaire de celle du microARN dont on souhaite réduire l'action. Après avoir sélectionné quelques microARN d'intérêt, les premiers tests de transfactions sont réalisés à partir d'oligonucléotides commerciaux. Les antimir utilisés pour le projet

sont des “mirVana miRNA Inhibitors” commercialisés par ThermoFisher Scientific. Du point de vu de la chimie, il s’agit d’oligonucléotides combinant des nucléotides de type LNA (Lock Nucleic Acid, cf Annexe les AntimiR) et des ribonucléotides normaux. On dispose à la réception du produit de 5 nanomoles de l’antimiR en poudre. Les 5 nanomoles sont remises en solution dans 100  $\mu\text{l}$  d’eau. Ainsi on obtient une solution “mère” à 50  $\mu\text{M}$ . Puis lors de la préparation des complexes antimiR et agent de transfection, on fait une dilution au 1/5<sup>ème</sup> de sorte à travailler avec des antimiR à 10  $\mu\text{M}$ . Les antimiR sont en concentration finale dans le puits à 30 nM.

Pour la suite du projet, une collaboration avec le laboratoire d’Eric Defrancq (Département de Chimie Moléculaire, Université Grenoble Alpes) étant spécialisé dans l’étude des oligonucléotides a été engagée. Les oligonucléotides sont réalisés avec une structure phosphorothioate (cf annexe “Les antimiR”) . Ces antagonistes ont la même séquence que les antimiR commerciaux. Ils sont testés dans les mêmes conditions que dans le paragraphe précédent.

### 1.3.2 Les chalcones

La synthèse des dérivés de chalcone est réalisée par le laboratoire d’Ahcène Boumendjel (Département de Pharmacologie Moléculaire, Université Grenoble Alpes). Les molécules testées sont obtenues à partir des réactions décrites en Introduction (cf Figure 11 en page 49).

En pharmacochimie, on sait que lorsqu’un petit changement est introduit dans la structure d’une molécule pharmacologique, son activité peut-être complètement modifiée. Les molécules créées par l’équipe d’Ahcène Boumendjel ont été synthétisées avec pour objectif de garder l’activité antitumorale de la chalcone tout en présentant un groupement fonctionnalisé pour pouvoir lier de manière covalente un analogue de microARN. Les molécules testées sont décrites dans le tableau 2 (page 58).

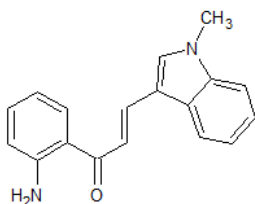
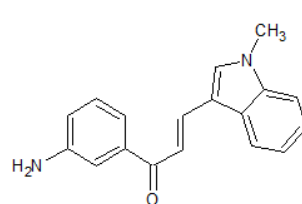
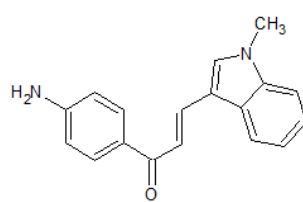
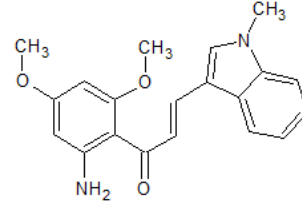
Molécules		
Formule	$C_{18}H_{16}N_2O$	$C_{18}H_{16}N_2O$
Masse moléculaire	276	276
Log P théorique	4.09	3.36
Nom	A1	A2
Molécules		
Formule	$C_{18}H_{16}N_2O$	$C_{20}H_{20}N_2O_3$
Masse moléculaire	276	336
Log P théorique	3.58	3.84
Nom	A3	B1

TABLE 2 – Molécules de chalcones testées

Le Log P permet d'appréhender l'hydrophobicité d'une molécule. Plus cette valeur est élevée moins la molécule est hydrophile.

## 1.4 Données bioinformatiques

### 1.4.1 Données transcriptomiques

Des données transcriptomiques sont accessibles à tous à partir de bases de données mises en ligne sur internet. Les auteurs de publications comportant des données transcriptomiques doivent généralement procéder aux dépôts en ligne lorsque les données sont nouvellement produites. Ces données sont référencées sous un numéro d'étude qui est indiqué sur la publication. Par exemple, le travail de Phillips *et al* [111] correspondant à la base de données "GEOdataset" (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gds>) est référencée par le

numéro GSE4271. Ces données peuvent être ré-analysées par quiconque et leur utilisation est mentionnée alors avec le même numéro tout en faisant référence aux premiers auteurs. Li et ses collaborateurs [112] se sont basés sur les travaux de Phillips puis ont complété leur étude avec des données déposées sur une base dédiée aux tumeurs du cerveau, la base de données REMBRANDT (REpository for Molecular BRAIn Neoplasia DaTa, [http://www.betastasis.com/glioma/rembrandt/gene\\_expression\\_in\\_glioma\\_subtypes/](http://www.betastasis.com/glioma/rembrandt/gene_expression_in_glioma_subtypes/)). Les données de ces deux études sont des profils d'expression d'ARN messagers réalisés sur puces Affymetrix HG-U133.

Une autre base de données plus complète est disponible et gérée par le National Institutes of Health (NIH), cette base s'appelle The Cancer Genome Atlas (TCGA, <http://cancergenome.nih.gov/>). Cette base regroupe pour 33 types de cancers plusieurs centaines de données cliniques (soit 11 000 patients) avec les données moléculaires associées. Les données utilisées pour l'analyse présentée ici sont issues de la catégorie Gliomes de haut grade. Un sous-ensemble de 112 tumeurs a été étudié à partir des profils d'expression d'ARN messagers par Verhaak *et al.* Ces mêmes données (n=112 tumeurs) ont été ré-analysées pour le projet de thèse en prenant en compte les trois méthodes de classification à partir d'expression d'ARN messagers (Li (2009) [112], Phillips (2006) [111] et Verhaak (2010) [113]) pour constituer et mieux caractériser les groupes d'apprentissage pour les tests statistiques qui concernent ensuite le diagnostic à partir des données d'expression des microARN. Un autre ensemble de 90 tumeurs qui n'a pas été classé par Verhaak *et al* est inclus dans un groupe de validation après le choix des microARN discriminants pour le diagnostic.

#### 1.4.2 Données de structure des protéines

Les protéines testées pour la modélisation de la fixation des chalcones étudiées sont issues de publications. Les structures tridimensionnelles de ces protéines déterminées à partir de l'étude de leurs cristaux sont connues et référencées dans la base de données Protein Data Bank (PDB). Pour chaque protéine, le fichier (.pdb) donne les coordonnées spatiales de chaque acide aminé et atome. Le site de fixation des ligands de ces protéines sont connus et indiqués dans le fichier PDB de la protéine.

## 2 Méthodes

### 2.1 Transfection d'antimiR

Trois agents de transfection (SIPORE-NEOFX (Ambion), Ribocellin (Cliniscience) et lipofectamine RNAimax (Invitrogen)) ont été utilisés et leurs efficacités comparées. Les complexes associant les agents de transfection et antimiR sont créés selon les recommandations du fournisseur. Ces complexes sont ensuite ajoutés aux milieux de culture de sorte que les antimiR transfectés soient en concentration finale dans le puits de 30 nM. Les antimiR qui ont été utilisés pour la réalisation de ce projet sont soit d'origine commerciale (mirVana miRNA inhibitor de ThermoFisher Scientific) soit des oligonucléotides synthétisés par le laboratoire d'Eric Defrancq (Département de Chimie Moléculaire, Université Grenoble Alpes). Le détail des antagonistes de microARN utilisés est décrit dans la partie "Matériel - Les AntimiR" et en annexe "Les microARN".

Pour s'assurer de l'efficacité de la transfection lors de chaque expérience, l'utilisation d'un contrôle positif, est nécessaire. Le contrôle choisi est le Cell Death (Qiagen) qui est un mélange de petits ARN (small interfering RNA : siRNA) induisant la mort cellulaire dans de nombreuses cellules. Il est utilisé dans les mêmes conditions que les tests avec les antimiR. Dans ces conditions d'utilisation on souhaite provoquer la mort de 80% minimum des cellules à 48 h après la transfection.

### 2.2 Préparations d'acides nucléiques

#### 2.2.1 A partir de tissus congelés ou de culots de cellules

Les extractions d'ARN à partir d'échantillons tissulaires congelés (80 mg) ou d'échantillons cellulaires ( $1.10^6$  cellules) sont réalisées à l'aide du kit mirVana (mirVana™ miRNA Isolation Kit, Ambion). L'utilisation de ce kit permet de séparer les "ARN longs" (de taille supérieure à 200 bases) des "ARN courts" (de taille inférieure à 200 bases). Ainsi l'étude des microARN est réalisée sur la fraction "ARN courts" enrichie en microARN.

Après avoir lysé l'échantillon dans un tampon dénaturant, on ajoute du Phénol-Chloroforme acidifié permettant de récupérer les ARN dans la phase aqueuse alors que les protéines restent dans la phase organique (phénol) et l'ADN à l'interface. La phase aqueuse est récupérée puis on ajoute d'abord 33% (du volume récupéré) d'éthanol ce qui permet de précipiter les ARN de grandes tailles qui sont retenus sur une colonne de silice. A l'éluat de cette première colonne, on ajoute 66% d'éthanol ce qui précipite les petits ARN. Ces derniers sont alors retenus sur une deuxième colonne de silice. Les colonnes de silice sont ensuite soumises à plusieurs lavages et les contaminants sont éliminés. Les ARN longs et ARN courts sont enfin élués des colonnes respectives dans 100 µl d'eau "RNase free" chauffée à 95° C.

### 2.2.2 A partir de tissus FFPE

Les échantillons de tissus fixés ont la particularité d'être inclus en paraffine. De plus les échantillons ont subi plusieurs étapes de traitement chimique pour être fixés rendant l'extraction d'ARN particulièrement délicate. Afin d'obtenir les meilleurs rendements et/ou qualités d'ARN plusieurs kits ont été testés en parallèle.

Deux types de kits d'extraction de microARN à partir de tissus fixés sont actuellement commercialisés : par extraction sur colonne de silice ou par capture sur billes magnétiques. Dans les deux cas de figure, le protocole commence par une étape primordiale de déparaffinage des coupes de tissus. En fonction des kits, la quantité de matériel de départ est comprise entre 1 à 2 coupes de 10 µm d'épaisseur ou 1 coupe de 20 µm. Les échantillons sont ensuite lysés à l'aide d'un tampon de lyse contenu dans chaque kit.

- ✓ Extractions sur colonne : Les échantillons sont chauffés à 80° C pendant 15 minutes pour casser les hybridations non spécifiques qui se sont créées lors de l'inclusion en paraffine de l'échantillon. Cette étape est suivie d'un traitement de l'échantillon à la DNase pour éliminer l'ADN génomique. Puis un volume d'éthanol est ajouté pour précipiter les ARN courts. Ces ARN seront par la suite retenus sur une colonne. Après plusieurs lavages, l'éluat se fait dans un petit volume qui ici a été fixé à 30 µl pour harmoniser le volume entre les différents kits testés.

- ✓ Extractions sur billes : Les billes magnétiques sont suspendues dans leur solution tampon en les vortexant. L'échantillon est mélangé à un volume de 80  $\mu\text{l}$  de suspension de billes (correspondant à environ  $80 \cdot 10^6$  billes) pendant 40 minutes à 30° C dans un agitateur. Les ARN ont de cette manière la possibilité de s'hybrider sur les billes où sont greffés des oligonucléotides complémentaires (voir figure 13) de chacun des microARN recensés dans la version 18 de miRBase. L'avantage de cette méthode, c'est la rapidité des lavages grâce à la récupération magnétique des billes capturant les microARN. L'élution se fait ensuite dans 100  $\mu\text{l}$  de solution tampon portée à 70° C.

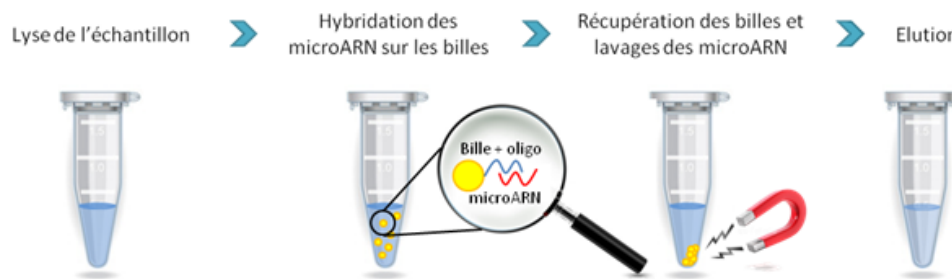


FIGURE 13 – Extraction des microARN avec des billes magnétiques recouvertes d'oligonucléotides

### 2.2.3 Quantification des ARN

La concentration en ARN est mesurée grâce à une méthode basée sur l'utilisation d'un intercalant fluorescent (Qubit, ThermoFisher Scientific) et en utilisant une gamme étalon réalisée avec un standard ARN de concentration parfaitement connue. Ensuite la qualité des ARN extraits est vérifiée par électrophorèse miniaturisée dans un gel réalisée sur des puces "RNA 6000 Nano Lab Chip" (bioanalyseur Agilent 2100) suivant les instructions du fournisseur. Les ARN sont rendus fluorescents par un intercalant introduit dans le gel et leur migration est inversement proportionnelle à leur taille. A partir des électrophorégrammes on peut extraire des informations qualitatives et quantitatives transcrites à l'utilisateur par un indicateur appelé RIN (RNA Integrity Number) afin de valider la qualité des préparations. On considère un échantillon de bonne qualité lorsque la valeur de RIN est comprise entre 8 et 10 (sur une échelle de 1 à 10).

## 2.3 Dosages des ARN

### 2.3.1 RT-qPCR adaptée aux microARN

Le dosage des ARN se fait classiquement avec la méthode de RT-qPCR qui se décompose en deux étapes : une première étape de RT (Reverse Transcription ou transcription inverse), puis une seconde étape d'amplification, dite qPCR (quantitative Polymerase Chain Reaction). La qPCR permet une quantification relative nécessitant la mesure de microARN normalisateurs.

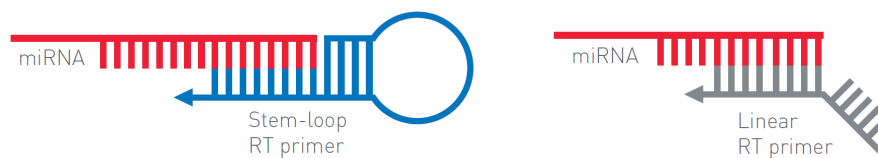


FIGURE 14 – Option technique pour l'étape de reverse transcription un primer en boucle (ThermoFisher Scientific) versus un primer linéaire

La transcription inverse permet la rétro-transcription des ARN en ADNc. Pour les microARN, elle est réalisée avec les kits MiR TaqMan Individual Assay (ThermoFisher), spécifiques de chacun des microARN. La spécificité de ces kits repose sur l'utilisation d'une amorce en forme de boucle contrairement à une amorce ordinaire qui est linéaire (cf Figure 14). Cette propriété de l'amorce n'autorise la transcription inverse que de la forme mature de chaque microARN. Les éléments utilisés pour la synthèse de l'ADNc sont la reverse transcriptase, les dNTP, un inhibiteur de RNase (RNAsin) qui proviennent du kit TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit (ThermoFisher). Au mélange réactionnel, réalisé selon les recommandations du fournisseur, on ajoute les primers en boucle et 10 ng d'ARN. Puis la transcription inverse se déroule en trois temps : l'hybridation des amorces (30 minutes à 16° C) ; la fixation de l'enzyme et la phase de synthèse du monobrin d'ADNc (30 minutes à 42° C) et enfin l'inactivation de l'enzyme (5 minutes à 85° C). Des contrôles pour détecter les réactions faussement positives sont réalisés afin de vérifier par exemple que les échantillons ne sont pas "contaminés" par de l'ADN génomique.

A partir d'ADNc, on procède ensuite à la qPCR qui est une PCR avec acquisition en temps réel (à chaque cycle) des niveaux de fluorescence reflétant la quantité d'ADN double



brin produite. La qPCR est réalisée grâce au kit TaqMan Universal PCR Master Mix 2X (ThermoFisher) selon le protocole optimisé par le fournisseur. Les sondes TaqMan avec les primers sont ajoutés (TaqMan microRNA assays probe) au mix pour permettre le suivi de fluorescence. En effet, les sondes TaqMan sont créées en exploitant le phénomène FRET (Fluorescent Resonance Energy Transfer) car elles comportent un fluorophore (FAM) et un “quencher” (MGB). Les cycles de qPCR et l’acquisition des résultats sont réalisés grâce au CFX96 de la société Biorad. Une première étape de 10 minutes à 95 °C permet la dénaturation des matrices et l’activation de l’enzyme. La qPCR est ensuite réalisée par une répétition de 45 cycles identiques (15 secondes à 95° C pour permettre la dénaturation des brins d’ADN ; suivies de 60 secondes à 60° C pour réaliser l’hybridation des primers et l’amplification). La mesure de fluorescence est enregistrée à la fin de chaque cycle. Lorsque la valeur de fluorescence d’un échantillon dépasse un seuil minimal défini par le constructeur, le cycle est désigné comme le Ct (Cycle threshold ou désormais nommé Cq pour Cycle de quantification). Sa valeur est inversement proportionnelle à la quantité initiale d’ADNc, donc de microARN.

L’analyse de l’expression génique est calculée selon la méthode des  $\Delta\Delta Cq$ . Après l’acquisition des données, une normalisation est effectuée afin de corriger les biais entre échantillons. Pour cela, on réalise (en parallèle des dosages des microARN d’intérêt) le dosage de plusieurs petits ARN (tels que des ARN nucléaires) dont les quantités sont connues pour être stables entre les échantillons et serviront de calibrateurs. Les meilleurs calibrateurs sont choisis en utilisant la méthode GeNorm du package NormqPCR [114]. Puis le Cq ( $C_q$ ) de chaque microARN d’intérêt est normalisé par soustraction de la moyenne de dosage de deux ou trois calibrateurs. Enfin les échantillons sont comparés entre eux (quantification relative) par la relation suivante :

$$miR_{echA}/miR_{echB} = (1 + Efficacité)^{-(C_{qechA}-C_{qechB})}$$

L’efficacité est calculé à l’aide d’une gamme de plusieurs dilutions d’un même échantillon (1, 1/10<sup>ème</sup>, 1/100<sup>ème</sup> ...). Entre un échantillon et sa dilution au dixième, on sait que la différence des valeurs de Cq est de 3,3 cycles lorsque celle ci est efficace à 100%. Les dosages de différentes dilutions séparées d’un facteur 10 permettent ainsi de connaître l’efficacité de la réaction qui doit être comprise entre 80% et 100% pour que le dosage soit correct.

### 2.3.2 Analyse par hybridation sur puces microARN

Les puces utilisées (microARN Genechip Affymetrix), comportent des sondes de capture spécifiques des microARN sous forme d'oligonucléotides synthétisés directement sur la puce par photolithographie. Elles sont composées de dizaines de milliers de "probesets" (ou sondes), correspondant aux séquences complémentaires des microARN et à d'autres petits ARN. En outre, plusieurs autres séquences spécifiques sont présentes et servent de contrôle qualité grâce à l'utilisation de standards rajoutés aux échantillons. Les séquences des sondes, d'environ 25 nucléotides ont été conçues à partir des séquences de la base de données Sanger miRbase pour les microARN et des bases Ensembl (<http://www.ensembl.org>) et SnoRNABase (<https://www.snorna.biotoul.fr>) pour les autres petits ARN. La découverte de nouveaux microARN grâce au séquençage de nouvelle génération a permis de faire évoluer la liste, des microARN connus. Ainsi la base de données miRBase ne cesse d'être implémentée. La version 3 (v3) des puces microARN est basée sur la version 17 de miRbase et comporte des probesets correspondant à 1 733 miARN matures humains (et 1658 pré-miR humains); la version 4 (la plus récente disponible) est basée sur la version 20 de miRbase et contient des probesets correspondant à 2 578 miARN humains (et 2 025 pré-miR humains). Les dosages de microARN par puces à ADN sont réalisés à partir des fractions d'ARN courts. 200 ng d'ARN courts subissent d'abord un marquage (Kit FlashTag Biotin HSR, Genisphere). Ce marquage est réalisé en deux temps : une première étape consiste à ajouter une extrémité poly-A en position 3' des ARN, puis une seconde à réaliser une réaction de ligature permettant d'ajouter au niveau des extensions poly-A des ARN un complexe multi-biotinylé. Les échantillons marqués sont ensuite hybridés sur la puce à 48 °C pendant 16 h.

### 2.3.3 Analyse des ARNm par hybridation sur puces HTA

Les puces HTA (Human Transcriptome Array) sont manufacturées de la même manière que les autres puces Affymetrix : les probesets (sondes) sont synthétisés directement sur la puce. La particularité de ces puces c'est leur densité. Il y a plus de 6 millions de probesets permettant d'évaluer l'expression très précisément de toutes les formes de 65 000 gènes humains (codant ou non pour une protéine) soit plus de 100 000 isoformes. La configuration des probesets (cf Annexe Les puces Affymetrix) est faite pour couvrir les exons mais aussi les introns avec en plus des probesets dits de "jonction" qui contiennent

des fragments de séquences retrouvés au niveau des jonctions entre deux exons en conséquence du processus d'épissage des ARN messagers. Ces probesets de jonction permettent de distinguer les transcripts différents d'un même gène (résultants des phénomènes d'épissages alternatifs). Sur ces puces, 70% des probesets représentent des exons pour 30% de probesets de jonction.

200 ng d'ARN longs (>200 bases) sont rétro-transcrits en ADN complémentaire et le brin correspondant à la séquence de chaque ARNm est amplifié. Les brins d'ADN complémentaire synthétisés sont ensuite fragmentés pour incorporer aux extrémités des fragments obtenus des groupements de biotine afin de permettre la détection des hybridations sur la puce. Les fragments d'ADN complémentaire sont hybridés sur la puce pendant 16 h à 45° C.

### **2.3.4 Dosage des microARN par la méthode QuantiGene**

QuantiGene est une méthode directe de quantification des ARN ou des ADN. Pour le dosage des microARN, cette technique est basée sur l'utilisation de plusieurs types d'oligonucléotides qui permettent d'assurer la capture des microARN et leur détection dans des puits de plaques 96 puits, ce qui fait ressembler cette méthode à la méthode ELISA pour les protéines. Au fond d'un puits d'une plaque 96 puits sont greffées des séquences génériques ("capture probe"). Elles permettent l'accrochage d'un autre oligonucléotide ("capture extender") de séquence spécifique pour la capture d'un microARN donné. Après hybridation des microARN à doser, un oligonucléotide spécifique ("label extender"), lui aussi complémentaire de la séquence du microARN, vient se fixer par hybridation. Ce dernier oligonucléotide permettra la fixation de nombreux éléments appelés ("Amplifiers") comme illustré dans la Figure 15. Ces éléments permettent d'amplifier le signal de manière directe et spécifique d'une séquence d'intérêt (dans ce cas un microARN) que l'on souhaite doser. L'échantillon (culot cellulaire ou coupe de tissus) est tout d'abord lysé puis l'extrait est incubé dans le puits pendant 16 h à 46° C. On révèle une quantité de molécules présente dans le puits par luminescence. En parallèle une gamme avec un nombre connu de molécules est réalisée permettant une quantification absolue pour tout échantillon inconnu. La luminescence est mesurée sur un lecteur de plaque PHERAstar FS (BMG LABTECH).

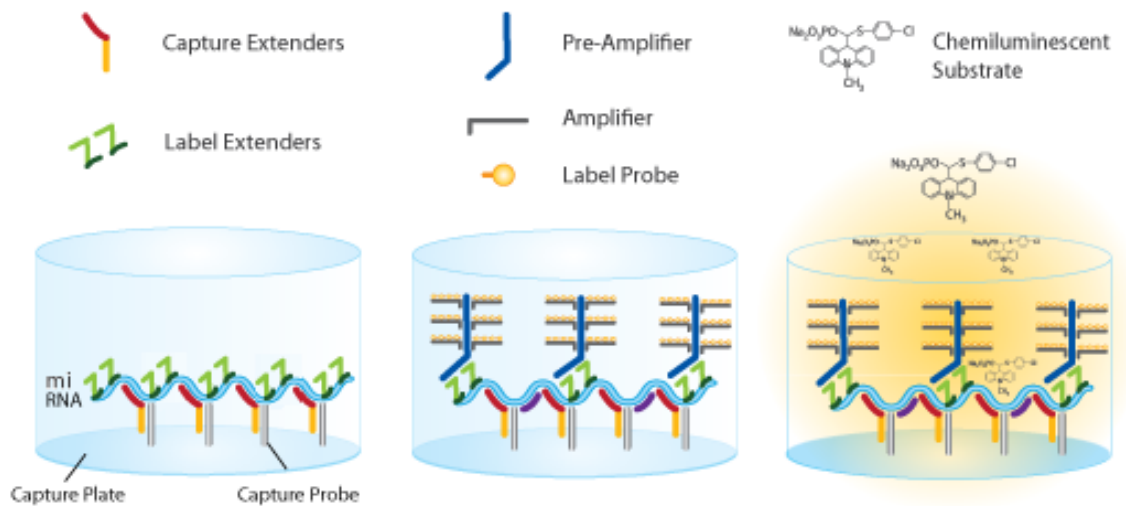


FIGURE 15 – Principe du dosage QuantiGene (Panomics)

### 2.3.5 digital droplet PCR

La digital droplet PCR est une technique récemment mise en avant et rendue accessible aux laboratoires par la commercialisation des équipements spécifiquement adaptés à cette méthode mais le principe a toutefois été décrit il y a plus de vingt ans par Sykes *et al* [115]. Le principe repose sur la réalisation de dilutions des échantillons jusqu'à une dilution limite qui permettrait d'obtenir une multitude d'échantillons tellement dilués que chaque copie d'ARN ou d'ADN composant l'échantillon de départ et que l'on veut doser par PCR serait individualisée. Pour obtenir cette individualisation des molécules à doser, la solution technique qui a été développée consiste à disperser un échantillon dans des microgouttelettes de 1 nl suspendues sous forme d'émulsion dans une phase lipidique. Chacune des gouttelettes contenant les acides nucléiques à doser et les réactifs et enzyme nécessaire pour l'amplification par PCR, il est alors possible de placer la suspension des gouttelettes dans un thermocycler et provoquer la réalisation d'une réaction de PCR dans chacune des gouttelettes de manière indépendante des voisines. L'intérêt d'isoler chacune des copies réside dans le fait d'être plus précis pour la quantification.

D'un point de vue statistique, la réalisation de ces multiples PCR (au total 20 000 gouttelettes sont présentes dans chaque émulsion, représentant ainsi 20 000 réactions de PCR par échantillon) va permettre une quantification plus fiable par rapport à des triplicats réalisés sur l'échantillon global. Ainsi on ne quantifie plus la fluorescence pour déterminer un seuil de quantification (Cq) comme on le fait pour la PCR quantitative (cf chapitre 2.3 pa-

ragraphe RT-qPCR adaptée aux microARN) mais on sépare après la PCR les gouttelettes dans un analyseur de gouttelettes et on compte tout simplement le nombre de gouttelettes au sein desquelles s'est réalisée une amplification des acides nucléiques à doser et qui de ce fait sont fluorescentes. Seules les gouttelettes qui lors de leurs formations auront incorporé une molécule d'acide nucléique à doser amplifieront les molécules, ce qui sera associé avec une production de fluorescence.

Pour ce projet, la méthode utilisée est celle de Biorad (équipement QX 100). Après une étape de transcription inverse spécifique d'un microARN, la PCR est réalisée à partir de 8 µl de produits de "Reverse Transcription" auxquels on ajoute 1 µl d'amorces, 2 µl d'eau et 11 µl de "ddPCR supermix" (Biorad). Ensuite 20 µl du mélange précédent sont déposés dans le puits "échantillon" d'une barrette ddPCR (Biorad). 70 µl d'huile sont mis dans le puits "huile" avant que l'émulsion soit obtenue par microfluidique. A la fin de l'étape de création de l'émulsion, on récupère avec précaution (afin de ne pas "casser" l'émulsion) 40 µl de gouttelettes pour les déposer dans une plaque standard de PCR. La PCR est réalisée en 40 cycles (15 secondes à 95° C suivies de 60 secondes à 60° C). A l'issue de la PCR, l'échantillon est analysé dans un appareil similaire à un cytomètre en flux pour détecter la fluorescence de chacune des 20 000 gouttelettes.

## 2.4 Test MTT

Le test MTT est réalisé afin d'évaluer la cytotoxicité des molécules d'intérêt pharmacologique de ce projet en mesurant la viabilité des cellules mises au contact de ces molécules par dosage d'une activité enzymatique. Il s'agit d'un test rapide, colorimétrique reposant sur la capacité des cellules viables à transformer un sel de tétrazolium, le MTT (bromure de 3-(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényl tétrazolium), en formazan (cristaux violets) formé dans la mitochondrie grâce à une activité réductase [116].

Le test est réalisé en plaque 96 puits et les cellules sontensemencées à 3 000 cellules par puits. Après un temps d'incubation avec les molécules à tester, le milieu de culture est retiré avant de le remplacer par du milieu contenant le MTT (100 µl du mélange réactionnel par puits). Ce milieu réactionnel est composé de 10 ml de milieu DMEM ou RPMI sans rouge phénol auxquels on ajoute 1ml de solution MTT à 5 mg/ml (dilué

en PBS). Les cellules sont ensuite remises à l'étuve (37° C, 5% de CO<sub>2</sub>) avec 100 µl du mélange réactionnel par puits pendant 3 h. Suite à cette incubation, la quantité de cristaux de formazan formée est fonction de la viabilité des cellules. Le milieu est retiré puis 100 µl de DMSO sont ajoutés pour solubiliser les cristaux formés. La plaque est ensuite agitée pour homogénéiser la solubilisation du formazan avant de mesurer la DO au spectrophotomètre à 570 nm et la corriger de la DO à 650 nm. La DO est proportionnelle au nombre de cellules viables par puits. Un témoin négatif et un témoin positif sont réalisés et l'on en déduit un pourcentage de viabilité en utilisant la formule suivante :

$$viabilité = 100 * (DO - DO_{négatif}) / (DO_{positif} - DO_{négatif})$$

Les résultats sont exprimés par la moyenne des pourcentages de cellules vivantes calculés pour au moins trois mesures par condition.

## 2.5 Cytométrie en flux

La cytométrie en flux consiste à étudier un ou plusieurs paramètres phénotypiques cellulaires de manière simultanée par une analyse à haut débit et individuelle de chaque cellule. Pour cela, après marquage des cellules, par hydrofocalisation, une à une les cellules de l'échantillon passent devant un détecteur qui enregistre les signaux des paramètres étudiés. Au minimum, sans marquage spécifique, l'appareil enregistre la taille et la granulosité des cellules. D'autres paramètres peuvent être suivis par marquage fluorescent. C'est le cas de l'analyse du cycle cellulaire, du suivi de la mort cellulaire par apoptose et de l'évaluation de l'efficacité de transfection des antimicroARN en utilisant un oligonucléotide fluorescent qui ont été explorés dans ce travail.

### 2.5.1 Analyse du cycle cellulaire

De manière simplifiée, on considère qu'une cellule va subir plusieurs modifications au cours du temps pour à terme donner deux cellules filles. La cellule commence par augmenter de volume (phase G1), remplit ses fonctions et prépare l'étape suivante de réplication d'ADN (phase S). Une fois cette étape de doublement de son ADN terminée, la cellule continue à remplir ses fonctions tout en préparant sa séparation en deux cellules identiques (phase G2). La cellule qui était en phase G2 se divise alors en deux cellules filles au cours de la phase de mitose (phase M). Les cellules filles quant à elles, reproduiront

normalement le même développement, c'est pourquoi on parle de cycle cellulaire. On comprend que si la cellule réplique son ADN, la quantité d'ADN dans la cellule en fonction de la phase du cycle où elle se trouve pourra varier au maximum du simple au double. De cette manière, en marquant l'ADN à l'aide d'un agent intercalant fluorescent comme l'Iodure de Propidium cela permet de mesurer la quantité d'ADN dans la cellule. Si ce paramètre est rapporté en fonction de la taille de la cellule alors on pourra en déduire dans quelle phase du cycle se trouve chaque cellule. Pour cela, les cellules en culture adhérentes sont traitées par la trypsine, lavées puis fixées à l'éthanol 70%. Elles sont ensuite traitées avec la RNase A en concentration finale de 0,5 mg/ml pour éliminer l'ARN et enfin de l'iodure de propidium à 20 µg/ml est utilisé pour le marquage de l'ADN.

### **2.5.2 Evaluation du taux de mort cellulaire**

La mort cellulaire correspond à l'arrêt des fonctions de la cellule et à son auto-destruction. L'apoptose est une mort programmée de la cellule et se caractérise par un transfert des phosphatidylsérines sur la couche extérieure de la membrane plasmique. Ainsi en détectant à l'aide d'annexine V fluorescente la présence de la phosphatidylsérine en périphérie des cellules, on peut différencier les cellules mortes des cellules vivantes. Le marquage est fait selon les recommandations du fournisseur Miltenyi sur  $1 \cdot 10^6$  de cellules. Les cellules sont mises à incuber avec l'annexine V pendant 15 minutes à l'obscurité. Mais cette simple observation, n'est pas suffisante pour repérer les cellules qui sont nécrotiques par rapport aux cellules apoptotiques. Pour pouvoir le faire, un marquage des acides nucléiques avec un intercalant est nécessaire. Ainsi après plusieurs lavages effectués à la suite de l'exposition avec l'annexine, de l'Iodure de Propidium (1 µg/ml) est ajouté aux cellules marquées avec l'annexine.

### **2.5.3 Evaluation de l'efficacité de transfection des cellules**

La transfection passe par une étape d'encapsulation du microARN (ou anti-microARN) par l'agent chimique de transfection sélectionné. Les cellules sont ensuite incubées avec le complexe microARN/agent de transfection. Pour confirmer l'import de l'oligonucléotide dans une majorité de cellules, une transfection est réalisée avec une petite séquence d'acides nucléiques couplée à un fluorochrome (FAM) en 5' appelée FAM Dye-Labeled Anti-miR Negative control (ThermoFisher Scientific). Les conditions de

transfection sont les mêmes que pour la transfection d'un anti-miR, c'est à dire que ce contrôle fluorescent est en concentration finale dans le puits à 30 nM. Après le temps de transfection (entre 4 h et 48 h), les cellules sont lavées puis analysées par cytométrie en flux directement.

## 2.6 Traitement des données

### 2.6.1 Normalisation des données Affymetrix

Après avoir obtenu les images d'une série de puces Affymetrix hybridées, l'étape suivante consiste à convertir cette image en données numériques (valeurs d'intensités de fluorescence) par "probeset" (séquence d'une vingtaine de nucléotides correspondant à un microARN ou à une petite partie d'ARN messenger). La puce (et par conséquent l'image) est organisée comme un damier où chaque petit carré correspond à un "probeset" soit une séquence bien définie. Une grille d'annotation appliquée automatiquement sur la photo du scan de la puce permet alors d'avoir une correspondance entre l'intensité de fluorescence mesurée et l'identité de la séquence correspondante.

Dans un premier temps les intensités récupérées sont des intensités brutes. Pour comparer les résultats des différentes puces, une étape de normalisation est nécessaire pour que globalement toutes les puces de l'analyse aient le même niveau d'intensité. Cette étape est réalisée dans l'environnement R CRAN (<https://cran.r-project.org/>), où la méthode de normalisation appliquée aux puces est une méthode classiquement utilisée nécessitant l'utilisation de l'algorithme RMA (Robust Multi-array Average) mis au point par Irizarry et ses collaborateurs [117]. De manière simplifiée, l'ajustement des intensités de chaque probeset pour chaque puce est calculé par rapport à un bruit de fond propre à chaque puce associé à une normalisation quantile.

### 2.6.2 Statistiques

Les différences calculées pour les différentes comparaisons sont soumises à un test statistique non-paramétriques puisque le nombre de réplicats est toujours inférieurs à  $n=30$ . Le test de Wilcoxon est un test de rangs réalisé pour différencier deux groupes d'échantillons qui peuvent être appariés ou non en fonction de l'expérience.



