



**HAL**  
open science

# Implication du long ARN non-codant "UCA1" dans la chimiorésistance des cancers de l'ovaire

Anaïs Wambecke

► **To cite this version:**

Anaïs Wambecke. Implication du long ARN non-codant "UCA1" dans la chimiorésistance des cancers de l'ovaire. Médecine humaine et pathologie. Normandie Université, 2019. Français. NNT : 2019NORMC406 . tel-03865127

**HAL Id: tel-03865127**

**<https://theses.hal.science/tel-03865127>**

Submitted on 22 Nov 2022

**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.



Normandie Université

## THÈSE

**Pour obtenir le diplôme de doctorat**

**Spécialité ASPECTS MOLECULAIRES ET CELLULAIRES DE LA BIOLOGIE**

**Préparée au sein de l'Université de Caen Normandie**

### **Implication du long ARN non-codant "UCA1" dans la chimiorésistance des cancers de l'ovaire**

**Présentée et soutenue par  
Anais WAMBECKE**

**Thèse soutenue publiquement le 17/10/2019  
devant le jury composé de**

Mme BETTINA COUDERC	Professeur des universités, Université Toulouse 3 Paul Sabatier	Rapporteur du jury
Mme BERNADETTE NEVE	Chargé de recherche HDR, 59 CHRU de LILLE	Rapporteur du jury
M. PHILIPPE GALERA	Professeur des universités, Université de Caen Normandie	Président du jury
M. MATTHIEU MERYET-FIGUIERE	Chercheur, Université de Caen Normandie	Membre du jury
M. DAVID TULASNE	Directeur de recherche à l'INSERM, Institut Pasteur	Membre du jury
M. CHRISTOPHE DENOYELLE	Maître de conférences HDR, Université de Caen Normandie	Directeur de thèse

**Thèse dirigée par CHRISTOPHE DENOYELLE, Unité de recherche interdisciplinaire pour la prévention et le traitement des cancers**



UNIVERSITÉ  
CAEN  
NORMANDIE



Normande de Biologie Intégrative,  
Santé, Environnement







Ce travail de thèse a été réalisé au sein de l'Unité de Recherche Inserm U1086 ANTICIPE (Unité de recherche interdisciplinaire pour la prévention et le traitement des cancers) et plus particulièrement au sein de l'axe 2, BioTICLA (Biologies et Thérapies Innovantes des Cancers de l'Ovaire). Cette unité se situe dans le bâtiment Recherche du Centre de Lutte Contre le Cancer François Baclesse à Caen.



Ce travail de recherche a été financé par l'Inserm, la Ligue Contre le Cancer (Comité de Normandie et de Seine-Maritime), le Cancéropôle Nord-Ouest (CNO), le Centre de Lutte contre le Cancer François Baclesse et l'Université de Caen Normandie. Mon contrat doctoral a été financé par la Région Normandie à 100%.



## Remerciements :

Ah !!!! Les remerciements, une partie simple à rédiger me semble t'il. Me voilà déjà arrivée au bout de ces trois ans de thèse, trois ans d'aventures, de nouveautés, de rencontres, d'expériences, de hauts et de bas mais surtout, au final, la réalisation d'un objectif personnel, celui de devenir docteur.

Je tiens avant toutes choses, à remercier les membres de mon jury d'être présents pour cette journée si importante pour moi et de me permettre de vous présenter mes travaux de recherche. Merci à mes deux rapporteurs de thèses, le **Dr. Bernadette Neve** et le **Pr. Bettina Couderc** d'avoir accepté d'évaluer ce manuscrit, et d'apporter un œil neuf sur ce travail de recherche. Merci également à mes deux examinateurs, le **Pr. Franck Carreiras** et le **Pr. Philippe Galera**, pour leur présence et leurs avis critiques sur ce travail.

Je vais commencer par toi '**Dr. Matthieu Meryet-Figuière**', mon co-encadrant de thèse sur le papier mais mon encadrant de thèse au quotidien. Je voulais te dire '**merci !!**' et ça du fond du cœur car durant ces trois ans tu m'as accompagné, guidé, encadré et surtout tu as compris qui j'étais. Tu as été je pense, le premier à cerner, mon caractère, mon côté fonceuse, mon côté déterminée mais aussi mon manque de confiance en moi et tu as toujours réussi à m'expliquer les choses, me pousser et même ne rien me dire dans les moments où je ronchonnais. On se ressemble sur de nombreux points et c'est ce qui a fait de nous ce bon binôme, ce fut un plaisir de travailler avec toi. Tu as su me donner goût à la biologie moléculaire ce qui n'était pas si évident. Tu m'as fait évoluer sur le plan professionnel et personnel, en me poussant chaque jour, que ce soit à participer à des congrès, des formations ou à continuer mon sport, à prendre du temps pour souffler car comme tu me l'as si bien dit, une thèse c'est comme un marathon, il faut tenir sur la durée. Je te souhaite d'être heureux, de réaliser tes projets, tes envies et d'aller loin. Bon vent à toi.

**'Dr.Christophe Denoyelle'**, mon directeur de thèse, merci à toi pour ton implication, tes conseils, ta délicatesse et la sagesse que tu emploies pour nous dire les choses. Nous avons moins eu la chance de travailler ensemble au quotidien mais ton parcours et ta persévérance m'impressionneront toujours, tu étais et est toujours présent quand j'ai besoin de toi, tu sais toujours me dire quand les choses vont ou non, tu m'apportes toujours un avis qui me permet

d'avancer et pour tout cela '**merci**'. Je te souhaite de très belles choses pour la suite, que tu accomplisses ce qui te tiens à cœur car tu le mérites amplement.

Un grand '**merci**' également à notre '**Dr. Laurent Poulain**', de m'avoir permise d'intégrer cette belle équipe et cette grande unité ANTICIPE, il y trois ans. Merci de passer de temps en temps dans chacun de nos bureaux, entre toutes tes réunions, tous tes devoirs de direction, pour nous demander 'si ça va, si tout ce passe bien, si on a le moral...'. Tu sais être présent quand il le faut, avoir un œil critique sur chacun des projets menés au labo pour faire avancer la recherche et nos travaux respectifs. Donc pour tout cela merci, je te souhaite plein de bonheur pour la suite, que les projets continus, que la réussite soit présente pour cette belle équipe et pour toi à titre personnel.

AH !!!!! Les thésards, les copains du quotidien, '**merci**' à vous car vous avez été pour moi un rayon de soleil permanent pour ces trois ans de thèse, de la rigolade, des anecdotes folles dont 'la trottinette de monsieur P.M', des congrès avec des buffets 'hummmm'... Ma petite **Romane**, un peu comme ma petite sœur de cette aventure, mon binôme de choc chaque jour, un bonheur au quotidien, une gentillesse sans limite, un moral d'acier et une force de travail comme peu de personnes l'ont à notre époque. Toujours prête à aider les autres, 'un peu trop d'ailleurs, attention bientôt je ne serai plus là pour te dire 'stop', bref Romane tu es la plus belle personne que j'ai rencontrée ici et tu vas beaucoup me manquer. Je te souhaite tout d'abord beaucoup de réussite et de courage pour l'année prochaine même si je ne me fais aucun souci pour toi, je serai là si tu as besoin d'aide, de relecture, d'avis... et je reviendrais peut-être pour ce beau moment qui est ta soutenance. Fonce pour réaliser ce que 'toi' tu veux, avec ta moitié et ne t'arrêtes jamais.

Ensuite mon petit **Pierre-Marie**, quel personnage que tu es, plein d'humour, un grand cœur mais aussi un cerveau rempli d'informations, de connaissances et surtout une vision de la vie que je qualifie toujours de 'bisounours' !!! Il en faut des gens comme toi, qui ne voit que le positif de chacun, ça fait du bien à ce monde, 'même si tu n'as pas cessé de me taquiner avec mon sport'. Je te dis tout d'abord merci pour ton aide dans ce travail de recherche et je te souhaite surtout de très belles choses pour la suite même si je suis convaincue que tu es plus que bien parti pour réussir, avec ton 'bagou' tu arriveras loin je n'en doute pas, tu as déjà une jolie famille donc continues juste sur la même lancée.

**Hippolyte**, toi tu es la force tranquille, un peu comme Romane, tu es la bonne humeur incarnée, la joie de vivre, la gentillesse, avec une force de travail impressionnante. Surtout mon conseil continue comme ça tu iras loin, merci d'avoir été là, toujours à l'écoute, de bons conseils et toujours prêt à nous faire rire, je te souhaite de très belles choses pour ton avenir qui sera brillant c'est certain.



**Louis-Bastien**, je te mets dans les thésards même si ce n'est plus le cas mais au quotidien c'est tout comme. Merci à toi simplement pour la personne que tu es, un homme discret, calme, posé, gentil, passionné et plus que volontaire. On a peu travaillé ensemble mais beaucoup échangé ces derniers temps, tu as une force de travail et un panel de connaissances qui m'épateront toujours. Je te souhaite les plus belles choses possibles pour toi, de la réussite, du bonheur... car tu le mérites vraiment.

**Mohammad** le petit dernier, bon presque 2m de haut mais quand même. Je te souhaite une belle aventure pour tes 4 ans de thèse en France, tu sembles être une personne sensible, discrète et surtout un travailleur-né. Je crois en ta réussite, en ton binôme avec Matthieu et j'espère que tu aimeras la France.

Un dernier mot pour les anciens, tout d'abord **Mégane et Romain**, notre couple préféré, merci à vous deux chacun pour vos qualités, vous êtes de très belles personnes, la vie américaine s'ouvre à vous et vous méritez de la vivre à deux et de réussir à deux donc pleins de belles choses à vous. Merci également à **Nicolas** pour sa gentillesse, son écoute, ses conseils et pour tous les moments d'échanges sur la santé, mes brûlures, mes fractures, le sport, les voyages... Pour finir **Marie-Laure et Siham**, les thésardes de 3<sup>èmes</sup> années quand j'étais une bébé thésarde, merci pour les moments de joie passés ensemble, pour les fous-rires à table et pour nos moments de partage.

OHHH !!! Les petits stagiaires, je vous dis '**merci**' à chacun pour vos personnalités propres, chacun de vous étant unique. Mon petit '**Maugan**', tu m'as fait rire tout ce temps passé à BioTiCLA, avec nos blagues de biologiste sur le 'stress du RE' partagées avec Hippolyte, tu as tellement évolué depuis ton arrivée que tu peux être fier de toi mais ne lâche rien et continue ainsi.

Ma petite **Cécilia**, comme pour Maugan, on t'a vu grandir, évoluer et prendre un peu plus confiance en toi, bravo franchement je veux que tu ne lâches rien et quoique l'avenir te réserve, continue sur cette voie.

Puis **Maude**, ce que je n'oublierai pas c'est ton rire qui pour le coup est unique, tu es une très belle personne, je ne peux pas réellement te souhaiter la réussite car pour moi tu as déjà réussi, bravo à toi pour ce beau parcours, je te souhaite en revanche tout le bonheur du monde et que se réalisent toutes tes envies professionnelles et personnelles.

Pour finir les trois médecins, **Zoé, Léopold et Enora**, vous avez été de passage pendant ma thèse et quel passage... Merci à vous trois pour vos sourires, votre bonne humeur, pour ces petits apéritifs et ces moments de partage que ce soit au laboratoire, en congrès 'toujours près du buffet avec Enora'. Et merci aussi pour vos visions de médecins qui nous permettent de voir l'autre côté des choses.

Les plus anciens, mais les plus top ;-)

Avant toute chose un grand 'merci' à ma petite **Florence** 'alias Flo', un bélier comme moi, un grand cœur, une bonne humeur inépuisable, de l'humour comme je n'ai jamais vu et surtout une capacité d'écoute pour chacun qui est magnifique. '**Merci**' ma petite flo chérie de m'avoir aidée sur ces RNA FISH 'mission robe rouge' et sur ces immunofluo, un merci très sincère et en réalité insuffisant mais sache que je te souhaite tellement de bonheur avec ta moitié et cette petite princesse, tu feras une 'maman qui déchire' et en plus tu seras là à ma soutenance, si ça ce n'est pas génial.

Ensuite je dis un grand merci à **Emilie**, une deuxième petite pépite de ce laboratoire, pleine de joie, de bonne humeur et de volonté, '**merci**' pour tous ces moments partagés à rire et à travailler ensemble que ce soit pour la migration, l'invasion... ou encore le TP. Tu es géniale et je te souhaite plein de bonheur ma petite Emilie.