L'analyse sur puce pour le diagnostic est faite de manière différente. Un grand nombre d'échantillons sont à notre disposition grâce aux bases de données. Afin de faire ressortir les marqueurs les plus discriminants on réalise un test adapté aux résultats obtenus par hybridation sur puces : le test SAM (Significant Analysis Microarray réalisé sous R à l'aide du package "samR") [118]. Cette méthode évalue la robustesse d'un marqueur en effectuant des permutations d'échantillons dans le groupe opposé, le calcul est itératif. D'autre part, la distinction de deux groupes de tumeurs pour le diagnostic basé sur les ratios de microARN repose sur une méthode de partitionnement qu'est le "k-mean" pour 2 groupes.

Les analyses de survies grâce à la représentation de Kaplan-Meier sont également gérées dans l'environnement R CRAN à l'aide du package "Survival". Quant aux courbes de ROC pour calculer la spécificité et sensibilité des marqueurs, elles sont générées à partir du package "ROCR".

### **2.6.3 Calculs de score d'affinité**

Le logiciel Rasmol permet de visualiser les protéines et leurs ligands en trois dimensions. L'application "1-Click Docking" accessible à partir du site web <https://mcule.com> permet le calcul d'un score d'affinité entre une protéine donnée et un ligand donné. Les coordonnées tridimensionnelles de la protéine sont chargées à partir du fichier PDB et le ligand est dessiné dans l'application par son numéro InCHI (International Chemical Identifier). S'il existe une possibilité pour que le ligand puisse interagir avec la protéine réceptrice alors l'application donne les quatre meilleures interactions possibles. On obtient les interactions sous forme d'un fichier PDB associé à un score généré par "1-Click Docking".

# Résultats



---

# Résultats

Ce projet est basé sur une approche théranostique visant à améliorer les méthodes diagnostiques et le traitement des patients atteints de tumeurs du cerveau ou de la vessie. La thérapie des patients étant orientée par le diagnostic, la première étape consiste donc à pouvoir définir avec précision, au niveau moléculaire, les différences entre les types ou grades de tumeurs. Ceci étant particulièrement critique dans le contexte des tumeurs cérébrales puisque les carences dans ce domaine ont été maintes fois soulignées.

## **1 Explorations des profils transcriptomiques microARN dans les tumeurs**

Pour établir un diagnostic, il est nécessaire de définir à partir de quel échantillon sera fait le diagnostic. Chaque type d'échantillon ayant ses avantages et ses inconvénients, il convient d'évaluer un maximum de possibilité pour choisir le matériel biologique et les méthodes d'analyse les plus appropriées. Dans cette partie du projet, au-delà d'une mise au point technique indispensable, le contenu en microARN présents dans les échantillons tumoraux et des échantillons non tumoraux est étudié afin de déterminer quels sont les microARN les plus "robustes" pour établir un diagnostic.

### **1.1 Choix des échantillons cliniques et des méthodes d'extraction d'ARN compatibles avec l'exploration des profils microARN**

#### **1.1.1 Les échantillons tissulaires congelés**

Les échantillons cliniques les plus couramment utilisés en recherche sont constitués de tissus congelés. Ces échantillons sont des fragments de tissus tumoraux obtenus par biopsies ou résultant de l'exérèse chirurgicale. A partir de ces échantillons, les ARN sont extraits par une méthode classique (technique miRVana basée sur l'extraction au phénol, cf matériels et méthodes) pour obtenir soit des ARN "totaux" soit des ARN séparés en deux fractions (appelées "ARN longs" et "ARN courts") contenant respectivement les ARN de taille supérieure ou inférieure à 200 bases environ. Initialement, l'équipe dans laquelle j'ai

réalisé les travaux d'analyse transcriptomique travaillait à partir d'ARN totaux. L'avantage indéniable d'extraire les ARN en deux fractions est de pouvoir travailler sur une fraction d'ARN courts dont le contenu est très enrichi en microARN.

La première étape à valider est le rendement d'extraction de la méthode de purification des ARN afin d'avoir un ordre de grandeur du nombre de dosages que l'on pourra ensuite réaliser à partir de quelques coupes d'échantillons (tumeurs cérébrales) congelés que l'on obtient auprès du CRB du CHU de Grenoble. Le tableau suivant montre qu'à partir de 100 mg de tissu congelé (soit un cube d'environ 4 mm de côté), on peut obtenir approximativement une vingtaine de microgrammes d'ARN courts et environ trois à quatre fois plus d'ARN longs. Ces quantités sont grandement suffisantes pour réaliser différentes analyses à large échelle du contenu en microARN. En effet, pour donner un ordre de grandeur, une analyse sur puce Affymetrix nécessite seulement 200 ng d'ARN et une exploration par "séquençage haut débit" une masse globale de 1 µg maximum.

Quantité de tissus (mg)	Quantité d'ARN longs (µg)	Quantité d'ARN courts (µg)
83	75	20
112	65	21
101	37	14
102	76	25

TABLE 3 – Rendements d'extraction en ARN à partir de tissus congelés

L'extraction des ARN à partir de fragments de tissus tumoraux (gliomes) a été réalisée en utilisant la méthode miRVana (Ambion). Les fractions ARN longs et ARN courts ont été purifiées et le dosage effectué avec le kit Qubit (ThermoFisher).

Il a été nécessaire également d'évaluer l'impact sur les résultats de dosages des microARN lorsqu'on étudie une fraction d'ARN enrichie en microARN. Cette observation a été faite de manière globale par hybridation sur puces GeneChip microRNA V1 d'Affymetrix. Des quantités croissantes d'ARN totaux (150 ng, 300 ng et 900 ng) ont été marquées et hybridées ainsi que des quantités d'ARN courts (50 ng, 100 ng, 300 ng) correspondant respectivement à trois fois moins d'ARN totaux. L'objectif ici étant de déterminer le meilleur compromis entre quantité d'ARN et résultats exploitables.

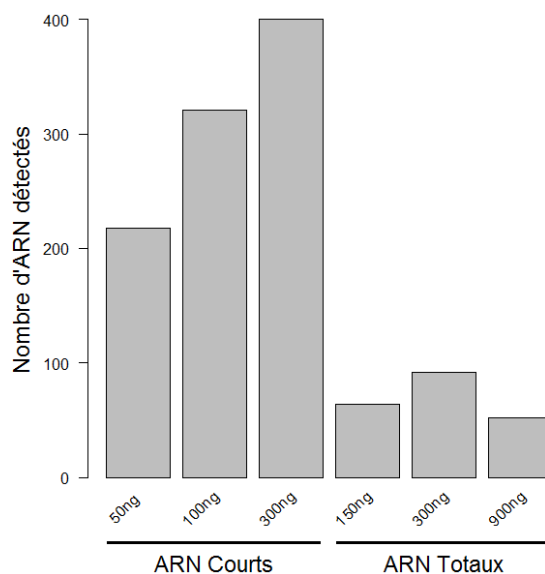


FIGURE 16 – Analyse globale des microARN dans les préparations d’ARN totaux ou d’ARN courts.

A partir de fragments d’une même tumeur (gliome) deux préparations distinctes ont été réalisées : les ARN totaux et les ARN courts. Ces deux types de préparations ont été analysées sur puces Affymetrix microARN V1 en utilisant les quantités croissantes d’ARN indiquées. Le nombre total de microARN humains détectés sur les puces est reporté sur le graphique.

La figure 16 montre une différence significative ( $p.value = 0,041$ ) entre le nombre de microARN détectés sur les puces hybridées avec des ARN courts et celles hybridées avec de l’ARN total. On peut remarquer également que le nombre d’ARN détectés croît en fonction de la quantité d’ARN marquée pour les puces réalisées à partir de la fraction des ARN courts, alors que ce n’est pas le cas avec la fraction des ARN totaux. Au vu des résultats obtenus, il a été décidé que les puces GeneChip microRNA seraient hybridées en routine avec 200 ng d’ARN courts.

### 1.1.2 Les échantillons tissulaires fixés

Pouvoir travailler sur tissus congelés est intéressant pour être au plus proche du profil moléculaire tel qu’il est dans la tumeur du patient. Néanmoins, il ne faut pas perdre de vue la volonté translationnelle du projet. Or pour réaliser un diagnostic en clinique, l’anatomopathologiste travaille quasi exclusivement sur coupes de tissus fixés. Pour être fixé l’échantillon tissulaire est amené à subir plusieurs traitements chimiques successifs avant d’être inclus en paraffine (échantillons nommés “tissus FFPE” de l’anglais “Formalin-

Fixed Paraffin- Embedded tissues” ). De ce fait, il paraît également important de mettre en place (si cela s’avère techniquement possible) des tests de détection des microARN à partir de coupes de tissus fixés. Pour cela, quatre techniques d’extraction d’ARN courts (uniquement) à partir de tissus inclus en paraffine ont été comparées. Les trois premières méthodes (fournisseurs Qiagen, Macherey-Nagel et Norgen Biotec) reposent sur la fixation des microARN solubilisés sur des colonnes remplies de silice capable d’interagir sélectivement avec les ARN. Pour la quatrième méthode (Ambion), la purification des microARN repose sur une capture sélective des microARN sur des billes magnétiques comportant des oligonucléotides de synthèse fixés de manière covalente et présentant des séquences complémentaires aux microARN que l’on souhaite extraire. Pour réaliser le test, la purification à l’aide de ces quatre méthodes a été réalisée sur un même échantillon, en traitant 2 coupes de 16 µm d’épaisseur à chaque fois (soit environ 2 à 3 mm<sup>3</sup> de tissu). Les quantités d’ARN ont été ensuite mesurées pour comparer les méthodes. Les résultats sont les suivants :

Fournisseur	Méthode	Principe	Quantité d’ARN (µg)
Qiagen	miRNeasy FFPE	Colonne de silice	1,4
Macherey Nagel	NucleoSpin miRNA	Colonne de silice	0,9
Norgen Biotec	FFPE RNA	Colonne de silice	1,0
Ambion	Taqman A/B kit	Billes magnétiques	0,5

**TABLE 4 – Rendements d’extraction des microARN à partir de tissus tumoraux fixés et paraffinés**

Les fragments d’échantillons (2 coupes de 16 µm d’épaisseur) ont été traités par les méthodes indiquées. Les quantités d’ARN courts sont mesurées avec le kit Qubit (ThermoFisher)

La méthode qui se distingue par le plus faible rendement d’extraction est celle d’Ambion. De plus, cette méthode et celle de Norgen Biotec sont aussi bien plus compliquées que les autres à mettre en œuvre pour préparer l’extraction car elles font appel à de nombreuses étapes expérimentales. Le tissu étant inclus dans de la paraffine il est nécessaire de se débarrasser de ce composé lors de l’extraction. Les méthodes Qiagen et Macherey-Nagel ont une solution pour tout simplement “dissoudre” la paraffine dans l’échantillon alors que les deux autres méthodes nécessitent plusieurs traitements par du

xylène et de l'éthanol avec des lavages afin de réaliser une lixiviation des tissus et les débarrasser intégralement de la paraffine. Ces deux méthodes (Qiagen et Macherey-Nagel) ont un rendement d'extraction correct voire très bon, pour ces raisons, elles ont été privilégiées pour une analyse plus complète de leurs performances.

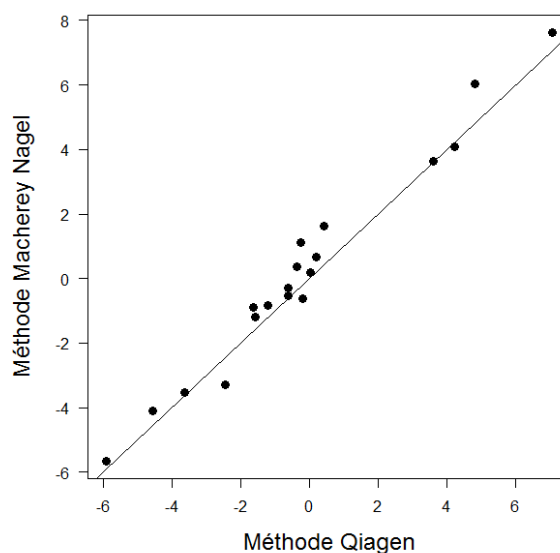


FIGURE 17 – Evaluation des méthodes d'extraction d'ARN courts Macherey-Nagel et Qiagen à partir d'échantillons paraffinés

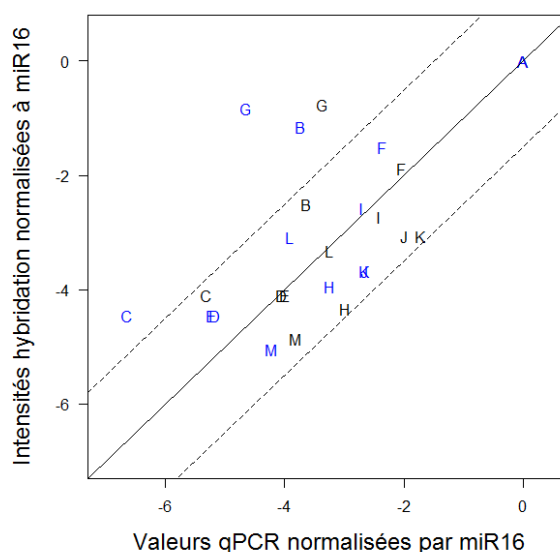
A partir d'un échantillon de gliome fixé et paraffiné les microARN ont été extraits par la méthode Qiagen et par la méthode Macherey-Nagel. Les quantités de 19 microARN ont été mesurées par RT-qPCR. Les valeurs des dosages normalisées (Cq du microARN dosé moins la moyenne des Cq des normalisateurs hsa-miR-16 et hsa-miR-134) sont reportées pour chaque méthode sur le graphique. En abscisse : valeurs de dosages de chacun des microARN purifiés par la méthode Qiagen ; en ordonnée : valeurs de dosage des microARN purifiés par la méthode Macherey-Nagel.

Afin de faire un choix entre les méthodes Qiagen et Macherey-Nagel, deux tests d'analyse du contenu en microARN ont été réalisés. Le premier test repose sur un dosage de 19 microARN par RT-qPCR uniquement, le deuxième compare les résultats RT-qPCR versus analyse par hybridation sur puces Affymetrix pour 13 microARN. Les microARN dosés ont été choisis parce qu'ils sont connus pour être bien exprimés dans les tumeurs cérébrales. Ils sont dosés en triplicats sur des réplicats d'extraction. La méthode qPCR reste à l'heure actuelle la méthode dite de référence malgré le développement des techniques à haut débit que sont le séquençage et l'hybridation. Pour les calculs des quantités de chacun des microARN dans les échantillons et afin de corriger les éventuelles erreurs portant sur



la quantité d'ARN analysée, on rapporte les mesures des microARN d'intérêt aux taux d'un ou plusieurs microARN dont les concentrations sont constantes entre les échantillons, et qui font office de référence. Les microARN hsa-miR-16 et hsa-miR-134 sont les deux normalisateurs qui ont été choisis grâce à la méthode GeNorm [119] calculée à l'aide du package NormqPCR [114] dans R. A partir des valeurs de cycles de quantification (Cq, équivalent au Ct ou threshold cycle), des  $\Delta Cq$  sont calculés pour chaque microARN par rapport à la moyenne des microARN normalisateurs. Pour chacun des microARN dosés, les valeurs de  $\Delta Cq$  obtenues sur les extraits purifiés avec la méthode Macherey-Nagel sont reportés en fonction des valeurs de  $\Delta Cq$  obtenues sur les extraits purifiés avec la méthode Qiagen figure 17 (page 79). On observe sur ce graphique que les points de dosage se répartissent selon une droite de pente 1 (avec un coefficient de corrélation de 0,97) ce qui traduit le fait que les compositions des extraits obtenus avec la méthode Macherey-Nagel et ceux obtenus avec la méthode Qiagen semblent extrêmement similaires. Ces résultats sont positifs mais insuffisants pour pouvoir faire le choix d'une des méthodes.

Pour le deuxième test, les mêmes échantillons ont été marqués et hybridés sur puces Affymetrix. Les quantités estimées pour chaque microARN par hybridation sur puces ou par qPCR sont normalisées par rapport aux quantités de hsa-miR-16. Les valeurs sont reportées dans la figure 18 (page 81) pour les dosages réalisés sur les extraits obtenus grâce à la méthode Macherey-Nagel (points représentés par les lettres en bleu) ou la méthode Qiagen (points représentés par les lettres en noir). Des compositions parfaitement identiques des échantillons évaluées par hybridation sur puces ou par qPCR devraient se traduire par une répartition des points selon la droite de pente 1 (ligne continue). Pour évaluer la variabilité des analyses, les droites en pointillés ont été ajoutées afin de matérialiser les contenus en microARN qui sont deux fois supérieures ou deux fois inférieures dans une analyse par rapport à l'autre (cf figure 18, page 81). Pour un même extrait, les plus faibles divergences de composition apparaissent entre les deux droites en pointillés du fait de l'utilisation de deux méthodes d'analyse. On note plus de dosages de moindre cohérence (hors de la zone entre les tracés en pointillés) pour la méthode Macherey-Nagel (3 incohérences versus 1 pour l'extrait Qiagen). Notre choix s'oriente donc en faveur de la méthode Qiagen.



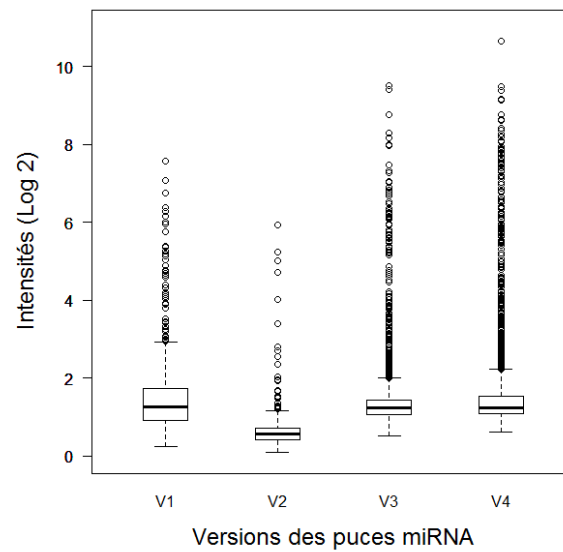
**FIGURE 18 – Comparaison des taux de microARN dosés par qPCR et hybridation sur puces dans les préparations obtenues grâce aux méthodes d'extraction Macherey-Nagel et Qiagen**

Les échantillons étudiés dans la figure précédente ont été analysés sur puces Affymetrix microARN V1. Les valeurs d'intensité de 13 microARN détectés ont été normalisées par rapport à l'intensité du signal du miR-16 et reportées sur l'axe des ordonnées. Les valeurs de dosage par qPCR des mêmes microARN normalisées par rapport à la quantité de miR-16 sont reportées en abscisse. Chaque microARN est représenté par une lettre. Les lettres en bleu correspondent aux microARN extraits par la méthode Macherey-Nagel et les lettres en noir représentent les microARN extraits par la méthode Qiagen.

### 1.1.3 Les liquides biologiques

Lorsque l'on établit un diagnostic sur coupes congelées ou fixées, la méthode d'obtention de l'échantillon est inévitablement très invasive pour le patient. L'idéal serait donc d'améliorer le diagnostic en le rendant possible à partir d'une simple prise de sang. Mais est-on capable de doser de manière suffisamment correcte des microARN dans le sang pour établir un diagnostic ? Cette partie du travail a été réalisée en collaboration avec une équipe du Centre de Lutte contre le Cancer François Baclesse de Caen (Dr C. Denoyelle, Dr N. Vigneron et Dr L. Poulain). Le travail a été réalisé dans le cadre du cancer de l'ovaire puisqu'une sérothèque importante est accessible dans ce centre pour ce type de cancer. L'objectif que nous avons mené ensemble est d'améliorer le diagnostic à partir des microARN et notamment le dosage de microARN sur sérums de patientes. Bien que des kits d'extraction soient commercialisés et que la preuve du concept (microARN dans le sérum) ait été faite par plusieurs équipes [120], pour autant, la question de la validité des

mesures pour le diagnostic reste ouverte [121] et n'est pas moins difficile. A partir de 300 µl de sérum, nous avons pu montrer qu'il est possible de réaliser une extraction d'ARN courts. La difficulté réside dans le fait que les quantités d'ARN obtenues sont très faibles et qu'il n'est pas possible de réaliser un dosage précis des masses purifiées. Il est impossible dès lors de faire des calculs de rendement comme je l'ai fait précédemment pour les autres méthodes.



**FIGURE 19 – Comparaison des résultats d’analyse avec différentes versions de puces Genechip microARN Affymetrix.**

Des quantités identiques d’extraits d’ARN courts obtenus à partir de sérums ont été analysées sur les 4 versions différentes de puces Affymetrix (V1 à V4). L’intensité de chacun des probesets est reportée en ordonnée en log2. Chaque microARN est représenté par un cercle sauf dans la zone où la densité de points est trop élevée (rectangles flanqués d’extension en pointillés). Le trait épais dans le rectangle correspond à la valeur médiane des dosages. Les côtés inférieurs des rectangles symbolisent le seuil en dessous duquel on détecte 25% des microARN ; les côtés supérieurs des rectangles le seuil en dessous duquel on détecte 75% des microARN. Les tirets extrêmes représentent le minimum et le maximum qui ne doivent pas dépasser 1,5 fois la hauteur de la boîte ; les points représentent les valeurs atypiques.

L’analyse qualitative des extraits obtenus à partir des sérums, a été engagée sur puces GeneChip miRNA d’Affymetrix. Cependant l’hybridation sur puce nécessitant selon le protocole standard des concentrations en ARN d’au moins 20 ng/µl, la réalisation de cette analyse est à mettre en place dans des conditions nouvelles et critiques. De plus,

le nombre de microARN humains recensés ayant évolué très vite ces dernières années, nous avons pu disposer pour ces tests de quatre versions différentes des puces Affymetrix (versions V1 à V4). Les versions V1 à V4, permettent respectivement d'analyser l'expression de 824, 1 050, 1 733 et 2 578 microRNA (à l'heure actuelle le contingent humain est de 2 588 microARN différents). Les analyses sur puces ont été réalisées à partir de 10 µl d'extrait purifié (soit un tiers du volume de l'éluat récupéré après purification). La figure 19 (page 82) représente la répartition des points de mesures de chaque microARN en fonction de leurs intensités (exprimées en log<sub>2</sub>) pour les analyses réalisées sur les 4 versions de puces. La première information particulièrement intéressante que l'on peut tirer de ces explorations, est qu'il est possible de doser quelques dizaines de microARN avec des intensités supérieures à 3 en log<sub>2</sub> (soit supérieur à 8 en échelle linéaire, cf tableau 5). En outre, cette figure permet de comparer globalement les changements liés à la technique d'analyse. On observe une gamme dynamique des valeurs plus grande pour les deux dernières versions des puces, ce qui est un signe d'amélioration globale de la qualité des analyses par hybridation. Au niveau clinique, la nécessité de pouvoir comparer des échantillons entre eux nécessite de faire appel à des microARN normalisateurs ou à des microARN non humains utilisés comme étalons externes afin de pouvoir suivre et compenser toutes variations de concentrations liées à la méthode d'extraction. Pour répondre à ce problème, nous avons décidé d'inclure des étalons externes dans les sérums avant de procéder aux extractions d'ARN courts. Nous avons choisi de rajouter un étalon externe sous forme d'un mélange de trois microARN de l'espèce *C. elegans* inexistants chez l'Homme, à savoir cel-miR-39, cel-miR-238 et cel-miR-54. Ces cel-miR peuvent donc être ajoutés en quantités connues (sous forme d'oligonucléotides de synthèse) dont les concentrations initiales sont parfaitement calibrées et qui peuvent être dosés à toutes les étapes de manière spécifique. L'utilisation de ces microARN exogènes, nous permet sans difficulté à l'issue du processus de purification et de dosage des microARN, de pouvoir recalculer précisément les concentrations des microARN dans le sérum. Ces travaux sur l'utilisation des cel-miR comme références ont fait l'objet d'une publication de la méthode d'utilisation et de calcul (article en révision). Ainsi, suite à ces travaux de mise au point et de validation, nous sommes en mesure de pouvoir détecter et doser correctement des quantités très modestes de microARN dans les sérums de patients. La mise au point d'un diagnostic sur la base de l'analyse des microARN présents dans le sérum paraît donc tout

à fait plausible techniquement à présent. Il reste donc à découvrir les microARN représentatifs des types et grades de tumeurs explorées et libérés dans la circulation sanguine soit sous forme de microARN libres soit inclus dans des exosomes relargués par les cellules tumorales.

	Ech65	Ech66	Ech85	Ech86
hsa-miR-4484	745	880	65	92
hsa-miR-122	857	596	78	61
hsa-miR-486-5p	585	713	133	151
hsa-miR-455-3p	727	399	8	30
hsa-miR-3665	494	543	39	48
hsa-miR-16	98	146	420	391
hsa-miR-23a	130	220	363	332
hsa-miR-1281	565	450	13	18
hsa-let-7b	411	202	160	123
hsa-miR-92a	231	314	157	154

**TABLE 5 – MicroARN extraits des sérums qui sont détectés avec la plus forte intensité par hybridation sur les Genechip microARN Affymetrix V4**

Les valeurs sont données en échelle linéaire. Les mesures ont été effectuées pour 4 échantillons différents.

## 1.2 Validation des modèles cellulaires

Afin de mieux comprendre les dérégulations observées dans les échantillons cliniques et pouvoir évaluer *in vitro* l'efficacité de molécules d'intérêt pharmacologique, il est important de disposer de modèles cellulaires. Les modèles choisis sont la lignée RT112 comme modèle de cellules des tumeurs épithéliales agressives de la vessie et la lignée U87 comme modèle de tumeurs gliales agressives appelées glioblastomes. Les extractions d'ARN sur cellules sont faites à partir d'un culot d'environ un million de cellules avec la même technique que pour les tissus congelés (miRVana). Les rendements d'extractions sont reportés dans le tableau suivant :

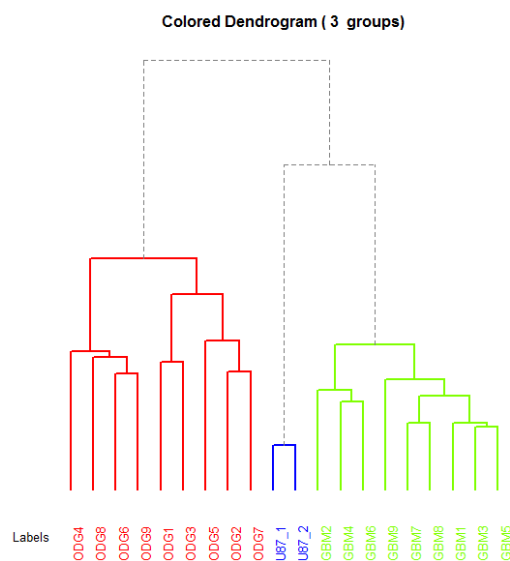
Lignée cellulaire	Concentration d'ARN longs (ng/µl)	Concentration d'ARN courts (ng/µl)
U87	110	25
RT112	86	15

TABLE 6 – Rendements d'extraction miRVana sur culots de cellules

Les rendements d'extraction d'ARN longs et courts sont similaires pour ces deux lignées tumorales. La qualité des ARN a été vérifiée sur puces Agilent "RNA 6000 Nano LabChip" et les valeurs de RIN obtenues pour les deux lignées sont supérieures à 8,5 (le RIN indique l'intégrité des ARN, compris entre 1 et 10 ; 10 correspondant aux échantillons de la plus haute qualité). L'indicateur RIN est dans la majorité des cas plus élevé pour des extractions à partir de cellules (8,5 - 10) que pour des extractions à partir de tissus (7 - 9). Suite à ce contrôle de qualité, il est envisageable de réaliser des puces Affymetrix à partir de ces échantillons pour explorer le profil moléculaire de ces lignées.

Les profils moléculaires (ARNm et microARN) de deux cultures de cellules U87 (glioblastome) ont été réalisés de manière globale par hybridation sur puces Affymetrix. Plusieurs équipes [111–113] ont proposé des méthodes de classification moléculaires des gliomes (à partir de tissus congelés), basées sur les taux d'expression d'ARN messagers, mesurés par une technique haut débit par hybridation sur puces. Les données de ces échantillons sont accessibles sur des bases de données (TCGA : <http://cancergenome.nih.gov/>, GEO database : <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gds>) et représentent des cohortes de nombreux patients. Pour évaluer la pertinence de notre modèle cellulaire U87, les données de profils transcriptomiques ARNm de ces cellules ont été comparées à celles des cohortes de patients pour lesquels il n'y a pas d'ambiguïté sur leur classification en utilisant les méthodes de classifications moléculaires citées précédemment. Dix huit échantillons tumoraux ont été retenus et classés en deux catégories, soit oligodendrogliomes (ODG, 9 échantillons) correspondant à des tumeurs de bas grade, soit glioblastomes (GBM, 9 échantillons) correspondant à des tumeurs de haut grade. La figure 20 (page 86) représente le résultat des calculs de proximité entre échantillons qui aboutit à une classification sous forme d'arbre de distance un peu à l'image d'un arbre généalogique. Ainsi on peut observer que les échantillons tissulaires se répartissent, comme attendu, selon deux groupes

bien distincts soulignés par les couleurs rouge et verte. Les échantillons de cellules U87 (2 cultures différentes U87\_1 et U87\_2), se positionnent à proximité l'un de l'autre, signe d'une similarité forte entre les deux échantillons, et de plus, elles sont associées par une "parenté" évidente avec le groupe des tumeurs les plus agressives. On note évidemment quelques différences moléculaires (profils non représentés) entre les cellules et les échantillons tissulaires des patients qui expliquent la position des cellules à la marge du groupe des tissus tumoraux de glioblastomes.



**FIGURE 20 – Comparaison des cellules U87 (glioblastomes) avec des tissus tumoraux d’oligodendrogliomes (ODG) et glioblastomes (GBM) sur la base des profils d’expression d’ARNm**

Les profils d’expression obtenus par hybridation sur puces de 9 tissus d’oligodendrogliomes (ODG1-9, en rouge), de 9 tissus de glioblastomes (GBM1-9, en vert) et de 2 cultures différentes de U87 (en bleu) sont analysés grâce au logiciel R et les similitudes entre échantillons illustrées par le dendrogramme.

D’un point de vue technique, on sait extraire des ARN courts à partir de types d’échantillons variés (tissus congelés ou fixés, sérums), et on vient de valider que le modèle cellulaire de tumeurs gliales sur lequel on se base (lignée U87) reflète relativement bien les tumeurs agressives. L’étape critique suivante dans ce processus de recherche de biomarqueurs robustes, c’est l’analyse globale de l’expression des microARN et l’étape de calcul des variations des concentrations de chaque microARN entre les différents échantillons afin de pouvoir repérer les microARN dont les taux sont dérégulés dans les tumeurs par rapport aux tissus sains ou entre les tumeurs de deux grades différents. Bien que l’on

premier soin de faire des comparaisons à partir d'une même quantité d'ARN pour chaque échantillon, il y a toujours des variations plus ou moins importantes sur les intensités de dosage. Il convient alors de les compenser ("normaliser") avant de faire l'analyse. Pour cela, on peut s'aider soit d'étalons externes (par exemple des cel-miR ajoutés à l'échantillon en début de processus, et/ou des contrôles qui sont rajoutés pour valider les étapes de marquage des ARN (ARN de contrôles pré-marqués, contrôles d'hybridation...)) soit de méthodes mathématiques ou encore de combiner les deux approches. Mais comment s'assurer que l'on ne déforme pas les résultats en les normalisant ?

microARN	A	B
hsa-miR-638	7,60	6,42
hsa-miR-877	4,96	4,69

TABLE 7 – Mise en évidence des probesets produisant des signaux non spécifiques sur puces Genechip miRNA d’Affymetrix

Les puces ont été hybridées avec des cocktails réalisés sans ARN provenant d'échantillons biologiques mais contenant (A) les sondes de contrôle de marquage et les sondes de contrôle d'hybridation ; (B) les sondes de contrôle d'hybridation uniquement.

### 1.3 Validation des méthodes de dosage des microARN et des méthodes de prétraitement des données

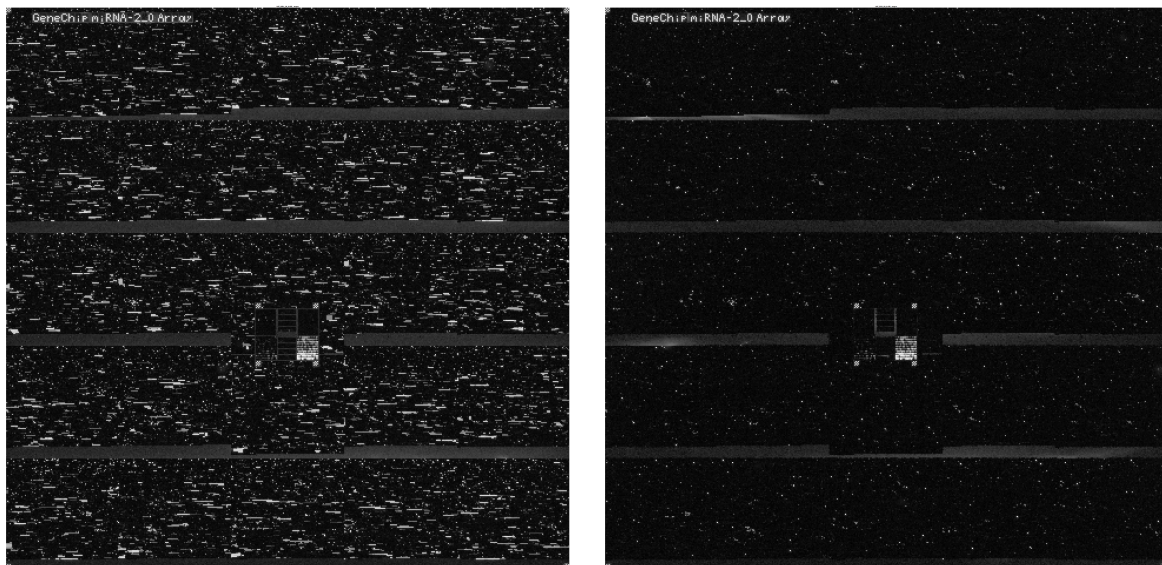
#### 1.3.1 Données acquises par hybridation sur puces

Un premier contrôle à réaliser, consiste à hybrider une puce avec seulement les ARN de contrôles de marquages et d'hybridation. Le but de cette analyse est de pouvoir faire apparaître les signaux faussement positifs que les ARN de contrôles peuvent générer au niveau des zones de détection des microARN d'intérêt (zones appelées "probesets"). Deux puces ont été hybridées, l'une avec un cocktail contenant les sondes de contrôle de marquage et les sondes de contrôle d'hybridation (A) et l'autre traitée de manière identique mais ne contenant que les ARN de contrôle d'hybridation marqués (B). Les probesets de microARN montrant un signal d'une intensité anormalement forte (valeur du signal supérieure à un seuil d'intensité en log2 de 3) sont reportés dans le tableau 7. Seulement 18 microARN sur un peu plus de 20 300 présents sur la puce révèlent un signal d'in-



tensité non négligeable lié à une hybridation non spécifique des contrôles d'hybridation. Parmi ceux-ci, seuls les probesets des microARN humains hsa-miR-638 et hsa-miR-877 donnent des signaux supérieurs au bruit de fond même en absence d'ARN. Le dosage de ces deux microARN ne sera donc pas considéré comme fiable dans la suite des travaux.

La figure 21 représente l'image des scans de deux puces Affymetrix. Chaque pixel de couleur claire correspond à une hybridation de microARN ou ARN de contrôle sur des probesets spécifiques. Sur ces deux exemples, il est facile de constater une très grande différence d'hybridation entre les deux images de puces. L'image de gauche correspond à l'analyse d'un échantillon cellulaire riche en ARN courts provenant de cellules U87, alors que celle de droite a été obtenue par hybridation d'ARN courts issus d'exosomes de cellules U87.



**FIGURE 21 – Images de deux puces Affymetrix GeneChip microARN**

Les puces ont été hybridées avec des ARN courts extraits d'échantillons provenant de cellules (image de gauche) ou d'exosomes (image de droite).

Afin de pouvoir comparer les résultats obtenus sur puces, une étape de normalisation est appliquée qui consiste à harmoniser les intensités des différentes puces entre elles. Pour cela, la normalisation classiquement utilisée pour les puces Affymetrix est la méthode RMA (Robust Multi-array Average). Cette méthode est globale, elle prend en compte

le niveau d'intensité de chaque puce ainsi que les contrôles d'hybridation. L'ajustement consiste en une méthode de "normalisation quantiles" où après traitements des données, les médianes d'intensités et quartiles de chacune des puces sont ramenés par l'algorithme pratiquement aux mêmes valeurs pour l'ensemble des puces. Autrement dit, lorsque l'on représente toutes les valeurs sous forme d'une "boîte à moustaches" (une boîte = une puce = un échantillon), toutes doivent être semblables et au même niveau. Une façon très courante de représenter les données pour valider que les données enregistrées pour 2 puces par exemple sont correctement normalisées et que de ce fait une recherche de microARN surexprimés dans un échantillon versus l'autre est licite, consiste à réaliser un "MvA plot" (figure 22, page 90). Les puces sont comparées deux à deux en reportant dans le graphique l'intensité moyenne des dosages des deux puces de chaque probeset en abscisse et en portant en ordonnée les différences d'intensité entre les deux puces pour chacun de ces mêmes probesets (valeur exprimées en  $\log_2$  des différences). On s'assure ensuite que le nuage de points est centré sur l'axe des abscisses avec une valeur en ordonnée de zéro. Cela signifie que globalement l'hybridation s'est faite de manière similaire pour les deux échantillons et qu'ils sont comparables. Les limites de la méthode RMA sont atteintes pour des échantillons pour lesquels l'hybridation s'est déroulée de manière comparable mais dont la composition d'un des échantillons au moins est totalement différente de celle des autres.

Dans certains cas, la normalisation peut donner des valeurs abusives pour certains microARN. En effet, si l'on reprend l'exemple de la comparaison des ARN de cellules versus les ARN d'exosomes correspondants (figure 21), les puces sont réalisées à partir de 200 ng d'ARN courts mais la proportion en microARN dans ces préparations d'ARN courts n'est visiblement pas la même pour un échantillon cellulaire ou un échantillon exosomal. Or la normalisation RMA va avoir pour effet de corriger les données dans le but d'ajuster une répartition similaire des données entre les deux puces étudiées et cela va créer des distorsions comme illustrées en figure 23 (page 91). Cette figure sert à évaluer l'impact de la normalisation d'une puce en fonction des autres puces à laquelle elle est comparée. C'est à dire que pour une même puce, deux normalisations ont été calculées. Dans un premier temps, une puce hybridée avec des ARN d'exosomes a été normalisée uniquement avec un ensemble d'autres puces toutes hybridées avec des ARN d'exosomes. Puis dans un second temps, l'analyse est effectuée pour comparer cette fois-ci, les données

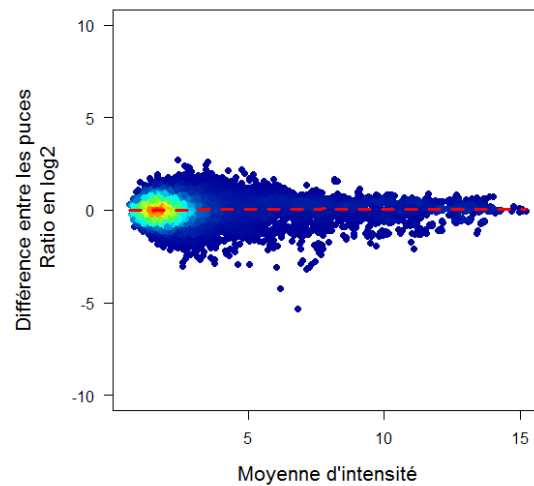


FIGURE 22 – Comparaison des données de deux puces après normalisation RMA (MvA plot)

Chaque point correspond à un microARN donné pour lequel la différence des intensités des signaux entre les deux puces est reportée en ordonnée ; et la moyenne des intensités en abscisse. Les valeurs des différences et moyennes sont exprimées en  $\log_2$ . La densité de points est symbolisée par la gamme de couleur allant du violet (points individuels) au rouge (zone de forte densité de points).

concernant les ARN d'exosomes versus les ARN de cellules. La normalisation est donc faite en incluant les puces hybridées avec l'ARN cellulaire. Les valeurs des deux normalisations sont ensuite représentées l'une par rapport à l'autre.

En conclusion de cette évaluation des méthodes d'acquisition des signaux sur les puces Affymetrix et sur les méthodes de normalisation, il convient de retenir que la normalisation des données massives générées (plus de 45000 lignes de données dans un tableur excel pour les puces Genechip microARN) est une étape qui peut être réalisée de manière performante par l'algorithme RMA, néanmoins il faut veiller à appliquer cette méthode à des lots d'échantillons relativement homogènes. Au cours de ce travail, la qualité des normalisations de la totalité des explorations de profils microARN par hybridation a été systématiquement contrôlée grâce aux tracés MVA des données correspondantes.

### 1.3.2 Données acquises par les méthodes de RT-qPCR

L'analyse des microARN par RT-qPCR a été réalisée au cours de ce travail en utilisant la méthode commercialisée par ThermoFisher et qui fait appel à des primers

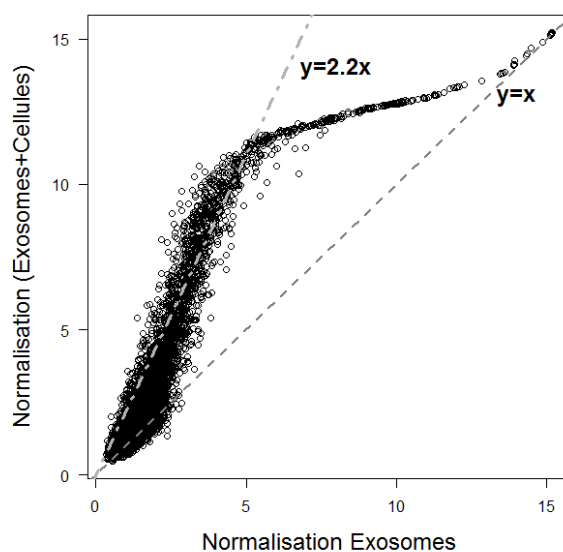


FIGURE 23 – **Impact des méthodes de normalisations sur la cohérence des données d’hybridation**

Les valeurs d’intensité des probesets de plusieurs puces hybridées avec des échantillons d’exosomes et normalisées entre elles sont reportées en abscisse ( $\log_2$ ) ; les valeurs d’intensité des probesets de ces mêmes puces hybridées avec des échantillons d’exosomes et normalisées avec un jeu de données de puces hybridées avec des échantillons cellulaires sont reportées en ordonnée ( $\log_2$ ). La droite en tirets-points correspond à la parfaite égalité attendue entre les valeurs en abscisse et en ordonnée. La droite en tiret (d’équation  $y = 2,2x$ ) correspond à la courbe de tendance pour une majorité des points expérimentaux.

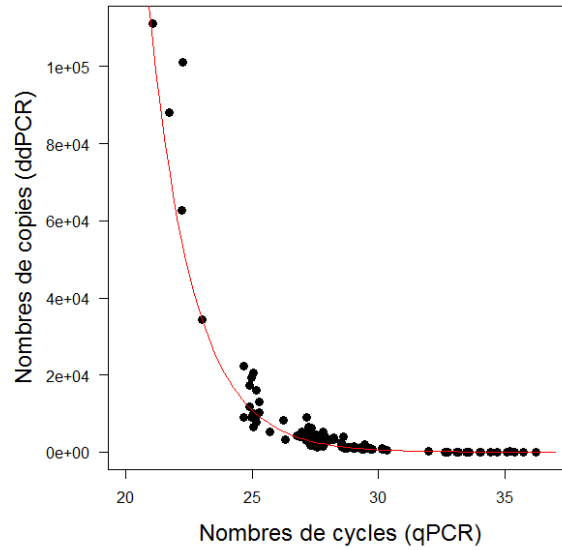
Taqman. Nous n’avons pas fait de mise au point ou optimisation sur cette méthode, par contre nous nous sommes intéressés à une technique de qPCR très récemment introduite dans les laboratoires : la digital PCR.

Cette méthode consiste dans son principe à isoler chaque molécule d’ARN de l’échantillon, réaliser des amplifications individuelles pour chacune de ces molécules avec des primers spécifiques d’un miRNA donné et effectuer ensuite un comptage des réactions positives. On attend d’une telle méthode une alternative au séquençage puisque cette technique nous donne une idée précise du nombre de molécules pour une séquence d’ARN ou d’ADN donnée selon les conditions. On notera que l’intérêt de cette technique réside dans le fait que l’on mesure de manière précise des quantités d’ARN, exprimées en nombre de molécules par unité de volume d’échantillon, et ceci même pour les transcrits peu abondants. L’intérêt en clinique ensuite est justement de pouvoir doser des ARN rares tels qu’ils peuvent l’être dans les fluides biologiques. Ainsi on espère un diagnostic fiable et

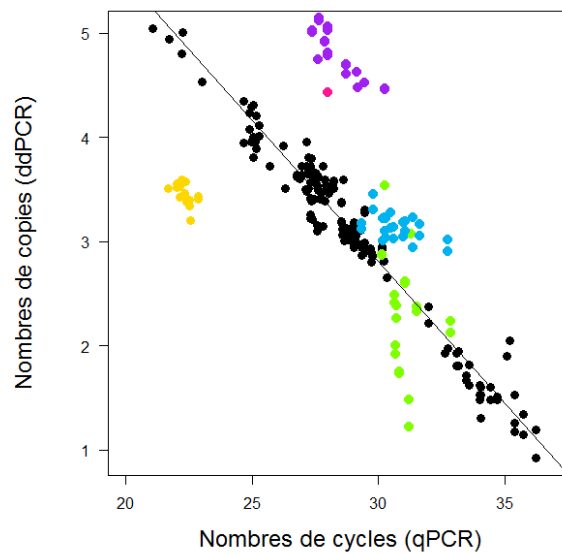
moins invasif. A l'heure actuelle, la PCR reste la technique de référence, donc la question posée ici est comment se positionne cette nouvelle technique de digital PCR par rapport à la technique de qPCR qui existe et qui est la référence ? La figure 24A (page 93) regroupe les valeurs de dosages de 44 miARN effectués sur plusieurs dizaines d'échantillon en mode qPCR standard ou en mode digital droplet PCR. Chaque point de ce graphique correspond au dosage d'un miR donné dans un échantillon spécifique. Les valeurs de dosage sont rapportées en Cq pour la qPCR (valeurs en abscisse) et en nombres de copies de molécules mesurées par digital PCR (valeurs données en ordonnée). L'allure globale de la courbe reflète une corrélation attendue entre les deux types de mesures. En effet, cette courbe est conforme à la relation qui lie le nombre de molécules à une valeur de Cq mesurée en PCR en temps réel, corrélation qui se traduit par l'équation suivante :  
nombre de molécules =  $2^{-Cq}$  (ceci est vrai quand l'efficacité de la qPCR est optimale).

De manière inattendue, l'application de cette nouvelle technique de digital PCR au projet, nous a permis de poser un regard critique sur les performances des kits de dosage de microARN en PCR en temps réel. En effet, dans la figure 24B (page 93), les valeurs de la figure 24A sont reprises mais dans cette figure les nombres de copies d'ARN obtenus par la méthode ddPCR (rapportés en ordonnée) sont représentés en log2 de leurs valeurs. La figure comporte donc en abscisse des données de nombres de cycles de PCR et des données en ordonnée en log2 du nombre de copies mesurées en ddPCR. Cela signifie qu'un incrément d'une valeur de 1 en ordonnée correspond à un doublement du nombre de copies d'ARN dans chaque échantillon.

La cohérence parfaite des dosages obtenus avec les deux méthodes doit donc se traduire de fait par l'alignement de tous les points de dosages selon une droite de pente négative. La droite tracée sur ce graphique illustre bien que cette règle prévaut pour un certain nombre de miR (points noirs répartis autour de la droite de corrélation) mais que pour 5 autres miR (let-7f, miR-10a, miR-134, miR-155, et miR-3162) le comportement ne suit pas la règle générale. La cohérence de dosage de ces 5 miR n'est donc pas garantie en utilisant deux méthodes de dosage qui sont pourtant toutes deux basées sur la PCR.



(A) Comparaison digital PCR et qPCR



(B) Tracé logarithmique

FIGURE 24 – Comparaison des méthodes digital droplet PCR et qPCR

Différents microARN (44 au total) ont été dosés à l'aide des kits Taqman (Life Technologies) par qPCR en plaques et par digital droplet PCR dans des échantillons de plusieurs tissus tumoraux et de concentrations diverses. (A) corrélation entre le nombre de molécules de microARN mesuré par ddPCR versus les C<sub>q</sub> obtenus en qPCR dans les mêmes échantillons. (B) Données du graphique A avec report des données de ddPCR en log<sub>10</sub> du nombre de molécules de microARN. Dosages incohérents entre qPCR et ddPCR : let-7f (rose) ; miR-10a (vert) ; miR-134 (violet) ; miR-155 (jaune) et miR-3162 (bleu)

Pour la quantification de miR-10a (points verts) la gamme dynamique de dosage est extrêmement réduite en qPCR par rapport à celle de ddPCR. Ceci semble indiquer

que miR-10a serait quantifié de manière incorrecte en qPCR. A l'inverse, pour miR-3162 (points bleus), c'est la gamme dynamique de dosage en ddPCR qui est extrêmement réduite par rapport à celle de qPCR ce qui suggère que miR-3162 serait quantifié de manière incorrecte en ddPCR. Quant à miR-155 (points jaunes), let7f (point rose) et miR-134 (points violets) il n'est pas possible de préciser si une seule ou les deux méthodes sont incorrectes. Ces incohérences de dosage peuvent être attribuées au fait que les kits de dosage ne contiennent pas de primers suffisamment spécifiques des miR à amplifier, ou que ces primers ne disposent pas d'une accessibilité parfaite à leur séquence d'amorçage du fait de l'existence de structures secondaires des ARN cibles, ou bien encore que certains des primers ne pourraient pas être aussi performants en ddPCR au sein des microgouttelettes d'amplification (volume 1 nl) qu'ils le seraient en PCR dans un volume de 20 µl dans des puits de plaque 96 puits.

En conclusion de ce chapitre, on peut relever que les méthodes de quantification des microARN peuvent produire quelques artefacts. Avec la méthode par hybridation sur puces, certains signaux faussement positifs peuvent être générés par les réactifs impliqués dans le protocole de marquage et l'hybridation. De même les méthodes de PCR quantitative qu'elles soient réalisées en plaque de 96 puits ou en gouttelettes montrent quelques anomalies qui incitent à la prudence pour tous les travaux destinés à la détection et à la quantification des microARN biomarqueurs d'intérêt clinique.

### **1.4 Recherche de biomarqueurs pour le diagnostic et le suivi thérapeutique**

Les cliniciens font le triste constat d'un manque de fiabilité du diagnostic impactant ensuite la prise en charge thérapeutique. Ce chapitre a pour but de faire la preuve de concept d'un diagnostic en clinique basé sur l'expression des microARN. Mais c'est également un point clé pour le projet puisque la sélection de microARN informatifs pour le diagnostic déterminera quels sont les microARN intéressants en thérapie. L'approche développée ici est une approche théranostique puisque le dosage des taux d'expression des microARN permettra le diagnostic et pourra être couplé à un traitement. Dans ce cadre, la thérapie sera directement déduite du bilan de dérégulation du profil des microARN dans

le tissu tumoral et le traitement reposera sur la délivrance au sein de la tumeur soit d'analogues de microARN, soit d'antagonistes de microARN. Ceci permettra respectivement, soit de compenser les carences en certains microARN, soit de réduire des taux exagérés de certains autres microARN et ceci dans le but de revenir à un profil microARN plus proche d'une situation non tumorale ce qui serait donc susceptible de promouvoir, si possible, la guérison du patient.

Les cohortes de patients sont extrêmement difficiles à établir si l'on veut prendre soin de disposer de toutes les informations cliniques qui seront mises en corrélation avec les profils de biologie moléculaire obtenus par analyse des tissus ou échantillons biologiques prélevés chez ces patients. Depuis quelques années maintenant, il existe une base de données (The Cancer Genome Atlas ou TCGA) regroupant diverses analyses moléculaires et de nombreuses données cliniques associées pour plusieurs types de cancer. Les équipes de Li, de Phillips et de Verhaak, citées précédemment ( cf chapitre "Validation des méthodes de dosage des microARN" ) se sont appuyées, de manière indépendante, sur cette base de données pour compléter ou effectuer leurs analyses de profils transcriptomiques (ARN messagers) sur des gliomes de haut grade. Cette partie du projet porte sur les mêmes cohortes de patients mais ne consiste pas à refaire ce qu'on déjà fait ces équipes. Au contraire, il s'agit de s'appuyer et de compléter leurs travaux avec une analyse des profils de microARN pour aller plus loin vers le diagnostic. Pour cela, les données d'expression d'ARN messagers et des microARN ont été récupérées sur la base de données pour 122 patients au total dont 10 sont des "individus sains".

La classification des gliomes étant difficile, avant de réaliser l'étude sur les microARN, un premier tri des tumeurs selon les différentes classifications existantes a été réalisé. Cette étape permet de définir plusieurs groupes de tumeurs : sur les 112 échantillons de gliomes, 44 sont reconnus comme des gliomes agressifs (car ils correspondent au groupe "G" selon la classification de Li *et al*, et au groupe "MES" soit mésoenchymateux selon les travaux de Phillips *et al* ou ceux de Verhaak *et al* ) et 37 correspondent à des tumeurs présentant un développement lent (groupe "O" pour Li et "PN" soit proneuraux pour Phillips ou Verhaak) tableau 8. Sur la base de ces trois classifications, on constate que 81 échantillons sont classés dans des catégories cohérentes (G et MES ou O et PN). Il reste donc environ



28% (12 “G\_PN” et 19 “O\_MES” par rapport aux 112 tumeurs classées) des tumeurs qui présentent un problème pour leur définir un statut cohérent par les méthodes de classification reprises ici.

Tum. classées selon Li	Tum. classées selon Phillips ou Verhaak	
	MES	PN
G	44	12
O	19	37

**TABLE 8 – Classification d’un groupe de 112 tumeurs gliales par les méthodes de Li *et al*, Phillips *et al* et Verhaak *et al***

Les données concernant les 112 tumeurs sont issues de la base de données du TCGA. G et O tumeurs correspondent respectivement à des tumeurs haut grades et bas grades selon Li *et al* (2009). MES et PN sont respectivement des tumeurs de haut grades et bas grades selon Phillips *et al* (2006) et Verhaak *et al* (2010).

Il est intéressant dans un premier temps d’avoir des groupes constitués d’individus avec un diagnostic a priori non ambigu de sorte à pouvoir mieux évaluer les différences moléculaires entre des groupes caractéristiques. Parmi les informations disponibles pour chaque patient, on dispose de l’âge auquel ils ont développé une tumeur du cerveau et l’on sait aussi si le patient est toujours vivant et dans le cas contraire, on dispose de la durée de sa survie après le diagnostic. Ainsi l’étude de la survie par groupe de tumeurs peut être étudiée à l’aide de l’estimateur Kaplan-Meier. Les tracés des courbes de survie (figure 25, page 97), correspondent à la proportion d’individus vivants à un instant t. Cette représentation donne lieu à une courbe en “marche d’escalier”. Un changement de niveau sur la courbe est dû au décès d’un patient, ce qui se traduit par une proportion moindre de patients vivants dans le groupe. Plus le nombre de personnes incorporées dans l’analyse de survie est grand, plus la courbe sera lissée. Les tracés de Kaplan-Meier ont été représentés pour les tumeurs classées de manière cohérente comme agressives (G\_MES) et peu agressives (O\_PN) par les trois méthodes de classification des gliomes (81 au total). Les durées de survie de ces deux groupes de tumeurs ne montrent toutefois pas de différences significatives (durée moyenne du groupe G\_MES : 12 mois, durée moyenne du groupe O\_PN : 14 mois).

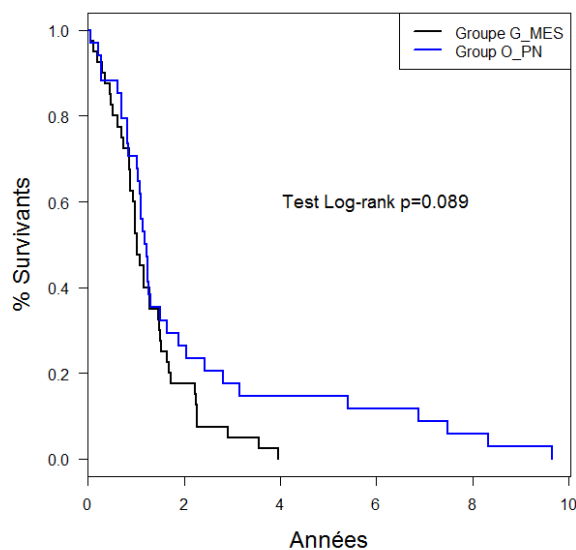


FIGURE 25 – Analyse de survie par groupes de tumeurs classées selon les trois méthodes

Il est cependant intéressant de noter si l'on analyse les durées de survie des patients en créant deux groupes sur le critère de l'âge au diagnostic, avec des groupes de patients ayant soit moins de 40 ans soit plus, on note des différences sensibles sur les durées de survie (cf figure 26, page 98). En effet, les patients de moins de 40 ans (traits pointillés) développent plus souvent des tumeurs de bas grades et une survie significativement plus longue (2 patients G\_MES avec un survie de 12 mois alors que 12 autres patients de moins de 40 ans ont une tumeur classée O\_PN ont une survie moyenne de 33 mois,  $pvalue=0,003$ ). A l'inverse, pour les patients de plus de 40 ans (traits pleins), les durées de survie des patients atteints de tumeurs du groupe G\_MES ne sont pas significativement différentes des durées de survie des patients atteints de tumeurs du type O\_PN (la valeur de survie moyenne pour le groupe G\_MES est de 12 mois et celle du groupe O\_PN est de 13 mois). Ceci semble donc bien indiquer qu'il existe des différences importantes en ce qui concerne les types de tumeurs gliales, que ces différences soient basées sur les caractéristiques intrinsèques mais inconnues encore des tumeurs ou sur la réponse physiologique des patients en fonction de leur âge.

Après avoir classé les échantillons selon leur profil d'ARNm, ces groupes serviront de modèles pour la sélection de microARN lors de tests d'apprentissages. Puis les microARN les plus performants seront retenus sur leur capacité à parfaitement bien classer toutes les tumeurs en deux groupes cohérents. Une centaine d'autres échantillons (groupe

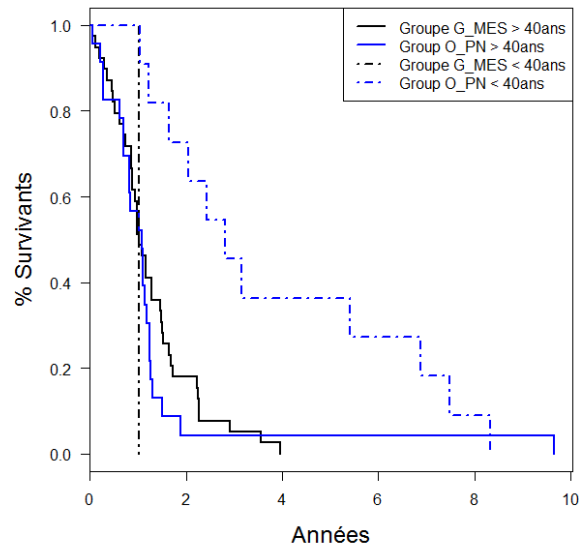
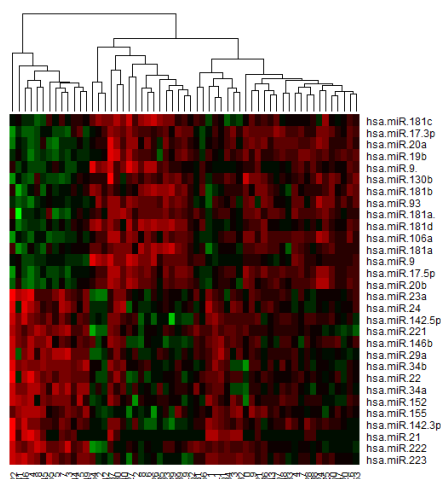


FIGURE 26 – Analyse de survie selon l'âge au diagnostic et le type de tumeur

du test de validation) sera classée à l'aide des microARN retenus comme biomarqueurs de diagnostic. L'analyse porte sur 534 microARN dont l'expression a été mesurée par hybridation sur puce Agilent (données TCGA). Un test statistique (Significant Analysis Microarray) adapté aux résultats sur puces permet de sélectionner les microARN les plus discriminants. Le résultat de cette analyse se visualise à l'aide d'un cluster d'Eisen [122] présenté figure 27 (page 99). Cette figure est une matrice combinant les microARN en lignes et les échantillons (n=122) en colonnes. Par convention, le niveau d'expression des microARN dans chaque échantillon est codé selon une échelle de couleur allant du vert au rouge. Le vert est associé à une sous-expression, le noir à une expression moyenne et enfin le rouge pour montrer une surexpression d'un microARN dans un échantillon donné. Le test SAM et un t-test effectués en complément font ressortir une vingtaine de microARN différenciellement exprimés avec une forte significativité (pvalue inférieure ou égale à 0,05) dans les tumeurs agressives par rapport aux non agressives.

A partir d'échantillons tissulaires, on a pu faire la démonstration qu'en établissant les profils d'expression des microARN il devient envisageable de distinguer des groupes de tumeurs gliales et potentiellement d'établir un diagnostic. Pour un transfert vers une routine clinique, il serait souhaitable si possible de pouvoir réaliser cette distinction non pas sur des fragments de tumeurs congelés comme cela a été réalisé dans les travaux ci-dessus mais plutôt sur les échantillons tumoraux fixés et inclus en paraffine qui représentent le



**FIGURE 27 – Distinction des échantillons de tissus de cerveaux tumoraux et normaux par leur profils microARN**

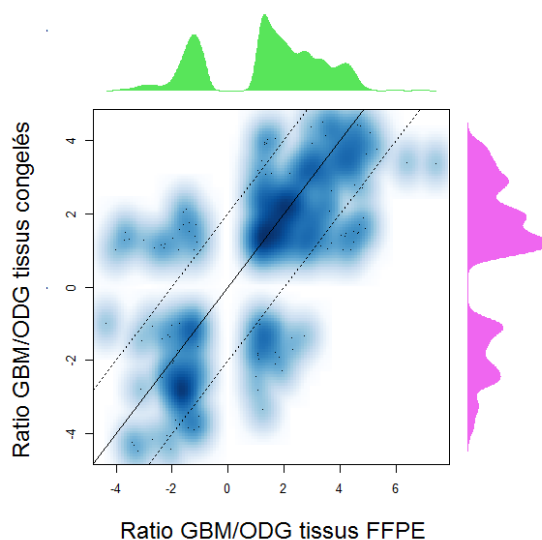
Les taux des microARN (indiqués verticalement) dans les échantillons tissulaires (indiqués par les numéros des colonnes) sont utilisés pour la construction d'un cluster par la méthode de Eisen. Les sousexpressions des miR sont indiquées par les cases de couleur verte et les surexpressions par les cases de couleur rouge. Le dendrogramme permet de visualiser les trois groupes d'échantillons (de gauche à droite : tumeurs agressives, tissus sains, tumeurs non-agressives).

matériel biologique communément manipulé par les anatomopathologistes. Pour cela, des ARN extraits à partir d'échantillons tissulaires congelés (n=6) et paraffinés (n=4) ont été marqués et hybridés sur puce GeneChip miRNA V1 d'Affymetrix. Dans les deux cas, les échantillons comprennent des oligodendrogliomes (ODG) et des glioblastomes (GBM) selon le classement clinique. Pour la totalité des microARN détectés sur les puces, une valeur d'intensité moyenne est calculée pour chacun des deux groupes de tumeurs. Puis pour chaque microARN un ratio de l'intensité moyenne dans les glioblastomes versus l'intensité moyenne dans les oligodendrogliomes est calculé. La figure 28 (page 101) permet de comparer de manière globale tous ces ratios entre eux. Sur ce graphique, chaque point représente un microARN placé en fonction du ratio GBM/ODG dans les échantillons de tissus fixés et paraffinés (valeurs en abscisse) et dans les échantillons de tissus congelés (valeurs en ordonnée). Plusieurs points pouvant avoir la même localisation sur le graphique, pour pouvoir visualiser cette situation une échelle de couleur du bleu clair (densité de points faible en un même endroit) au bleu foncé (densité de points élevée) a été appliquée. En outre, une projection de la densité des données a été représentée sur chaque axe pour mieux repérer les distributions de ratio pour chacune des méthodes.

La courbe verte correspond à la distribution des ratios dans les échantillons en paraffine alors que la courbe rose correspond à la distribution des ratios pour les tissus congelés. On note visuellement qu'une majorité de ratios se répartit dans le prolongement d'une droite de corrélation parfaite (ligne noire continue). Si l'on veut définir une tolérance pour cette corrélation afin de repérer les miR pour lesquels le ratio GBM/ODG n'est jamais deux fois plus grand ou deux fois plus faible dans les échantillons paraffinés par rapport aux échantillons congelés, cela revient à borner cette droite parfaite par les deux droites en pointillés. On peut donc conclure de cette analyse que les mesures quantitatives des microARN réalisées dans les échantillons de tumeurs de cerveau fixés et paraffinés reflètent de manière relativement fiable ce qui peut être mesuré dans des tissus congelés. Compte tenu des traitements chimiques agressifs (agent de réticulation comme le formol) utilisés pour la fixation et inclusion en paraffine des fragments de tissus, il n'était pas garanti de pouvoir trouver une aussi bonne correspondance entre les mesures. Ce résultat est donc très prometteur pour une application clinique des analyses sur échantillons inclus en paraffine.

Pour avancer dans une démarche translationnelle vers la clinique, une nouvelle étape consiste à étendre la preuve de concept d'un diagnostic qui serait possible avec un petit nombre de microARN en l'appliquant aux tissus conservés en paraffine. Pour cela, parmi les microARN dont nous avons montré ci-dessus qu'ils sont dosés de manière similaire dans les tissus congelés et les tissus FFPE, les quantités d'une trentaine de ces microARN ont été mesurés par RT-qPCR sur une nouvelle cohorte (n=24) de tissus inclus en paraffine. Une sélection de dix microARN qui permettent de segmenter les échantillons en deux groupes est réalisée par la méthode des clusters montrée précédemment. A la suite de quoi tous les ratios entre ces dix microARN sont calculés pour pouvoir choisir les deux meilleurs ratios permettant de faire une distinction claire entre les deux groupes de tumeurs. Les résultats des tests statistiques font émerger deux ratios ( $let-7a/miR-21$  et  $miR-26b/miR-21$ ) dont les taux sont les plus discriminants entre tumeurs agressives et non agressives.

Pour valider que les ratios de microARN peuvent être pertinents pour le diagnostic, un test de spécificité et de sensibilité est fait pour les deux ratios retenus en utilisant les



**FIGURE 28 – Comparaison des résultats d’analyse des microARN purifiés à partir de tissus congelés et tissus FFPE**

Les ARN courts ont été extraits d’échantillons tissulaires de glioblastomes et d’oligodendrogliomes disponibles à la fois sous formes congelés et sous formes fixés et paraffinés. Les taux de chacun des microARN ont été ensuite mesurés par hybridation sur puces microARN Affymetrix. Pour chaque miR les ratios des taux d’expression entre le tissu de glioblastome fixé et le tissu d’oligodendrogliome fixé ont été calculés et reportés en ordonnée versus les ratios des taux d’expression entre le tissu de glioblastome congelé et le tissu d’oligodendrogliome congelé en abscisse. Les ratios sont exprimés en  $\log_2$ . La coloration bleu est proportionnelle à la densité de points de ratios de microARN sur le graphique. La droite en trait continu correspond à la parfaite égalité attendue entre les valeurs en abscisse et en ordonnée.

valeurs de dosage pour les échantillons de la cohorte de patients “TCGA” pour lesquels le diagnostic est sans ambiguïté. Ainsi pour chaque patient, le diagnostic établi sur la base des ratios est confronté au diagnostic de “référence” basé sur la cohérence des trois méthodes de classification utilisées précédemment. De cette manière, on obtient quatre catégories de résultats par rapport à un diagnostic indiquant tumeur agressive ou non agressive : les vraies tumeurs agressives et les vraies non agressives pour les diagnostics cohérents alors que les incohérences sont dans les catégories fausses tumeurs agressives et fausses tumeurs non agressives. A partir de ces résultats les courbes de ROC sont tracées pour chacun des ratios permettant d’évaluer en même temps la spécificité et la sensibilité (cf figure 29, page 102). L’idéal est d’avoir un indicateur diagnostique sensible et spécifique caractérisé par une courbe de ROC avec une aire sous la courbe (AUC) de 1 correspondant à 100% de résultats justes. On remarque sur les courbes figure 29 que l’aire sous la courbe est

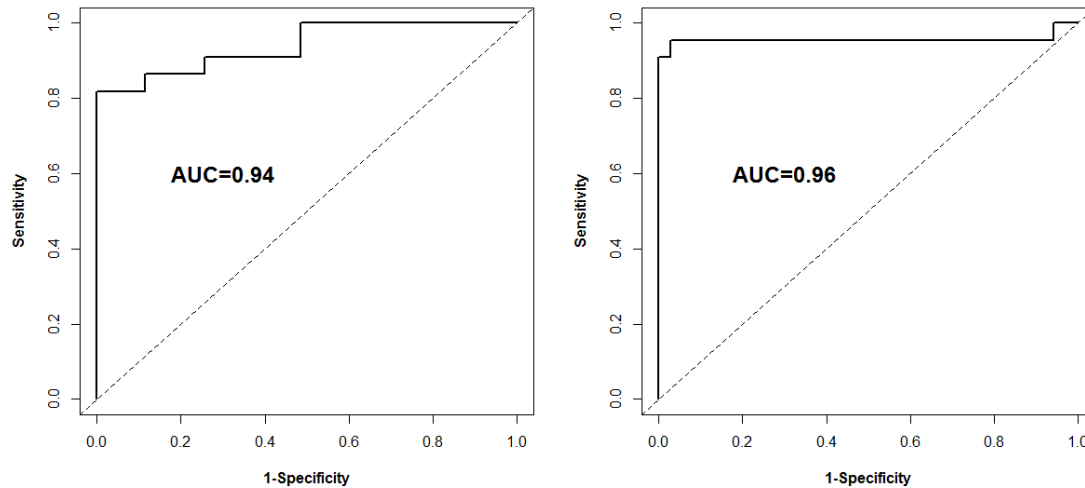
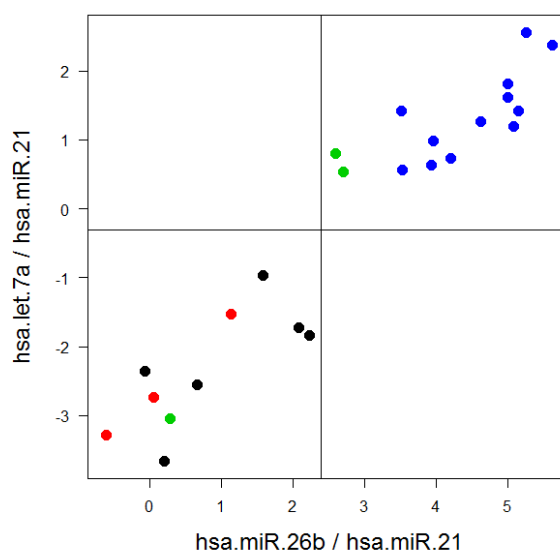


FIGURE 29 – Evaluation des ratios de microARN pour le diagnostic

Les deux ratios retenus pour distinguer les deux groupes de tumeur sont évalués sur une cohorte de 81 patients avec des résultats obtenus à partir de tissu congelé (données TCGA). Pour chacun des ratios, est représenté le taux de résultats cohérents (sensibilité) par rapport au taux de résultats incohérents (spécificité) à l'aide d'un graphique que l'on appelle courbe de ROC (Receiver Operating Characteristics en anglais). Ce type de graphique est indicateur de la validité d'un test. Si la courbe représente une droite en diagonale, cela signifie autant de réponses cohérentes qu'incohérentes : le test est dans ce cas là inutile. Plus la courbe va être éloigné de la diagonale (pointillés), meilleur sera le test se traduisant par une aire sous la courbe (AUC) se rapprochant de 1. Le premier graphique à gauche correspond au ratio miR-26b/miR-21 et le graphique de droite correspond au ratio let-7a/miR-21.

supérieure à 0,9 pour les deux ratios. Cela valide l'intérêt pour le diagnostic de ces deux indicateurs de tumeurs agressives ou non.