**Marie-Hélène** notre faux petit dragon qui a un si grand cœur, tu m'as fait rire de nombreuses fois avec nos moments papotages en salles de pauses, '**merci**' encore pour ton bébé bouilloire, je te souhaite de magnifiques choses pour l'avenir.

**Edwige** qui est la plus 'speed' de toutes, toujours prêtes à aider mais à vitesse grand 'V', '**merci**' pour tes expressions de normandes, pour tes 'blabla' toute seule qui nous ont fait rire, pour ton imitation de la 'tortue' pour que Mohammad comprenne, enfin merci pour tout et bonne continuation à toi.

**Monique** et ses voyages, son rire et ses aventures, '**merci**' à toi pour ces moments échangés avec nous qui furent passionnants et merci juste pour la personne que tu es je te souhaite bon courage pour l'année prochaine qui va sans doute être un peu 'HARD'.

Un grand merci aussi aux filles du bas **Marie et Mélanie** je vous souhaite plein de bonheurs, de joies, de réussites les filles, vous le méritez sincèrement.

'**Merci**' également à **Laetitia**, pour l'aide qu'elle a pu m'apporter sur de nombreuses commandes, sur l'administratif qui est juste un calvaire et merci pour les petits moments de papotages, prend soin de toi et avant tout du futur bébé qui arrive, garde ton sourire.

Ma petite **Chantal** 'alias chanchan', quel bonheur ce petit bout de femme au quotidien, avec beaucoup de goût, un parfum de vanille qui me rappelait ma maman, un sourire toujours radieux, '**merci**' ma chanchan pour tout, pour avoir été toi, une personne en OR.

Ensuite les hommes, '**merci**' à **Jérémie**, notre super copine, pour ses blagues, son rire, sa bonne humeur, tu es super ne change rien.

'**Merci**' à **Benoît** 'alias beubeu', pour sa pleine forme, sa bonne humeur, nos conversations de sportifs... je te souhaite tout pleins de belles choses pour toi et ta petite famille.

**Bernard**, notre papi, un grand '**merci**' à toi, sache que tu m'impressionneras toujours par ton savoir, ton recul, tes connaissances, tu es une superbe personne qui apporte un peu à chacun de nous, merci pour ton humour, tes conseils et tes encouragements.

Je tenais absolument à dire un grand '**MERCI**' à ceux qui m'ont permise d'en arriver jusque-là, ceux qui m'ont donné cette envie de faire cette thèse et qui m'ont accompagnée tout au long du chemin et ce encore aujourd'hui. **Sabrina, Franck** vous êtes vraiment deux personnes chères à mon cœur, à qui je dois beaucoup. Sachez que je vous dédis cet objectif, ce défis qui est ma thèse, qui pour moi est le bout du parcours et la revanche aux étapes traversées ensemble. Le reste ne sera que du bonheur, peu importe le chemin.

Et voilà, j'arrive tout de même au plus important de tous, **ma famille**. C'est avant tout à eux que je dois ma réussite; mon papa chéri, ma mamounette d'amour et mon frerot.

**Mes chers parents**, je tenais à vous dire '**merci**', merci de m'avoir éduquée comme vous l'avez fait, merci de m'avoir transmis autant de valeurs qui enrichissent ma vie et la personne que je suis. Merci d'être présents et de me soutenir à chaque étape, de toujours me pousser plus loin. Vous êtes des parents remplis de qualités, vous aimez échanger avec vos enfants, vous êtes fiers de vos enfants et on le ressent chaque jour. Sachez que je suis fière de vous en retour, je vous aime et ce pour toujours.

**Mon frerot chéri**, tu m'as toujours protégée, accompagnée et aimée. La vie n'est pas toujours simple, rose, parfaite mais elle est belle car on s'aime, on a une famille qui s'aime. Je veux que tu sache que je suis fière de toi et je te remercie d'être là pour moi. Vous êtes ma vie et je vous aime.

Je n'oublie pas ma belle-sœur, **Anne-So** qui est toujours prête à me proposer son aide pour ma thèse, mes posters, mes oraux..., que ce soit pour relire, me corriger et pour mon anglais donc pour tout ça merci, merci d'avoir toujours pensé à moi.

Je remercie aussi mes **beaux-parents** pour leurs encouragements, leur soutien, leur confiance en moi sachez que je vous aime et que je suis heureuse de vous avoir dans ma vie. Idem pour toi mon petit **Hadrien**, mon beau-frère, qui sait toujours me taquiner comme il se doit, 'potatoes power', sache que je suis fière de toi et de t'avoir dans ma vie.

Un petit mot pour mes amis qui sont chers à mon cœur, qui me soutiennent sans failles, mon **juju** et sa moitié **nana**, tu as toujours été présent pour moi mon juju, toujours positif, toujours dans l'échange et dans le soutien. Tu crois en moi bien plus que je ne crois moi-même en moi et tes mots m'ont aidé à aller au bout de cette thèse. Même dans la correction de ce manuscrit, tu t'es toujours proposé et impliqué et mes mots ne suffiront jamais pour te dire merci. Tous les deux vous êtes une force pour moi et de vrais amis, merci.

Ma **bikette** et sa moitié **nina**, ma **momo** et son **jéjé**, ainsi que ma petite **élise**, vous êtes des perles, des rayons de soleil et j'en suis là aussi grâce à vous.

Je vais finir ces remerciements par l'homme de ma vie, mon '**Jeremy**', ma vie, ma moitié, je te dis '**merci**' mais ça ne sera jamais suffisant pour tout ce que tu m'apportes, 3 ans à vivre loin l'un de l'autre, 3 ans que tu me soutiens pour chaque étapes de cette thèse, pour chaque moments qu'ils soient bons ou plus difficiles. Tu as toujours su comprendre mon objectif, me pousser, me soutenir, tu as toujours eu confiance en moi et seul TOI en était capable. Tous ces moments loin l'un de l'autre pour pouvoir construire notre futur chez nous et notre futur NOUS, pour pouvoir avoir une vie à trois puis à quatre. Je t'aimais, je t'aime et je t'aimerai : '**Together against ourselves**'.

*« Il n'est jamais trop tard pour être ce que vous auriez pu être. » – **George Eliot***

*« Les défis sont ce qui rend la vie intéressante et les surmonter est ce qui lui donne du sens. » – **Joshua Marine***

*« Les deux jours les plus importants de votre vie sont le jour où vous êtes né et le jour où vous découvrirez pourquoi. » – **Mark Twain***

*« Il n'y a qu'une seule façon d'éviter les critiques. Ne rien faire, ne rien dire, et n'être rien. » – **Aristote***







## Sommaire :

<b>Remerciements</b> .....	<b>4</b>
<b>Sommaire</b> .....	<b>12</b>
<b>Liste des Abréviations</b> .....	<b>16</b>
<b>Liste des Figures</b> .....	<b>22</b>
<b>Liste des Tableaux</b> .....	<b>26</b>
<b>Etude Bibliographique</b> .....	<b>28</b>
<b>I. Les ARNs non-codants (ARNnc)</b> .....	<b>30</b>
<b>A. Généralités</b> .....	<b>30</b>
1. Définition/origine .....	31
2. Une grande diversité d'ARNnc.....	34
a) Les ARNnc à chaîne courte.....	34
i. Les ARNs interférents.....	34
ii. Les autres petits ARNs .....	37
b) Les ARNnc à chaîne longue.....	40
<b>B. Les lncRNAs</b> .....	<b>41</b>
1. Origine des lncRNAs.....	41
2. Leurs principales fonctions .....	43
3. Les caractéristiques des lncRNAs .....	45
a) Définition et principales caractéristiques .....	45
b) Classification des lncRNAs.....	46
i. Une transcription proche des séquences codantes .....	47
ii. Une transcription éloignée des séquences codantes .....	48



4. Différents mécanismes d'action .....	49
a) Régulation épigénétique .....	51
i. Régulation de la méthylation de l'ADN.....	52
ii. Régulation des histones .....	54
iii. Les lncRNAs coordonnent différents modes de régulation épigénétique .....	57
b) Régulation génétique.....	60
i. Modifications transcriptionnelles et post-transcriptionnelles.....	60
c) Régulateurs de miARNs .....	63
i. L'origine des miARNs .....	64
ii. La biogenèse des miARNs.....	66
iii. Leurs mécanismes d'action .....	68
iv. Leurs principales fonctions en cancérologie.....	70
<b>II. Les lncRNAs en cancérologie .....</b>	<b>74</b>
<b>A. Les « hallmarks » du cancer .....</b>	<b>74</b>
1. Généralités .....	74
2. Implication des lncRNAs dans les « hallmarks » du cancer.....	76
a) Instabilités génétiques et mutations .....	76
b) Maintien de la prolifération .....	78
c) Insensibilité aux signaux supprimant la croissance de la tumeur.....	79
d) Echappement au système immunitaire .....	81
e) Inflammation tumorale .....	81
f) Réplication illimitée .....	83

g) Induction de l'angiogenèse .....	83
h) Résistance à la mort cellulaire .....	85
i) Dérégulation du métabolisme énergétique .....	87
j) Invasion et formation de métastases .....	88
<b>B. Les cancers de l'ovaire.....</b>	<b>91</b>
1. Epidémiologie .....	91
2. Les facteurs de risques.....	92
3. Les caractéristiques des cancers de l'ovaire .....	94
a) L'origine du cancer de l'ovaire .....	94
b) Stades et grades .....	96
c) Hétérogénéité moléculaire .....	98
i. Les tumeurs de type I .....	99
ii. Les tumeurs de type II.....	99
d) La prise en charge des cancers de l'ovaire .....	100
4. Les lncRNAs dans la biologie des cancers de l'ovaire.....	102
<b>C. UCA1 : un lncRNA aux multiples fonctions.....</b>	<b>105</b>
1. UCA1 dans divers cancers .....	107
2. Les mécanismes d'action connus d'UCA1 .....	108
a) Interaction avec des complexes modifiant la chromatine .....	108
b) Liaison à d'autres facteurs protéiques .....	110
c) Compétition endogène pour la liaison à des miARNs.....	111
d) Autres fonctions aux mécanismes non définis.....	112
3. UCA1 dans les cancers de l'ovaire .....	113

<b>Résultats .....</b>	<b>118</b>
<b>I. Revue: The influence of long non-coding RNAs in response to treatment         in ovarian cancer .....</b>	<b>119</b>
<b>II. Article : The long non-coding RNA ‘UCA1’ modulates the response to         chemotherapy of ovarian cancer through direct binding to miR-27a-5p         and control of UBE2N levels.....</b>	<b>150</b>
<b>III. Résultats complémentaires .....</b>	<b>195</b>
<b>A. La chimiosensibilisation induite par l’inhibition d’UCA1 dans les             cellules OAW42-R.....</b>	<b>195</b>
<b>B. L’inhibition d’UCA1 perturbe les mécanismes de réparation de             l’ADN.....</b>	<b>203</b>
<b>C. Les lncRNAs tumoraux comme potentiels marqueurs pronostiques ..</b>	<b>209</b>
<b>Matériel et Méthodes .....</b>	<b>215</b>
<b>Discussion, conclusion générale et perspectives .....</b>	<b>220</b>
<b>Références .....</b>	<b>231</b>
<b>Annexes.....</b>	<b>263</b>

## Liste des abréviations :

5-FU : 5-Fluoro-Uracile  
ADAR : Adenosine Deaminase Acting on RNA  
ADN : Acide DésoxyriboNucléique  
Ago1 : Argonaute 1  
Ago2 : Argonaute 2  
AICD : Activation-induced cell death  
AMPK : AMP-activated protein kinase  
ANRIL : Antisense non-coding RNA in the INK4 locus  
ARID1A : AT-Rich Interaction Domain 1A  
ARN : Acide Ribonucléique  
ARNi : ARN interférent  
ARNm : ARN messenger  
ARNnc : ARN non-codant  
ARN Pol II : ARN Polymérase II  
ARN Pol III : ARN Polymérase III  
ARNr : ARN ribosomique  
ARNt : ARN de transfert  
ATM : Ataxia Telangiectasia Mutated  
ATR : Ataxia Telangiectasia and Rad3 Related Protein  
AURKA : Aurora kinase A  
BRCA1 : BReast CAncer 1  
BRCA2 : BReast CAncer 2  
BRG1 : Brahma related gene 1  
BRIP1 : BRCA1 Interacting Protein C-Terminal Helicase 1  
CAR : Chimeric antigen receptor  
CARM1 : Coactivator-associated arginine methyltransferase 1  
CBX7 : Chromobox homolog 7  
CCOC : Clear cell ovarian carcinoma  
CDK : Cyclin-dependent kinase  
ceRNA : Competiting endogenous RNA  
circRNA : Circular RNA  
ciRNA : Circular intronic RNA  
CLDN11 : Claudin-11  
CNI : Chromosomal number instability

CoREST : Corepressor for repressor element-1 silencing transcription factor  
CREB : CAMP-response element binding protein  
CTNNB1 : Catenin  $\beta$ 1  
CUDR : Cancer Upregulated Drug Resistant transcript  
DCP2 : Decapping enzyme 2  
DDSR1 : DNA damage-sensitive RNA1  
DDX6 : DEAD-box Helicase 6  
DFS : Disease-free survival  
DGCR8 : DiGeorge syndrome Critical Region gene 8  
DNMT : DNA méthyl-transférase  
dsRBD : Double strand RNA Binding Domain  
eIF4 : Eukaryotic initiation factor 4  
ElcircRNA: ARN circulaires exon-introns  
elncARN : ARN enhancer unidirectionnel  
ENCODE : Encyclopedia of DNA Elements  
Endo-siRNA : siRNA endogène  
ENOC : Endometrioid ovarian carcinoma  
ERBB2 : Erb-B2 Receptor Tyrosine Kinase 2  
eRNA : ARN enhancer  
EZH2 : Enhancer of zeste homolog 2  
FGF : Fibroblast growth factor  
FFPE : Formalin-fixed paraffin-embedded  
FGFR1: Fibroblast growth factor receptor 1  
FIGO: Fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique  
FSCN1 : Fascin homologue 1  
GACAT3 : Gastric Cancer Associated Transcript 3  
GAS5 : Growth arrest specific transcript 5  
GC : Glucocorticoid  
GLUT1/4 : Glucose transporter  $\frac{1}{4}$   
GO : Gene Ontology  
GR : Glucocorticoid receptor  
GRE : Glucocorticoid response element  
HAT : Histone acétyltransférase  
HBD ou rhed : Heme Binding Domain ou RNA-binding Heme Domain  
HCC : Hepatocellular carcinoma  
HDAC : Histone désacétylase  
HGSOC : High-grade serous ovarian cancer

HIF-1 : Hypoxia Inducible Factors 1  
HMT : Histone methyl-transférase  
HNF1 $\beta$  : Hepatocyte nuclear factor-1 $\beta$   
hnRNP1 : Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein 1  
hnRNPK : Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein K  
HOTAIR : HOX Transcript Antisense RNA  
HR : Homologous recombination  
HRD : Homologous Recombination Deficiency  
Igf2 : Insulin-like growth factor type 2  
IL-6 : Interleukine-6  
IL-10 : Interleukine-10  
INK4 : Cyclin-dependent kinase inhibitors (p16INK4a, p15INK4b, p18INK4c, p19INK4d)  
kb: Kilobase  
KLF2 : Kruppel-like factor 2  
Let-7 : Lethal-7  
LGSOC : Low-grade serous ovarian cancer  
Lin-4 : Abnormal cell lineage-4  
lincRNA : Long intergenic non-coding RNA  
lncRNA : long non-coding RNA  
LSD1 : Lysine-specific demethylase 1  
MALAT1 : Metastasis Associated Lung Adenocarcinoma Transcript 1  
MAP-K : Map-kinase  
Mb : Mega base  
MEC : Matrice extracellulaire  
MEG3 : Maternally expressed gene 3  
MEGM : Mammary Epithelial Growth Medium  
MIAT : Myocardial infarction-associated transcript  
MID : Middle  
miRNA : MicroRNA  
MLH1 : MutL Homolog 1  
MMP : Matrix Metallopeptidase  
MMR : Mismatch repair  
MOC : Mucinous ovarian carcinoma  
MRE : miRNA response elements  
MSH2 : MutS Homolog 2  
MSH6 : MutS Homolog 6  
mTOR : Mammalian target of rapamycin

MVIH : Microvascular invasion in HCC  
NATs : Natural antisens transcripts  
ncRNA-a : ARN non-codant activateur  
NEAT1 : Nuclear enriched abundant transcript 1  
NF- $\kappa$ B : Nuclear factor-kappa B  
NKILA : NF- $\kappa$ B-interacting long noncoding RNA  
NORAD : Noncoding RNA Activated by DNA Damage  
Nt : Nucléotides  
OS : Overall survival  
PABP : Poly(A) binding protein  
PAN2/3 : Poly(A) ribonucléase sous-unité 2/3  
paRNA : Promoter associated lncRNA  
PARP : Poly(ADP-ribose) polymérase  
PAZ : Piwi-Argonaute-Zwile  
PCAT-1 : Prostate cancer associated transcript 1  
PCDHA : Protocadhérines-  $\alpha$   
PcG : polycomb-group proteins  
PDCD4-ASI : PDCD4-antisens RNA I  
PGK1 : Phosphoglycerate kinase 1  
PI3-Kinase : Phosphoinositide 3-kinase  
PIK3CA : Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphate 3-Kinase Catalytic Subunit Alpha  
piRNA : Piwi-interacting RNAs  
PMS2 : PMS1 Homolog 2  
PPP2R1A : Protein Phosphatase 2 Regulatory subunit 1A  
PRC1 : Polycomb Repressive Complex 1  
PRC2 : Polycomb Repressive Complex 2  
pre-miARN : miARN précurseur  
pri-miARN : miARN primaire  
pRNA : Promoter associated RNA  
PTEN : Phosphatase and TENsin homolog  
rasiRNA : Repeat associated small interfering RNA  
RB : Retinoblastoma-associated  
REST : Repressor element-1 silencing transcription factor  
RISC : RNA induced Silencing Complex  
RLC : Risc Loading Complex  
ROS : Reactive oxygen species  
siRNA : Short interfering RNA

SNORDs : C/D-box snoARNs  
snoRNA : Small nucleolar RNA  
snRNA : Small nuclear RNA  
SP1 : Specificity protein 1  
spliRNAs: Splice-site RNA  
sRNA : LncRNA exonique sens  
SRp40 : Serine/arginine-rich splicing factor 5  
STAT3 : Signal transducer and activator of transcription 3  
SUZ12 : Suppressor of zeste 12 homolog  
tel-sARN : Telomere specific small RNA  
TEM : Transition épithélio-mésenchymateuse  
TERC : Telomerase RNA Component  
TERRA : LncRNA associé aux télomères  
TERT : Telomerase Reverse Transcriptase  
TGA : Transcriptional gene activation  
TGS : Transcriptional gene silencing  
TIP5 : Transcription termination factor I interacting protein 5  
tiRNA : Transcription initiation RNA  
TNRC6 : Trinucleotide repeat-containing gene 6  
TP53 ou p53 : Tumor protein 53  
TRBP : Trans-Activation Response RNA binding protein  
TSSA-RNAs : Transcription Start Site Associated RNAs  
TU : Transcription Unit  
TUG1 : Taurine-upregulated gene 1  
TXG : Trithorax groupe  
uaRNA : LncRNA associé au 3'-UTR  
UCA1 : Urothelial Cancer Associated 1  
VEGF : Vascular endothelial growth factor  
VEGFR : Vascular Endothelial Growth Factor Receptor  
vlincRNA : Very long intergenic ncRNA  
WIF-1 : WNT inhibitory factor 1  
XIST : X-inactive specific transcript  
ZEB1 : Zinc Finger E-Box Binding Homeobox 1  
ZEB2 : Zinc Finger E-Box Binding Homeobox 2





## Liste des figures :

<b>Figure I.A1</b> : Représentation schématique, différenciant les gènes codants et les gènes non-codants pour des protéines.....	<b>p 30</b>
<b>Figure I.A2</b> : La proportion d'ADN non-codant augmente avec la complexité des espèces.....	<b>p 31</b>
<b>Figure I.A3</b> : Chronologie des découvertes majeures en lien avec la biologie et le rôle des ARNs non-codants.....	<b>p 33</b>
<b>Figure I.A4</b> : Mécanismes de synthèse et modes de régulation des petits ARNs interférents : siRNA, miRNA et piRNA.....	<b>p 35</b>
<b>Figure I.A5</b> : Mécanisme de régulation de la transcription par les enhancers.....	<b>p 38</b>
<b>Figure I.A6</b> : Modes d'action des eRNAs.....	<b>p 38</b>
<b>Figure I.A7</b> : Structure secondaire des C/D-box snoARNs et hybridation en antisens avec les ARNs cibles.....	<b>p 39</b>
<b>Figure I.A8</b> : Structure secondaire du promoteur de l'ADNr, présentant la séquence d'un pRNA (en rouge) et la présence de deux box, A et B (en bleu), ayant une interaction très conservée chez les animaux métazoaires.....	<b>p 40</b>
<b>Figure I.A9</b> : Représentation schématique de la régulation en Cis ou Trans par les lncRNAs.....	<b>p 40</b>
<b>Figure I.A10</b> : Les domaines d'interactions des lncRNAs.....	<b>p 41</b>
<b>Figure I.B1</b> : Origine génomique des lncRNAs, selon leur localisation par rapport à des gènes codants pour des protéines (Group I), des éléments régulateurs (Group II) ou des régions chromosomiques (Group III).....	<b>p 42</b>
<b>Figure I.B2</b> : Exemples d'associations entre lncRNAs et diverses pathologies cancéreuses.....	<b>p 44</b>
<b>Figure I.B3</b> : Principaux modes d'action des lncRNAs.....	<b>p 46</b>
<b>Figure I.B4</b> : Autres classification des principaux mécanismes d'actions des lncRNAs....	<b>p 51</b>
<b>Figure I.B5</b> : Rôles des ARNs non-codants dans les mécanismes épigénétiques du contrôle de l'expression des gènes, impliquant la méthylation de l'ADN, la modification des histones et le changement conformationnel de la chromatine.....	<b>p 52</b>
<b>Figure I.B6</b> : Méthylation de l'ADN.....	<b>p 53</b>

<b>Figure I.B7</b> : Régulation de la méthylation de l'ADN par les lncRNAs.....	<b>p 54</b>
<b>Figure I.B8</b> : Les modifications post-traductionnelles des histones.....	<b>p 55</b>
<b>Figure I.B9</b> : Implication des lncRNAs dans la régulation des histones.....	<b>p 56</b>
<b>Figure I.B10</b> : Implication des lncRNAs dans le remodelage de la chromatine et dans la progression du cancer, par leur association avec les complexes SWI/SNF.....	<b>p 57</b>
<b>Figure I.B11</b> : Adressage du complexe PRC2 par le lncRNA MEG3 dans des régions en « GA » par formation de triple hélice ADN-ADN-ARN.....	<b>p 59</b>
<b>Figure I.B12</b> : Le lncRNA HOTAIR permet de coordonner diverses activités épigénétiques inhibitrices de la transcription dans un même locus.....	<b>p 59</b>
<b>Figure I.B13</b> : Implication du lncRNA GAS5 dans la régulation négative de l'expression de gènes, favorisant le développement du cancer.....	<b>p 61</b>
<b>Figure I.B14</b> : Les lncRNAs sont impliqués dans la régulation post-transcriptionnelle des ARNm par complémentarité de séquence.....	<b>p 62</b>
<b>Figure I.B15</b> : Mécanismes d'action de divers lncRNAs nucléaires.....	<b>p 63</b>
<b>Figure I.B16</b> : Liens fonctionnels entre lncRNAs et miRNAs.....	<b>p 64</b>
<b>Figure I.B17</b> : Origines génomiques des miARNs.....	<b>p 65</b>
<b>Figure I.B18</b> : La biogenèse des miRNAs.....	<b>p 67</b>
<b>Figure I.B19</b> : Interaction entre un miRNA et un ARNm cible.....	<b>p 69</b>
<b>Figure I.B20</b> : Les miRNAs ont un mode d'action multicible.....	<b>p 70</b>
<b>Figure I.B21</b> : Implication des miRNAs dans les 'hallmarks' du cancer.....	<b>p 71</b>
<b>Figure II.A1</b> : Les différents 'hallmarks' du cancer.....	<b>p 75</b>
<b>Figure II.A2</b> : Implication des lncRNAs dans les 'hallmarks' du cancer.....	<b>p 76</b>
<b>Figure II.A3</b> : Implication du lncRNA NORAD dans l'intégrité du génome.....	<b>p 77</b>
<b>Figure II.A4</b> : Régulation de la réparation des cassures doubles brins par le lncRNA DDSR1.....	<b>p 78</b>
<b>Figure II.A5</b> : Le lncRNA ANRIL régule l'expression des gènes, p15/CDKN2B, p16/CDKN2A et p14/ARF (localisés sur le même locus qu'ANRIL), par le recrutement des complexes PRC2 et PRC1, via leurs sous-unités respectives SUZ12 et CBX.....	<b>p 80</b>