En outre, une combinaison de ces deux ratios permet de tracer le graphique en figure 30 (page 103). Ce graphique montre que les valeurs de ces deux ratios sont clairement distinctes selon que la tumeur d'origine est une tumeur de bas grade ou de haut grade. La distinction entre tumeurs de haut grade (grade IV, points en bleu sur le graphique) et des tumeurs de bas grades (grade I et II, points en noir et rouge) est réalisable avec une ambiguïté faible ce qui est cohérent avec les courbes précédentes pour évaluer les ratios. En outre, ce graphique montre que des tumeurs de grade III selon les critères d'anatomopathologie (points verts) s'assimilent par la méthode de dosage des microARN soit à des grades élevés soit à des bas grades.



**FIGURE 30 – Distinction des grades de tumeurs gliales grâce au dosage de 3 microARN dans des échantillons tissulaires fixés et paraffinés**

Les ARN courts ont été extraits de 24 échantillons fixés et paraffinés et les dosages des miR-21, miR-26b et let-7a ont été effectués par ddPCR. Pour chaque échantillon, les ratios des intensités let-7a/miR-21 ont été calculés et reportés en ordonnée versus les ratios des intensités miR-26b/miR-21. Les ratios sont reportés en échelles en  $\log_2$ . Tumeurs gliales de grade I (points noirs) ; Tumeurs gliales de grade II (points rouges) ; Tumeurs gliales de grade III (points verts) ; Tumeurs gliales de grade IV (points bleus).

Toutes les analyses précédentes démontrent que l'on peut raisonnablement envisager d'établir un diagnostic, apporter un complément d'information aux anatomopathologistes pour renforcer le diagnostic par le dosage de quelques microARN seulement. Cette exploration confirme que les taux de plusieurs microARN sont très nettement différents entre les tumeurs de divers grades. Ces observations permettent d'orienter la sélection des microARN pour une approche théranostique adaptée aux tumeurs. En effet, il devient donc possible d'envisager que le dosage de quelques microARN dans une tumeur permettra de sélectionner en toute connaissance de cause une cible thérapeutique constituée d'un microARN fortement surexprimé ou au contraire fortement sous-exprimé dans une tumeur et cela quels que soient l'identité ou le grade de la tumeur définis par l'analyse anatomopathologique.

## 1.5 Validation des méthodes d'analyse des données

Bien que très attractives, les données précédentes ne sont qu'une première étape seulement dans la validation du concept d'une approche théranostique. En effet et pour être



rigoureux, il convient de pouvoir évaluer la robustesse des analyses dans divers contextes. En particulier, il est légitime de se demander dans quelles mesures les différentes techniques sont adaptées à l'analyse clinique d'intérêt diagnostique ou théranostique. On a observé déjà (cf paragraphe ddPCR) que les cohérences de dosage par des méthodes différentes de PCR quantitatives ne sont pas inattaquables. La précision, la sensibilité, la spécificité et la reproductibilité seront probablement différentes d'une méthode de dosage à l'autre. Il convient donc d'être vigilant et de pouvoir appréhender les dispersions obtenues sur les résultats qui sont liées aux méthodes elles-mêmes. Le ratio de l'expression du microARN hsa-miR-21 versus l'expression du microARN hsa-miR-210 est un exemple intéressant et informatif pour illustrer cette nécessité de vigilance. Le microARN miR-21 étant bien connu pour son rôle d'oncogène, son expression est très forte dans les tumeurs de haut grade. Pour une tumeur donnée, il devrait être possible de doser les quantités de ces deux microARN par différentes méthodes et de calculer un ratio miR-21/miR-210 dont la valeur devrait être une signature, une quasi constante propre à l'échantillon et cela quelle que soit la méthode de dosage utilisée. Or, si nous observons les ratios calculés pour des échantillons de glioblastomes, à l'aide de 7 méthodes de dosages reposant sur des principes d'hybridation, de séquençage ou de qPCR, force est de constater que l'homogénéité de ces ratios n'est pas avérée (cf figure 31, page 105). En conséquence, il sera nécessaire d'être prudent dans la démarche théranostique et de définir des protocoles de travail reposant sur la sélection de méthodes et de bien veiller à ne pas tenter de comparer les résultats obtenus par une méthode envers une autre.

## **1.6 Choix des microARN qui permettront de synthétiser des conjugués pharmacologiques**

Il est maintenant envisageable de pouvoir faire le choix des microARN qui pourraient orienter la conception d'une approche thérapeutique. Ce choix se base notamment sur les acquis techniques précédents. Des puces microARN ont été réalisées pour comparer l'expression des microARN dans les modèles cellulaires du cancer de la vessie (lignée RT112) et du cancer du cerveau (lignée U87). A partir de ces résultats, l'objectif a été de repérer des microARN qui seraient surexprimés dans les tissus tumoraux. L'idéal étant de pouvoir trouver des microARN surexprimés dans les tumeurs de la vessie et dans les tumeurs gliales, de sorte qu'une approche thérapeutique mise au point sur ces

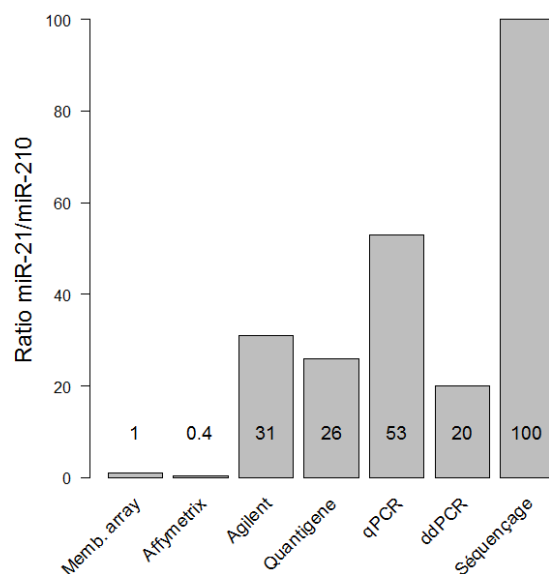


FIGURE 31 – Les quantifications des microARN dans les tissus sont dépendantes des méthodes d’analyse

Les microARN miR-21 et miR-210 ont été dosés dans des échantillons d’ARN courts par des méthodes de PCR (RT-qPCR en plaque, ddPCR) ou basées sur l’hybridation (Membrane arrays en nylon, puces Genechip microARN Affymetrix, puces Agilent (données TCGA), méthode QuantiGene) et séquençage à haut débit (NGS, plate-forme Illumina). Les ratios des quantités miR-21/miR-210 ont été calculés et sont reportés dans cet histogramme en échelle linéaire. Les valeurs de chaque ratio sont précisées sur les barres de l’histogramme. Les données de séquençage sont issues du travail de Hua *et al* (2012) [123]

microARN puisse - en principe - s’appliquer sans discernement à l’une ou l’autre des tumeurs. L’approche thérapeutique parfaitement adaptée à ces microARN surexprimés (donc potentiellement oncogéniques) consiste logiquement à faire appel à des oligonucléotides complémentaires des séquences des miR en question. Ces oligonucléotides agiraient, une fois introduits dans les cellules tumorales, comme des antagonistes des miR surexprimés et neutraliseraient leurs effets oncogéniques. Les taux d’expression des microARN dans la lignée de gliome U87 ont ainsi été comparés à ceux de la lignée de tumeur de vessie RT112 (figure 32, page 106). A l’évidence, la dispersion des points souligne le fait que les tumeurs ont des profils moléculaires très différents. On note aussi que pour certains microARN leur expression est quasiment tumeur spécifique, puisque fortement exprimés dans une lignée et quasiment pas dans l’autre (points proches des axes).

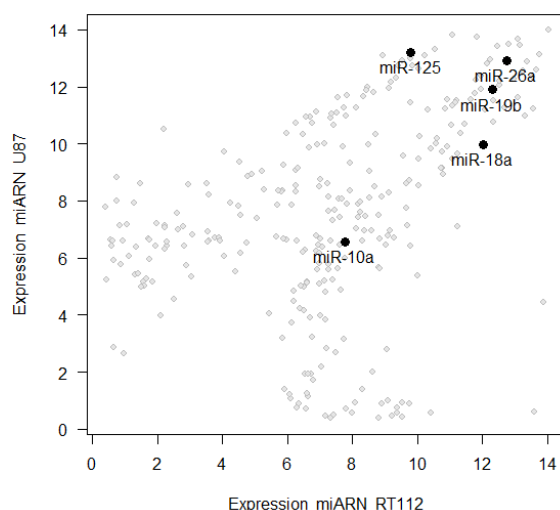


FIGURE 32 – **Choix de microARN pour la thérapie**

Comparaison des taux d'expression des microARN dans les cellules U87 versus les cellules RT112. Les mesures ont été réalisées par hybridation sur puces Affymetrix. Les taux d'expression sont indiqués en  $\log_2$ .

Le choix des microARN dont l'expression est forte à la fois dans la lignée de gliome et dans la lignée RT112 doit donc s'effectuer dans le nuage de points en haut à droite du graphique. Pour restreindre le choix à quelques microARN seulement, l'apport d'une recherche bibliographique est important. Sur cette base documentaire, trois microARN sont choisis pour être impliqués dans le processus du développement tumoral (miR-10a, miR-26a [124, 125], et miR-19b), un pour son rôle dans la sensibilité aux chimiothérapies (miR-125b) [126–128] et un dont la fonction est pertinente avec la radiosensibilité des tumeurs (miR-18a) [129, 130]. Ces deux derniers microARN apparaissent comme des cibles avec un potentiel très intéressant car il pourrait être envisageable de combiner l'approche thérapeutique impliquant un antimiR pour sensibiliser les tumeurs aux traitements chimiques ou à la radiothérapie [129, 131]. Il émergerait alors un concept original de bi-voire tri-thérapie dès lors que l'on combinerait une chalcone, un antimiR et une molécule antitumorale ou la radiothérapie. Dans un premier temps, nous avons choisi de synthétiser des antagonistes des microARN miR-125b, miR-10a, miR-26a, miR-19b et miR-18a. Ces molécules ont été synthétisées par l'équipe dirigée par Eric Defrancq au Département de Chimie Moléculaire. Le design de ces antagonistes a été fait tout simplement en créant la séquence strictement inversement complémentaire du miR mature. Ces antimiR sont donc de longueur identique au miR mature qu'ils ciblent, la chimie de synthèse repose sur l'utilisation de monomères de ribonucléosides et l'ensemble des liaisons phosphodiester

sont sous forme de phosphorothioates. L'usage des groupements thiophosphates assure une bonne protection des ribo-oligonucléotides contre d'éventuelles dégradations par les nucléases.

## **2 Import des antimicroARN dans les cellules et effets pharmacologiques**

Pour moduler le taux d'un microARN dans une cellule par un agoniste ou un antagoniste, il faut pouvoir faire pénétrer ces composés dans la cellule ce qui ne peut se produire sans le concours d'une méthode de perméation adaptée. La méthode classique utilisée de nos jours en recherche, c'est d'englober ces petites séquences d'oligonucléotides avec un agent de transfection (cf matériel et méthodes). De manière à trouver les conditions optimales qui permettent de faire pénétrer dans la cellule un maximum de molécules des antimicroARN que nous avons synthétisés, trois agents de transfection ont été testés (SiPort, Ribocellin et Lipofectamine RNAimax). Seuls les résultats correspondant aux agents de transfection SiPort et Lipofectamine RNAimax sont présentés dans la figure 33 ( page 108). Le troisième agent de transfection (Ribocellin) a montré quant à lui une efficacité intermédiaire par rapport aux deux premiers.

En parallèle, de chacun des tests de transfection des antimicroARN, un contrôle positif (Ctl +) et un contrôle négatif (Ctl -) sont réalisés. Le contrôle positif repose sur l'utilisation d'une séquence commerciale (siARN CellDeath, Qiagen) provoquant la mort cellulaire et le contrôle négatif est un oligonucléotide ne correspondant à aucune séquence humaine d'une vingtaine de nucléotides (Anti-miR Negative control, ThermoFisher Scientific).

Le choix de l'agent de transfection doit prendre en compte le fait que celui-ci doit être le moins toxique possible par lui-même et l'efficacité du contrôle positif maximale. L'effet que l'on souhaite observer avec les antimicroARN que nous avons sélectionnés sera ainsi mis en évidence avec la plus grande précision. Pour évaluer ces paramètres, la viabilité cellulaire avant et après transfection est mesurée à l'aide d'un test MTT. Les

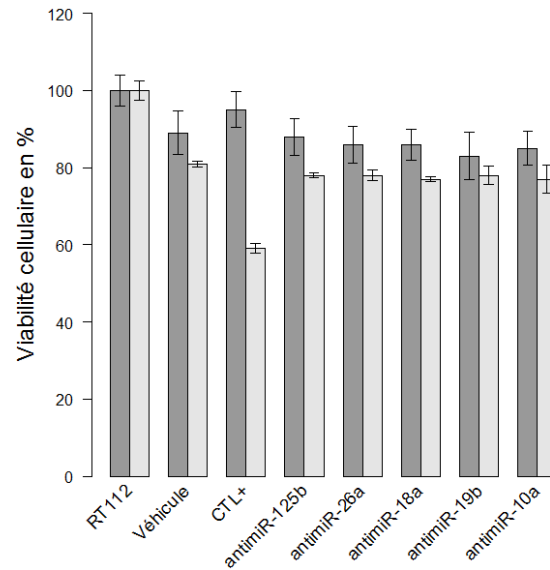


FIGURE 33 – Tests d’agents de transfections

Les cellules de RT112 ont été transfectées avec des antimicroARN en utilisant deux agents de transfection différents (Siport et Lipofectamine). Cinq antimicroARN ont été utilisés, un contrôle de transfection est réalisé en absence de tout antimicroARN afin d’évaluer la toxicité des agents de transfection (véhicule) et un contrôle d’efficacité de transfection est mené avec un mélange de siRNA toxiques pour les cellules (CTL+). Après 48 h l’état des cellules est évalué par un test MTT. La viabilité des cellules est calculée en pourcentage par rapport à un contrôle composé de cellules n’ayant pas été transfectées (RT112) Transfection avec le Siport : barres d’histogramme gris foncé ; Transfection avec la Lipofectamine : barres d’histogramme gris clair.

transfections réalisées avec le Siport sont quasiment inefficaces puisque les résultats de chaque condition de transfection sont identiques (après transfection il reste en moyenne entre 100% et 85% de cellules vivantes). C’est donc la lipofectamine qui répond le mieux aux critères de sélection d’un agent de transfection définis ci-dessus et qui de ce fait est choisie pour effectuer les transfections des antimicroARN.

Pour confirmer que nos antimicroARN sont bien internalisés dans les cellules de RT112, on réalise la transfection avec un microARN fluorescent (ce miR est lié à un fluorochrome FAM de couleur bleue) pour que l’on puisse suivre le devenir de ce microARN. Après incubation et lavages, des tests de cytométrie en flux sont réalisés pour évaluer la cinétique de transfection afin d’être dans des conditions qui favorisent l’entrée d’un maximum de molécules. Un premier essai permet de vérifier que l’on peut réaliser ce test sur le cytomètre avec un résultat permettant de distinguer une population transfectée d’une population non transfectée. La transfection est faite dans les conditions mises au point précédemment pour un temps de 48 h.

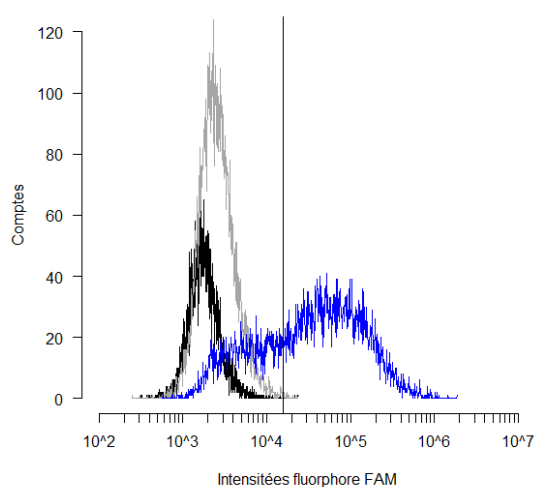
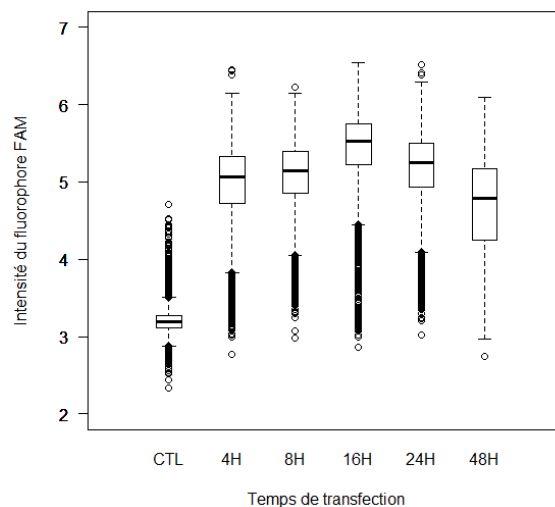


FIGURE 34 – **Contrôle de la transfection des microARN par cytométrie.**

Des cellules de RT112 ont été transfectées par un microARN fluorescent (marqueur FAM) en présence de lipofectamine pendant 48 h puis les cellules ont été analysées grâce à un cytomètre de flux (acquisition de fluorescence). Les cellules non transfectées (tracé gris) ou les cellules soumises à l'agent de transfection seul (tracé noir) ont été traitées de manière totalement identique. Les nombres de cellules fluorescentes sont reportés en fonction de l'intensité de fluorescence des cellules (NB pour les tracés gris et noir, la fluorescence enregistrée correspond à une autofluorescence caractéristique des cellules).

Le test a été réalisé avec des cellules qui n'ont subi aucun traitement (tracé gris, enregistrement de l'autofluorescence des cellules figure 34), des cellules qui ont été en présence de l'agent de transfection seul (tracé noir, enregistrement de l'autofluorescence des cellules figure 34) et enfin des cellules ayant été incubées avec en plus de l'agent de transfection le microARN non humain fluorescent (tracé bleu, enregistrement de la fluorescence du fluorochrome FAM,  $\lambda_{ex}$  : 495nm et  $\lambda_{em}$  : 520, figure 34) pendant 48 h. Sur cette figure 34, les intensités de fluorescence mesurées sont reportées sur l'axe des abscisses et le nombre de cellules en ordonnée. Les tracés gris et noir qui correspondent à des conditions contrôles permettent d'observer l'autofluorescence des cellules. En effet, on observe, des intensités de fluorescence réparties de manière homogène et groupée entre  $10^3$  et  $10^4$ . Dans la condition de transfection avec le microARN fluorescent, les intensités de fluorescence sont environ dix fois supérieures. Ainsi un seuil (trait noir vertical) de fluorescence peut être positionné après les pics formés par les tracés gris et noir pour détecter une fluorescence acquise. Par la suite, ce seuil permet de déduire la

quantité de cellules transfectées par rapport à la totalité des cellules ayant été en contact avec le microARN fluorescent. L'analyse des cellules ayant été en contact 48 h avec le microARN fluorescent (tracé bleu) montre deux populations que l'on déduit de l'allure du tracé et aussi grâce au seuil. L'étape suivante consiste à évaluer s'il est nécessaire d'ajuster les conditions de transfection. En particulier et pour cela, des cellules ont été transfectées avec le microARN fluorescent à différents temps soit 4 h, 8 h, 16 h, 24 h et 48 h.



**FIGURE 35 – Cinétique de transfection d'un microARN fluorescent par la lipofectamine dans des cellules RT112**

Les conditions expérimentales et la méthode d'analyse sont identiques à celles indiquées dans la figure précédente. Les durées de transfection sont sélectionnées entre 4 h et 48 h. Les niveaux de fluorescence enregistrés sont reportés en ordonnée en log10. CTL : les cellules n'ont pas été transfectées par le microARN fluorescent et le niveau de fluorescence correspond à la fluorescence intrinsèque des cellules.

Les boîtes à moustaches de la figure 35 représentent la distribution des intensités de fluorescence mesurées en log10 sur l'axe des ordonnées. Si la boîte est étroite comme pour la condition contrôle (CTL), l'histogramme forme un pic étroit comme le tracé noir de la figure 34. A l'inverse, à 48 h, on observe une gamme d'intensités beaucoup plus grande, la boîte est plus grande avec très peu de valeurs au-delà des moustaches. Cette situation correspond au tracé bleu de la figure 34. Plus l'intensité de fluorescence des cellules est élevée, plus bien évidemment la transfection aura été efficace. On observe une légère augmentation de la transfection jusqu'à 16 h. Après 16 h, une décroissance de fluorescence s'amorce jusqu'à un "étalement" du signal à 48 h. Ceci pourrait s'expliquer par le fait qu'à 48 h, la totalité du microARN a été complètement incorporée et qu'en

parallèle un petit nombre de cellules non fluorescentes a eu le temps de se dupliquer. En proportion un nombre plus réduit de cellules sont fluorescentes mais cela semble indiquer que la transfection est très peu toxique pour les cellules sur plusieurs dizaines d'heures et qu'à 48 h le maximum de transfection a été atteint. Les effets des agonistes ou antagonistes de microARN seront donc observés à 24 h et 48 h pour être certain d'avoir atteint un taux de transfection maximum.

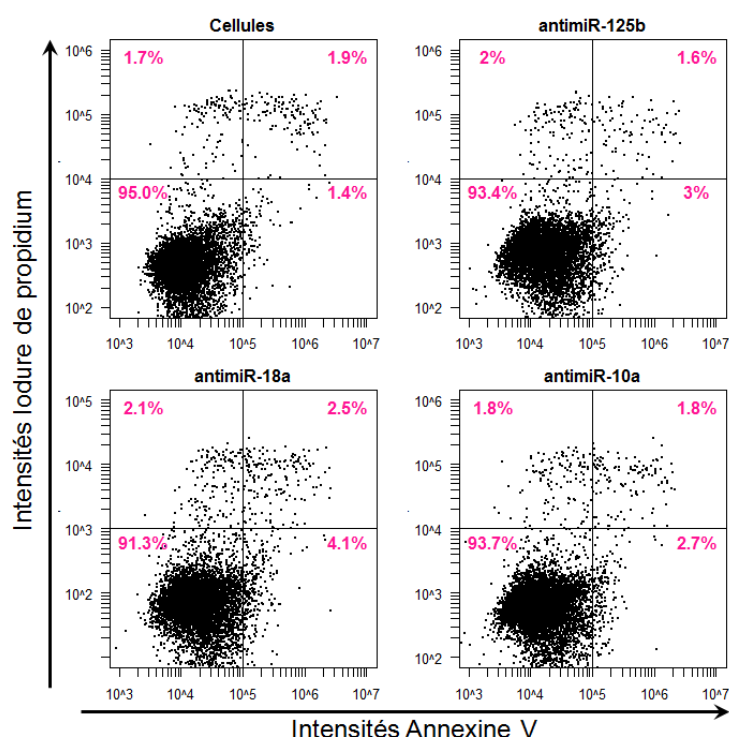


FIGURE 36 – Impact de la transfection des antimicroARN sur le taux d'apoptose des cellules RT112. Analyse en cytométrie de flux

Les cellules RT112 sont transfectées 24 h avec les antimicroARN suivants : antimicroARN-125b, antimicroARN-18a ou antimicroARN-10a. Le contrôle correspond à une condition de transfection sans antimicroARN. Le niveau de fluorescence des cellules dû à l'iodure de propidium est reporté en ordonnée, celui lié à la fixation d'annexine V fluorescente en abscisse. Les pourcentages correspondent à la proportion de cellules (points) dans chaque cadran du graphique. Le carré en bas à gauche correspond aux cellules vivantes alors que les trois autres cadrans correspondent à des cellules mortes ou train de mourir.

Dans la perspective d'une thérapie antitumorale, il est primordial de choisir des microARN dont on pourra aisément moduler le taux d'expression afin de tuer ou au moins sensibiliser spécifiquement à une autre thérapie les cellules tumorales. C'est pourquoi, l'effet sur l'apoptose suite à la transfection d'un antimicroARN (antagoniste de microARN) a été



étudié sur le modèle cellulaire RT112 par cytométrie en flux. Les cellules ont été marquées à l'iodure de propidium et l'annexine V fluorescente pour distinguer les cellules mortes ou vivantes. Pour des cellules non apoptotiques, la membrane cellulaire restera intègre et la phosphatidylsérine n'aura pas été exposée à la surface de la cellule, par conséquent elles ne seront marquées ni par l'iodure de propidium ni par l'annexine V. Ainsi, en représentant pour chaque traitement, l'intensité de fluorescence liée au marquage par l'annexine V en fonction de celle de l'iodure de propidium (figure 36, page 111), on peut en déduire l'état dans lequel se trouve chaque cellule de l'échantillon. Les seuils de fluorescence sont définis par des monomarquages. Un seuil de détection de fluorescence est établi pour l'iodure de propidium (axe des abscisses, trait vertical) et pour l'annexine V (axe des ordonnées, trait horizontal) formant 4 cadrans. Ainsi les cellules situées dans le cadran en bas à gauche sont vivantes puisqu'elles n'ont pas été marquées. A l'inverse, le cadran en haut à droite correspond à un double marquage des cellules donc des cellules en apoptose. Les cadrans haut/gauche et bas/droite sont des conditions où les cellules ont perdu l'intégrité de leur membrane, on considère que ce sont des cellules nécrotiques (mort non programmée). Dans des conditions standards de culture (figure 36 graphique "Cellules"), il y a un renouvellement permanent et donc toujours une petite fraction (environ 5%, somme des cellules en apoptose et des cellules nécrotiques) de cellules mortes ou qui vont mourir. En présence des antimiR les effets observés restent limités, l'effet le plus marqué est visible avec l'antimiR-18a, condition pour laquelle on peut observer pratiquement 9% de cellules mortes.

Dans la cellule, on sait qu'un microARN peut avoir plusieurs gènes cibles. Mais à l'inverse, un même gène présente dans sa région 3'UTR un ou plusieurs sites d'hybridation pour différents microARN. Dans le cadre du développement tumoral, les cellules cancéreuses produisent spontanément une combinaison (cluster) de microARN ciblant une même protéine suppresseur de tumeur. L'utilisation d'une combinaison d'un ou plusieurs antimicroARN peut donc être une stratégie intéressante à envisager pour la thérapie. Des combinaisons de deux ou trois antimiR ont donc été testées avec les antimicroARN antimiR-125b, antimiR-10a et antimiR-18a qui ont montré les effets les plus forts bien que modérés individuellement sur les cellules RT112.

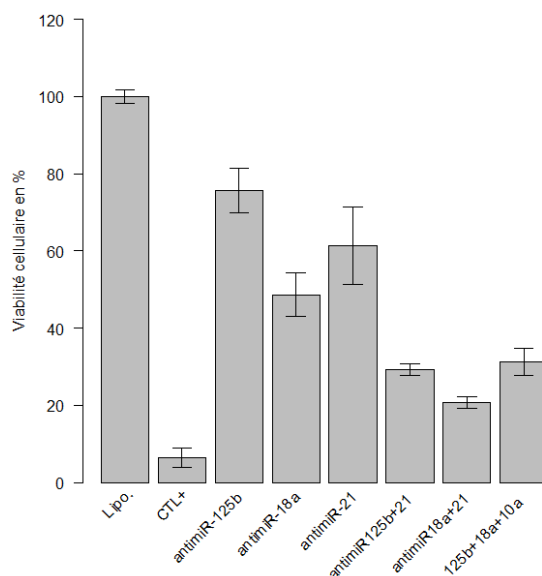


FIGURE 37 – Analyse de l'effet des antimicroARN utilisés en combinaison sur les cellules RT112

Les cellules RT112 sont transfectées pendant 48 h. La viabilité est mesurée par un test MTT. Les pourcentages de viabilité sont reportés en ordonnée et calculés par rapport à la viabilité des cellules non traitées. Les contrôles correspondent à une transfection par l'agent de transfection seul (Lipo), ou avec un siRNA cytotoxique (CTL+).

La comparaison de l'effet d'une combinaison de microARN par rapport aux microARN individuels a été évaluée par l'utilisation du test MTT. Une condition de référence expérimentale pour pouvoir évaluer correctement l'effet sur les cellules qui incombe spécifiquement aux antimicroARN est requise et nécessite d'incuber les cellules avec l'agent de transfection uniquement (Lipofectamine RNAimax sans antimicroARN). Ainsi on calibre la viabilité cellulaire maximale dans cette condition et l'impact d'une éventuelle activité cytotoxique de l'agent de transfection (que l'on espère modérée) sera donc pris en compte. La réalisation d'un contrôle positif (par utilisation d'un mélange cytotoxique de siRNA) permet de plus de s'assurer que la transfection a fonctionné comme attendu. La transfection avec certains antimicroARN individuels a un impact au niveau de l'activité cellulaire. En effet, après transfection de l'antimiR miR-18a la viabilité cellulaire est seulement de 49% . La transfection avec l'antimiR miR-21 réduit la viabilité cellulaire à 60% (voir figure 37). De manière intéressante, la transfection combinée de l'antimiR-18a et de l'antimiR-21 est encore plus efficace puisqu'il ne reste que 20% de cellules vivantes après cette transfection. Le second cas de figure intéressant pour son effet sur la viabilité cellulaire est l'association des anti-miR-125b et anti-miR-21. Individuellement

ces deux anti-microARN sont peu actifs : la viabilité cellulaire est voisine de 80% après transfection de l'antimiR-125b (voir figure 37) et 60% après transfection de l'antimiR-21 comme mentionné juste au-dessus . La combinaison des deux antimiR quant à elle permet de réduire la viabilité à environ 30%, ce qui est plus que la simple addition des effets de chaque anti-microARN. Des tentatives de transfusions avec des combinaisons de plus de deux antimiR ont été tentées, mais n'ont pas montré d'efficacité supérieures aux combinaisons avec deux antimiR.

### **3 Choix de la chalcone permettant de synthétiser des conjugués pharmacologiques**

Les chalcones sont connues pour les vertus thérapeutiques de certaines d'entre elles et en particulier pour leurs effets antitumoraux. Au laboratoire CaCys, diverses molécules de chalcones produites par le laboratoire du Pr A Boumendjel ont été testées sur des lignées cellulaires de tumeurs de vessie dans le but d'évaluer leur capacité à interférer avec le développement des cellules. Ces tests ont été menés en particulier sur les lignées RT112 et RT112 CP, cette dernière étant résistante au cisplatine. Le travail présenté ici concerne en plus le modèle cellulaire de glioblastome U87.

Le but de ces mesures est de déterminer la chalcone la plus active qui permettrait à terme, en plus d'exercer une activité antitumorale, de véhiculer un antimicroARN doué d'activité antitumorale. De plus, il sera nécessaire d'évaluer l'impact de modifications chimiques sur l'efficacité d'une chalcone sélectionnée pour son activité antitumorale contre les cellules RT112, RT112CP et U87.

Quatre molécules ont été comparées de manière classique avec un test MTT pour évaluer l'impact que chacune pouvait avoir sur la prolifération des cellules cancéreuses. Comme précédemment, la condition de référence choisie est celle où les cellules ont été mises en présence uniquement du "solvant" des chalcones : le diméthylsulfoxyde (DMSO). L'activité cellulaire (viabilité et/ou prolifération) est calculée par rapport à la condition de référence toujours considérée étant à 100%. Les chalcones sont administrées aux cellules

tumorales en concentrations croissantes finales allant jusqu'à 100  $\mu\text{M}$ . Les conditions opératoires sont choisies de telle sorte que le volume de solution de chalcone ne dépasse jamais 2% du volume total du milieu de culture. Ainsi on peut confronter les effets "dose-réponse" obtenus pour chacune des molécules.

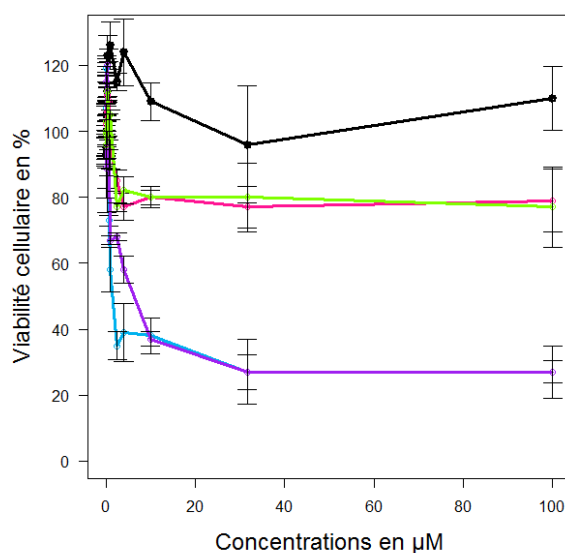


FIGURE 38 – **Impact des chalcones sur la viabilité des cellules U87. Effets en fonction de la concentration des chalcones**

Les cellules U87 sont mises en contact pendant 48 h avec les chalcones utilisées à des concentrations variant entre 0,5 et 100  $\mu\text{M}$ . Le contrôle est réalisé en absence de chalcone mais le solvant des chalcones (DMSO) est ajouté aux cultures aux concentrations identiques à celles correspondant aux tests des chalcones. La viabilité est mesurée par un test MTT. Les pourcentages de viabilité sont reportés en ordonnée et calculés par rapport à la viabilité des cellules non traitées. Courbe noire : DMSO ; courbe bleue : chalcone A1 ; courbe verte : chalcone A2 ; courbe rose : chalcone A3 ; courbe violette : chalcone B1.

Les courbes dose-réponse présentées figure 38 permettent d'accéder à un certain nombre d'informations telles que la puissance et l'efficacité des chalcones. La puissance étant définie par une valeur de concentration qui provoque le demi effet maximum de la molécule étudiée (on parle également de concentration efficace à 50% ou EC50), et l'efficacité comme la valeur maximale de l'effet observé (ici la mort des cellules). L'efficacité correspond à la valeur asymptotique du pourcentage maximum de la mort cellulaire provoquée par la chalcone.

En ce qui concerne les tests sur les cellules U87 (figure 38), on note des différences importantes d'efficacité entre les quatre molécules de chalcones (valeurs maximales des réductions de viabilité). Les molécules A2, A3 se caractérisent par une efficacité médiocre. La mortalité maximale ne dépasse pas 20% des cellules U87 aux fortes concentrations avec ces chalcones. Par contre, les molécules A1 et B1 provoquent au maximum la mort d'environ 80% des cellules aux fortes concentrations.

L'efficacité d'une molécule est bien évidemment importante mais il faut aussi évaluer la puissance à provoquer la mort cellulaire des molécules de chalcones. Pour estimer la valeur de demi effet provoqué par la chalcone il est plus précis de procéder à une représentation semi-logarithmique des données en traçant la valeur du pourcentage de cellules viables en fonction du log10 de la concentration en chalcones. De ce fait les tracés présentent une allure sigmoïdale et le point d'inflexion des courbes permet de définir la concentration de chalcone qui provoque 50% de l'effet cytotoxique maximum caractéristique de cette chalcone en particulier (figure 38).