<b>Figure II.A6</b> : La cytokine 'IL-6' est impliquée dans divers processus oncogénique.....	<b>p 82</b>
<b>Figure II.A7</b> : Représentation schématique du switch angiogénique, se produisant suite à un déséquilibre entre les facteurs anti- et pro-angiogénique, avec une croissance tumorale stimulée par l'accumulation de facteurs pro-angiogénique.....	<b>p 84</b>
<b>Figure II.A8</b> : Représentation schématique des protéines de la famille Bcl-2.....	<b>p 85</b>
<b>Figure II.A9</b> : Représentation schématique des différentes voies métaboliques utilisées par les cellules non proliférantes (normales) et les cellules proliférantes, normales ou tumorales (Effet warburg).....	<b>p 87</b>
<b>Figure II.A10</b> : Représentation schématique de la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM ou EMT) et des facteurs associés au phénotypes épithélial ou mésenchymateux.....	<b>p 89</b>
<b>Figure II.B1</b> : Estimation de l'incidence et de la mortalité des cancers de l'ovaire en France, en 2018.....	<b>p 91</b>
<b>Figure II.B2</b> : L'origine des cancers de l'ovaire.....	<b>p 95</b>
<b>Figure II.B3</b> : Les tumeurs de l'ovaire.....	<b>p 96</b>
<b>Figure II.B4</b> : Répartition des types histologiques des cancers épithéliaux de l'ovaire et de leurs altérations génétiques les plus fréquentes dans les cancers de type I ou de type II.....	<b>p 100</b>
<b>Figure II.B5</b> : Impact de la taille du résidu tumoral post-chirurgical sur la survie globale.....	<b>p 101</b>
<b>Figure II.B6</b> : LncRNAs ayant un rôle dans les cancers de l'ovaire et leurs mécanismes associés.....	<b>p 103</b>
<b>Figure II.C1</b> : Cartographie du gène d'UCA1 sur le chromosome 19p13.12.....	<b>p 105</b>
<b>Figure II.C2</b> : Les deux principales isoformes du lncRNA UCA1.....	<b>p 106</b>
<b>Figure II.C3</b> : Evolution du nombre de publication concernant le lncRNA UCA1.....	<b>p 107</b>
<b>Figure II.C4</b> : Divers mécanismes moléculaires oncogéniques dans lesquels le lncRNA UCA1 est impliqué.....	<b>p 108</b>

<b>Figure II.C5</b> : Représentation schématique du mécanisme moléculaire associant UCA1 et EZH2 dans l'activation de la prolifération cellulaire et dans la progression du cancer gastrique.....	<b>p 109</b>
<b>Figure II.C6</b> : Représentation schématique d'UCA1 régulant négativement l'apoptose induite par le cisplatine et la gemcitabine, en association avec CREB et le miR-196a-5p.....	<b>p 110</b>
<b>Figure II.C7</b> : Régulation positive de l'expression d'UCA1 par divers facteurs de transcriptions.....	<b>p 111</b>
<b>Figure II.C8</b> : Mode de régulation de la voie de signalisation Hippo-YAP par UCA1 dans les cancers de l'ovaire.....	<b>p 114</b>
<b>Figure Discussion</b> : Rôles des différents types de protéines ubiquitine ligases (E1, E2 et E3) dans le processus d'ubiquitination des protéines .....	<b>p 228</b>

## Liste des tableaux :

**Tableau II.1 :** Exemple de l'implication de multiples lncRNAs dans un panel de cancers.....p 74

**Tableau II.B1 :** Ensemble des facteurs de risques ayant une influence positive ou négative sur la survenue des cancers de l'ovaire.....p 94

**Tableau II.B2 :** Les 4 stades des cancers regroupant, les ovaires, les trompes de Fallope et le péritoine, suivant la classification FIGO de 2014.....p 97

**Tableau II.B3 :** Les 5 sous-types histologiques des carcinomes ovariens.....p 98



## **Etude Bibliographique**

---

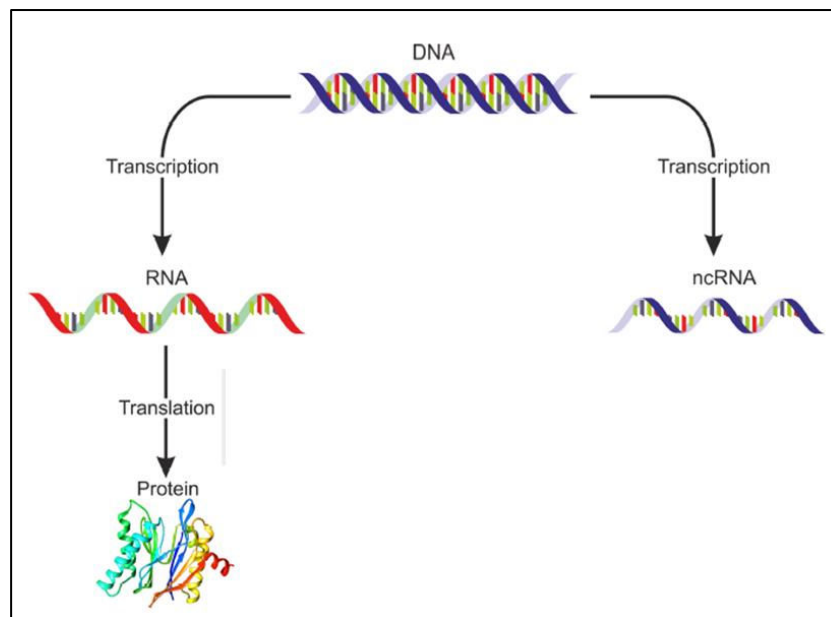




# I. Les ARNs non-codants (ARNnc)

## A. Généralités

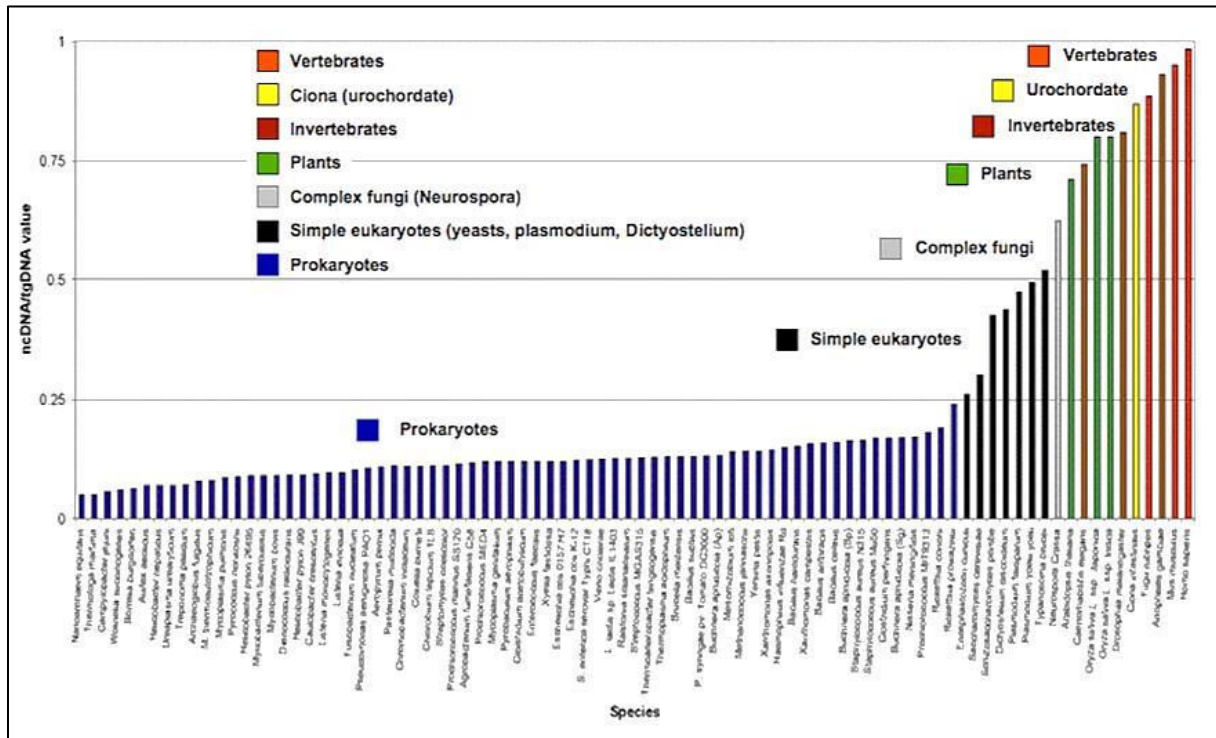
Depuis le début des années 2010, le dogme central de la transmission de l'information génétique a été remis en question. Ce dogme est décrit comme un passage de l'information génétique de l'ADN aux protéines *via* les ARN messagers (ARNm), qui ne présenteraient qu'un simple rôle d'intermédiaires dans les processus d'expression génique, passant par la transcription, la traduction et aboutissant à la mise en place des grandes fonctions biologiques cellulaires. Il est important de souligner qu'environ 80% de notre génome est transcrit en ARNs et que seulement 2% de ces ARNs codent pour des protéines (Peschansky and Wahlestedt, 2014), ces transcrits sont donc majoritairement non-codants (Berretta and Morillon, 2009; Clark et al., 2011; Meseure, 2016; Ponting et al., 2009) (**Figure I.A1**).



**Figure I.A1 : Représentation schématique, différenciant les gènes codants et les gènes non-codants pour des protéines adapté de (Slaby et al., 2017).**

De plus, on sait à ce jour que le développement et la complexité physiologique d'un organisme ne sont pas directement corrélés au nombre de gènes codant pour des protéines. Dans le cas de l'*Homo sapiens* et de *Caenorhabditis elegans*, on compte environ 20 000 gènes codants (Mattick, 2011) et dans le cas de *Drosophila melanogaster* environ 13 500, ce qui signifie que le nombre de gènes codants ne permet pas d'expliquer la complexité propre de ces organismes. En revanche, *Ryan J. Taft, Michael Pheasant, et John S. Mattick*, ont

mis en évidence une corrélation positive entre la proportion d'ADN non-codant et la complexité des organismes (**Figure I.A2**) (Mattick, 2004; Taft et al., 2007), démontrant la réelle importance de la fraction non codante de notre génome.



**Figure I.A2 : La proportion d'ADN non-codant augmente avec la complexité des espèces (Mattick, 2011) adapté de (Taft et al., 2007).**

## 1. Définition/origine

Les ARNs non-codants (ARNnc) ont longtemps été considérés comme de l'ADN poubelle n'ayant aucune fonctionnalité, mais de plus en plus d'études montrent que ces ARNnc catalytiques, structuraux ou régulateurs peuvent être fonctionnels (Peschansky and Wahlestedt, 2014).

Dans les années 50, il a été défini que l'ADN se situait dans le noyau, que les protéines étaient synthétisées dans le cytoplasme par l'intermédiaire d'ARNs présents au niveau de ribosomes (Eddy, 2001). James Watson faisait part de l'hypothèse dite « un gène, un ribosome, une protéine » qui signifiait que chaque gène produisait un ribosome spécifique, composé d'un ARNm spécifique associé à des protéines ribosomiques permettant de catalyser la traduction. Une théorie qui a rapidement été invalidée, notamment par la simple observation que les gènes sont d'une grande variété de tailles et de compositions alors que les ARNs ribosomiques (ARNr) sont non variés et stables. C'est le début de l'identification des ARNr comme étant des ARNs non traduits. Une deuxième

classe d'ARNs fonctionnels non codants a été ensuite identifiée par Francis Crick nommée 'ARNs adaptateurs', des intermédiaires clefs de la traduction en association avec les ARNm assurant ainsi le lien entre code génétique et acide aminé. Ces mêmes 'adaptateurs' ont parallèlement été mis en évidence biochimiquement par *Mahlon Hoagland* et son équipe, ce sont les ARNs de transfert (ARNt) (Eddy, 2001). Pendant longtemps les ARNm, ARNr et ARNt sont apparus comme les seuls ARNs fonctionnels de notre génome.

Par la suite, des années 60 à 80, la découverte des introns a permis d'identifier et de mieux comprendre le rôle d'autres ARNnc tels que les ARNs nucléaires (ARNsn ou snRNAs) présents dans le spliceosome, ou les ARNs nucléolaires (ARNsno ou snoRNAs) (Hannon et al., 2006). Il est alors apparu la notion d'ARNs catalytiques ayant des rôles dans le clivage des ARNs ou dans l'épissage des introns grâce à leur structure second-tertiaire spécifique et témoignant d'une complexité d'action supplémentaire des ARNnc (**Figure I.A3**).