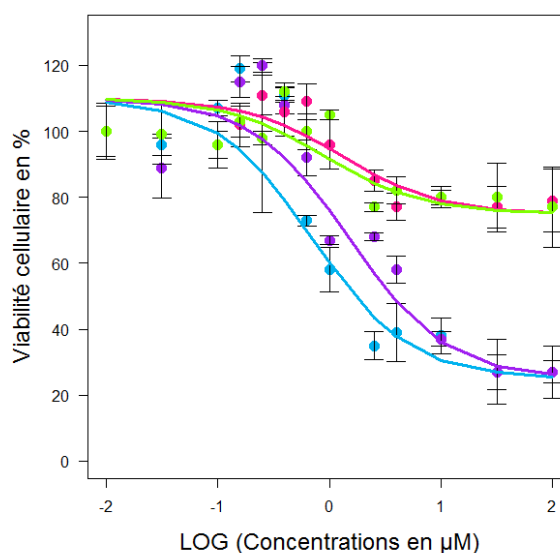
La représentation semi-logarithmique permet d'assimiler la courbe dose-réponse à une sigmoïde dont l'équation 1 est définie par quatre paramètres :

$$Viabilité = viabilité_{max} + \frac{viabilité_{min} - viabilité_{max}}{1 + 10^{LOG((EC50)-x)}} \quad (1)$$

Les viabilités max et min sont exprimées en pourcentage par rapport à la viabilité du contrôle sans chalcone. La viabilité min correspond au pourcentage minimum de viabilité induit par une concentration infinie en chalcone. EC50 est la concentration de chalcone qui provoque le demi-effet létal. x représente la concentration de chalcone en  $\mu\text{M}$ .

Cette équation permet la modélisation de la réponse de chacune des chalcones testées et ainsi de pouvoir retrouver la valeur d'EC50. Les molécules les plus intéressantes pour la thérapie sont les molécules A1 et B1 parce que plus efficaces que les molécules A2 et A3 (figure 39, page 117). En revanche, les différences que l'on constate pour les valeurs de EC50 pour ces 4 molécules apparaissent très faible. Il est également attractif de noter que les EC50 des chalcones actives sont proches de 1  $\mu\text{M}$  ce qui est une concentration relativement modeste et compatible avec une utilisation pharmacologique. Enfin, les

valeurs d'EC50 des chalcones A1 et B1 mesurées ici pour les cellules U87, cadrent avec les valeurs de demi effet mesurée au laboratoire CaCys pour ces mêmes molécules envers les cellules RT112 et RT112CP.



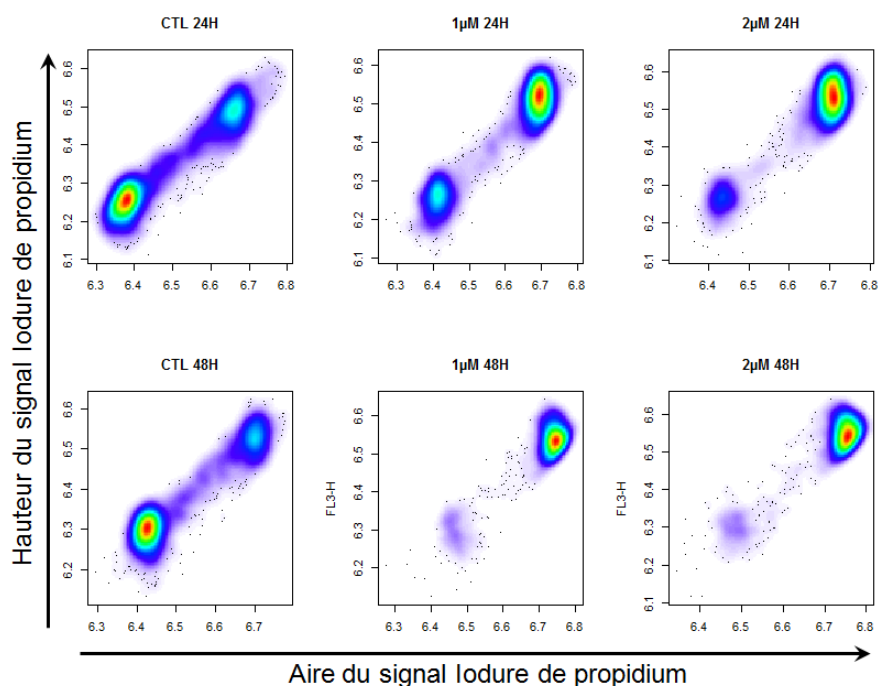
**FIGURE 39 – Courbes dose-réponse de l'effet des chalcones sur la viabilité des cellules U87 représentées en tracé semi-logarithmique**

Les données de viabilité présentées à la figure précédente ont été reportées en traçant le pourcentage de viabilité mesuré versus le log10 des concentrations en chalcones utilisées. Les données expérimentales sont modélisées par les courbes tracées en utilisant l'équation présentée ci-dessus. courbe bleue : chalcone A1 ; courbe verte : chalcone A2 ; courbe rose : chalcone A3 ; courbe violette : chalcone B1.

Les tests MTT pratiqués dans cette première étape de sélection des chalcones permettent de faire un tri rapide des molécules actives ou non, toutefois ils restent relativement sommaires dans la mesure où ils n'indiquent pas précisément si les cellules sont réellement mortes ou seulement bloquées dans leur prolifération. Pour caractériser mieux l'action de ces molécules, l'analyse du cycle cellulaire s'impose.

La molécule A1 étant la molécule de chalcone la plus active, le cycle cellulaire a été analysé à plusieurs temps d'incubation et pour différentes concentrations de molécule A1 sur les cellules U87. Les résultats sont reportés figure 40 où chaque graphique représente une condition de temps et de concentration. Les graphiques correspondent à des représentations des intensités de fluorescence de l'iodure de propidium qui sont le reflet de la quantité d'ADN cellulaire. En cytométrie en flux on peut analyser individuelle-

ment chaque cellule et distinguer les cellules en phase G2/M par la mesure de la quantité d'ADN nucléaire. En effet, les cellules en G2/M ont un contenu ADN qui est doublé par rapport à celui des cellules en G0/G1. A chaque passage devant le détecteur, le signal de fluorescence de l'iodure de propidium lié à l'ADN est enregistré. Le signal enregistré se caractérise par une amplitude maximum et une aire du signal lors du déplacement des cellules dans le détecteur. Ces deux paramètres permettent de bien distinguer les cellules en G2/M des cellules en G0/G1 et même d'éventuels agrégats de cellules. C'est pourquoi, l'analyse du cycle cellulaire est faite en représentant l'amplitude maximale du signal émis par l'iodure de propidium en fonction de l'aire du signal. L'échelle de couleur sur les graphiques correspond à une densité de points (chaque point correspondant à une cellule). La couleur rouge traduit une très forte densité de points puis l'échelle se décline en orange, jaune, vert, cyan jusqu'au bleu foncé qui est la densité la plus faible.



**FIGURE 40 – Impact de la molécule A1 sur les cellules U87. Analyse du cycle cellulaire en cytométrie de flux**

Les niveaux de fluorescence des cellules dus à l'iodure de propidium sont enregistrés et pour chaque cellule sont reportés : la valeur d'intensité du pic de détection en ordonnée et l'aire du signal de fluorescence du pic de détection en abscisse.

Les cellules en phase G0/G1 sont en général les cellules présentent en majorité dans une population de cellules en culture dans des conditions normales de croissance. C'est ce que l'on observe pour les conditions contrôles en figure 40. Les cellules en phase G0/G1 se trouvent en bas à gauche de chaque graphique. Pour les phases G2 et M, le contenu en ADN est doublé et les cellules qui sont dans cette phase du cycle cellulaire vont se trouver en haut à droite des graphiques. Sur cette figure 40, on note qu'à partir de 24 h avec 1  $\mu\text{M}$  de molécule A1, les cellules commencent à s'accumuler en phase G2/M (densité plus forte couleur rouge). Cette tendance se confirme en augmentant la concentration et le temps de contact avec la molécule.

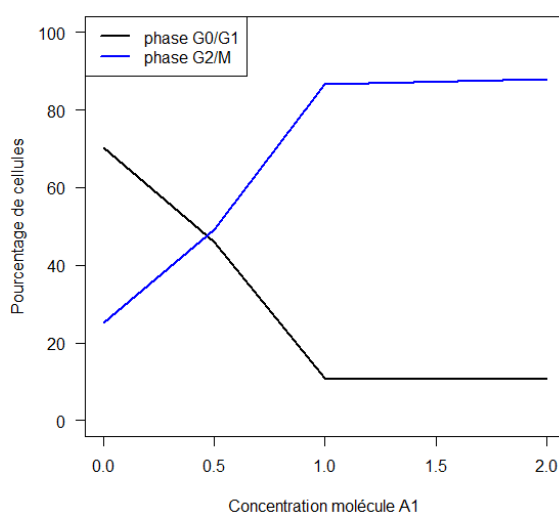


FIGURE 41 – Courbes “dose-réponse” de l’impact des chalcones sur le cycle cellulaire des cellules U87

Les données de cycle cellulaire ont été acquises comme indiqué dans la figure précédente après mise en contact des cellules U87 pendant 48 h avec des concentrations variables de chalcone A1. Les pourcentages de cellules en phase G0/G1 ou G2/M sont reportés en ordonnée versus les concentrations en chalcone A1 utilisées (en  $\mu\text{M}$  et en échelle linéaire). Courbe noire : évolution des pourcentages de cellules en phase G0/G1. Courbe bleue : évolution des pourcentages de cellules en phase G2/M.

Sur l'ensemble des analyses réalisées à 48 h avec des concentrations croissantes de chalcones on peut suivre précisément la disparition des cellules en phase G0/G1 et l'accumulation des cellules en phase G2/M (voir figure 41). On remarque sur cette figure que les deux courbes se croisent à 0,5  $\mu\text{M}$  indiquant la concentration efficace médiane puisqu'il y a autant de cellules en phase G0/G1 qu'en phase G2/M. Cette valeur est concordante avec celle de la concentration de 0,5  $\mu\text{M}$  qui provoque 50% de l'effet cytotoxique maximum



observé avec le test MTT. On constate donc que la chalcone A1 bloque les cellules U87 dans la phase G2/M du cycle cellulaire plutôt qu'elle ne provoque réellement la mort de ces cellules. Une observation identique avait été faite par le laboratoire CaCys pour les cellules RT112.

Les actions des chalcones étant assez variées [132, 133], il est difficile d'avoir un a priori sur la ou les cible(s) spécifique(s) de la molécule A1. Une approche basée sur l'analyse globale des profils d'expression des ARN messagers a donc été envisagée afin de pouvoir disposer de signaux de dérégulations d'expression qui suggéreraient des cibles probables. Des puces Human Transcriptome Array Affymetrix ont été utilisées pour réaliser cette analyse. Les ARN de cellules RT112 traitées avec la molécule A1 et non traitées ont été extraits (cf Matériels et Méthodes) et les fractions d'ARN longs ont été marquées (cf Matériels et Méthodes) et hybridées sur les puces.

Les données obtenues sur ces puces HTA Affymetrix ont été normalisées par la méthode RMA (cf Matériels et Méthodes) et les taux d'expression des transcrits des cellules traitées par la chalcone A1 comparés à ceux des cellules qui n'ont pas été en contact avec la molécule grâce au logiciel TAC 3.0. Plusieurs transcrits sont surexprimés et d'autres sous-exprimés. Le niveau d'expression du gène CYP1A1 codant la protéine CYP1A1 (protéine de la famille des cytochromes P450) est augmenté plus de quatre fois du fait du traitement par la chalcone A1. De plus, les puces HTA nous fournissent des renseignements sur les taux d'expression des variants d'épissage alternatif de chaque gène. Dans le cas du gène CYP1A1, il est connu que la transcription de celui-ci peut conduire à la production de plusieurs transcrits alternatifs.

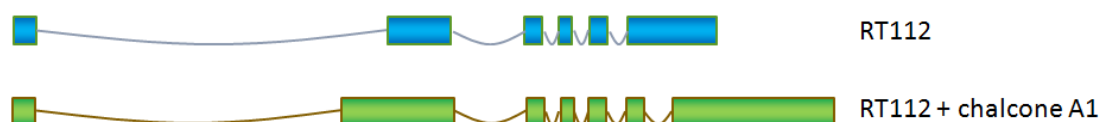


FIGURE 42 – **Représentation schématique des structures des transcrits engendrées par le gène CYP1A1.**

Les exons sont représentés par des cylindres. A. structure du transcrit produit en absence de chalcone (total 6 exons). B. structure du transcrit produit en présence de chalcone A1 (total 7 exons).

L'analyse détaillée de nos données transcriptomiques montrent qu'une forme de transcrit du gène CYP1A1 prédomine dans les cellules non exposées à la molécule A1. Ce transcrit est constitué de l'assemblage de 6 exons et ne code pas pour une forme de protéine CYP1A1 conventionnelle et active. La protéine CYP1A1 active est composée de 512 acides aminés (masse moléculaire 58165 Da) la protéine codée en absence de chalcone est beaucoup plus courte (158 acides aminés). En revanche, le traitement par la chalcone A1 induit un changement qualitatif et quantitatif concernant les transcrits produits par le gène CYP1A1. En effet la forme courte du transcrit comportant 6 exons est légèrement surexprimée, par contre, une forme composée de 7 exons exprimée en très faible proportion en absence de chalcone devient majoritaire (son taux d'expression est devenu 24 fois supérieur en présence de chalcone). Ce transcrit normal avec 7 exons correspond au transcrit qui code la protéine entière et active.

L'impact de la chalcone sur la modification du mode et du taux d'expression du gène CYP1A1 apparaît donc important et complexe et les mécanismes qui conduisent à ces changements restent à définir. Dans l'optique de rationaliser ces événements et de valider si la protéine CYP1A1 pourrait être une cible directe de la chalcone, il convient donc de rechercher si la chalcone pourrait être un ligand de CYP1A1. Cette question peut être abordée d'un point de vue théorique grâce à des outils de modélisation d'interaction chimique (ou "docking") entre les deux molécules. Les protéines dont la structure tridimensionnelle est connue sont répertoriées dans la base Protein Data Bank (PDB). La structure de la forme "longue" de CYP1A1 est connue et disponible sur cette base. Ainsi à partir de ces données, on peut grâce au logiciel de docking en ligne (<https://molecule.com/apps/1-click-docking/>) tenter de modéliser l'interaction de la molécule de chalcone A1 dans le site actif de la protéine CYP1A1 (cf figure 43, page 122).

La modélisation simple faite avec CYP1A1 n'indique pas à quel point cette hypothèse est juste. Pour être plus objectif, il est nécessaire de comparer des valeurs mesurant l'interaction entre les molécules. Pour chaque modélisation, il est possible de calculer un score reflétant avec quelle « affinité » un ligand s'insère dans un site donné de la protéine. La valeur de ce score est inversement proportionnelle à la probabilité pour une molécule

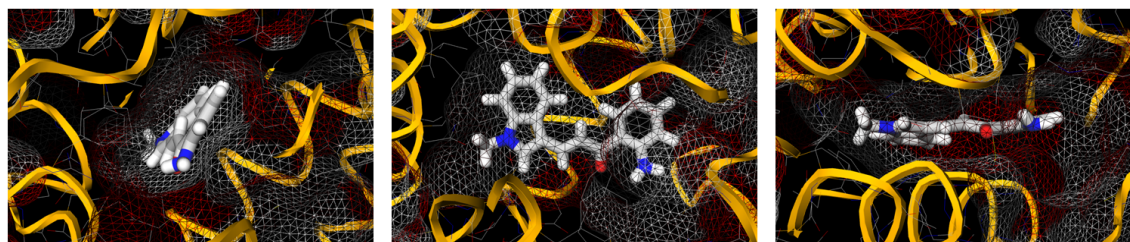


FIGURE 43 – Représentation tridimensionnelle de l’interaction de la molécule chalcone A1 dans le site actif de la protéine CYP1A1

Observations sous trois angles différents.

d’être un authentique ligand de la protéine (i.e., plus la valeur du score est négative, plus grande est la probabilité d’une interaction du ligand dans le site).

La figure 43 montre la position de la chalcone dans le site actif sous trois angles différents. L’ossature de la chaîne polypeptidique de CYP1A1 est représentée par les rubans jaune-orange formant des structures classiques telles que des hélices facilement reconnaissables. Le contour des résidus d’acides aminés de la protéine est suggéré par un maillage blanc et rouge. Enfin la chalcone est modélisée par une structure en bâtons et on voit qu’elle prend une position relativement plane au sein du site actif. Cette modélisation permet de repérer plus facilement le lien entre la séquence d’acides aminés et le site actif. D’autre part, la bibliographie impliquant ce cytochrome P450 et des flavonoïdes renforce cette modélisation [134].

```

MLFPISM SATEFLLASVIFCLVFWVIRASRPQVPKGLKNPPGPWGWP LIGHMLTLGKNPHLALSR
MSQQYGDVLQIRIGSTPVVVL SGLD TIRQALVRQGDDFKGR PDLYTFTL SNGQ SMSFSPDSGPVW
AAR RRLAQNGLKSF SIASDPASSTSCYLEEHVSKEAEVLISTLQELMAGPGHFNPYRYVVVSVTNVI
CAICFGRRYDHNHQELLSLVNL NNEGEVVGSGNPADFIPIRLYLPNPSLNAFKDLNEK FYSFMQ
KMVKEHYKTFEKGHIRDITDSLIEHCQEKQLDENANVQLSDEKIINIV
LDLFG AGFDTVTTAISW SLMYLMNPRVQRKIQEELDTVIGRSRRPR
LSDRS HLPYMEAFI LETFRHSSFPFT I PHSTTRDTSLKGFYIPKGR CV
FVNQWQINHDQ KLWVNPSEFLPERFLTPDGAIDKVLSEKVIIFGMGKR KCIGETIARWEVF
LFLAILLQRVEFSVPLGVKVDMP IYG TMKHACCEHFQMLRS
    
```

FIGURE 44 – Séquences protéiques des isoformes de CYP1A1 produites en absence ou en présence de chalcone A1

En figure 44 (page 122) est montrée la séquence protéique de CYP1A1 de la forme la plus abondante (long transcrit de 7 exons codant pour une protéine 512 acides aminés) après traitement avec la molécule A1. En rapport avec la modélisation, les acides aminés importants dans le site actif sont surlignés en rouge et ceux impliqués dans la fixation de l'hème en vert. A l'aide d'un logiciel d'alignement, les deux séquences protéiques correspondant aux transcrits long et court sont comparées. Le résultat montre que le transcrit court code pour une partie de la forme longue, il est repéré par la séquence en gras figure 44.

La forme courte de CYP1A1 est peu documentée et elle n'existe pas dans la base PDB. On remarque que 11 résidus d'acides aminés sur 15 nécessaires à la constitution du site actif dans la forme normale ne sont pas présents dans cette forme courte. De même, en ce qui concerne les 5 acides aminés impliqués dans la fixation de l'hème dans la protéine active, un seul est conservé dans la forme courte. A l'évidence, cette forme courte ne dispose pas des éléments requis pour assumer la réaction catalysée par la forme codée par le transcrit de 7 exons.

Selon cette analyse, CYP1A1 pourrait constituer une cible de la chalcone A1 qui se fixerait dans le site actif de cette protéine. Cette observation si elle était avérée n'explique pas pour autant les effets phénotypiques provoqués par la chalcone et en particulier le blockage des cellules en phase G2/M. Il est donc tout à fait probable que la molécule A1 ait une autre cible. Par ailleurs les modélisations suggèrent que la chalcone soit également capable d'interagir avec le facteur de transcription AHR, lequel est nécessaire pour la transcription de CYP1A1 ce qui pourrait en partie rationaliser la surexpression du gène CYP1A1.

Plusieurs interactions ont été modélisées et pour lesquelles le score d'affinité a été reporté dans le tableau 9 (page 124). Les molécules de protéines capables de fixer les chalcones qui ont été testées ont été choisies grâce à une recherche bibliographique, à des algorithmes de prédiction de cibles. Ces protéines sont Ferredoxin-1 (FDX1), Pim-1 Proto-Oncogene, Serine/Threonine Kinase (PIM1), Cyclin-Dependent Kinase 6 (CDK6) et P38-MAPK. Pour avoir des valeurs de référence auxquelles se rapporter, la fixation des

Molécule	FDX1	PIM1	CDK6	p38-MAPK	AHR	CYP1A1
A1	-6,8	-8,9	-9,1	-8,3	-8,9	-10,6
A2	-6,8	-9,4	-9,4	-8,1	-9,4	-10,9
A3	-7,1	-8,8	-9,1	-7,8	-8,8	-10,8
B1	-6,8	-8,7	-8,2	-7,0	-8,3	-10,4
BHF	/	/	/	-8,5	-7,4	-13,3
STL	/	/	/	-7,7	-5,6	-9
TCDD	/	/	/	-7,8	-8,6	-9,7
A1+”linker”	/	/	/	-7,9	/	-5,2
B1+”linker”	/	/	/	-6,8	/	-7,6

TABLE 9 – Scores d’affinités entre les chalcones et leur cibles potentielles

substrats reconnus (BHF : alpha-naphthoflavone, STL : résératrol et TCDD : dioxin) des protéines p38-MAPK, AhR et CYP1A1 a été modélisée de la même manière.

On remarque dans le tableau tableau 9 que les molécules A2 et A3 ont les meilleurs scores d’affinité pour les modélisations testées. Or ce sont les deux molécules les moins actives. Une explication de ce résultat inattendu pourrait être liée au fait que la modélisation ne prend pas en compte la présence des co-facteurs des protéines. Pour la modélisation CYP1A1, par exemple, le calcul est approximatif car il ne prend pas en compte la position de l’hème qui est importante pour l’activité catalytique de l’enzyme. Ces résultats sont néanmoins complémentaires à la partie expérimentale et la renforce en proposant des pistes de travail pour comprendre mieux l’action de ces molécules.

Si on fait un focus sur le cas de la molécule A1, et si par rapport au score d’affinité entre protéine et ligand avéré (AHR et dioxin ou CYP1A1 et alphanaphtoflavone), on place un seuil d’affinité à -8 pour un score correspondant à une réalité, on remarque alors dans ce tableau, que la molécule bien qu’ayant des affinités a priori plus faibles pour les autres molécules que pour CYP1A1, rien ne permet de dire que PIM1, CDK6 ou P38-MAPK sont ou ne sont pas des protéines avec lesquelles la chalcone pourrait interagir. En revanche, la protéine FDX1 semble la piste la moins probable.

On constate aussi que les scores d'affinité de la chalcone A1 pour p38-MAPK, AhR et CYP1A1 sont voisins des scores de fixation des ligands BHF, STL et TCDD sur ces protéines. Par ailleurs, le score d'affinité pour CYP1A1 est plus important que pour p38-MAPK et AhR. Ces éléments semblent confirmer que CYP1A1 pourrait lier la molécule de chalcone A1, qui plus est, au niveau du site actif de cette enzyme. En supposant que la cellule mise en contact avec la chalcone souhaite se soustraire à une activité inhibitrice de la chalcone, il ne serait pas aberrant, dans un objectif de détoxification de la cellule, de voir que l'expression d'une protéine de la famille des cytochromes P450 est augmentée et de valider que cette protéine est capable d'interagir avec la chalcone comme le montrent les simulations.

Enfin, afin de prédire les effets des modifications chimiques des chalcones (modifications souhaitées pour le couplage avec un antimiR) sur la fixation sur les protéines cibles, la modélisation de la fixation des chalcones A1 et B1 auxquelles on a rajouté un linker sur la fonction amine portée par le cycle A a été modélisée. A l'évidence, les valeurs d'affinité se dégradent de manière importante et la modification a un effet très négatif sur la fixation des chalcones.

## **4 Le conjugué chalcone-antimiR**

Les données de la littérature ainsi que les travaux présentés ici confirment que les molécules de chalcones ont un potentiel fort en pharmacologie et c'est aussi le cas pour les microARN. Ainsi ayant à disposition des outils thérapeutiques en cours de développement, il paraît logique d'évaluer l'effet de l'association de ces deux types de composants. En effet, l'objectif est de se servir des avantages de la chalcone et de l'antimicroARN en espérant une synergie entre les deux molécules.

Dans un premier temps, l'association des deux a été testée par co-traitement des cellules tumorales U87. Les cellules ont été traitées avec un mélange d'antimicroARN ayant l'effet cytotoxique le plus important (antimiR-18a) et la molécule de chalcone A1 aux mêmes concentrations finales que lorsqu'ils sont utilisés seuls. Les résultats du co-traitement sont comparés aux résultats obtenus avec chacune des molécules (cf figure 45).

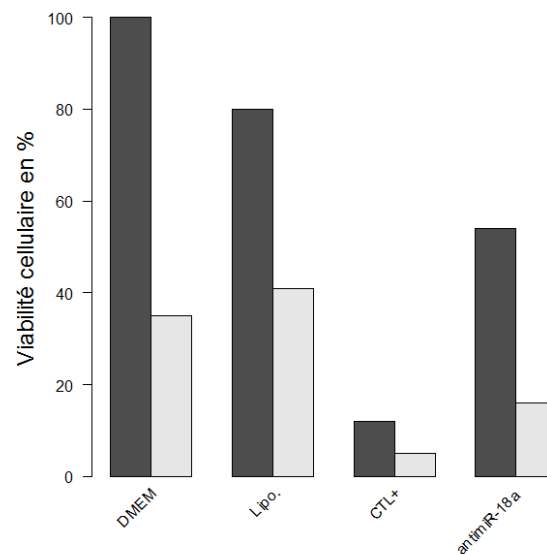


FIGURE 45 – **Evaluation de l'efficacité d'un cotraitement**

Les cellules RT112 sont transfectées pendant 48 h en présence ou non de chalcone A1. La viabilité est mesurée par un test MTT. Les pourcentages de viabilité sont reportés en ordonnée et calculés par rapport à la viabilité des cellules non traitées. Les conditions de culture sans chalcone A1 sont représentées par des barres d'histogramme gris foncé. Les conditions de culture avec chalcone A1 sont représentées par des barres d'histogramme gris clair.

Ce graphique rappelle que la molécule A1 seule peut inhiber la prolifération cellulaire à 70%. L'antimicroARN seul montre un maximum d'efficacité de 40% environ. L'association des deux molécules permet de provoquer la mort de près de 90% des cellules. Il a été vérifié que cet impact du co-traitement n'est pas dû à l'agent de transfection qui favoriserait l'entrée de la molécule A1 dans les cellules. La condition agent de transfection plus molécule A1 sans microARN n'est pas plus efficace que la molécule A1 seule. Si aucune des deux molécules prises séparément n'est parfaitement efficace pour tuer la totalité des cellules, on constate que l'association des deux semble aboutir à une addition des effets, ce qui serait déjà un progrès sensible. En outre, si la chalcone ne montre qu'un effet cytostatique (blocage réversible en G2/M), l'association avec l'antimicroARN pourrait favoriser plus facilement une transition vers la mort cellulaire, voire sensibiliser les cellules aux rayonnements utilisés en radiothérapie ce qui serait extrêmement bénéfique en thérapie des cancers.

Ces résultats positifs devraient donc être complétés pour déterminer précisément la nature de l'amélioration observée lors du co-traitement. Ces résultats sont encourageants pour tenter une combinaison de la chalcone et du microARN incorporés idéalement dans une même molécule ou un même vecteur.





# Discussion



---

# Discussion

A l'issue de ce travail destiné à valider la preuve du concept d'une approche théranostique antitumorale basée sur l'utilisation d'antagonistes de microARN et de chalcones, il est possible de faire la synthèse des questions abordées et des niveaux d'aboutissement technique atteints. Ces questions sont donc déclinées ci-après.

## 1 Peut on détecter correctement des microARN dans les tissus tumoraux ?

Aujourd'hui, une des grandes difficultés qui conditionne l'efficacité de la thérapie est liée à la qualité du diagnostic. En effet, fréquemment, plus le diagnostic est tardif ou incorrect, plus le traitement à mettre en œuvre est important. La prise en charge thérapeutique du patient est donc dépendante de la sensibilité, et de la robustesse du diagnostic. Ce constat banal justifie à lui seul la nécessité d'envisager et d'évaluer de nouvelles stratégies pour le développement d'approches théranostiques susceptibles d'accroître les performances de la lutte contre les tumeurs.

Pour qu'un diagnostic soit sensible et spécifique, il faut être dans des conditions qui permettent une très bonne mesure (détection) du (ou des) marqueurs de la pathologie. Pour ce projet, le but a consisté à exploiter les microARN comme marqueurs de tissus tumoraux plus ou moins agressifs (tumeurs de la vessie et glioblastomes pour les tumeurs du cerveau). L'idée sur laquelle est basé cet objectif repose sur le fait que les microARN sont de petites molécules naturellement produites par la cellule mais dont les taux d'expression vont être modifiés par le développement d'une tumeur. Dès lors, pour faire la preuve du concept que l'on peut utiliser les microARN pour le diagnostic, la question essentielle qui se pose est la suivante : sait-on parfaitement bien détecter ces petits ARN dans des échantillons biologiques prélevés chez le patient ?

Pour commencer à répondre à cette question, le premier point à aborder concerne l'échantillon sur lequel le dosage sera fait. Quelques années après la découverte des microARN, en 2002, l'équipe de Croce avait montré des dérégulations des taux d'expres-

sion de deux microARN chez des patients atteints d'une leucémie [83] suggérant ainsi un lien important entre microARN et oncogénèse. Ce travail a été réalisé sur des cellules prélevées dans la moelle osseuse. Au-delà des questions fondamentales relatives au rôle physiopathologique des microARN, ce travail illustre que les microARN pourraient être des révélateurs, des biomarqueurs d'un développement tumoral. Ceci servait d'initiateur pour de nombreuses études d'intérêt clinique mises en place pour la détection de marqueurs moléculaires susceptibles d'aider à la caractérisation des tumeurs. Pour les tumeurs solides, de nombreux travaux ont été réalisés à partir de tissus congelés dont on extrait l'ARN comme l'ont fait Lu et ses collaborateurs sur plusieurs types d'échantillons [135] et pour réaliser un profil d'expression des microARN dans de nombreux cancers. Cette approche expérimentale est cohérente avec le fait que la masse tumorale en développement est accessible au prélèvement (biopsies) ou fait l'objet d'un acte thérapeutique reposant sur une exérèse chirurgicale, et il est dès lors souvent aisé de disposer d'un fragment du tissu tumoral au sein duquel on souhaite identifier les signatures de la pathologie. En outre, afin de préserver la qualité de l'échantillon et de ne pas altérer la composition en ARN (ARNm ou microARN) qui sont des molécules très sensibles aux dégradations enzymatiques, l'habitude de travailler sur des échantillons congelés s'est généralement imposée. Toutefois, on peut se demander si ce choix du matériel biologique d'analyse et de son mode de prétraitement est judicieux pour développer une approche théranostique qui doit pouvoir s'implanter en clinique avec la plus grande facilité tout en étant la moins invasive pour le patient. C'est pourquoi, il est nécessaire tout d'abord de bien maîtriser l'analyse sur tissus congelés pour disposer d'une base de connaissance des biomarqueurs solide et ensuite mettre au point d'autres méthodes d'emploi plus aisées en routine clinique tout en restant parfaitement performantes.

Il est intéressant de noter qu'à la différence des travaux de recherche, en clinique et notamment en oncologie, les analyses sont pratiquées à partir d'échantillons tissulaires fixés inclus en paraffine. Or il a été montré que la fixation des tissus pouvait avoir un impact important sur leur contenu, sur la qualité en acides nucléiques [136]. Si l'on prend comme référence le tissu congelé, une extraction à partir de 100 mg de tissu permet d'obtenir en moyenne 80 µg d'ARN total (somme des ARN longs plus ARN courts, voir page 76 tableau 3) dont 20 µg sont des ARN ayant une taille inférieure à 200 bases. Les protocoles

d'extraction d'ARN sur tissus inclus en paraffine sont établis pour des extractions d'ARN sur colonnes à partir de 4 coupes de 10 µm d'épaisseur. Partant de ces 4 coupes, on peut estimer que pour une tumeur de 10 mm de diamètre, le volume total de tumeur engagé dans le protocole d'extraction sera d'environ 3 mm<sup>3</sup>. Sur la base d'une masse volumique du tissu proche de 1 µg/mm<sup>3</sup>, ce sont environ 3 mg de tissu tumoral qui sont traités et à partir desquels on extrait grosso modo 1 µg d'ARN courts. Compte tenu des rendements indiqués ci-dessus pour 100 mg de tissu congelé, la masse d'ARN courts obtenue pour 3 mg de tissus congelé devrait être de 0,6 µg environ. Bien que ce calcul soit très approximatif, on peut considérer que les rendements d'extraction des microARN à partir des tissus fixés et paraffinés sont raisonnablement proches. Les quantités purifiées sont donc tout à fait acceptables et sont suffisantes pour le dosage de plusieurs dizaines de microARN en RT-qPCR, ce qui est confortable pour le diagnostic.

Une autre possibilité pour le dosage de biomarqueurs en clinique serait d'effectuer le dosage à partir d'une prise de sang, cela est beaucoup moins invasif pour le patient. Nous avons pu montrer que l'on pouvait extraire des microARN à partir de 300 µl de sérum sanguin (volume que l'on peut facilement obtenir à partir d'un prélèvement de quelques millilitres de sang total). Cependant pour cette quantité de sérum, la quantité d'ARN extraite est difficilement dosable précisément. Les concentrations d'ARN courts obtenues sont d'environ 20 ng/µl [137] ce qui est dans la limite basse d'un dosage spectrophotométrique pour un appareil classique tel que le Nanodrop ou le Qubit. Cette faible concentration est un handicap pour les dosages par hybridation sur puce. En revanche, à l'issue de la purification, les microARN sont récupérés dans un volume d'eau de 30 µl soit une quantité totale de 600 ng. Cette quantité est toutefois compatible avec une analyse clinique par qPCR sur quelques microARN (il suffit de disposer de 10 ng d'ARN courts par microARN dosé par cette méthode).

Etre en mesure de détecter des microARN dans les tissus et même des fluides biologiques est un élément technique important, néanmoins cela n'est pas encore suffisant pour le diagnostic. En effet, au-delà de cette capacité de détection, il faut savoir repérer une "signature" moléculaire pour chaque type de tumeur, ce qui permettra ensuite d'établir un diagnostic. Le but ici a été de rechercher des microARN pour distinguer plusieurs grades

de gliomes qui sont des tumeurs particulièrement agressives et difficiles à différencier. Or, pour le patient, il est extrêmement important de bien faire la différence puisque les chances de sa survie (quelques mois pour les tumeurs les plus agressives et quelques années pour les moins invasives) et par conséquent le traitement et le suivi thérapeutique qui seront proposés pourront être adaptés dans une certaine mesure. Ainsi on comprend que la précision du dosage des microARN est primordiale si l'on souhaite transférer la technique en clinique. La question à présent formulée est de savoir comment s'assurer que la sélection des biomarqueurs est valable et robuste ?

Pour établir un nouvel outil diagnostic, il est indispensable de se baser sur des données robustes. Pour cela, pour limiter les incertitudes, les statistiques conseillent d'effectuer un nombre de mesures le plus grand possible soit au minimum trente individus par groupes. D'un point de vue clinique, localement, il parfois est difficile de constituer de telles cohortes de patients avec un suivi des patients qui permette d'établir des groupes robustes. C'est pourquoi, pour faciliter ce travail, l'Institut National de la santé américain finance des études sur plusieurs types de cancers et met à disposition les données recueillies dans une base de données (TCGA). Ces initiatives de partages de données permettent de compléter de petites cohortes de patients afin de renforcer le choix des biomarqueurs fait sur ces plus petites cohortes.

Mais si le nombre d'individus dans chaque groupe est important, la maîtrise des outils qui permettent la sélection des biomarqueurs l'est tout autant. Connaître ou prendre conscience des limites des méthodes de sélection est donc indispensable. Par exemple, l'analyse globale sur puces miRNA d'Affymetrix a ces avantages mais peut aussi dans certains cas amener des distorsions (cf Résultats, figure 23). Cette figure 23 illustre le fait que si l'on n'a pas un regard critique sur la méthode, cela peut conduire à une sélection de biomarqueurs qui sont en fait le reflet d'une normalisation inappropriée entre des groupes d'échantillons très différents. Cette analyse montre l'impact que peut avoir le traitement de données si l'on n'est pas vigilant. Pour initier ce regard critique sur les résultats, la manière la plus simple est de changer de principe de dosage. Ainsi on s'oblige à positionner l'analyse sous un autre angle d'analyse. L'obtention de résultats différents selon les méthodes de dosage nous poussent à regarder plus en détail les raisons de ces divergences

et ainsi à faire émerger un biais technologique. Malgré tout, cela permet d'établir une liste restreinte de biomarqueurs détectés de manière cohérente par un maximum de méthodes.