Depuis les années 90, un développement important des méthodes de génomique et de transcriptomique, comprenant le microarray et plus récemment le séquençage à haut débit (NGS) est observé, et s'accompagne de progrès dans nos capacités à analyser ces données grâce au développement des programmes d'analyses bio-informatiques de plus en plus perfectionnés. Ces évolutions ont permis *in fine* de séquencer des génomes complets, comme le génome humain en 2001, ainsi que la séquence génomique de différents organismes complexes ces dernières années, de revoir l'organisation fonctionnelle du génome, permettant l'identification d'un ensemble d'ARNs codants et non-codants présents dans notre génome. Toutes ces données sont recensées dans une encyclopédie nommée 'GENCODE/ENCODE' (Encyclopedia of DNA Elements) et en 2014, une proposition de classification a recensé 100 000 ARNnc, un nombre qui s'avère bien supérieur au nombre des ARNs codants. Ces techniques ont également permis d'identifier de nouveaux ARNnc comme les ARNnc régulateurs dont les petits ARNs interférents et les longs ARNs non-codants (lncRNAs) mais la compréhension exacte, des réseaux, des mécanismes et des fonctions de ces ARNnc, est encore loin d'être complète. Tout ceci met en évidence une complexité et une flexibilité du transcriptome humain ayant permis de faire évoluer notre vision sur le rôle des gènes non-codants (Hannon et al., 2006; St Laurent et al., 2014).

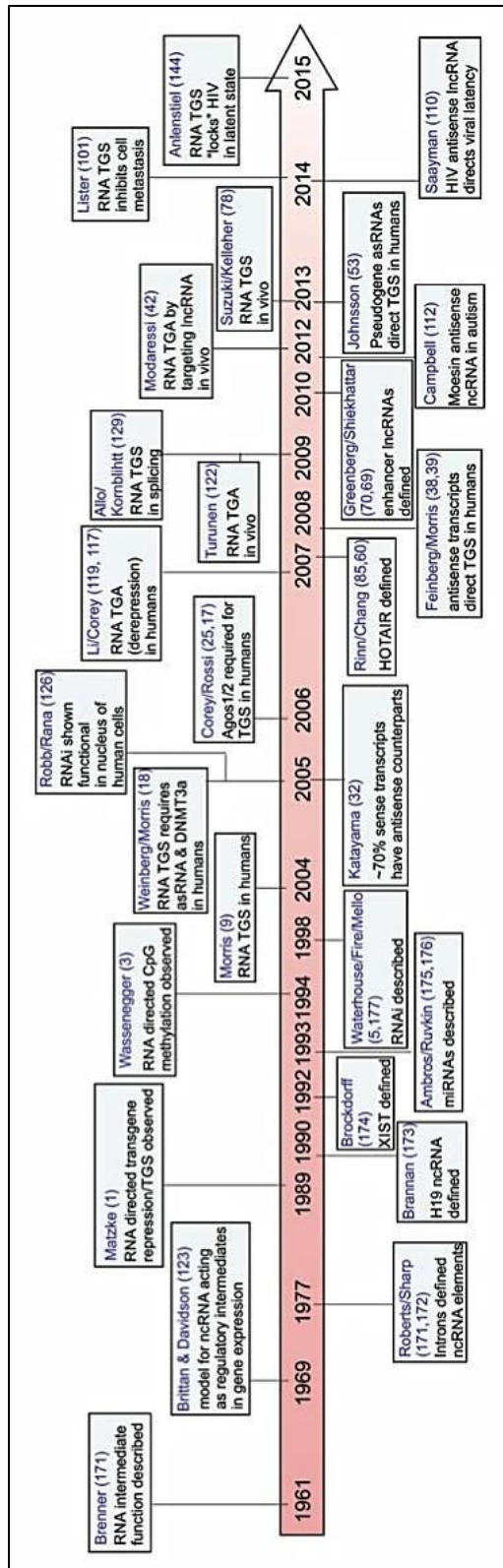


Figure I.A3 : Chronologie des découvertes majeures en lien avec la biologie et le rôle des ARNs non-codants. (TGS : Transcriptional gene silencing, TGA: Transcriptional gene activation). (Weinberg and Morris, 2016)

## 2. Une grande diversité d'ARNnc

A ce jour, les ARNnc fonctionnels connus sont subdivisés en deux catégories principales, les ARNnc à chaîne courte ou petits ARNs non-codants et ceux à chaîne longue, les longs ARNs non-codants nommés lncRNAs. A cause de la grande diversité du monde des ARNnc, tous ne seront pas décrits dans ce manuscrit (Sabin et al., 2013).

### a) Les ARNnc à chaîne courte

Les ARNnc à chaîne courte sont caractérisés par une taille comprise entre environ 18 et 200nt (nucléotides), et généralement obtenus à partir de longs précurseurs endogènes.

Il existe un très grand nombre de petits ARNnc qui sont souvent classés en fonction de leurs origines génomiques et de leurs mécanismes d'action. Ces petits ARNs non-codants comprennent les petits ARNs interférents, dont les siRNAs (small-interfering-RNAs), les miRNAs (micro-RNAs), les piRNA (Piwi-interacting RNAs), ceux associés aux séquences répétées (rasiRNAs) et les ARNs d'initiation de la transcription (tiRNAs). Puis comprennent également, les 'autres petits ARNs non-codants' tels que les ARN associés aux enhancers (eRNAs), ceux associés aux promoteurs (pRNAs), les petits ARNs nucléolaires (snoRNAs et CD-box snoRNAs), les ARNs associés au site de départ de la transcription (TSSA-RNAs), les petits ARNs spécifiques au télomère (tel-sRNAs)... L'ensemble de ces catégories témoigne de la diversité de ces petits ARNs non-codants (Farazi et al., 2008; Kim and Reitmair, 2013; Meseure, 2016), dont seule une fraction de chacune des catégories sera abordée dans ce manuscrit.

#### i. Les ARNs interférents

La découverte des ARNi a permis la mise en évidence de leur rôle régulateur sur l'expression génique, soit grâce à leur complémentarité de séquence avec l'ARN cible, soit grâce au ciblage, des ARNs naissants à partir de séquences répétées ou directement de l'ADN de ces régions. Par la suite, la régulation transcriptionnelle se fait grâce à la prise en charge de ces ARNi par des protéines membres de la famille Argonaute, comprenant les protéines AGO, au nombre de 4 (Ago1, 2, 3, 4), ou les protéines PIWI, HIWI et HILI (**Figure I.A4**) (Farazi et al., 2008; Höck and Meister, 2008; Sabin et al., 2013). C'est un mécanisme conservé au cours de l'évolution, démontrant le rôle essentiel des petits ARNs non-codants, comme le démontrent les travaux de *Fire* et *Mello*, publiés en 1998, concernant l'inhibition de l'expression de gène par un ARN double brin chez *C.elegans* (Fire et al., 1998). Cette

découverte majeure a été récompensée par un prix Nobel en 2006 (Fire et al., 1998), car elle a permis de changer la vision sur les fonctions régulatrices des petits ARNs ainsi que d'envisager de nouveaux outils accélérant grandement la recherche en biologie.

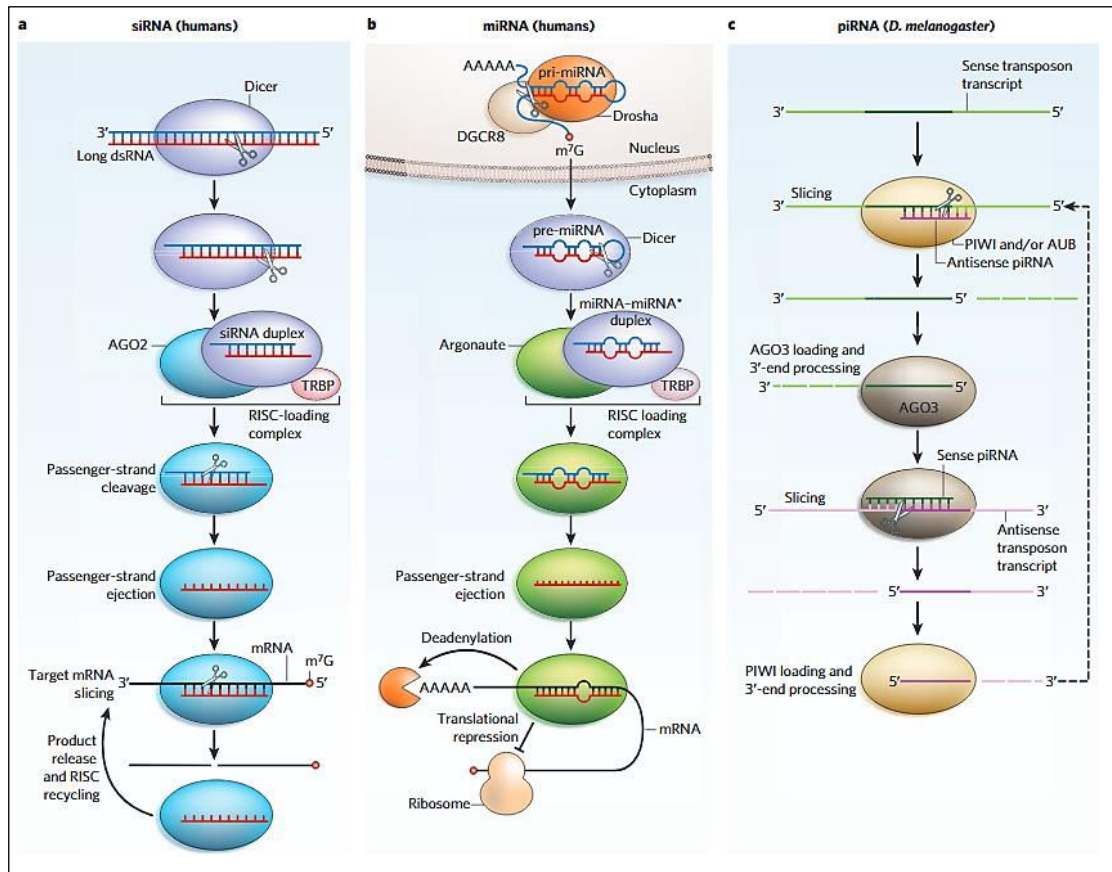


Figure I.A4 : Mécanismes de synthèse et modes de régulation des petits ARNs interférents : siRNA, miRNA et piRNA. (Jinek and Doudna, 2009)

Les siARNs peuvent dériver de longs ARNs double brin exogènes clivés par DICER et formant un siARN double brin de 19 à 24 nt. Ce duplexe est pris en charge par un complexe nommé RISC (RNA induced Silencing Complex) constitué de protéines dont Ago2 et l'un des deux brins (le brin passager) est dégradé. Ces siARNs agissent sur leur cible à la condition d'une complémentarité de séquence entre le brin « guide » du siARN et la séquence ARN cible. L'appariement doit être parfait, notamment entre les bases 9-11 du siARN, afin que l'activité « slicer » d'Ago2 puisse agir et cliver la séquence cible, qui sera alors rapidement dégradée. Ce mécanisme constitue le 'Silencing génique' au niveau post-transcriptionnel (Ghildiyal and Zamore, 2009; Jinek and Doudna, 2009; Qureshi and Mehler, 2012).

Il existe également des siARNs endogènes, qui ont été découverts tout d'abord chez les plantes et chez *C.elegans* puis plus récemment chez la mouche du vinaigre et les

mammifères pouvant suggérer leur présence chez les eucaryotes supérieurs (Ghildiyal and Zamore, 2009). Ce sont des ARNs encore mal connus à ce jour, mais dont les fonctions semblent similaires aux siARNs exogènes. Les premiers endo-siARNs découverts chez les mammifères correspondaient au rétrotransposon Line-1, puis ils ont été mis en évidence dans des cellules germinales et somatiques de drosophile et d'ovocyte de souris où ils présentent une taille constante de 21nt et une orientation à la fois sens et antisens. Ils proviennent de plusieurs localisations génomiques. Que ce soit à partir de la transcription de transposons orientés de façon inversée, de transcription bidirectionnelle, de transcription convergente, leur synthèse dépend de DICER et ils sont également associés à Ago2. A ce jour, leurs mécanismes d'action et leurs fonctions exactes restent à identifier (Ghildiyal and Zamore, 2009).