Il est important d'évaluer une méthode par rapport à une autre puisque chacune peut apporter une spécificité particulière. Par exemple, la RT-qPCR (kit Taqman microRNA assays) dose une seule forme d'un microARN alors que le séquençage permettra de quantifier toutes les formes existantes. En outre, les unités et la gamme de dosage ne sont pas du tout les mêmes. En effet, pour reprendre les deux cas de figure précédent, dans un cas le résultat sera exprimé en Cq dans l'autre directement (ou presque) en nombre de molécules. De plus, il se peut aussi comme dans le cas de l'hybridation qu'il y ait une intensité propre au bruit de fond comprise dans la mesure. Alors comment peut-on faire pour doser les biomarqueurs de manière robuste dans ces conditions ?

Si les unités de chacune des mesures diffèrent et rendent difficiles les comparaisons, les proportions entre microARN pour un même échantillon devraient, elles, rester constantes. En dosant 3 ou 4 microARN et en calculant les ratios entre ces microARN pour réaliser des comparaisons entre échantillons, on limite l'impact des fluctuations de dosages entre deux séries de dosages. En effet, pour les techniques qui produisent des résultats exprimés en intensités de mesure ou soumises à pollution par des inhibiteurs, il est difficile de comparer avec précision les seules valeurs absolues de ces dosages pour plusieurs échantillons. L'utilisation des ratios permet de normaliser les données, qui plus est en faisant appel à des microARN intrinsèques à l'échantillon, ce qui réduit fortement l'inconvénient des variations entre dosages liés aux méthodes. C'est sur ces bases là que le diagnostic avec les microARN a été basé sur des comparaisons de ratios d'un petit nombre de microARN. Si un microARN caractérise un groupe de tumeur alors le ratio de ce microARN par rapport un autre microARN peut être informatif pour distinguer deux types de tumeurs. Cependant, cela n'est pas systématiquement vérifié et il est donc nécessaire de valider le ratio des microARNs en tant que marqueur d'un tissu tumoral. D'autre part, ce ratio peut lui aussi dépendre des formes du microARN dosé. Ces écarts de ratios sont très clairement mis en évidence dans l'exemple du ratio miR-21 et miR-210 présenté dans la figure 31 (page 105).

En résumé, les microARN peuvent apporter une signature moléculaire d'un tissu donné avec une méthode de dosage donnée. Le concept du diagnostic basé sur les ratios de



microARN est relativement robuste pour être appliquée à différents types d'échantillons biologiques. En revanche, les méthodes de dosage étant toutes spécifiques, il conviendra pour une application clinique d'établir une référence des valeurs de ratios utilisés propre à chaque centre et selon la technique employée pour doser les microARN. Mais le diagnostic clinique en oncologie repose aujourd'hui principalement sur des approches techniques maîtrisées par les anatomopathologistes (analyses histologiques et cytologiques en microscopie). L'analyse de microARN peut malgré tout être compatible avec cette approche méthodologique basée sur l'analyse de coupes de tissus sur lame. A titre d'exemple Yang et ses collaborateurs ont réalisé des détections du microARN let-7i sur des coupes (par hybridation *in situ*) dans le cadre du cancer de l'ovaire après avoir fait une sélection de biomarqueurs en utilisant des puces microARN pour une exploration exhaustive [138].

## **2 Peut-on convertir les microARN biomarqueurs en un composé anti-tumoral ?**

Actuellement, la plupart des molécules thérapeutiques ciblent des enzymes ou des récepteurs. Or le rôle majeur des microARN dans la cellule est de moduler l'expression des protéines. Partant de ce constat, l'idée d'utiliser les microARN comme molécules thérapeutiques paraît alors logique. Un des avantages que l'on peut espérer par rapport à d'autres molécules c'est de limiter la réponse immunitaire puisque la cellule produit elle-même des microARN. Cependant, si l'idée paraît attrayante, quelques questions pratiques sont à aborder pour convertir ces petites molécules en outils thérapeutiques. Est-ce que le microARN apporté comme molécule thérapeutique sera stable ? Va-t-il être pris en charge comme un microARN présent dans la cellule ? Pour cela sous quelle forme (pré-miARN, microARN mature...) faut-il l'apporter à la cellule ? Les réponses pour les analogues de microARN sont-elles les mêmes que celles concernant les antagonistes de microARN ? Et enfin, comment distribuer ces composés aux cellules ?

Dans le cadre du cancer, depuis quelques années, l'intérêt pour les microARN est grandissant. Ils se révèlent être des biomarqueurs intéressants pour les classifications moléculaires. C'est aussi ce que montre la première partie de cette thèse plus particulièrement pour le cancer du cerveau. Des tumeurs difficiles à diagnostiquer présentent au

niveau moléculaire des profils d'expression de microARN différents. Ce projet est basé sur une approche théranostique, où l'objectif est de se servir du diagnostic pour le traitement thérapeutique ciblé et personnalisé. Avec les microARN, ceci est possible puisque l'on part d'un constat (i.e., l'observation des dérégulations de microARN dans le tissu pathologique) qui sert au diagnostic et ce constat donne la solution immédiate du type de molécules à administrer pour rétablir une situation moléculaire au sein des cellules tumorales proche de la "normale".

Lorsqu'on parle de dérégulations de microARN, on perçoit facilement qu'un microARN dérégulé signifie qu'il est soit anormalement absent de la cellule soit abusivement présent. On envisage alors deux possibilités qui s'offrent à nous. En effet, soit on choisit de combler un manque de microARN en apportant le même oligonucléotide ou bien on préfère annuler l'effet du microARN trop exprimé dans la cellule. Les deux approches sont aujourd'hui développées en phases précliniques. Les exemples les plus avancés dans les essais cliniques sont le miRavirsen (antimiR-122) pour lutter contre l'hépatite C [90] et plus récemment le MRX34 (analogue de miR-34a ; on parle aussi de miR-34a mimic) [139]. Cependant l'approche basée sur un antimiR pour capturer un microARN perturbateur est bien plus développée [140], peut être parce que cette approche ressemble à celle des ARN court interférents (siARN). Il est aussi peut-être plus facile de limiter l'effet d'un microARN (oncogène par exemple) plutôt que d'introduire un microARN en suffisamment grande quantité pour voir un effet antitumoral apparaître. Dans un premier temps pour ce projet, nous avons choisi l'approche la plus commune en étudiant l'effet des antimiR dirigés contre les microARN miR-10a, miR-18a, miR-19b, miR-21, miR-26a ou miR-125b.

En faisant le choix des microARN à cibler, on se demande aussi si l'on peut choisir un microARN générique sur lequel agir pour limiter le développement tumoral. La première réponse est sans doute de tenter de limiter l'expression de miR-21 qui est un oncomiR relativement bien connu et surexprimé dans de très nombreux cancers. L'objet d'un certain nombre d'études a été d'approfondir le rôle de ce microARN et plusieurs gènes cibles sont maintenant validées expérimentalement. Toutefois, son expression ne se retrouve pas dans les mêmes proportions dans un cancer par rapport à un autre. C'est par

exemple ce que l'on peut constater figure 32 (page 106), miR-21 ne fait pas partie des miR communs aux deux types de cancers étudiés ici (cancer de la vessie et cancer du cerveau). Cet oncomiR n'est pas aussi fortement dérégulé dans le cancer de la vessie que dans d'autres tumeurs. Par exemple Ratert et ses collaborateurs ne montrent pas miR-21 parmi les plus surexprimés dans les tumeurs de vessie [141]. Bien que certains microARN soient communs à plusieurs cancers (on a choisi de cibler des microARN communs), il paraît toutefois difficile de trouver un microARN générique limitant le développement de diverses tumeurs. Le contexte dans chaque tissu est spécifique et un même microARN n'aura pas toujours le même rôle [80] certainement parce qu'il est question d'association de plusieurs dérégulations et non pas celle d'un seul miR. Les résultats obtenus en associant deux microARN au lieu d'un seul paraissent plus intéressants pour la thérapie (cf figure 37, page 113). Mais l'association de trop nombreux microARN en revanche n'apporte pas d'atout pour la thérapie. Il est possible d'anticiper que leurs effets risquent de se contrarier.

Méthode	Base de la prédiction	Référence
miRanda	Complémentarité	John <i>et al.</i> , 2004 [142]
microCosm	Complémentarité	Griffiths-Jones <i>et al.</i> , 2006 [75, 143]
TargetScanHuman	Complémentarité	Agarwal <i>et al.</i> , 2015 [144]
Diana-microT	Thermodynamique	Paraskevopoulou <i>et al.</i> , 2013 [145]
PicTar	Thermodynamique	Kerk <i>et al.</i> , 2005 [146]
GenMiR++	Méthode statistique	Hang <i>et al.</i> , 2007 [147]
miRDB	Méthode statistique	Wong <i>et al.</i> , 2015 [148]

TABLE 10 – Algorithmes de prédiction de gènes cibles de microARN

Ce dernier point (un même microARN joue un rôle physiologique qui est dépendant du contexte cellulaire) amène à se questionner sur les cibles du microARN que l'on a choisi pour anticiper quel pourrait être l'effet produit. Pour cela, des algorithmes complexes (voir la sélection dans le tableau 10) basés sur les homologies de séquence ou la thermodynamique entre les ARNm et les microARN autorisant quelques bases non appariées ont permis d'obtenir des listes de gènes (plusieurs centaines) ciblés potentiellement par un même microARN. Non seulement un seul microARN a des centaines d'ARNm-cibles avec

lesquels il peut interagir mais en plus, ces listes vont être différentes en fonction de l'algorithme utilisé, ce qui rend au final l'évaluation des gènes cibles relativement complexe. A l'inverse, l'expression d'un même gène pouvant être régulée par plusieurs microARN différents il convient aussi de prendre en compte ce paramètre dans la démarche de choix des antimicroARN d'intérêt thérapeutique. Pour tenter de limiter les combinaisons possibles, des outils (ComiR [149], miRror [150] par exemple) ont été développés pour croiser les différents algorithmes et sélectionner uniquement les gènes ciblés par une même liste de microARN ou l'inverse les microARN qui ciblent le même gène. Cependant, les associations gènes-microARN proposées restent encore trop nombreuses pour identifier précisément la cible d'un microARN donné. Par exemple, sur miRror, lorsqu'on cherche les ARNm cibles communs aux miR-125b, miR-10a et miR-18a, on obtient plus de 200 gènes pouvant tous être régulés par ces trois microARN. Des bases de données complémentaires (miR-Walk [151] et miRecord [152]) recensent les publications d'études fonctionnelles ayant caractérisé de manière expérimentale un microARN avec un gène cible. L'inconvénient de telles bases c'est la difficulté qu'ont les auteurs des bases de données à les mettre à jour par rapport au nombre grandissant d'études sur les microARN. Une autre approche est de croiser des profils d'expression d'ARNm avec les profils des ARN courts obtenus par des méthodes telles que l'hybridation ou le séquençage. Des validations à plus petites échelles complétées de tests fonctionnels pour s'assurer du lien de cause à effet sont de toute manière essentielles.

Bien qu'il reste difficile d'avoir une idée précise de la cible des microARN sélectionnés pour ce projet, on peut néanmoins avoir une idée de leurs actions par différents tests. Un des objectifs de ce projet étant de développer une thérapie antitumorale, à l'image de ce qui est fait pour d'autres molécules thérapeutiques, on procède dans un premier temps à une sélection des molécules en fonction de l'observation d'événements "macroscopiques". C'est à dire que l'on évalue si les microARN peuvent favoriser la mort cellulaire et/ou le blocage de la prolifération, de la migration etc... Les résultats en cytométrie montrent peu d'effets des antimicroARN testés seuls sur la mort cellulaire. On atteint au maximum 9% de cellules mortes alors que les résultats de viabilité cellulaire en MTT montrent des taux d'inactivité des cellules plus importants (environ 20%). Cela semble indiquer que les microARN auraient plus d'effet sur la prolifération que sur l'apoptose. Des tests

au niveau du cycle cellulaire notamment en cytométrie à l'aide de différents marquages (KI67, BrdU...) pourraient compléter ces observations. L'impact sur la chimiorésistance des cellules serait également une information supplémentaire pertinente pour la thérapie. La comparaison de l'effet des antimicroARN sur les cellules cancéreuses de vessie par rapport à la même lignée rendue résistante au cisplatine apporterait aussi des éléments nouveaux dans cette recherche des meilleurs candidats thérapeutiques.

Dans cette étape de sélection des microARN, il est important aussi d'évaluer le type de chimie choisie pour la synthèse des microARN et qui peut impacter l'effet de l'antimicroARN dans les cellules. La chimie va permettre par exemple de rendre plus résistant le microARN aux dégradations enzymatiques par les RNAses. En effet, ces enzymes sont très présentes dans l'organisme et assurent le renouvellement des ARN codants ou non codants. Cela permet aux cellules une adaptation par des profils différents d'expression des ARN en fonction de la situation. Dans la cellule, l'ARN est protégé un certain temps de l'action des RNAses par des extrémités 5' et 3' modifiées pour les ARN messagers ou par leur incorporation dans des complexes protéiques (RISC) pour les microARN. Quelles sont alors les stratégies de modification des oligonucléotides pour limiter la dégradation des antimiR tout en conservant en même temps ses caractéristiques d'interaction avec les microARN ? Plusieurs chimies sont couramment utilisées pour la synthèse d'antimiR et plus largement pour les oligonucléotides antisens (cf Annexes les antimiR). Plusieurs sociétés commerciales proposent la chimie LNA. Pour ce projet, le laboratoire d'Eric Defrancq et ses collaborateurs (Université Grenoble Alpes) nous ont permis de tester des antimiR synthétisés sous forme 2'O-Méthyl-phosphorothioates. L'avantage des oligonucléotides phosphorothioates (décrit par Geary en 2009 [153]) est de rapidement être distribués par la circulation sanguine grâce à une bonne affinité avec les protéines plasmatiques. De plus, ces oligonucléotides seraient très stables (1 à 4 semaines) dans l'organisme après distribution. Le passage de la barrière hémato-encéphalique peut être un frein à la distribution des antimiR au cerveau mais dans ce cas une injection locale pourrait être privilégiée comme pour les tests précliniques chez la souris.

### 3 MicroARN et thérapies

L'hybridation de microARN surexprimés sur l'extrémité 3'UTR d'un ARN messager codant pour une protéine suppresseur de tumeur a pour conséquence de faciliter le développement tumoral. A l'inverse, on sait qu'un microARN peut réprimer la traduction d'une oncoprotéine limitant ainsi le cancer. Partant du rôle des microARN, il est évident que prendre le contre-pied de leurs actions pro-tumorales paraît être une solution thérapeutique attractive.

Pour ce projet, l'inhibition d'un microARN par une séquence d'oligonucléotide antisens (complémentaire au microARN) a été retenue mais il existe d'autres stratégies pour moduler l'expression des microARN. Une première approche pour annuler l'effet d'un microARN oncogène consiste à apporter ou faire produire dans la cellule une longue séquence équivalente à un ARNm contenant plusieurs sites de fixation du microARN oncogène. De ce fait la fixation du microARN sur les sites de l'ARN messager cible sera détournée en partie vers la fixation sur la séquence piège ce qui va en conséquence réduire l'impact négatif du microARN sur l'expression de l'ARN messager. Cette approche est appelée "MicroRNA sponges" [154]. Elle a été récemment utilisée pour séquestrer le microARN miR-221 ayant un rôle oncogène et surexprimé dans les cellules d'hépatocarcinome [155]. Plutôt que de séquestrer les microARN en reproduisant la séquence de l'ARN messager, une autre approche consiste à protéger la région 3'UTR par une séquence complémentaire qui va occuper les sites de fixations des microARN [156]. Cette approche moins développée est connue sous le nom de "miR-mask".

La séquence du microARN est importante pour l'hybridation avec les ARN messagers mais les quelques bases de leur région 5' font toute l'importance de la fixation. En effet, huit bases du côté 5' du microARN déterminent majoritairement le site de fixation avec l'ARN messager [157, 158], cette région est appelée region "seed". A partir de cette information, Obad et ses collègues ont développé un antimicroARN dirigé contre une famille de microARN [159]. C'est à dire qu'ils proposent de synthétiser des séquences antimicroARN de huit bases qui vont s'hybrider sur plusieurs microARN en même temps possédant des séquences hybridant avec les mêmes régions "seed". L'approche peut être intéressante s'il

Il y a plusieurs microARN d'une même famille qui sont dérégulés. En revanche, pour ce projet où l'on souhaite lier le diagnostic et la thérapie, on a tout intérêt à développer des solutions thérapeutiques spécifiques et adaptées aux résultats du diagnostic.

Une fois la preuve du concept établie avec les antimicroARN que le microARN peut être l'élément clé entre diagnostic et thérapie, une approche complémentaire basée sur les microARN mimics pourrait être envisagée (apport aux cellules des microARN suppresseurs de tumeurs manquants). Toutes ces approches ont aussi un intérêt thérapeutique pour lutter contre la résistance aux traitements comme l'on montré Zheng et ses collaborateurs. A partir d'une lignée de cellules de cancer du poumon résistantes à la doxorubicine, l'apport du microARN-299-3p permet de réduire l'expression de la protéine ABCG2 impliquée dans la résistance de ces cellules à la chimiothérapie [160]. Avec la même idée, le microARN miR-205 mimic permet de sensibiliser des cellules de cancer du sein à la radiothérapie alors qu'elles étaient radiorésistantes [161].

## **4 La chalcone est elle un bon choix pour la thérapie ?**

Les chalcones font partie d'une grande famille de molécules, à savoir les flavonoïdes et plus largement elles sont associées au groupe des polyphénols. Ces familles de molécules sont reconnues depuis "presque toujours" pour avoir des vertus thérapeutiques (anti-inflammatoires, anti-fongiques...). L'Homme a d'abord développé des remèdes grâce à ce qui était disponible dans son environnement, ces molécules étant présentes dans de nombreuses plantes, elles ont donc été utilisées pour soigner avant même d'être caractérisées par la pharmacologie moderne. Le médecin grec Hippocrate préconisait des plantes pour améliorer la santé, en revanche les principes actifs de ces plantes n'étaient pas encore connus. Aujourd'hui, l'ethnopharmacologie s'intéresse aux médecines traditionnelles afin de mieux comprendre l'efficacité de certaines pratiques thérapeutiques. L'Organisation Mondiale de la Santé face à un regain d'intérêt pour la phytothérapie encourage les études sur les molécules issues de végétaux et autres pratiques traditionnelles afin de mieux encadrer l'utilisation de telles thérapies. Par exemple, en médecine chinoise, la racine de réglisse est très utilisée. Aujourd'hui, de nombreuses publications se sont intéressées aux

molécules contenues dans la racine de réglisse et en particulier les chalcones . Shi et ses collaborateurs ont ainsi montré un effet antitumoral de molécules contenues dans cette racine [162]. L'étude des chalcones et la synthèse de ses dérivés se placent donc dans un contexte pharmacologique reliant passé et futur.

Les molécules de flavonoïdes présentes dans l'alimentation pénètrent dans l'organisme au niveau des cellules épithéliales de l'intestin. Une expérience menée chez le rat indique que les flavonoïdes traversent le placenta et s'accumulent dans le cerveau du fœtus alors que la mère élimine rapidement la molécule [163]. Si les flavonoïdes peuvent traverser le placenta, est ce que ces molécules ont la particularité de passer la barrière hémato-encéphalique ? Cette barrière est une difficulté pour atteindre les cellules du cerveau et il pourrait être intéressant dans le cadre des tumeurs du cerveau de pouvoir la faire traverser aisément par des molécules pharmacologiques qui ne peuvent spontanément infuser dans le cerveau.

L'équipe de Kavvadias a montré par exemple qu'une molécule flavonoïde peut traverser la barrière hémato-encéphalique et avoir un effet thérapeutique anticonvulsant intéressant [164]. Récemment, Vidac et ses collaborateurs ont observé l'impact des flavonoïdes de l'alimentation sur l'évolution des glioblastomes [165]. Ils en déduisent que leur effet n'est pas suffisant pour limiter la progression du cancer du cerveau. Quoiqu'il en soit les molécules de chalcone si elles présentent des effets intéressants et passent les tests des phases cliniques, la concentration administrée sera certainement différente de celle des flavonoïdes que l'on ingère à partir de l'alimentation et sera adaptée s'il y a lieu au cancer du cerveau.

De plus, de nouvelles molécules dérivées de chalcones ont l'avantage d'induire l'apoptose de cellules cancéreuses résistantes aux traitements classiques. En effet, les travaux réalisés au laboratoire Cacys sur les cellules de cancer de la vessie résistantes au cisplatine montrent une sensibilité à la chalcone identique à celle des cellules sensibles aux traitements cisplatine. Et on sait par ailleurs que des dérivés synthétiques de chalcone comme la molécule JAI51 rendent les tumeurs de cerveau plus sensibles à la radiothérapie [107]. Ceci est donc un élément intéressant à développer.



**Quel pourrait être le mécanisme d'action de la chalcone A1 ?** Comme cela a été décrit dans la partie résultats (cf figure 42 page 120), le transcrite produit par le gène CYP1A1 est très fortement exprimé (taux augmenté de 4 fois) dans les cellules RT112 (cancer de la vessie) lorsqu'elles sont mises en présence de la molécule A1 (la chalcone qui a été montrée comme la plus efficace et la plus puissante parmi les quatre dérivés de chalcones testés pour leur action antitumorale envers les cellules RT112, cf figure 39 page 117).

L'analyse des acteurs probables de cette augmentation du transcrite, nous a conduit vers la protéine AhR, un facteur de transcription qui se trouve normalement au niveau de la membrane cytoplasmique. Lorsqu'elle est en contact avec son ligand (une molécule organique aromatique), celle-ci va être transloquée vers le noyau pour activer la transcription de nombreuses protéines notamment une protéine de la famille des cytochromes p450, la CYP1A1 (cf figure 46).

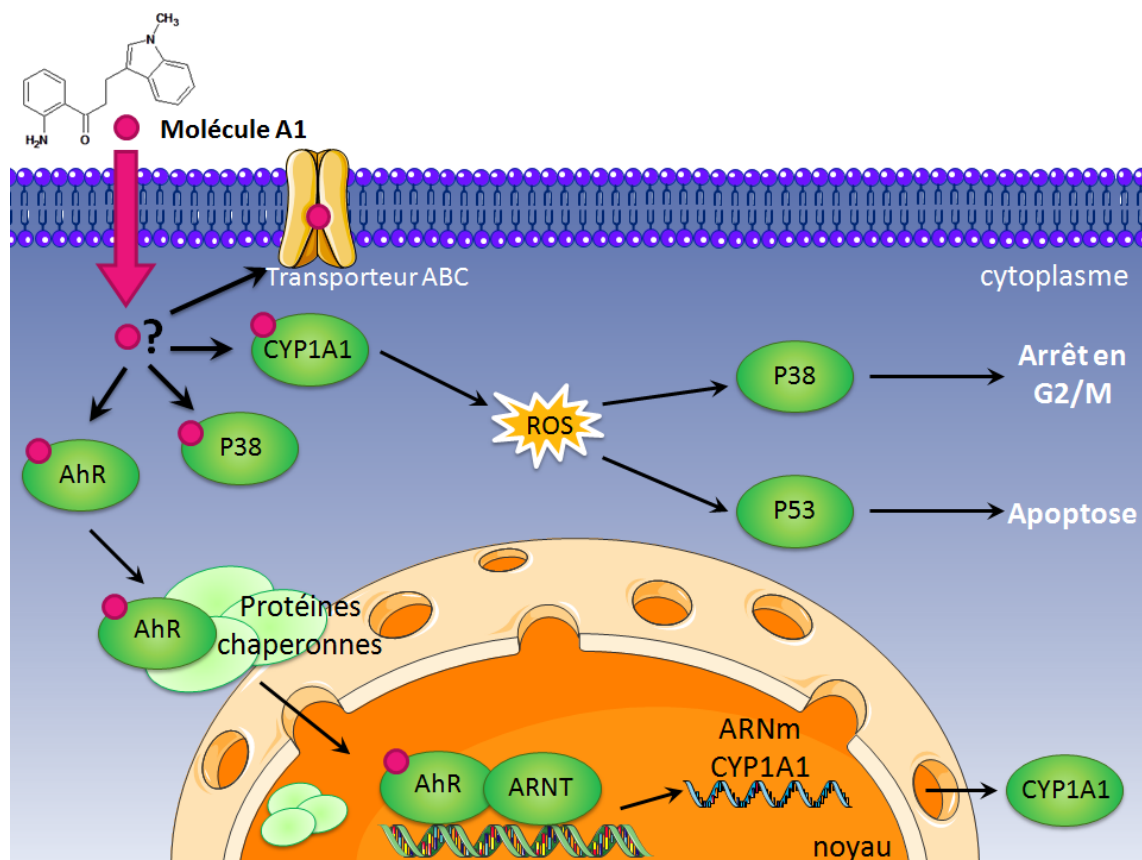


FIGURE 46 – Modes d'action envisagés de la molécule chalcone A1

Plusieurs formes de cette protéine CYP1A1 existent. Les analyses transcripto-

miques montrent que dans les cellules traitées si l'augmentation des taux de transcrits codant la forme active est un des éléments de cette surexpression, elle est aussi fortement corrélée avec un changement de structure du transcrit du fait d'un phénomène d'épissage alternatif qui aboutit en particulier à l'addition d'un exon dans le transcrit exprimé en absence de chalcone. Il convient de noter que la forme du transcrit majoritairement exprimée en absence de chalcone est constitué de 6 exons. La protéine codée comporte 157 acides aminés (ENST00000564596) ne contient pas la totalité des acides aminés essentiels à la fonction catalytique de CYP1A1. Cette forme courte, bien que représentant une forme de CYP1A1 (cf figure 44 page 122) est donc une forme inactive de cytochrome P450. Le transcrit long de 7 exons produit en présence de chalcone A1 code quant à lui pour la protéine active de 512 acides aminés (ENST00000379727). Si on ne s'intéresse plus à l'expression globale mais uniquement à la forme active (ENST00000379727), on déduit des analyses transcriptomique que cette forme de la protéine pourrait être surinduite d'un facteur 24 environ par rapport aux cellules sans traitement. Les modélisations réalisées au cours de ce travail de la fixation des chalcones avec diverses protéines qui fixent des molécules aromatiques laissent envisager que la molécule A1 pourrait être capable de se fixer à la fois à la protéine AhR et à la protéine CYP1A1. L'un des mécanismes possibles expliquant alors la surexpression du gène CYP1A1 reposerait sur le fait que la fixation de la chalcone sur le facteur de transcription AhR activerait ce dernier et le rendrait compétent pour amplifier la transcription du gène CYP1A1. Mais ces observations suscitent plus d'interrogations qu'elles n'apportent de certitudes. En effet, la surproduction de CYP1A1 est-il un évènement favorable ou néfaste pour une chimiothérapie basée sur l'utilisation des chalcones ?

La première hypothèse que l'on peut envisager, c'est que cette augmentation de CYP1A1 en réponse à un traitement par des molécules chalcones a pour but la détoxification de la cellule. Ce mécanisme pourrait être complémentaire des mécanismes d'efflux médiés par les transporteurs ABC protéines. Il est toutefois intéressant de noter que la chalcone JAI-51 a été montrée comme un inhibiteur des pompes d'efflux et d'ABCG2 en particulier [132]. Les cytochromes P450 modifient les molécules pour les éliminer. Il n'est pas anormal d'observer une surexpression de CYP1A1 qui fait partie de cette famille.

La deuxième hypothèse consiste à considérer la surproduction de CYP1A1 comme un élément positif pour la thérapie [166]. En appui de cette hypothèse, on peut rapprocher les observations concernant certaines cellules cancéreuses qui peuvent être résistantes aux flavonoïdes. En effet, deux articles montrent que des lignées de cellules de cancers du sein et des cellules cancéreuses rénales ne sont pas sensibles à l'aminoflavone [166, 167]. Cela s'expliquerait par une relocalisation subcellulaire anormale dans le noyau de la protéine AhR (impliquée comme indiqué ci-dessus dans la réponse de la cellule aux molécules aromatiques), ce qui entraîne une passivité de la cellule suite à un contact avec la molécule de flavonoïde. Mais ces événements négatifs restent peu décrits. Ces deux références font donc de AhR (et CYP1A1 éventuellement aussi) un élément majeur de la sensibilité des cellules aux aromatiques.

En outre, l'action du CYP1A1 pourrait-être de produire des composés encore plus cytotoxiques que la chalcone d'origine [168]. Ce sont ces métabolites qui seraient de ce fait d'intérêt antitumoral. La métabolisation des chalcones et l'effet sur les cellules des produits résultants ne sont pas précisément connus. Boumendjel et al ont mis en évidence l'apparition d'un métabolite de JAI-51 dans les glioblastomes implantés dans des souris traitées par cette chalcone, sans toutefois identifier la forme chimique de ce composé [132]. D'autre part, si la chalcone se fixe au site actif de CYP1A1 elle provoque peut-être une inhibition de l'enzyme [169] et donc cela aurait pour effet soit d'empêcher la détoxification et donc d'augmenter artificiellement la quantité de chalcone non modifiée, qui restera active et qui pourra tuer les cellules ; soit de perturber les réactions d'oxydo-réduction catalysées par CYP1A1 et ainsi engendrer la production des ROS [170] qui présentent des effets cytotoxiques bien connus par eux-mêmes.

Malgré tout, les chalcones pourraient aussi agir au travers d'autres cibles et il pourrait y avoir plusieurs modes d'action cumulés de manière simultanée. Ainsi, il semblerait qu'il existe aussi en parallèle une voie indépendante d'AhR pour induire l'expression de CYP1A1. Bien que le mécanisme ne soit pas encore très clair, Joiakim et ses collègues ont montré qu'en inhibant AhR, on observe malgré tout une "superinduction" de CYP1A1 sans activation de AhR en présence de cycloheximide [171]. Par ailleurs, Weiss et ses collaborateurs ont montré qu'en réponse à la dioxine (qui est le ligand conventionnel du

récepteur AhR), la voie p38-MAPK pouvait être activée de manière indépendante de AhR et ainsi induire l'oncogène c-jun [172]. Cela pourrait concorder avec les observations de Joiakim qui suggérait une induction de CYP1A1 par un mécanisme indépendant. De plus, l'activation de la voie des MAP Kinases serait cohérente avec le blocage des cellules en phases G2/M. Les modélisations avec les protéines réceptrices montrent que par rapport à la dioxine (TCDD), la molécule A1 pourrait avoir autant d'affinité pour la protéine p38 que la dioxine (cf tableau 9 page 124). Cette hypothèse serait donc intéressante à valider.

Enfin, on sait que d'autres flavonoïdes comme la quercétine en forte concentration peuvent causer des dégâts au niveau de l'ADN via une interaction avec la topoisomérase II (bien que ce résultat reste controversé) [173, 174].

Ce qu'il faut retenir c'est la possibilité pour les molécules de flavonoïde de pénétrer spontanément dans la cellule de par leur propriété hydrophobe. Le rôle antitumoral et anti-inflammatoire important pour lutter contre le développement des tumeurs sont des vertues reconnues de cette famille moléculaire. Peu d'effets secondaires semblent être reliés à ces molécules et la résistance rare. La molécule A1 est donc un candidat pharmacologique intéressant et adapter pour tenter une approche de bithérapie. Il y a même possibilité d'envisager une tri-thérapie comprenant la chalcone, un antimicroARN et la radiothérapie.

## 5 Le conjugué

Les chalcones sont une famille de molécules ayant un fort potentiel en pharmacologie. Par ailleurs, l'intérêt grandissant pour les microARN s'oriente de plus en plus vers leur utilisation en thérapie. L'approche théranostique du projet a consisté à personnaliser la thérapie par l'utilisation des microARN. Les microARN peuvent par exemple amplifier l'action des chalcones ayant une activité antitumorales comme l'ont montré récemment Chakrabarti et Ray dans le cancer du cerveau [175]. Cet article renforce l'idée d'associer les chalcones et les microARN pour lutter contre le développement tumoral.

Dans un premier temps, la molécule A1 et les anti-miR ont été testés *in vitro* en

combinaison. L'association avec les microARN montre une cytotoxicité accrue vis-à-vis des cellules tumorales. En revanche, à ce stade de l'analyse, il est difficile de dire si l'effet des deux est simplement additif ou synergique. Pour cela, il faudrait faire varier la concentration d'une molécule par rapport à l'autre et vice-versa de manière à tracer une courbe "isobogramme" [176]. Cet aspect est important pour le traitement afin de mieux cerner le mode d'action d'une bithérapie. Ainsi on pourra savoir dans quelle mesure les deux molécules agissent pour un même effet puisque, à certaines combinaisons de concentrations des deux molécules, il peut arriver que l'on ait des effets indésirables. On peut également déterminer le taux d'occupation des récepteurs ou avoir la suggestion qu'il peut y avoir plusieurs récepteurs des molécules.

La molécule A1 paraît intéressante pour limiter le développement tumoral. Sur la molécule A1, deux solutions s'offrent alors pour lier de manière covalente un microARN, soit du côté de la fonction amine (cycle A), soit du côté de la fonction indole (cycle B, cf Matériels et Methodes, page 58). Maintenant que l'on a une idée de quelques protéines qui peuvent fixer la molécule A1 (CYP1A1, AhR ou P38-MAPK), il est possible de confronter ces modélisations avec la stratégie de greffage d'un microARN sur ces protéines. Les modélisations laissent envisager que toutes modifications importantes sur la molécule A1 perturberaient la fixation avec la protéine CYP1A1. Si la molécule de chalcone est dégradée par CYP1A1, le fait que son dérivé ne puisse plus se fixer sur cette enzyme serait un avantage permettant une présence plus longue de la molécule active dans la cellule. L'autre piste qui paraît intéressante par rapport à la bibliographie concerne la protéine P38. La configuration dans laquelle la molécule A1 vient se lier à la protéine P38 laisse la possibilité d'ajouter un groupement du côté de l'indole (figure 47).

Pour les microARN, y a-t-il aussi des contraintes qui limiteront les possibilités de leur greffer des groupements pour une liaison avec la chalcone ? On peut considérer plus largement le problème en considérant le microARN comme une séquence d'oligonucléotides. Dans ce cas, il existe depuis de nombreuses années des tentatives thérapeutiques où sont liées une séquence de quelques bases ARN ou ADN greffée à du cholestérol pour permettre une meilleure pénétration de l'oligonucléotide dans la cellule. La séquence peut être liée au cholestérol par son côté 5' ou 3', ainsi la société Dharmacon s'appuyant sur les tra-

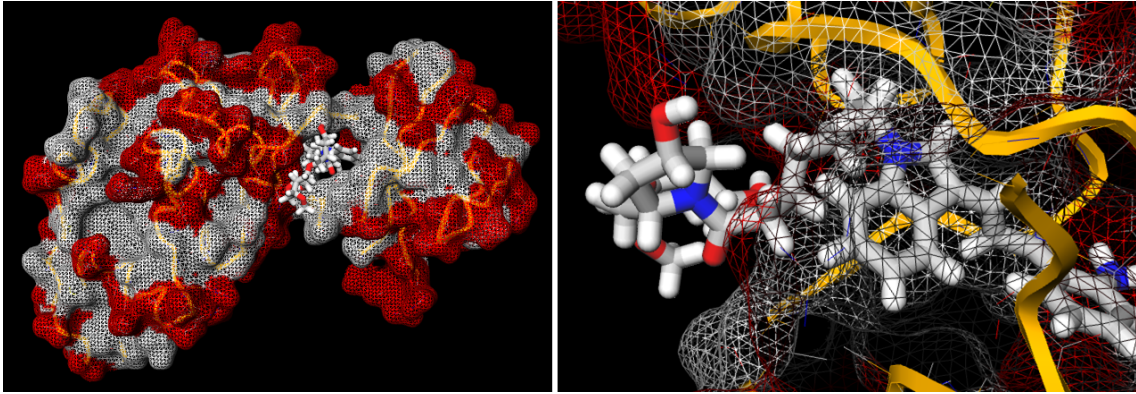


FIGURE 47 – Modélisation de la molécule chalcone A1 fixée dans p38

Cette figure correspond à la modélisation de la chalcone A1 avec une extension sur la fonction indole. Une vision globale de l'interaction est représentée à gauche de la figure, alors qu'à droite il s'agit d'un zoom sur la molécule A1.

vaux de MacKellar [177] propose les deux options. Il en est de même pour les groupements fluorescents. Si l'on souhaite un microARN fluorescent, un groupement FAM peut être présent sur l'une ou l'autre des extrémités. Les problèmes d'encombrements stériques des extrémités des microARN par des groupements rajoutés ne sont pas un problème lorsqu'on ne souhaite pas évaluer l'efficacité cytotoxique d'un microARN. Si on veut simplement suivre par fluorescence ou faire entrer une séquence à l'aide du cholestérol, l'extrémité sur laquelle on fixe le groupement n'a pas d'importance. Cependant, dès lors qu'on souhaite voir un effet du microARN, il faut prendre en compte son mode de fonctionnement. Or, on sait que l'interaction avec l'ARN messager concerne essentiellement huit bases du côté 5' du microARN [157, 158]. C'est certainement pour cette raison que Krützfeldt et ses collaborateurs lorsqu'ils ont montré le potentiel d'un antimicroARN couplé au cholestérol *in vivo* [178], le cholestérol était lié à l'antimicroARN du côté 3'. En effet, l'hybridation entre un microARN et sa cible n'a pas besoin d'être totale mais un groupement imposant en 5' annule probablement les interactions efficaces du microARN avec ses cibles.

Les paragraphes précédents évoquent des solutions envisageables qui impliqueraient une liaison covalente et permanente entre la chalcone et le microARN. Mais dans cette éventualité on peut penser qu'un manque d'efficacité de l'une ou de l'autre des molécules liées ensemble voire de la molécule conjuguée elle-même pourrait être dû à des conformations trop différentes de celles des molécules seules. Ce qui pourrait être envisagé, c'est d'inclure dans la liaison des deux molécules une fonction clivable par

la cellule pour qu'elles puissent trouver chacune, librement, leur site d'action pour plus d'efficacité de la bi-thérapie. En chimie plusieurs possibilités de fonction clivables (esters, ponts disulfures...) pourraient être tentées [179] mais une des solutions privilégiées en pharmacologie implique dans la cellule l'activité des estérases (enzymes ayant la capacité de couper des molécules contenant une fonction ester) [180].

Enfin, un des points liés à l'efficacité de chacune des molécules concerne la concentration à administrer. Les deux molécules seraient liées au moins jusqu'à l'import dans la cellule, cela implique d'apporter autant de l'une que de l'autre (équistoéchiométrie liée au couplage d'une seule molécule d'antimiR avec une seule molécule de chalcone). Or les deux molécules n'ont pas les mêmes propriétés et la même concentration de l'une et de l'autre n'est pas nécessairement requise pour que le traitement soit efficace. Pour observer *in vitro* un effet du microARN, les concentrations de travail sont de l'ordre de quelques nanomolaires alors que pour la chalcone, des concentrations de l'ordre du micromolaire sont requises. L'écart des concentrations nécessaires est important. Mais cet élément n'est pas limitant pour la thérapie puisque le microARN qui a besoin d'un vecteur (dans ce cas, la chalcone) est efficace à plus faible concentration. Autrement dit, il y aurait besoin d'une petite quantité de conjugué correspondant à la concentration en microARN à administrer complétée par la chalcone seule en quantité adaptée à l'effet thérapeutique souhaité. Une autre façon d'aborder le co-traitement, sans les lier chimiquement, serait de les distribuer grâce à des nanoparticules.

Parmi les méthodes d'intérêt pour distribuer les molécules thérapeutiques, les nanoparticules sont des moyens de plus en plus développés. Cette forme de galénique paraît prometteuse, ressemblant à un couteau suisse moléculaire, cette approche permet d'aller encore plus loin en terme de lien entre diagnostic et suivi thérapeutique. Un exemple concernant le cancer du cerveau et illustré par les travaux de Yang et son équipe qui élargissent le suivi thérapeutique à l'imagerie par résonance magnétique grâce à des nanoparticules chargées en gadolinium, épirubicine (molécule anti-tumorale) et du microARN let-7g [181].

Malgré les difficultés que l'on pourrait rencontrer à lier le microARN et la chalcone,

tous ces éléments laissent envisager des perspectives attrayantes de ce projet. D'une part, cela permet de conserver un co-traitement qui semble d'intérêt thérapeutique. Et d'autre part, le diagnostic peut être encore plus lié à la thérapie par un suivi en imagerie informatif sur la localisation du traitement et sur l'évolution de la tumeur.





# Conclusion



---

# Conclusion

Ce projet de thèse a fait appel à des expertises relevant de plusieurs disciplines, la biologie cellulaire, la biologie moléculaire, la chimie et la bioinformatique pour s'inscrire dans une recherche appliquée en cancérologie. L'objectif étant de développer une nouvelle approche thérapeutique liée au diagnostic pour traiter les tumeurs solides. C'est-à-dire une approche théranostique, ou thérapie ciblée dont l'enjeu réside dans le fait de pouvoir créer des molécules antitumorales parfaitement adaptées aux caractéristiques intrinsèques des tumeurs et de surcroît déduites (et designées) à partir de ces caractéristiques.

Les classifications des tumeurs pour établir un diagnostic restent encore aujourd'hui problématiques, en particulier pour les cancers du cerveau (gliomes). La base d'une approche théranostique sur laquelle reposait le projet consistait tout d'abord à évaluer comment améliorer les méthodes d'explorations moléculaires de ces tumeurs. Pour être utilisé en routine clinique, il fallait développer une méthode simple, rapide et surtout fiable. Les résultats obtenus sont encourageants puisque le dosage de trois ou quatre microARN sur tissus fixés et paraffinés permet d'établir un diagnostic. De plus les travaux rapportés ici montrent que les dosages des microARN effectués sur des prélèvements biologiques divers permettent de bien préciser les caractéristiques moléculaires propres à chaque tumeur, chaque patient. Ces informations sont capitales pour pouvoir créer des approches thérapeutiques personnalisées. Néanmoins, il convient de rester vigilant sur l'usage des différentes méthodes de dosage des microARN, qui ne sont pas toujours parfaitement cohérentes, comme le montre ce travail.

Le développement d'une approche thérapeutique originale a été pensé par la création d'un conjugué entre un antimicroARN et une molécule de chalcone. Les molécules d'antimicroARN sont des molécules ayant un intérêt indéniable en pharmacologie même si leurs effets restent bien sûr à mieux caractériser. L'activité antitumorale des chalcones est également bien documentée à présent. Le couplage des deux composants devrait permettre d'assurer la pénétration dans la cellule des antimicroARN et de délivrer dans la cellule un composé bipotentiel, puisque la chalcone et un antimicroARN judicieusement choisis combineront leurs effets antitumoraux. En outre, l'apport de l'analyse transcriptomique dans ce projet apparaît majeur puisqu'une des cibles potentielles des chalcones a pu être identifiée. De

plus amples travaux permettront de mieux comprendre les rôles respectifs des chalcones et antimicroARN afin de créer des molécules ayant le meilleur impact antitumoral, ou la meilleure capacité à potentialiser une chimiothérapie ou la radiothérapie. Au-delà de ces travaux, d'autres perspectives de recherche et applications concernent la vectorisation de ces composés antitumoraux en utilisant par exemple des nanoparticules qui sont une nouvelle forme de galénique.

---

# Bibliographie

- [1] E. Chatelais, “Mort d’un cancer il y a 3 200 ans,” Mar. 2014.
- [2] N. Papavramidou, T. Papavramidis, and T. Demetriou, “Ancient greek and greco-roman methods in modern surgical treatment of cancer,” *Annals of Surgical Oncology*, vol. 17, pp. 665–667, Mar. 2010.
- [3] D. Hanahan and R. A. Weinberg, “Hallmarks of cancer : the next generation,” *Cell*, vol. 144, pp. 646–674, Mar. 2011.
- [4] L. S. Goodman and M. M. Wintrobe, “Nitrogen mustard therapy ; use of methyl-bis (beta-chloroethyl) amine hydrochloride and tris (beta-chloroethyl) amine hydrochloride for Hodgkin’s disease, lymphosarcoma, leukemia and certain allied and miscellaneous disorders,” *Journal of the American Medical Association*, vol. 132, pp. 126–132, Sept. 1946.
- [5] A. Lujambio and S. W. Lowe, “The microcosmos of cancer,” *Nature*, vol. 482, pp. 347–355, Feb. 2012.
- [6] A. L. Oom, B. A. Humphries, and C. Yang, “MicroRNAs : novel players in cancer diagnosis and therapies,” *BioMed Research International*, vol. 2014, p. 959461, 2014.
- [7] J. Ferlay, E. Steliarova-Foucher, J. Lortet-Tieulent, S. Rosso, J. W. W. Coebergh, H. Comber, D. Forman, and F. Bray, “Cancer incidence and mortality patterns in Europe : estimates for 40 countries in 2012,” *European Journal of Cancer (Oxford, England : 1990)*, vol. 49, pp. 1374–1403, Apr. 2013.
- [8] D. S. Kaufman, W. U. Shipley, and A. S. Feldman, “Bladder cancer,” *Lancet*, vol. 374, pp. 239–249, July 2009.
- [9] M. Burger, J. W. F. Catto, G. Dalbagni, H. B. Grossman, H. Herr, P. Karakiewicz, W. Kassouf, L. A. Kiemeny, C. La Vecchia, S. Shariat, and Y. Lotan, “Epidemiology and risk factors of urothelial bladder cancer,” *European Urology*, vol. 63, pp. 234–241, Feb. 2013.
- [10] T. S. Scott, “The incidence of bladder tumours in a dyestuffs factory,” *British Journal of Industrial Medicine*, vol. 9, pp. 127–132, Apr. 1952.

- [11] Y.-S. Hong, K.-H. Song, and J.-Y. Chung, "Health effects of chronic arsenic exposure," *Journal of Preventive Medicine and Public Health = Yebang Uihakhoe Chi*, vol. 47, pp. 245–252, Sept. 2014.
- [12] L. E. Moore, A. H. Smith, C. Eng, D. Kalman, S. DeVries, V. Bhargava, K. Chew, D. Moore, C. Ferreccio, O. A. Rey, and F. M. Waldman, "Arsenic-related chromosomal alterations in bladder cancer," *Journal of the National Cancer Institute*, vol. 94, pp. 1688–1696, Nov. 2002.
- [13] R. J. Sylvester, A. P. M. van der Meijden, W. Oosterlinck, J. A. Witjes, C. Bouffoux, L. Denis, D. W. W. Newling, and K. Kurth, "Predicting recurrence and progression in individual patients with stage Ta T1 bladder cancer using EORTC risk tables : a combined analysis of 2596 patients from seven EORTC trials," *European Urology*, vol. 49, pp. 466–465 ; discussion 475–477, Mar. 2006.
- [14] S. D. Lokeshwar, R. Ruiz-Cordero, M. C. Hupe, M. Jorda, and M. S. Soloway, "Impact of 2004 ISUP/WHO classification on bladder cancer grading," *World Journal of Urology*, Apr. 2015.
- [15] F. Pellucchi, M. Freschi, M. Moschini, L. Rocchini, C. Maccagnano, S. Nazareno, F. Bergamaschi, F. Montorsi, and R. Colombo, "Oncological predictive value of the 2004 World Health Organisation grading classification in primary T1 non-muscle-invasive bladder cancer. A step forward or back?," *BJU international*, vol. 115, pp. 267–273, Feb. 2015.
- [16] P. Sharma, H. Kini, R. R. Pai, K. K. Sahu, and J. Kini, "Study of the reproducibility of the 2004 World Health Organization classification of urothelial neoplasms," *Indian Journal of Pathology & Microbiology*, vol. 58, pp. 59–61, Mar. 2015.
- [17] B. W. G. van Rhijn, M. Musquera, L. Liu, A. N. Vis, T. C. M. Zuiverloon, G. J. L. H. van Leenders, W. J. Kirkels, E. C. Zwarthoff, E. R. Boeve, A. C. Jobsis, B. Bapat, M. A. S. Jewett, A. R. Zlotta, and T. H. van der Kwast, "Molecular and clinical support for a four-tiered grading system for bladder cancer based on the WHO 1973 and 2004 classifications," *Modern Pathology : An Official Journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, vol. 28, pp. 695–705, May 2015.
- [18] C. Premo, A. B. Apolo, P. K. Agarwal, and D. E. Citrin, "Trimodality Therapy in Bladder Cancer : Who, What, and When?," *The Urologic Clinics of North America*, vol. 42, pp. 169–180, May 2015.

- [19] A. Morales, D. Eidinger, and A. W. Bruce, "Intracavitary Bacillus Calmette-Guerin in the treatment of superficial bladder tumors," *The Journal of Urology*, vol. 116, pp. 180–183, Aug. 1976.
- [20] K. Kawai, J. Miyazaki, A. Joraku, H. Nishiyama, and H. Akaza, "Bacillus Calmette-Guerin (BCG) immunotherapy for bladder cancer : current understanding and perspectives on engineered BCG vaccine," *Cancer Science*, vol. 104, pp. 22–27, Jan. 2013.
- [21] L. Topazio, R. Miano, V. Maurelli, G. Gaziev, M. Gacci, V. Iacovelli, and E. Finazzi-Agro, "Could hyaluronic acid (HA) reduce Bacillus Calmette-Guerin (BCG) local side effects ? Results of a pilot study," *BMC urology*, vol. 14, p. 64, 2014.
- [22] J.-W. Hsu, P.-N. Yin, R. Wood, J. Messing, E. Messing, and Y.-F. Lee, "1 alpha, 25-dihydroxylvitamin D3 promotes Bacillus Calmette-Guerin immunotherapy of bladder cancer," *Oncotarget*, vol. 4, pp. 2397–2406, Dec. 2013.
- [23] C. N. Sternberg, S. M. Donat, J. Bellmunt, R. E. Millikan, W. Stadler, P. De Mulder, A. Sherif, H. von der Maase, T. Tsukamoto, and M. S. Soloway, "Chemotherapy for bladder cancer : treatment guidelines for neoadjuvant chemotherapy, bladder preservation, adjuvant chemotherapy, and metastatic cancer," *Urology*, vol. 69, pp. 62–79, Jan. 2007.
- [24] D. Hanahan and R. A. Weinberg, "The hallmarks of cancer," *Cell*, vol. 100, pp. 57–70, Jan. 2000.
- [25] J. M. Ruppert, K. Tokino, and D. Sidransky, "Evidence for two bladder cancer suppressor loci on human chromosome 9," *Cancer Research*, vol. 53, pp. 5093–5095, Nov. 1993.
- [26] P. Cairns, M. E. Shaw, and M. A. Knowles, "Preliminary mapping of the deleted region of chromosome 9 in bladder cancer," *Cancer Research*, vol. 53, pp. 1230–1232, Mar. 1993.
- [27] J. Gu, Y. Horikawa, M. Chen, C. P. Dinney, and X. Wu, "Benzo(a)pyrene diol epoxide-induced chromosome 9p21 aberrations are associated with increased risk of bladder cancer," *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention : A Publication of the American Association for Cancer Research, Cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, vol. 17, pp. 2445–2450, Sept. 2008.



- [28] X.-R. Wu, "Urothelial tumorigenesis : a tale of divergent pathways," *Nature Reviews. Cancer*, vol. 5, pp. 713–725, Sept. 2005.
- [29] M. A. Knowles and C. D. Hurst, "Molecular biology of bladder cancer : new insights into pathogenesis and clinical diversity," *Nature Reviews. Cancer*, vol. 15, pp. 25–41, Jan. 2015.
- [30] F. Massari, C. Ciccarese, M. Santoni, M. Brunelli, A. Conti, A. Modena, R. Montironi, D. Santini, L. Cheng, G. Martignoni, S. Cascinu, and G. Tortora, "The route to personalized medicine in bladder cancer : where do we stand ?," *Targeted Oncology*, Jan. 2015.
- [31] D. R. Feldman, G. Iyer, L. Van Alstine, S. Patil, H. Al-Ahmadie, V. E. Reuter, G. J. Bosl, R. S. Chaganti, and D. B. Solit, "Presence of somatic mutations within PIK3ca, AKT, RAS, and FGFR3 but not BRAF in cisplatin-resistant germ cell tumors," *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, vol. 20, pp. 3712–3720, July 2014.
- [32] D. R. Morais, S. T. Reis, N. Viana, C. B. Piantino, C. Massoco, C. Moura, N. Dip, I. A. Silva, M. Srougi, and K. R. Leite, "The involvement of miR-100 in bladder urothelial carcinogenesis changing the expression levels of mRNA and proteins of genes related to cell proliferation, survival, apoptosis and chromosomal stability," *Cancer Cell International*, vol. 14, no. 1, p. 119, 2014.
- [33] Z. Li, X. Li, C. Yu, M. Wang, F. Peng, J. Xiao, R. Tian, J. Jiang, and C. Sun, "MicroRNA-100 regulates pancreatic cancer cells growth and sensitivity to chemotherapy through targeting FGFR3," *Tumour Biology : The Journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, vol. 35, pp. 11751–11759, Dec. 2014.
- [34] C. Braicu, R. Cojocneanu-Petric, S. Chira, A. Truta, A. Floares, B. Petrut, P. Achimas-Cadariu, and I. Berindan-Neagoe, "Clinical and pathological implications of miRNA in bladder cancer," *International Journal of Nanomedicine*, vol. 10, pp. 791–800, 2015.
- [35] T. Shimizu, H. Suzuki, M. Nojima, H. Kitamura, E. Yamamoto, R. Maruyama, M. Ashida, T. Hatahira, M. Kai, N. Masumori, T. Tokino, K. Imai, T. Tsukamoto, and M. Toyota, "Methylation of a panel of microRNA genes is a novel biomarker

- for detection of bladder cancer,” *European Urology*, vol. 63, pp. 1091–1100, June 2013.
- [36] D. Xie, C. Shang, H. Zhang, Y. Guo, and X. Tong, “Up-regulation of miR-9 target CBX7 to regulate invasion ability of bladder transitional cell carcinoma,” *Medical Science Monitor : International Medical Journal of Experimental and Clinical Research*, vol. 21, pp. 225–230, 2015.
- [37] G. Pignot, G. Cizeron-Clairac, S. Vacher, A. Susini, S. Tozlu, A. Vieillefond, M. Zerbib, R. Lidereau, B. Debre, D. Amsellem-Ouazana, and I. Bieche, “mi-croRNA expression profile in a large series of bladder tumors : identification of a 3-miRNA signature associated with aggressiveness of muscle-invasive bladder cancer,” *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer*, vol. 132, pp. 2479–2491, June 2013.
- [38] D. Ricard, A. Idbah, F. Ducray, M. Lahutte, K. Hoang-Xuan, and J.-Y. Delattre, “Primary brain tumours in adults,” *Lancet*, vol. 379, pp. 1984–1996, May 2012.
- [39] L. De Angelis, “Brain Tumors,” *N Engl J Med*, no. 344, 2001.
- [40] D. N. Louis, H. Ohgaki, O. D. Wiestler, W. K. Cavenee, P. C. Burger, A. Jouvet, B. W. Scheithauer, and P. Kleihues, “The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system,” *Acta Neuropathologica*, vol. 114, pp. 97–109, Aug. 2007.
- [41] A. Behin, K. Hoang-Xuan, A. F. Carpentier, and J.-Y. Delattre, “Primary brain tumours in adults,” *Lancet*, vol. 361, pp. 323–331, Jan. 2003.
- [42] M. C. Mabray, R. F. Barajas, and S. Cha, “Modern brain tumor imaging,” *Brain Tumor Research and Treatment*, vol. 3, pp. 8–23, Apr. 2015.
- [43] N. Martin-Duverneuil, R. Guillevin, and J. Chiras, “Imagerie des gliomes,” *Cancer/Radiotherapie*, vol. 12, pp. 669–675, Nov. 2008.
- [44] S. Lonn, A. Ahlbom, P. Hall, M. Feychting, and Swedish Interphone Study Group, “Long-term mobile phone use and brain tumor risk,” *American Journal of Epidemiology*, vol. 161, pp. 526–535, Mar. 2005.
- [45] S. Larjavaara, J. Schuz, A. Swerdlow, M. Feychting, C. Johansen, S. Lagorio, T. Tynes, L. Klæboe, S. R. Tonjer, M. Blettner, G. Berg-Beckhoff, B. Schlehofer, M. Schoemaker, J. Britton, R. Mantyla, S. Lonn, A. Ahlbom, O. Flodmark, A. Lilja,

- S. Martini, E. Rastelli, A. Vidiri, V. Kahara, J. Raitanen, S. Heinavaara, and A. Auvinen, "Location of gliomas in relation to mobile telephone use : a case-case and case-specular analysis," *American Journal of Epidemiology*, vol. 174, pp. 2–11, July 2011.
- [46] L. Hardell, M. Carlberg, F. Soderqvist, and K. H. Mild, "Case-control study of the association between malignant brain tumours diagnosed between 2007 and 2009 and mobile and cordless phone use," *International Journal of Oncology*, vol. 43, pp. 1833–1845, Dec. 2013.
- [47] E. Cardis, B. K. Armstrong, J. D. Bowman, G. G. Giles, M. Hours, D. Krewski, M. McBride, M. E. Parent, S. Sadetzki, A. Woodward, J. Brown, A. Chetrit, J. Figuerola, C. Hoffmann, A. Jarus-Hakak, L. Montestruq, L. Nadon, L. Richardson, R. Villegas, and M. Vrijheid, "Risk of brain tumours in relation to estimated RF dose from mobile phones : results from five Interphone countries," *Occupational and Environmental Medicine*, vol. 68, pp. 631–640, Sept. 2011.
- [48] S. Vida, L. Richardson, E. Cardis, D. Krewski, M. McBride, M.-E. Parent, M. Abrahamowicz, K. Leffondre, and J. Siemiatycki, "Brain tumours and cigarette smoking : analysis of the INTERPHONE Canada case-control study," *Environmental Health : A Global Access Science Source*, vol. 13, p. 55, 2014.
- [49] C. M. Kitahara, M. S. Linet, A. V. Brenner, S. S. Wang, B. S. Melin, Z. Wang, P. D. Inskip, L. E. B. Freeman, M. Z. Braganza, T. Carreon, M. Feychting, J. M. Gaziano, U. Peters, M. P. Purdue, A. M. Ruder, H. D. Sesso, X.-O. Shu, M. A. Waters, E. White, W. Zheng, R. N. Hoover, J. F. Fraumeni, N. Chatterjee, M. Yeager, S. J. Chanock, P. Hartge, and P. Rajaraman, "Personal history of diabetes, genetic susceptibility to diabetes, and risk of brain glioma : a pooled analysis of observational studies," *Cancer Epidemiology, Biomarkers & Prevention : A Publication of the American Association for Cancer Research, Cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, vol. 23, pp. 47–54, Jan. 2014.
- [50] C. Daumas-Duport, F. Beuvon, P. Varlet, and C. Fallet-Bianco, "Gliomas :WHO and Sainte-Anne Hospital classifications," *Ann Pathol*, vol. 20, pp. 413–428, 2000.
- [51] M. A. Mittler, B. C. Walters, and E. G. Stopa, "Observer reliability in histological grading of astrocytoma stereotactic biopsies," *Journal of Neurosurgery*, vol. 85, pp. 1091–1094, Dec. 1996.

- [52] D. Figarella-Branger and C. Bouvier, "Histological classification of human gliomas : state of art and controversies," *Bulletin Du Cancer*, vol. 92, pp. 301–309, Apr. 2005.
- [53] C. Daumas-Duport, P. Varlet, M. L. Tucker, F. Beuvon, P. Cervera, and J. P. Chodkiewicz, "Oligodendrogliomas. Part I : Patterns of growth, histological diagnosis, clinical and imaging correlations : a study of 153 cases," *Journal of Neuro-Oncology*, vol. 34, pp. 37–59, Aug. 1997.
- [54] C. Daumas-Duport, M. L. Tucker, H. Kolles, P. Cervera, F. Beuvon, P. Varlet, N. Udo, M. Koziak, and J. P. Chodkiewicz, "Oligodendrogliomas. Part II : A new grading system based on morphological and imaging criteria," *Journal of Neuro-Oncology*, vol. 34, pp. 61–78, Aug. 1997.
- [55] C. Daumas-Duport, F. Beuvon, P. Varlet, and C. Fallet-Bianco, "Gliomas :WHO and Sainte-Anne Hospital classifications," *Ann Pathol*, vol. 20, pp. 413–428, 2000.
- [56] S. Hofer and A. Merlo, "Options therapeutiques pour les gliomes malins de degre III et IV OMS," 2002.
- [57] R. Stupp, W. P. Mason, M. J. van den Bent, M. Weller, B. Fisher, M. J. B. Taphoorn, K. Belanger, A. A. Brandes, C. Marosi, U. Bogdahn, J. Curschmann, R. C. Janzer, S. K. Ludwin, T. Gorlia, A. Allgeier, D. Lacombe, J. G. Cairncross, E. Eisenhauer, R. O. Mirimanoff, European Organisation for Research and Treatment of Cancer Brain Tumor and Radiotherapy Groups, and National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group, "Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma," *The New England Journal of Medicine*, vol. 352, pp. 987–996, Mar. 2005.
- [58] H. Ohgaki and P. Kleihues, "Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma," *The American Journal of Pathology*, vol. 170, pp. 1445–1453, May 2007.
- [59] A. Idhahbi, E. Criniere, K. L. Ligon, O. Delattre, and J.-Y. Delattre, "Array-based genomics in glioma research," *Brain Pathology (Zurich, Switzerland)*, vol. 20, pp. 28–38, Jan. 2010.
- [60] J. E. C. Bromberg and M. J. van den Bent, "Oligodendrogliomas : molecular biology and treatment," *The Oncologist*, vol. 14, pp. 155–163, Feb. 2009.
- [61] M. Nakamura, T. Watanabe, Y. Yonekawa, P. Kleihues, and H. Ohgaki, "Promoter methylation of the DNA repair gene MGMT in astrocytomas is frequently associated

- with G :C → A :T mutations of the TP53 tumor suppressor gene,” *Carcinogenesis*, vol. 22, pp. 1715–1719, Oct. 2001.
- [62] S. A. Ciafre, S. Galardi, A. Mangiola, M. Ferracin, C.-G. Liu, G. Sabatino, M. Negri, G. Maira, C. M. Croce, and M. G. Farace, “Extensive modulation of a set of microRNAs in primary glioblastoma,” *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 334, pp. 1351–1358, Sept. 2005.
- [63] J. Silber, D. A. Lim, C. Petritsch, A. I. Persson, A. K. Maunakea, M. Yu, S. R. Vandenberg, D. G. Ginzinger, C. D. James, J. F. Costello, G. Bergers, W. A. Weiss, A. Alvarez-Buylla, and J. G. Hodgson, “miR-124 and miR-137 inhibit proliferation of glioblastoma multiforme cells and induce differentiation of brain tumor stem cells,” *BMC medicine*, vol. 6, p. 14, 2008.
- [64] B. Malzkorn, M. Wolter, F. Liesenberg, M. Grzendowski, K. Stuhler, H. E. Meyer, and G. Reifenberger, “Identification and functional characterization of microRNAs involved in the malignant progression of gliomas,” *Brain Pathology (Zurich, Switzerland)*, vol. 20, pp. 539–550, May 2010.
- [65] E. Lages, A. Guttin, M. El Atifi, C. Ramus, H. Ipas, I. Dupre, D. Rolland, C. Salon, C. Godfraind, F. deFraipont, M. Dhobb, L. Pelletier, D. Wion, E. Gay, F. Berger, and J.-P. Issartel, “MicroRNA and target protein patterns reveal physiopathological features of glioma subtypes,” *PloS One*, vol. 6, no. 5, p. e20600, 2011.
- [66] D. S. Kennedy, A. J. Bester, and S. M. Heywood, “The regulation of protein synthesis by translation control RNA,” *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 61, pp. 415–423, Nov. 1974.
- [67] C. Napoli, C. Lemieux, and R. Jorgensen, “Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into Petunia Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans,” *The Plant cell*, vol. 2, pp. 279–289, Apr. 1990.
- [68] E. De Paoli, A. Dorantes-Acosta, J. Zhai, M. Accerbi, D.-H. Jeong, S. Park, B. C. Meyers, R. A. Jorgensen, and P. J. Green, “Distinct extremely abundant siRNAs associated with cosuppression in petunia,” *RNA*, vol. 15, pp. 1965–1970, Nov. 2009.
- [69] M. Lagos-Quintana, “Identification of Novel Genes Coding for Small Expressed RNAs,” *Science*, vol. 294, pp. 853–858, Oct. 2001.

- [70] S. Baskerville and D. P. Bartel, “Microarray profiling of microRNAs reveals frequent coexpression with neighboring miRNAs and host genes,” *RNA (New York, N.Y.)*, vol. 11, pp. 241–247, Mar. 2005.
- [71] V. N. Kim, “MicroRNA biogenesis : coordinated cropping and dicing,” *Nat Rev Mol Cell Biol*, vol. 6, pp. 376–385, May 2005.
- [72] Y. Lee, M. Kim, J. Han, K.-H. Yeom, S. Lee, S. H. Baek, and V. N. Kim, “MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II,” *The EMBO Journal*, vol. 23, pp. 4051–4060, Oct. 2004.
- [73] V. N. Kim, J. Han, and M. C. Siomi, “Biogenesis of small RNAs in animals,” *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, vol. 10, pp. 126–139, Feb. 2009.
- [74] J. Winter, S. Jung, S. Keller, R. I. Gregory, and S. Diederichs, “Many roads to maturity : microRNA biogenesis pathways and their regulation,” *Nature Cell Biology*, vol. 11, pp. 228–234, Mar. 2009.
- [75] S. Griffiths-Jones, R. J. Grocock, S. van Dongen, A. Bateman, and A. J. Enright, “miRBase : microRNA sequences, targets and gene nomenclature,” *Nucleic Acids Research*, vol. 34, pp. D140–144, Jan. 2006.
- [76] S. Griffiths-Jones, H. K. Saini, S. van Dongen, and A. J. Enright, “miRBase : tools for microRNA genomics,” *Nucleic Acids Research*, vol. 36, pp. D154–158, Jan. 2008.
- [77] L. He and G. J. Hannon, “MicroRNAs : small RNAs with a big role in gene regulation,” *Nature Reviews. Genetics*, vol. 5, pp. 522–531, July 2004.
- [78] G. A. Calin, C. Sevignani, C. D. Dumitru, T. Hyslop, E. Noch, S. Yendamuri, M. Shimizu, S. Rattan, F. Bullrich, M. Negrini, and C. M. Croce, “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*, vol. 101, pp. 2999–3004, Mar. 2004.
- [79] E. A. Chiocca and S. E. Lawler, “The many functions of microRNAs in glioblastoma,” *World Neurosurgery*, vol. 73, pp. 598–601, June 2010.
- [80] J. Banzhaf-Strathmann and D. Edbauer, “Good guy or bad guy : the opposing roles of microRNA 125b in cancer,” *Cell communication and signaling : CCS*, vol. 12, p. 30, 2014.

- [81] S. Costinean, N. Zanesi, Y. Pekarsky, E. Tili, S. Volinia, N. Heerema, and C. M. Croce, "Pre-B cell proliferation and lymphoblastic leukemia/high-grade lymphoma in E(mu)-miR155 transgenic mice," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 103, pp. 7024–7029, May 2006.
- [82] S. D. Selcuklu, M. T. A. Donoghue, and C. Spillane, "miR-21 as a key regulator of oncogenic processes," *Biochemical Society Transactions*, vol. 37, pp. 918–925, Aug. 2009.
- [83] G. A. Calin, C. D. Dumitru, M. Shimizu, R. Bichi, S. Zupo, E. Noch, H. Aldler, S. Rattan, M. Keating, K. Rai, L. Rassenti, T. Kipps, M. Negrini, F. Bullrich, and C. M. Croce, "Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 99, pp. 15524–15529, Nov. 2002.
- [84] A. Cimmino, G. A. Calin, M. Fabbri, M. V. Iorio, M. Ferracin, M. Shimizu, S. E. Wojcik, R. I. Aqeilan, S. Zupo, M. Dono, L. Rassenti, H. Alder, S. Volinia, C.-G. Liu, T. J. Kipps, M. Negrini, and C. M. Croce, "miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 102, pp. 13944–13949, Sept. 2005.
- [85] C. S. Fuziwara and E. T. Kimura, "Insights into Regulation of the miR-17-92 Cluster of miRNAs in Cancer," *Frontiers in Medicine*, vol. 2, p. 64, 2015.
- [86] E. Lages, H. Ipas, A. Guttin, H. Nesr, F. Berger, and J.-P. Issartel, "MicroRNAs : molecular features and role in cancer," *Frontiers in Bioscience (Landmark Edition)*, vol. 17, pp. 2508–2540, 2012.
- [87] "Micro-arn implique dans la degenerescence maculaire." Classification internationale C12N15/113 ; Classification cooperative C12N2310/141, C12N2310/113, A61K31/7105, A61K31/713, C12N15/113, A61K45/06, C12N2310/3231, C12N2310/14.
- [88] S. Wang, K. M. Koster, Y. He, and Q. Zhou, "miRNAs as potential therapeutic targets for age-related macular degeneration," *Future Medicinal Chemistry*, vol. 4, pp. 277–287, Mar. 2012.

- [89] C. Jopling, "Liver-specific microRNA-122 : Biogenesis and function," *RNA biology*, vol. 9, pp. 137–142, Feb. 2012.
- [90] R. E. Lanford, E. S. Hildebrandt-Eriksen, A. Petri, R. Persson, M. Lindow, M. E. Munk, S. Kauppinen, and H. Orum, "Therapeutic Silencing of MicroRNA-122 in Primates with Chronic Hepatitis C Virus Infection," *Science*, vol. 327, pp. 198–201, Jan. 2010.
- [91] R. Kanasty, J. R. Dorkin, A. Vegas, and D. Anderson, "Delivery materials for siRNA therapeutics," *Nature Materials*, vol. 12, pp. 967–977, Oct. 2013.
- [92] J. Krutzfeldt, S. Kuwajima, R. Braich, K. G. Rajeev, J. Pena, T. Tuschl, M. Manoharan, and M. Stoffel, "Specificity, duplex degradation and subcellular localization of antagomirs," *Nucleic Acids Research*, vol. 35, no. 9, pp. 2885–2892, 2007.
- [93] A. Griveau, J. Bejaud, S. Anthiya, S. Avril, D. Autret, and E. Garcion, "Silencing of miR-21 by locked nucleic acid-lipid nanocapsule complexes sensitize human glioblastoma cells to radiation-induced cell death," *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 454, pp. 765–774, Oct. 2013.
- [94] V. Sanna, N. Pala, and M. Sechi, "Targeted therapy using nanotechnology : focus on cancer," *International Journal of Nanomedicine*, vol. 9, pp. 467–483, 2014.
- [95] N. Tominaga, Y. Yoshioka, and T. Ochiya, "A novel platform for cancer therapy using extracellular vesicles," *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 95, pp. 50–55, Dec. 2015.
- [96] Y. Zhao, Y. Li, L. Wang, H. Yang, Q. Wang, H. Qi, S. Li, P. Zhou, P. Liang, Q. Wang, and X. Li, "microRNA response elements-regulated TRAIL expression shows specific survival-suppressing activity on bladder cancer," *Journal of experimental & clinical cancer research : CR*, vol. 32, p. 10, 2013.
- [97] M. Chalopin, A. Tesse, M. C. Martinez, D. Rognan, J.-F. Arnal, and R. Andriantsohaina, "Estrogen Receptor Alpha as a Key Target of Red Wine Polyphenols Action on the Endothelium," *PLoS ONE*, vol. 5, p. e8554, Jan. 2010.
- [98] M. Jalal Hasan, "Biological Activities Importance of Chalcone Derivatives," *International Journal of Chemical and Biomolecular Science*, vol. 1, pp. 107–112, Oct. 2015.