Les '**miARNs**' sont des ARN d'environ 19 à 24nt et sont les plus étudiés à ce jour. Ils sont endogènes, générés suite à un clivage par DICER à partir de précurseur d'ARN double brin et pris en charge par le complexe RISC tout comme les siARNs. Les protéines Ago sont toutes capables de prendre en charge les miARNs mais seule Ago2 est capable ensuite d'inhiber l'expression des ARNm et de les couper en cas d'appariement parfait entre le miARN et sa cible. Cette protéine est la plus exprimée chez l'homme et possède également le nom de « slicer » au regard de sa capacité endonucléolytique (Meister and Tuschl, 2004). Les miARNs permettent une régulation négative de l'expression génique au niveau post-transcriptionnel (Filipowicz et al., 2008; Jinek and Doudna, 2009) et leur mode d'action ainsi que leurs fonctions seront davantage détaillés plus loin dans cette introduction.

Les '**piARNs**' sont connus pour être composés de 26 à 31nt, et sont synthétisés indépendamment de DICER, contrairement aux siARNs et aux miARNs. Un précurseur à chaîne unique permet la formation de plusieurs piARNs et environ 50 000 ont été dénombrés à ce jour (Lin, 2007). C'est une classe de petits ARNnc initialement spécifique à la lignée germinale (Sabin et al., 2013), mais aussi identifiée dans les cellules somatiques plus récemment (Qureshi and Mehler, 2012). Ils sont connus pour leur spécificité de liaison à leur cible dite « additive ». Contrairement aux siARNs qui nécessitent un appariement parfait avec leurs cibles pour agir, les piARNs peuvent présenter différents degrés d'efficacité d'action, des décalages ou des mutations de séquence créant un appariement imparfait entre cet ARNnc et sa cible, engendrant ainsi une diminution de son efficacité et non pas une inhibition complète de son activité (Huang et al., 2013). Ils sont capables de se lier aux protéines Piwi et non aux protéines Ago. PIWI est un facteur de liaison à la chromatine et est associé aux PcG (nuclear Polycomb Group) tels que PRC1/PRC2 (Wei et al., 2017). Ces derniers sont des complexes régulateurs épigénétiques catalysant l'ajout de modifications



post-traductionnelles sur les histones réprimant l'activité transcriptionnelle, définissant ainsi un rôle de régulateur épigénétique des piARNs. Les piARNs dérivés de séquences répétées, comme celles des transposons, sont impliqués dans la régulation négative de l'activité de ces transposons. Plus récemment certains piARNs ont pu être identifiés comme impliqués dans la modulation de l'expression génique (Qureshi and Mehler, 2012) en régulant positivement la stabilité et la traduction des ARNm comme PIWI chez la drosophile et MIWI un homologue de PIWI chez la souris, contrairement aux siARNs et aux miARNs (Lin, 2007).

## ii. Les autres petits ARNs

Il existe diverses autres classes de petits ARNs dont ceux impliqués dans la modification d'autres ARNs comme les snoARNs, les pARNs, et d'autres encore mal caractérisés à ce jour tels que les tiARNs, les spliARNs (splice-site RNA)...

Les '**eARNs**' sont des ARNnc transcrits à partir des régions enhancers des gènes grâce à l'ARN polymérase II et ont été identifiés pour la première fois en 2010. Les enhancers sont des régions cis-régulatrices distales, c'est à dire qu'ils catalysent la formation de boucles sur un même brin d'ADN, permettant la mise en contact de deux régions génomiques pourtant éloignées. Cette mise en relation a pour effet d'amener des éléments régulateurs activateurs de la transcription dans le promoteur du gène cible (**Figure I.A5**). Les eARNs sont classés en deux groupes, les 1D eARNs sont connus pour avoir une taille supérieure à 4kb, pour être polyadénylés et pour être transcrits de façon unidirectionnelle, et les 2D eARNs, qui diffèrent par leur taille inférieure à 2kb, leur état non polyadénylé et par leur transcription bidirectionnelle. Les mécanismes moléculaires mis en place par ces eARNs sont encore mal connus mais il a tout de même été démontré qu'ils sont impliqués dans l'activité de ces enhancers en régulant la formation des boucles enhancer-promoteur, l'accessibilité à la chromatine, ou encore le recrutement de médiateurs au niveau des promoteurs. Ces eARNs sont ainsi impliqués dans la régulation de la transcription des gènes et dans la dynamique des modifications d'histones propre aux enhancers telle que H3H4me1 (**Figure I.A6**). Les eARNs sont instables et possèdent une demi-vie courte. Une expression anormale de ces ARNnc est connue pour être impliquée dans diverses pathologies comme le diabète, les maladies neurodégénératives ou le cancer (Ding et al., 2018; Ren et al., 2017).

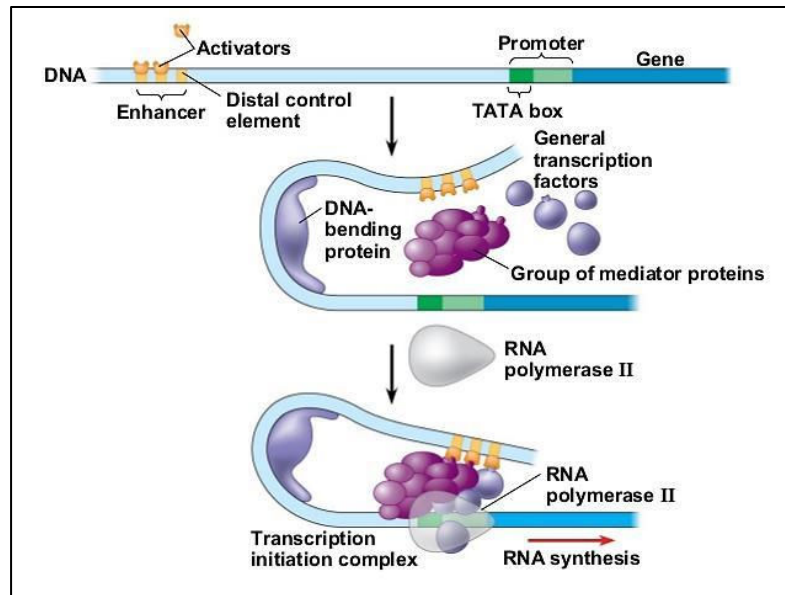


Figure I.A5 : Mécanisme de régulation de la transcription par les enhancers.  
<http://advancedtranscription16.blogspot.com/p/overview.html>

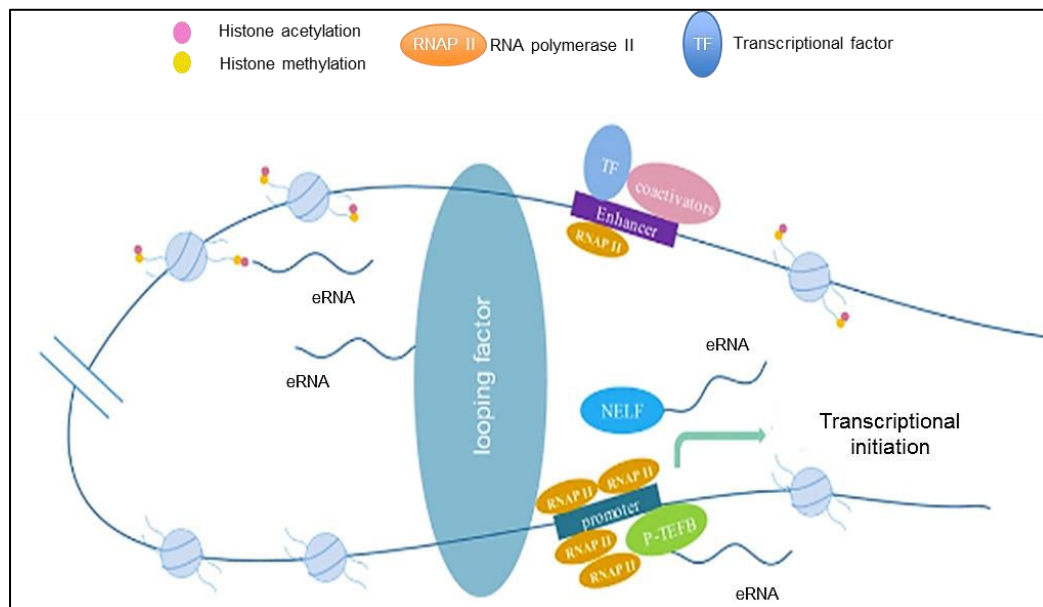
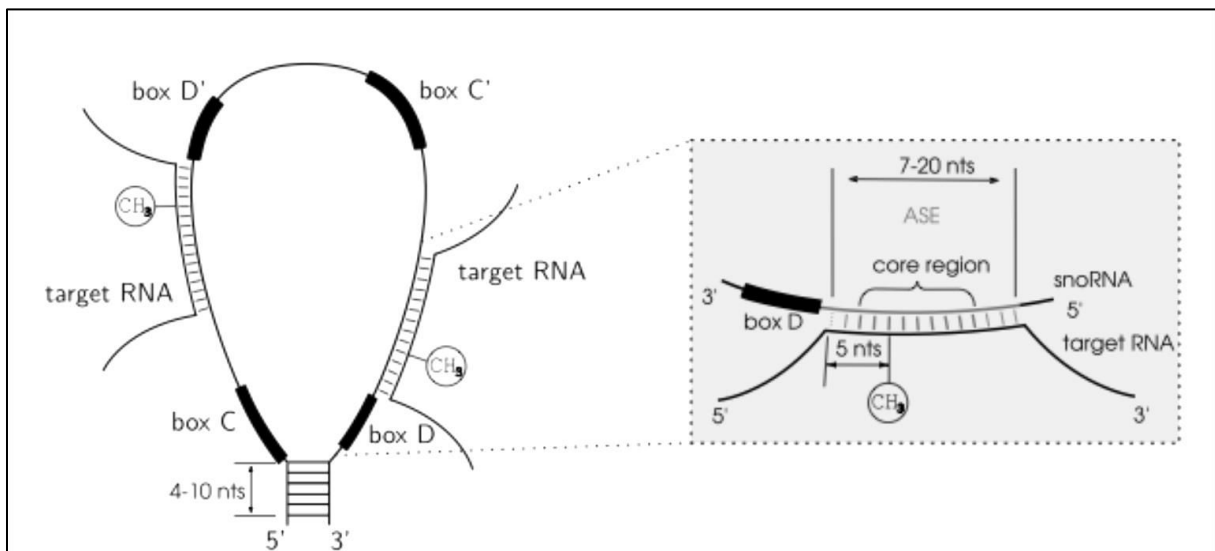


Figure I.A6 : Modes d'action des eRNAs :

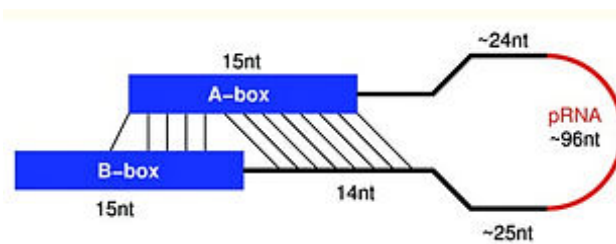
(i) L'interaction des eRNAs avec les facteurs associés aux boucles enhancer-promoteur favorise l'interaction enhancer-promoteur et ainsi l'activation transcriptionnelle; (ii) Les eRNAs régulent positivement la transcription en activant le facteur d'élongation P-TEFB, ou en agissant comme leurre (Decoy) du facteur d'élongation négatif (NELF). Adapté à partir de (Ding et al., 2018).

Les '**C/D-box snoARNs**' (SNORDs) sont des petits ARNnc mesurant de 60 à 300 nt dérivant des introns et sont fortement exprimés. Les SNORDs contiennent des éléments de séquence appelés boîtes C (RUGAUGA, R=purine) et D (CUGA) bien conservées et présentes sous forme de duplicats, avec C' et D' qui elles sont moins conservées, avec jusqu'à deux boîtes antisens s'hybridant aux ARNr cibles (**Figure I.A7**). Les snoARNs contenant ces boîtes C et D ont été démontrés comme ayant une complémentarité parfaite pour des régions des ARNr matures 18S et 25-28S, dont ils favorisent la maturation notamment par 2'-O-méthylation. Leurs rôles sont toutefois variés, et ils sont également impliqués dans la régulation de l'épissage alternatif des pré-ARNm ou encore participent à la formation de divers complexes ribonucléoprotéiques (Falaleeva et al., 2016, 2017; Kiss-László et al., 1996).