- [99] B. Orlikova, D. Tasdemir, F. Golais, M. Dicato, and M. Diederich, "Dietary chalcones with chemopreventive and chemotherapeutic potential," *Genes & Nutrition*, vol. 6, pp. 125–147, May 2011.
- [100] D. I. Batovska and I. T. Todorova, "Trends in utilization of the pharmacological potential of chalcones," *Current Clinical Pharmacology*, vol. 5, pp. 1–29, Feb. 2010.
- [101] A. Boumendjel, X. Ronot, and J. Boutonnat, "Chalcones derivatives acting as cell cycle blockers : potential anti cancer drugs ?," *Current drug targets*, vol. 10, pp. 363–371, Apr. 2009.
- [102] A. Boumendjel, J. Boccard, P.-A. Carrupt, E. Nicolle, M. Blanc, A. Geze, L. Choisnard, D. Wouessidjewe, E.-L. Matera, and C. Dumontet, "Antimitotic and antiproliferative activities of chalcones : forward structure-activity relationship," *Journal of Medicinal Chemistry*, vol. 51, pp. 2307–2310, Apr. 2008.
- [103] E.-H. Zhang, R.-F. Wang, S.-Z. Guo, and B. Liu, "An update on antitumor activity of naturally occurring chalcones," *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine : eCAM*, vol. 2013, p. 815621, 2013.
- [104] T. Ji, C. Lin, L. S. Krill, R. Eskander, Y. Guo, X. Zi, and B. H. Hoang, "Flavokawain B, a kava chalcone, inhibits growth of human osteosarcoma cells through G2/M cell cycle arrest and apoptosis," *Molecular Cancer*, vol. 12, p. 55, 2013.
- [105] W. Wu, H. Ye, L. Wan, X. Han, G. Wang, J. Hu, M. Tang, X. Duan, Y. Fan, S. He, L. Huang, H. Pei, X. Wang, X. Li, C. Xie, R. Zhang, Z. Yuan, Y. Mao, Y. Wei, and L. Chen, "Millepachine, a novel chalcone, induces G2/M arrest by inhibiting CDK1 activity and causing apoptosis via ROS-mitochondrial apoptotic pathway in human hepatocarcinoma cells in vitro and in vivo," *Carcinogenesis*, vol. 34, pp. 1636–1643, July 2013.
- [106] R. N. Eskander, L. M. Randall, T. Sakai, Y. Guo, B. Hoang, and X. Zi, "Flavokawain B, a novel, naturally occurring chalcone, exhibits robust apoptotic effects and induces G2/M arrest of a uterine leiomyosarcoma cell line," *The Journal of Obstetrics and Gynaecology Research*, vol. 38, pp. 1086–1094, Aug. 2012.
- [107] A. Bouchet, A. Boumendjel, E. Khalil, R. Serduc, E. Brauer, E. A. Siegbahn, J. A. Laissue, and J. Boutonnat, "Chalcone JAI-51 improves efficacy of synchrotron

- microbeam radiation therapy of brain tumors,” *Journal of Synchrotron Radiation*, vol. 19, pp. 478–482, July 2012.
- [108] K.-H. Shen, J.-K. Chang, Y.-L. Hsu, and P.-L. Kuo, “Chalcone arrests cell cycle progression and induces apoptosis through induction of mitochondrial pathway and inhibition of nuclear factor kappa B signalling in human bladder cancer cells,” *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, vol. 101, pp. 254–261, Oct. 2007.
- [109] K. A. Youdim, M. Z. Qaiser, D. J. Begley, C. A. Rice-Evans, and N. J. Abbott, “Flavonoid permeability across an in situ model of the blood-brain barrier,” *Free Radical Biology & Medicine*, vol. 36, pp. 592–604, Mar. 2004.
- [110] P. Bedford, S. A. Shellard, M. C. Walker, R. D. Whelan, J. R. Masters, and B. T. Hill, “Differential expression of collateral sensitivity or resistance to cisplatin in human bladder carcinoma cell lines pre-exposed in vitro to either X-irradiation or cisplatin,” *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer*, vol. 40, pp. 681–686, Nov. 1987.
- [111] H. Phillips, S. Kharbanda, R. Chen, W. Forrest, R. Soriano, and T. Wu, “Molecular subclasses of high-grade glioma predict prognosis, delineate a pattern of disease progression, and resemble stages in neurogenesis,” *Cancer Cell*, vol. 9, pp. 157–173, 2006.
- [112] A. Li, J. Walling, S. Ahn, Y. Kotliarov, Q. Su, M. Quezado, J. C. Oberholtzer, J. Park, J. C. Zenklusen, and H. A. Fine, “Unsupervised analysis of transcriptomic profiles reveals six glioma subtypes,” *Cancer research*, vol. 69, pp. 2091–2099, Mar. 2009.
- [113] R. G. Verhaak, K. A. Hoadley, E. Purdom, V. Wang, Y. Qi, M. D. Wilkerson, C. R. Miller, L. Ding, T. Golub, and J. P. Mesirov, “Integrated Genomic Analysis Identifies Clinically Relevant Subtypes of Glioblastoma Characterized by Abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1,” *Cancer Cell*, vol. 17, pp. 98–110, Jan. 2010.
- [114] J. R. Perkins, J. M. Dawes, S. B. McMahon, D. L. H. Bennett, C. Orengo, and M. Kohl, “ReadqPCR and NormqPCR : R packages for the reading, quality checking and normalisation of RT-qPCR quantification cycle (Cq) data,” *BMC genomics*, vol. 13, p. 296, 2012.

- [115] P. J. Sykes, S. H. Neoh, M. J. Brisco, E. Hughes, J. Condon, and A. A. Morley, "Quantitation of targets for PCR by use of limiting dilution," *BioTechniques*, vol. 13, pp. 444–449, Sept. 1992.
- [116] T. Mosmann, "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival : application to proliferation and cytotoxicity assays," *Journal of Immunological Methods*, vol. 65, pp. 55–63, Dec. 1983.
- [117] R. A. Irizarry, B. M. Bolstad, F. Collin, L. M. Cope, B. Hobbs, and T. P. Speed, "Summaries of Affymetrix GeneChip probe level data," *Nucleic Acids Research*, vol. 31, p. e15, Feb. 2003.
- [118] V. G. Tusher, R. Tibshirani, and G. Chu, "Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 98, pp. 5116–5121, Apr. 2001.
- [119] J. Vandesompele, K. De Preter, F. Pattyn, B. Poppe, N. Van Roy, A. De Paepe, and F. Speleman, "Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes," *Genome Biology*, vol. 3, p. RESEARCH0034, June 2002.
- [120] J. S. McDonald, D. Milosevic, H. V. Reddi, S. K. Grebe, and A. Algeciras-Schimnich, "Analysis of circulating microRNA : preanalytical and analytical challenges," *Clinical Chemistry*, vol. 57, pp. 833–840, June 2011.
- [121] J. Jarry, D. Schadendorf, C. Greenwood, A. Spatz, and L. C. van Kempen, "The validity of circulating microRNAs in oncology : five years of challenges and contradictions," *Molecular Oncology*, vol. 8, pp. 819–829, June 2014.
- [122] M. B. Eisen, P. T. Spellman, P. O. Brown, and D. Botstein, "Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns," *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, vol. 95, pp. 14863–14868, Dec. 1998.
- [123] D. Hua, F. Mo, D. Ding, L. Li, X. Han, N. Zhao, G. Foltz, B. Lin, Q. Lan, and Q. Huang, "A catalogue of glioblastoma and brain MicroRNAs identified by deep sequencing," *Omics : A Journal of Integrative Biology*, vol. 16, pp. 690–699, Dec. 2012.
- [124] P. Guo, Q. Nie, J. Lan, J. Ge, Y. Qiu, and Q. Mao, "C-Myc negatively controls the tumor suppressor PTEN by upregulating miR-26a in glioblastoma multiforme

- cells,” *Biochemical and Biophysical Research Communications*, vol. 441, pp. 186–190, Nov. 2013.
- [125] B. Liu, X. Wu, B. Liu, C. Wang, Y. Liu, Q. Zhou, and K. Xu, “MiR-26a enhances metastasis potential of lung cancer cells via AKT pathway by targeting PTEN,” *Biochimica Et Biophysica Acta*, vol. 1822, pp. 1692–1704, Nov. 2012.
- [126] J. Chen, X. Fu, Y. Wan, Z. Wang, D. Jiang, and L. Shi, “miR-125b inhibitor enhance the chemosensitivity of glioblastoma stem cells to temozolomide by targeting Bak1,” *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, Mar. 2014.
- [127] G. Tezcan, B. Tunca, A. Bekar, M. Preusser, A. S. Berghoff, U. Egeli, G. Cecener, G. Ricken, F. Budak, M. O. Taskapilioglu, H. Kocaeli, and S. Tolunay, “microRNA Expression Pattern Modulates Temozolomide Response in GBM Tumors with Cancer Stem Cells,” *Cellular and molecular neurobiology*, Apr. 2014.
- [128] M. Zhou, Z. Liu, Y. Zhao, Y. Ding, H. Liu, Y. Xi, W. Xiong, G. Li, J. Lu, O. Fodstad, A. I. Riker, and M. Tan, “MicroRNA-125b confers the resistance of breast cancer cells to paclitaxel through suppression of pro-apoptotic Bcl-2 antagonist killer 1 (Bak1) expression,” *The Journal of Biological Chemistry*, vol. 285, pp. 21496–21507, July 2010.
- [129] S. Liu, X. Pan, Q. Yang, L. Wen, Y. Jiang, Y. Zhao, and G. Li, “MicroRNA-18a enhances the radiosensitivity of cervical cancer cells by promoting radiation-induced apoptosis,” *Oncology Reports*, vol. 33, pp. 2853–2862, June 2015.
- [130] Y. Song, P. Wang, W. Zhao, Y. Yao, X. Liu, J. Ma, Y. Xue, and Y. Liu, “MiR-18a regulates the proliferation, migration and invasion of human glioblastoma cell by targeting neogenin,” *Experimental Cell Research*, vol. 324, pp. 54–64, May 2014.
- [131] S. Haemmig, U. Baumgartner, A. Gluck, S. Zbinden, M. P. Tschan, A. Kappeler, L. Mariani, I. Vajtai, and E. Vassella, “miR-125b controls apoptosis and temozolomide resistance by targeting TNFAIP3 and NKIRAS2 in glioblastomas,” *Cell Death & Disease*, vol. 5, p. e1279, 2014.
- [132] A. Boumendjel, A. McLeer-Florin, P. Champelovier, D. Allegro, D. Muhammad, F. Souard, M. Derouazi, V. Peyrot, B. Toussaint, and J. Boutonnat, “A novel chalcone derivative which acts as a microtubule depolymerising agent and an inhibitor of

- P-gp and BCRP in in-vitro and in-vivo glioblastoma models,” *BMC Cancer*, vol. 9, no. 1, p. 242, 2009.
- [133] A. Boumendjel, X. Ronot, and J. Boutonnat, “Chalcones derivatives acting as cell cycle blockers : potential anti cancer drugs ?,” *Current drug targets*, vol. 10, pp. 363–371, Apr. 2009.
- [134] V. P. Androutsopoulos, A. Papakyriakou, D. Vourloumis, and D. A. Spandidos, “Comparative CYP1a1 and CYP1b1 substrate and inhibitor profile of dietary flavonoids,” *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, vol. 19, pp. 2842–2849, May 2011.
- [135] J. Lu, G. Getz, E. A. Miska, E. Alvarez-Saavedra, J. Lamb, D. Peck, A. Sweet-Cordero, B. L. Ebert, R. H. Mak, A. A. Ferrando, J. R. Downing, T. Jacks, H. R. Horvitz, and T. R. Golub, “MicroRNA expression profiles classify human cancers,” *Nature*, vol. 435, pp. 834–838, June 2005.
- [136] M. Srinivasan, D. Sedmak, and S. Jewell, “Effect of Fixatives and Tissue Processing on the Content and Integrity of Nucleic Acids,” *The American Journal of Pathology*, vol. 161, pp. 1961–1971, Dec. 2002.
- [137] J. Song, Z. Bai, W. Han, J. Zhang, H. Meng, J. Bi, X. Ma, S. Han, and Z. Zhang, “Identification of suitable reference genes for qPCR analysis of serum microRNA in gastric cancer patients,” *Digestive Diseases and Sciences*, vol. 57, pp. 897–904, Apr. 2012.
- [138] N. Yang, S. Kaur, S. Volinia, J. Greshock, H. Lassus, K. Hasegawa, S. Liang, A. Leminen, S. Deng, L. Smith, C. N. Johnstone, X.-M. Chen, C.-G. Liu, Q. Huang, D. Katsaros, G. A. Calin, B. L. Weber, R. Butzow, C. M. Croce, G. Coukos, and L. Zhang, “MicroRNA microarray identifies Let-7i as a novel biomarker and therapeutic target in human epithelial ovarian cancer,” *Cancer Research*, vol. 68, pp. 10307–10314, Dec. 2008.
- [139] K. Kelnar, H. J. Peltier, N. Leatherbury, J. Stoudemire, and A. G. Bader, “Quantification of Therapeutic miRNA Mimics in Whole Blood from Nonhuman Primates,” *Analytical Chemistry*, vol. 86, pp. 1534–1542, Feb. 2014.
- [140] E. van Rooij and S. Kauppinen, “Development of microRNA therapeutics is coming of age,” *EMBO Molecular Medicine*, vol. 6, pp. 851–864, July 2014.

- [141] N. Ratert, H.-A. Meyer, M. Jung, P. Lioudmer, H.-J. Mollenkopf, I. Wagner, K. Miller, E. Kilic, A. Erbersdobler, S. Weikert, and K. Jung, “miRNA Profiling Identifies Candidate miRNAs for Bladder Cancer Diagnosis and Clinical Outcome,” *The Journal of Molecular Diagnostics*, vol. 15, pp. 695–705, Sept. 2013.
- [142] B. John, A. J. Enright, A. Aravin, T. Tuschl, C. Sander, and D. S. Marks, “Human MicroRNA targets,” *PLoS biology*, vol. 2, p. e363, Nov. 2004.
- [143] A. J. Enright, B. John, U. Gaul, T. Tuschl, C. Sander, and D. S. Marks, “MicroRNA targets in *Drosophila*,” *Genome Biology*, vol. 5, no. 1, p. R1, 2003.
- [144] V. Agarwal, G. W. Bell, J.-W. Nam, and D. P. Bartel, “Predicting effective microRNA target sites in mammalian mRNAs,” *eLife*, vol. 4, Aug. 2015.
- [145] M. D. Paraskevopoulou, G. Georgakilas, N. Kostoulas, I. S. Vlachos, T. Vergoulis, M. Reczko, C. Filippidis, T. Dalamagas, and A. G. Hatzigeorgiou, “DIANA-microT web server v5.0 : service integration into miRNA functional analysis workflows,” *Nucleic Acids Research*, vol. 41, pp. W169–173, July 2013.
- [146] A. Krek, D. Grun, M. N. Poy, R. Wolf, L. Rosenberg, E. J. Epstein, P. MacMenamin, I. da Piedade, K. C. Gunsalus, M. Stoffel, and N. Rajewsky, “Combinatorial microRNA target predictions,” *Nature Genetics*, vol. 37, pp. 495–500, May 2005.
- [147] J. C. Huang, T. Babak, T. W. Corson, G. Chua, S. Khan, B. L. Gallie, T. R. Hughes, B. J. Blencowe, B. J. Frey, and Q. D. Morris, “Using expression profiling data to identify human microRNA targets,” *Nature Methods*, vol. 4, pp. 1045–1049, Dec. 2007.
- [148] N. Wong and X. Wang, “miRDB : an online resource for microRNA target prediction and functional annotations,” *Nucleic Acids Research*, vol. 43, pp. D146–D152, Jan. 2015.
- [149] C. Coronello and P. V. Benos, “ComiR : combinatorial microRNA target prediction tool,” *Nucleic Acids Research*, vol. 41, pp. W159–W164, July 2013.
- [150] Y. Friedman, G. Naamati, and M. Linial, “MiRror : a combinatorial analysis web tool for ensembles of microRNAs and their targets,” *Bioinformatics*, vol. 26, pp. 1920–1921, Aug. 2010.
- [151] H. Dweep and N. Gretz, “miRWalk2.0 : a comprehensive atlas of microRNA-target interactions,” *Nature Methods*, vol. 12, p. 697, Aug. 2015.

- [152] F. Xiao, Z. Zuo, G. Cai, S. Kang, X. Gao, and T. Li, “miRecords : an integrated resource for microRNA-target interactions,” *Nucleic Acids Research*, vol. 37, pp. D105–110, Jan. 2009.
- [153] R. S. Geary, “Antisense oligonucleotide pharmacokinetics and metabolism,” *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*, vol. 5, pp. 381–391, Apr. 2009.
- [154] M. S. Ebert, J. R. Neilson, and P. A. Sharp, “MicroRNA sponges : competitive inhibitors of small RNAs in mammalian cells,” *Nature Methods*, vol. 4, pp. 721–726, Sept. 2007.
- [155] F. Moshiri, E. Callegari, L. D’Abundo, F. Corra, L. Lupini, S. Sabbioni, and M. Negrini, “Inhibiting the oncogenic mir-221 by microRNA sponge : toward microRNA-based therapeutics for hepatocellular carcinoma,” *Gastroenterology and Hepatology from Bed to Bench*, vol. 7, no. 1, pp. 43–54, 2014.
- [156] Z. Wang, “The principles of MiRNA-masking antisense oligonucleotides technology,” *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)*, vol. 676, pp. 43–49, 2011.
- [157] B. John, A. J. Enright, A. Aravin, T. Tuschl, C. Sander, and D. S. Marks, “Human MicroRNA targets,” *PLoS biology*, vol. 2, p. e363, Nov. 2004.
- [158] D. P. Bartel, “MicroRNAs : Target Recognition and Regulatory Functions,” *Cell*, vol. 136, pp. 215–233, Jan. 2009.
- [159] S. Obad, C. O. dos Santos, A. Petri, M. Heidenblad, O. Broom, C. Ruse, C. Fu, M. Lindow, J. Stenvang, E. M. Straarup, H. F. Hansen, T. Koch, D. Pappin, G. J. Hannon, and S. Kauppinen, “Silencing of microRNA families by seed-targeting tiny LNAs,” *Nature Genetics*, vol. 43, pp. 371–378, Apr. 2011.
- [160] D. Zheng, Y. Dai, S. Wang, and X. Xing, “MicroRNA-299-3p promotes the sensibility of lung cancer to doxorubicin through directly targeting ABCE1,” *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, vol. 8, no. 9, pp. 10072–10081, 2015.
- [161] P. Zhang, L. Wang, C. Rodriguez-Aguayo, Y. Yuan, B. G. Debeb, D. Chen, Y. Sun, M. J. You, Y. Liu, D. C. Dean, W. A. Woodward, H. Liang, X. Yang, G. Lopez-Berestein, A. K. Sood, Y. Hu, K. K. Ang, J. Chen, and L. Ma, “miR-205 acts as a tumour radiosensitizer by targeting ZEB1 and Ubc13,” *Nature Communications*, vol. 5, p. 5671, 2014.

- [162] X. Shi, M. Zou, J. He, H. Xie, and X. Li, "Studies on the identification of constituents in ethanol extract of Radix Glycyrrhizae and their anticancer activity," *African journal of traditional, complementary, and alternative medicines : AJTCAM / African Networks on Ethnomedicines*, vol. 11, no. 2, pp. 334–338, 2014.
- [163] J. P. Schroder-van der Elst, D. van der Heide, H. Rokos, G. Morreale de Escobar, and J. Kohrle, "Synthetic flavonoids cross the placenta in the rat and are found in fetal brain," *The American Journal of Physiology*, vol. 274, pp. E253–256, Feb. 1998.
- [164] D. Kavvadias, P. Sand, K. A. Youdim, M. Z. Qaiser, C. Rice-Evans, R. Baur, E. Sigel, W.-D. Rausch, P. Riederer, and P. Schreier, "The flavone hispidulin, a benzodiazepine receptor ligand with positive allosteric properties, traverses the blood-brain barrier and exhibits anticonvulsive effects," *British Journal of Pharmacology*, vol. 142, pp. 811–820, July 2004.
- [165] M. Vidak, D. Rozman, and R. Komel, "Effects of Flavonoids from Food and Dietary Supplements on Glial and Glioblastoma Multiforme Cells," *Molecules (Basel, Switzerland)*, vol. 20, no. 10, pp. 19406–19432, 2015.
- [166] A. I. Loaiza-Perez, S. Kenney, J. Boswell, M. Hollingshead, M. C. Alley, C. Hose, H. P. Ciolino, G. C. Yeh, J. B. Trepel, D. T. Vistica, and E. A. Sausville, "Aryl hydrocarbon receptor activation of an antitumor aminoflavone : basis of selective toxicity for MCF-7 breast tumor cells," *Molecular Cancer Therapeutics*, vol. 3, pp. 715–725, June 2004.
- [167] M. Callero, G. Suarez, G. Luzzani, B. Itkin, B. Nguyen, and A. Loaiza-Perez, "Aryl hydrocarbon receptor activation by aminoflavone : New molecular target for renal cancer treatment," *International Journal of Oncology*, Apr. 2012.
- [168] V. P. Androutsopoulos, A. M. Tsatsakis, and D. A. Spandidos, "Cytochrome P450 CYP1a1 : wider roles in cancer progression and prevention," *BMC Cancer*, vol. 9, no. 1, p. 187, 2009.
- [169] T. Shimada, K. Tanaka, S. Takenaka, N. Murayama, M. V. Martin, M. K. Foroozesh, H. Yamazaki, F. P. Guengerich, and M. Komori, "Structure-function relationships of inhibition of human cytochromes P450 1a1, 1a2, 1b1, 2c9, and 3a4 by 33 flavonoid derivatives," *Chemical Research in Toxicology*, vol. 23, pp. 1921–1935, Dec. 2010.



- [170] L. McLean, U. Soto, K. Agama, J. Francis, R. Jimenez, Y. Pommier, L. Sowers, and E. Brantley, "Aminoflavone induces oxidative DNA damage and reactive oxidative species-mediated apoptosis in breast cancer cells," *International Journal of Cancer. Journal International Du Cancer*, vol. 122, pp. 1665–1674, Apr. 2008.
- [171] A. Joiakim, P. A. Mathieu, A. A. Elliott, and J. J. Reiners, "Superinduction of CYP1a1 in MCF10a cultures by cycloheximide, anisomycin, and puromycin : a process independent of effects on protein translation and unrelated to suppression of aryl hydrocarbon receptor proteolysis by the proteasome," *Molecular Pharmacology*, vol. 66, pp. 936–947, Oct. 2004.
- [172] C. Weiss, D. Faust, H. Durk, S. K. Kolluri, A. Pelzer, S. Schneider, C. Dietrich, F. Oesch, and M. Gottlicher, "TCDD induces c-jun expression via a novel ah (dioxin) receptor-mediated p38-MAPK-dependent pathway," *Oncogene*, vol. 24, pp. 4975–4983, July 2005.
- [173] Z. Zhang, S. Chen, H. Mei, J. Xuan, X. Guo, L. Couch, V. N. Dobrovolsky, L. Guo, and N. Mei, "Ginkgo biloba leaf extract induces DNA damage by inhibiting topoisomerase II activity in human hepatic cells," *Scientific Reports*, vol. 5, p. 14633, Sept. 2015.
- [174] N. Yamashita and S. Kawanishi, "Distinct mechanisms of DNA damage in apoptosis induced by quercetin and luteolin," *Free Radical Research*, vol. 33, pp. 623–633, Nov. 2000.
- [175] M. Chakrabarti and S. K. Ray, "Anti-tumor activities of luteolin and silibinin in glioblastoma cells : overexpression of miR-7-1-3p augmented luteolin and silibinin to inhibit autophagy and induce apoptosis in glioblastoma in vivo," *Apoptosis : An International Journal on Programmed Cell Death*, Nov. 2015.
- [176] R. J. Tallarida and R. B. Raffa, "The application of drug dose equivalence in the quantitative analysis of receptor occupation and drug combinations," *Pharmacology & Therapeutics*, vol. 127, pp. 165–174, Aug. 2010.
- [177] C. MacKellar, D. Graham, D. W. Will, S. Burgess, and T. Brown, "Synthesis and physical properties of anti-HIV antisense oligonucleotides bearing terminal lipophilic groups," *Nucleic Acids Research*, vol. 20, pp. 3411–3417, July 1992.

- 
- [178] J. Krutzfeldt, N. Rajewsky, R. Braich, K. G. Rajeev, T. Tuschl, M. Manoharan, and M. Stoffel, "Silencing of microRNAs in vivo with 'antagomirs'," *Nature*, vol. 438, pp. 685–689, Dec. 2005.
- [179] G. Leriche, L. Chisholm, and A. Wagner, "Cleavable linkers in chemical biology," *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, vol. 20, pp. 571–582, Jan. 2012.
- [180] T. Fukami and T. Yokoi, "The emerging role of human esterases," *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, vol. 27, no. 5, pp. 466–477, 2012.
- [181] H.-W. Yang, C.-Y. Huang, C.-W. Lin, H.-L. Liu, C.-W. Huang, S.-S. Liao, P.-Y. Chen, Y.-J. Lu, K.-C. Wei, and C.-C. M. Ma, "Gadolinium-functionalized nanographene oxide for combined drug and microRNA delivery and magnetic resonance imaging," *Biomaterials*, vol. 35, pp. 6534–6542, Aug. 2014.



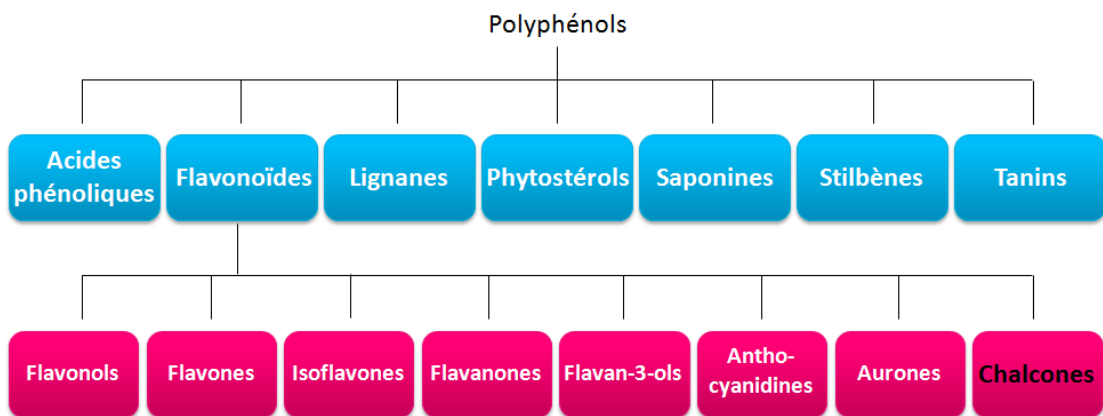
# Annexes



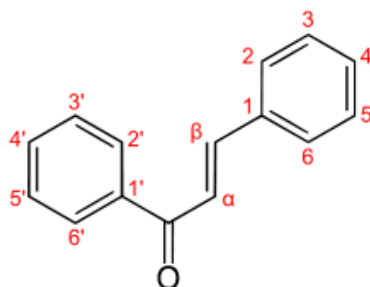
# Les chalcones

Composés aromatiques de la famille des flavonoïdes et plus largement des polyphénols. Ces molécules chalcones sont très répandues chez les végétaux qui les synthétisent naturellement et sont responsables d'une coloration jaune. Parmi celles que l'on consomme facilement dans notre alimentation, on trouve la naringénine (pamplemousse), quercétine (pomme) etc.

## Famille des flavonoïdes



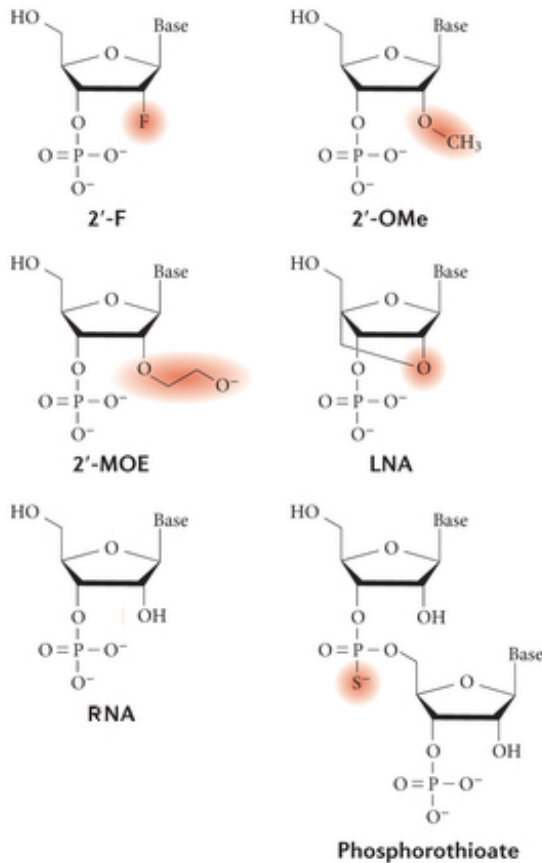
## Formule des chalcones





# Les anti-miR

## Les chimies des microARN



## Séquences des anti-miRs

anti-miR-21 : UCAACAUCAGUCUGAUAAGCUA

anti-miR-contrôle : CGUGAUCUUCACCGACAAGAU

anti-miR-125b : UCACAAGUUAGGGUCUCAGGGA

anti-miR-18a : CUAUCUGCACUAGAUGCACCUUA

anti-miR-10a : CACAAAUUCGGAUCUACAGGGUA

anti-miR-19b : UCAGUUUUGCAUGGAUUUGCACA

anti-miR-26a : AGCCUAUCCUGGAUUACUUGAA





---

# Liste des microARN dosés pour valider les méthodes d'extraction

hsa-miR-16

hsa-miR-134

hsa-miR-21

hsa-miR-210

hsa-let-7f

hsa-miR-20a

hsa-miR-134

hsa-miR-155

hsa-miR-15b

hsa-miR-124a

hsa-miR-132

hsa-miR-149

hsa-miR-19b

hsa-miR-128b

hsa-miR-146b

hsa-miR-330

hsa-miR-9

hsa-miR-127

hsa-miR-139



# Production Scientifique



---

# Production Scientifique

## Publications

- 1 : Ipas H, Guttin A, Issartel JP **Exosomal microRNAs in tumoral U87MG versus normal astrocyte cells.** *MicroRNA* 2015 ; PMID : 26456536.
- 2 : Nissou MF, Guttin A\*, Zenga C, Berger F, Issartel JP, Wion D. **Additional Clues for a Protective Role of Vitamin D in Neurodegenerative Diseases : 1,25-Dihydroxyvitamin D3 Triggers an Anti-Inflammatory Response in Brain Pericyte** *J Alzheimers Dis.* 2014 Jun 16 ; PMID :24934545. \* **co-premier auteur**
- 3 : Nissou MF, El Atifi M, Guttin A, Godfraind C, Salon C, Garcion E, van der Sanden B, Issartel JP, Berger F, Wion D. **Hypoxia-induced expression of VE-cadherin and filamin B in glioma cell cultures and pseudopalisade structures** *J Neurooncol.* 2013 Jun ;113(2) :239-49. PMID : 23543272.
- 4 : Nissou MF, Brocard J, El Atifi M, Guttin A, Andrieux A, Berger F, Issartel JP, Wion D. **The transcriptomic response of mixed neuron-glia cell cultures to 1,25-dihydroxyvitamin d3 includes genes limiting the progression of neurodegenerative diseases** *J Alzheimers Dis.* 2013 ;35(3) :553-64. PMID : 23455988. PMCID : PMC3962683.
- 5 : Dupont PY, Guttin A, Issartel JP, Stepien G. **Computational identification of transcriptionally co-regulated genes, validation with the four ANT isoform genes** *BMC Genomics.* 2012 Sep 15 ;13 :482. PMID :22978616. PMCID : PMC3477019.
- 6 : Lages E, Ipas H, Guttin A, Nesr H, Berger F, Issartel JP. **MicroRNAs : molecular features and role in cancer** *Front Biosci (Landmark Ed).* 2012 Jun 1 ;17 :2508-40. PMID : 22652795. PMCID : PMC3815439.
- 7 : Lages E, Guttin A, El Atifi M, Ramus C, Ipas H, Dupré I, Rolland D, Salon C, Godfraind C, deFraipont F, Dhobb M, Pelletier L, Wion D, Gay E, Berger F, Issartel JP. **MicroRNA and target protein patterns reveal physiopathological features of glioma subtypes** *PLoS One.* 2011 ;6(5) :e20600. PMID : 21655185. PMCID : PMC3105101.
- 8 : Gay E, Lages E, Ramus C, Guttin A, El Atifi M, Dupré I, Bouamrani A, Salon C, Ratel D, Wion D, Berger F, Issartel JP. **The heterogeneity of meningioma revealed by multiparameter analysis : infiltrative and non-infiltrative clinical phenotypes** *Int J Oncol.* 2011 May ;38(5) :1287-97. PMID : 21318223.

## **Brevets**

3 Brevets (FR 09/58737 ; FR10/60278 ; FR10/60279) : Méthodes de diagnostic in vitro intra/inter tissulaire

Inventeurs : Lages E, Guttin A, Ipas H, El Atifi M, Berger F, Issartel J-P

## **Communications**

Présentation orale journée transversale (EPHE, Paris) : “Développement d’une molécule thérapeutique : quelle place pour l’image ?” Guttin A

Poster journée scientifique du médicament (UJF, Grenoble) : “Développement d’une thérapie dépendante des microARN pour les tumeurs solides” Guttin A, Issartel JP, V Frachet et X Ronot

## Résumé

### Développement d'une bithérapie antitumorale basée sur une approche théranostique

Le projet a consisté à développer une nouvelle stratégie thérapeutique basée sur les spécificités moléculaires intrinsèques des tumeurs solides afin de personnaliser le traitement en le reliant directement au diagnostic de la tumeur (theranostic). Les tumeurs cérébrales et les tumeurs de vessies sont deux exemples de tumeurs solides particulièrement agressives. Ces deux types de tumeurs sont classés en plusieurs sous-groupes ayant leur propre profil moléculaire. Les microARN (ou miR) sont des molécules synthétisées naturellement par les cellules. Ces molécules peuvent avoir un rôle d'oncogène ou de suppresseur de tumeurs et leur expression est fortement dérégulée dans les tumeurs. Ainsi la mesure des taux d'expression de quelques microARN dans un échantillon de tissu tumoral permet de réaliser la distinction des gliomes de haut grade par rapport à ceux de bas grade. Dans le cadre du traitement, la thérapie envisagée consiste à moduler l'expression des microARN dérégulés dans les tumeurs. L'approche évaluée consiste à contrer l'expression de microARN oncogènes surexprimés à l'aide d'un antimicroARN (antimiR). Ce type de molécule est chimiquement semblable aux molécules d'ARN naturellement présentes dans la cellule. Pour une meilleure efficacité de cette stratégie thérapeutique, l'autre partie du projet a consisté à optimiser le transport de l'antimiR et l'effet de la thérapie. Pour introduire l'antimicroARN au plus près du coeur de la tumeur, il a été prévu de réaliser un couplage entre un antimiR et un dérivé de chalcones pénétrant facilement dans les cellules et doué de propriétés antitumorales, cette combinaison paraît prometteuse.

**Mots-clés :** Oncologie, AntimiR, Chalcone, Thérapie

## Abstract

### Development of a dual antitumor therapy based on a theranostic approach

Solid malignant tumors have molecular characteristics that clearly distinguish them from healthy tissue. The project is to develop a new therapeutic strategy based on these molecular characteristics. We set up a new therapeutic approach so as to customize treatment by connecting it directly to the diagnosis of the tumor (theranostic approach). Brain tumours and bladder tumours are two examples of particularly aggressive solid tumours. These two types of tumors are classified into several subgroups that have their own molecular profiles. The microRNAs (miR) are molecules naturally synthesized by cells. These molecules may have a role of oncogene or tumour suppressors whose expression is strongly deregulated in tumours. So the assessment of the expression levels of few microRNA allows the distinction of gliomas of high grade compared to low grade. To set up the new therapy we needed to modulate the expression of microRNAs deregulated in tumors. The proposed approach was to counter the expression of oncogenic microRNAs overexpressed using an antimicroARN (antimiR). This type of molecule is chemically similar to the naturally occurring RNA molecules in the cells. For a better efficiency of this new therapeutic strategy, we tried to optimize the transport of the antimiR to increase the therapeutic effect. To vectorize the therapeutic antimiR to the heart of the tumor, we envisioned to chemically combine the antimiR to a cell-penetrating antitumoral compound. Chalcones derivatives which are hydrophobic have this capability. A combination of the two molecules (antimicroARN and chalcone) was evaluated and the results appeared promising.

**Keywords :** Oncology, AntimiR, Chalcone, Therapy