**Figure I.A7 : Structure secondaire des C/D-box snoARNs et hybridation en antisens avec les ARNs cibles (Kehr et al., 2013).**

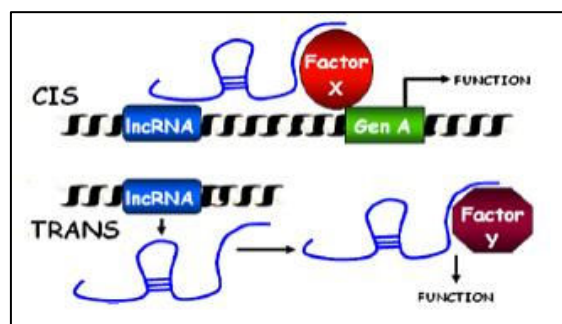
Les '**pARNs**' sont des ARNnc d'une taille d'environ 90 à 100 nt et sont associés aux promoteurs. Ils chevauchent le promoteur de l'opéron des ARNr situé en amont du site de départ de la transcription des pré-ARNr (**Figure I.A8**). Ces pARNs agissent comme des régulateurs des ARNr grâce à la liaison de leur structure en tige-boucle avec TIP5 (transcription termination factor I interacting protein 5) qui est la grande sous-unité du complexe NoRC. Ce complexe est impliqué dans le remodelage chromatinien, permettant le recrutement d'enzymes pour la formation d'hétérochromatine et sert de médiateur pour l'inhibition de l'expression des gènes ARNr. L'extrémité 5' de ces pARNs permet le recrutement de l'ADN-méthyltransférase (DNMT) sur l'ADNr et la formation d'un complexe ADN-ARN permettant l'hyperméthylation de l'ADN (Guil and Esteller, 2012; Wehner et al., 2014).



**Figure I.A8 : Structure secondaire du promoteur de l'ADNr, présentant la séquence d'un pRNA (en rouge) et la présence de deux box, A et B (en bleu), ayant une interaction très conservée chez les animaux métazoaires (Wehner et al., 2014).**

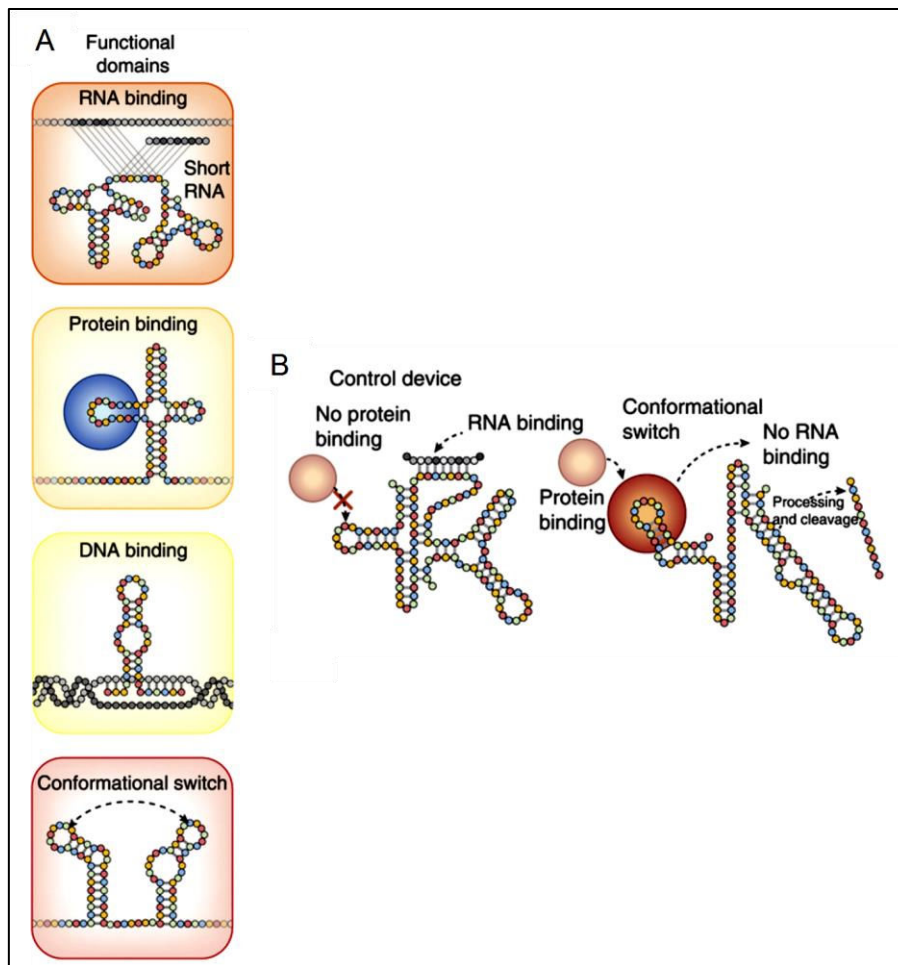
## b) Les ARNnc à chaîne longue

Les ARNs non-codants à chaîne longue (lncRNAs) sont définis comme des transcrits de taille supérieure à 200nt, sans potentiel codant (Sabin et al., 2013). Bien qu'un petit nombre de lncRNAs aient été mis en évidence depuis de nombreuses années, tel que Xist, leur grand nombre et leur diversité n'ont été découverts et étudiés que bien après les petits ARNnc grâce notamment au développement des techniques de séquençage haut débit. Ces lncRNAs représentent la classe majoritaire des ARNnc (Ma et al., 2013). Ils possèdent en majorité des rôles régulateurs de l'expression des gènes, et contrairement aux protéines, ils affichent une fonctionnalité directe après leur transcription sans nécessité de transport nucléo-cytoplasmique ou encore de traduction. Ils sont aptes à agir directement au niveau de leur site de transcription (en « cis ») ou à distance (en « trans ») (**Figure I.A9**). Ils sont capables de former des complexes avec des protéines, des ARNs ou encore avec l'ADN (**Figure I.A10**). Leurs mécanismes d'action, très variés, sont encore mal définis (Mercer et al., 2009; Meryet-Figuère et al., 2016; Whitehead et al., 2009).



**Figure I.A9 : Représentation schématique de la régulation en Cis ou Trans par les lncRNAs.**

En Cis, la régulation du lncRNA a lieu sur un gène situé sur son chromosome d'origine, en Trans elle a lieu sur un autre chromosome (Garitano-Trojaola et al., 2013).



**Figure I.A10 : Les domaines d'interactions des lncRNAs.**

(A) La structure secondaire des lncRNAs permet la formation de domaines d'interactions ARN-ARN, ARN-protéine ou encore ARN-ADN, rendant possible des changements conformationnels du lncRNA. (B) Un même lncRNA peut posséder différents domaines d'interactions (Mercer and Mattick, 2013).

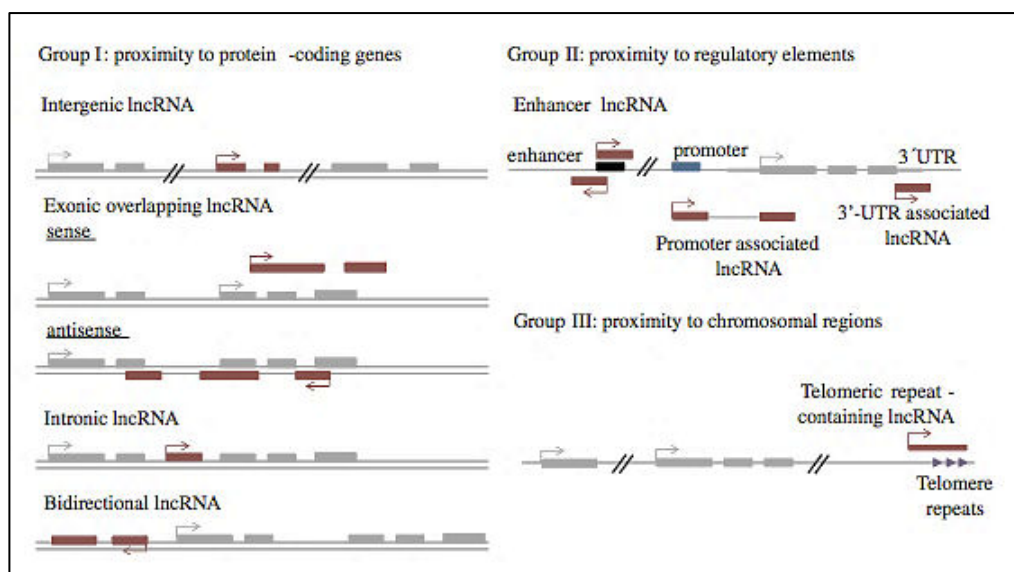
## B. Les lncRNAs

### 1. Origine des lncRNAs

Les premiers lncRNAs ont été découverts grâce à des approches génétiques fonctionnelles, démontrant leurs rôles de régulateurs impliqués dans des mécanismes biologiques spécifiques, comme le lncRNA XIST, un des lncRNAs fonctionnellement caractérisé et impliqué dans l'inactivation du chromosome X (Brockdorff et al., 1992; Brown et al., 1992), ou encore le lncRNA H19 qui joue un rôle dans l'empreinte parentale par son implication dans l'inactivation de l'expression génique (Brannan et al., 1990; Kung et al., 2013). Suite au développement des technologies de génomiques à haut débit, telles que le microarray ou le séquençage de nouvelle génération (NGS), il a été montré qu'environ 80%

de notre génome est transcrit, mettant en évidence un grand nombre de transcrits non-codants, de l'ordre de quelques dizaines voire quelques centaines de milliers selon les classifications. Ce nombre et cette diversité n'avaient pas été anticipés, posant la question de la fonctionnalité de ces transcrits en général : quelle proportion est fonctionnelle, à l'instar de Xist, quelle proportion résulte d'un simple bruit transcriptionnel ? (Guttman et al., 2009). De nombreuses études ont alors essayé de caractériser la fonctionnalité de ces lncRNAs et leur implication dans divers types cellulaires et tissulaires, que ce soit en condition physiologique ou pathologique. Les lncRNAs fonctionnels sont en augmentation constante avec fin 2018, 127 802 transcrits et 56 946 gènes de lncRNA recensés dans la base de données LNCipedia 5 (Volders et al., 2019). Ils sont également recensés dans diverses autres bases de données dédiées comme lncRNAdb, NONCODE, lncRNAtor, ou encore MyTranscriptome (Derrien et al., 2012; Park et al., 2014).

Les origines génomiques de ces lncRNAs sont variées : ils peuvent provenir d'introns de gènes codants ou les englober (« overlapping transcripts »), être antisens de gènes codants, provenir de régions intergéniques, ou encore de séquences répétées telles que les rétrotransposons ou transposons (**Figure I.B1**) (Ponting et al., 2009).



**Figure I.B1 : Origine génomique des lncRNAs, selon leur localisation par rapport à des gènes codants pour des protéines (Group I), des éléments régulateurs (Group II) ou des régions chromosomiques (Group III).**

lncRNAs (en rouge), gènes codants (en gris), enhancer (en noir) et promoteur (en bleu) (Melissari and Grote, 2016).

La caractérisation fonctionnelle d'un nombre encore restreint de lncRNAs a été effectuée, mais ils sont déjà impliqués dans la majorité des processus physiologiques et

pathologiques. La découverte de ces lncRNAs et la mise en évidence du caractère fonctionnel d'un nombre croissant d'entre eux représentent ainsi un niveau de complexité supérieur dans la régulation de l'expression génique.

## 2. Leurs principales fonctions

A ce jour seulement 0,1% des lncRNAs ont été caractérisés sur le plan fonctionnel. Il s'avère que les lncRNAs sont la classe d'ARNnc ayant la plus grande diversité fonctionnelle, avec une spécificité tissulaire reflétant un rôle majeur dans des processus biologiques essentiels (Clark and Mattick, 2011; Melissari and Grote, 2016). Ils ont été mis en évidence comme étant impliqués dans le développement embryonnaire, dans l'organogénèse et plus largement comme jouant un rôle majeur dans le maintien de l'homéostasie (Flynn and Chang, 2014), ceci grâce à leurs rôles centraux dans la régulation de l'expression des gènes, une partie qui sera davantage détaillée plus loin dans cette introduction (Meryet-Figuère et al., 2016).

Au cours du développement embryonnaire les cellules-souches vont se différencier, et certains lncRNAs sont connus pour être impliqués dans cette différenciation, comme le lncRNA Fendrr, avec une expression qui varie selon le stade de l'étape du développement. Il a été mis en évidence l'implication de certains d'entre eux comme régulateurs positifs de la différenciation des cellules souches, ou comme capable de maintenir leur pluripotence (Melissari and Grote, 2016; Ng et al., 2012; Rosa and Brivanlou, 2013). Certains lncRNAs sont également exprimés par les cellules souches adultes dans le cas de lncRNAs impliqués dans l'empreinte parentale comme le lncRNA H19 (Autuoro et al., 2014; Mattick, 2009).

Au cours de l'organogénèse, il a été démontré que l'expression et le mode de régulation des lncRNAs sont spécifiques à leur critère spatio-temporel, c'est à dire que certains vont permettre le développement du système osseux comme les lncRNAs HOTAIR ou HOTTIP, d'autres le système nerveux central comme le lncRNA RNACR4, d'autres les muscles, ou encore d'un organe précis, en lien avec leurs localisations et leurs dynamiques d'expression au cours de ce processus (Grote and Herrmann, 2015; McMullen and Ooi, 2017; Melissari and Grote, 2016).

De plus, ils jouent également un rôle primordial dans l'équilibre homéostatique par leurs capacités à réguler un panel de processus physiologiques, grâce à leur régulation de l'expression génique. Celle-ci étant permise grâce à leurs séquences et à leurs structures secondaires-tertiaires, et par leurs capacités à se lier à de multiples molécules, dont l'ADN, l'ARN, ou les protéines (Di Gesualdo et al., 2014). Ils permettent la communication intra/intercellulaire ou avec le microenvironnement cellulaire en partie grâce à leur transport par des exosomes, et permettent la modulation de divers processus biologiques comme le

cycle cellulaire, la mort cellulaire, le métabolisme ou encore l'immunité (Giroud and Scheideler, 2017; Kwok and Tay, 2017; Mowel et al., 2018).

Au regard de ces éléments, il semble donc plus qu'évident que leur dérégulation peut conduire à de nombreuses conséquences dans les cellules. Ils sont effectivement fréquemment dérégulés dans un grand panel de pathologies et favorisent leur développement, comme dans des maladies neurodégénératives, ou dans la dystrophie facio-scapulo-humérale (Melissari and Grote, 2016; Wapinski and Chang, 2011). De plus en plus d'études les ont démontrés comme étant impliqués dans le développement et la progression des cancers (**Figure I.B2**), une partie qui sera plus précisément détaillée dans la suite de cette introduction (Meryet-Figuière et al., 2016; Sheng et al., 2017).

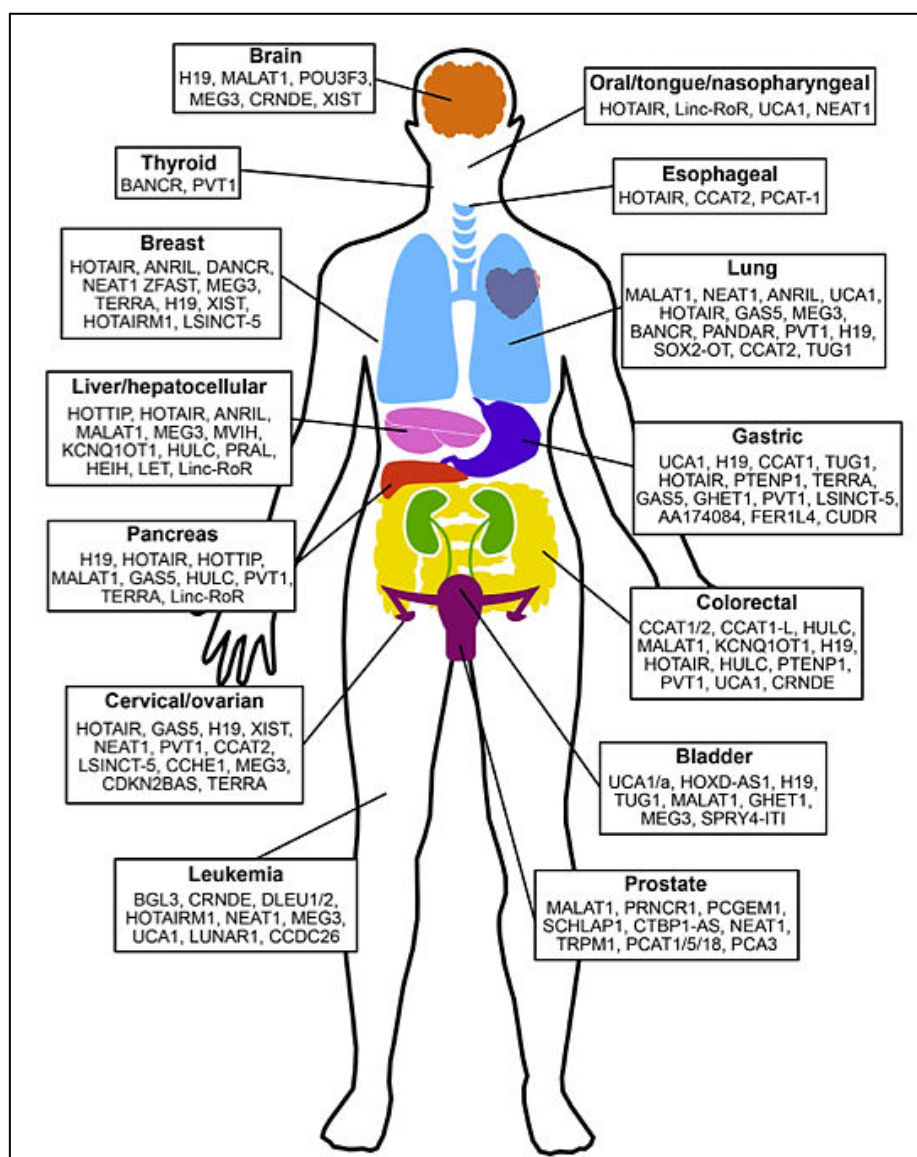


Figure I.B2 : Exemples d'associations entre lncRNAs et diverses pathologies cancéreuses (Balas and Johnson, 2018).

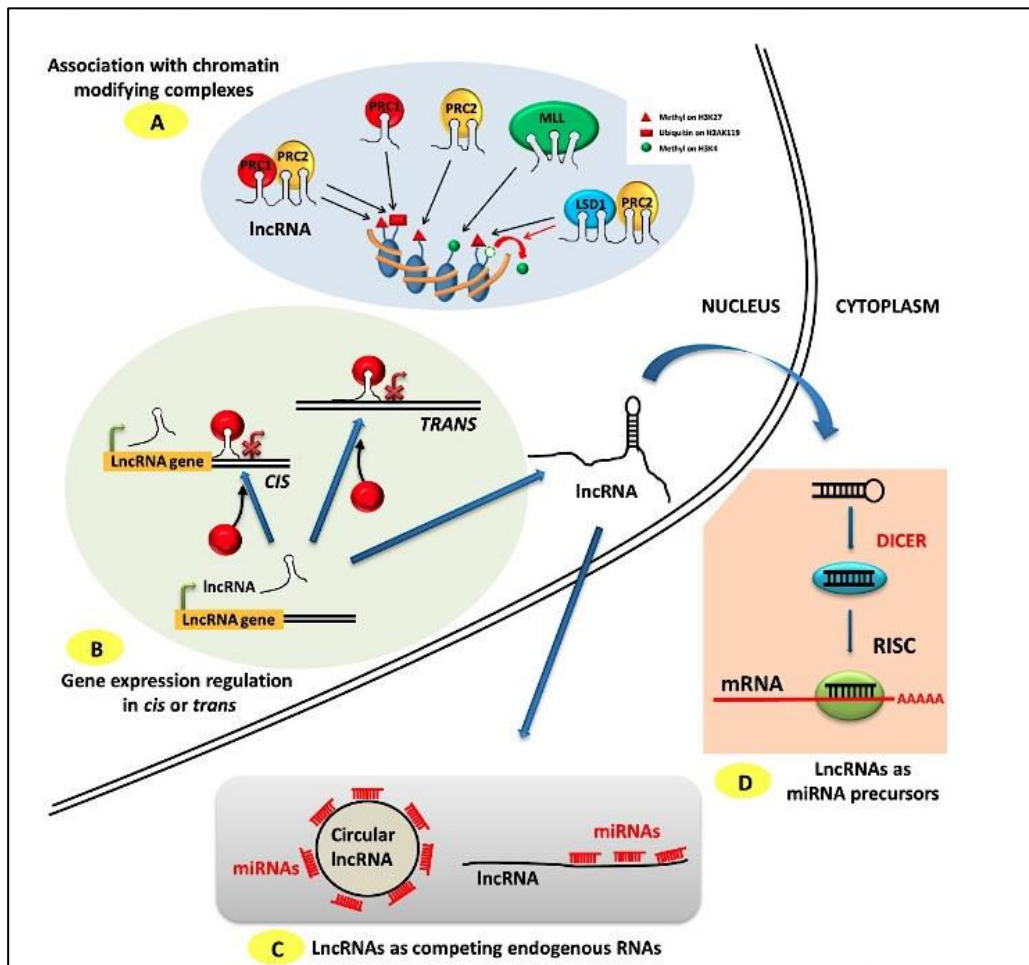


### 3. Les caractéristiques des lncRNAs

#### a) Définition et principales caractéristiques

Leur définition est permissive puisqu'elle se limite à une taille supérieure à 200nt et à l'absence d'un potentiel codant significatif. La longueur du plus long ORF prédit dans les ARNs codant par rapport aux lncRNAs est beaucoup plus grande pour les ARN codants avec une longueur médiane de 1200nt comparée à 250nt pour les lncRNAs (Niazi and Valadkhan, 2012; Wang and Chang, 2011). Leur taille peut dépasser 100 kilo-bases (kb), par exemple pour les macroRNAs, non épissés, nucléaires et impliqués dans la mise en place de l'empreinte parentale. Les vlincRNAs (« very long intergenic RNA ») ont une taille pouvant atteindre la méga-base (Mb), ils ont été démontré comme pouvant être classés en trois groupes, ceux étant des transcrits entièrement autonomes, ceux adjacent aux gènes connus avec soit une transcription bidirectionnelle soit antisens. Ils peuvent jouer le rôle de plateforme dans la régulation de l'organisation des chromosomes, et sont très abondants dans les tissus cancéreux (Latos and Barlow, 2009; St Laurent et al., 2013).

Les lncRNAs sont souvent exprimés en fonction du contexte, du tissu et du stade de développement. La séquence des lncRNAs est en général peu conservée entre les espèces au cours de l'évolution. Cette caractéristique a été utilisée comme argument pour suggérer une absence de fonctionnalité. Toutefois, leurs fonctions mettent en jeu le plus souvent leurs structures secondaires, et celles-ci semblent quant à elles mieux conservées (Derrien et al., 2012; Melissari and Grote, 2016). Ils ont de nombreux points communs avec les ARNm, comme la présence d'une queue poly-A à l'extrémité 3', et présentent une coiffe 7-méthyl-guanosine (m7G) à leur extrémité 5', spécifique d'une transcription par l'ARN polymérase II et ils peuvent être composés de un ou plusieurs exons (Giroud and Scheideler, 2017; Kwok and Tay, 2017). Ils pourront exercer leurs fonctions dans le compartiment nucléaire ou bien cytoplasmique (**Figure I.B3**). Une sous-catégorie de lncRNAs présente une structure circulaire. Les lncRNAs circulaires ont été découverts vers 1970 dans les virus à ARN, à une période où ils étaient considérés comme des erreurs liées à l'épissage plutôt que comme des lncRNAs fonctionnels. A partir de 2012 et suite aux progrès technologiques, ils ont été formellement caractérisés et sont depuis plus largement étudiés. Ils sont le résultat d'un rétro-épissage, ou « backsplicing », et peuvent être nucléaires et/ou cytoplasmiques. Contrairement aux lncRNAs linéaires, ils ne possèdent pas d'extrémités polarisées « 5' et 3' » ou encore de queue poly A, ce qui les rend particulièrement stables (Guo et al., 2014; Memczak et al., 2013).



**Figure I.B3 : Principaux modes d'action des lncRNAs.**

(A) Les lncRNAs s'associent à des complexes modifiant la chromatine, dont PRC1, PRC2 et MLL, et peuvent agir comme des échafaudages (scaffold) pour plusieurs d'entre eux. (B) Les lncRNAs régulent l'expression génique en Cis ou en Trans en adressant des complexes modifiant la chromatine. (C) Les lncRNAs agissent comme des compétiteurs endogènes par séquestration de miARNs. (D) Les lncRNAs sont des précurseurs de miARNs (Meryet-Figuère et al., 2016).

## b) Classification des lncRNAs

Il existe plusieurs classifications des lncRNAs selon des critères structuraux, fonctionnels...(St Laurent et al., 2015). Il est également possible de les définir en fonction de la localisation de leurs séquences associées sur le génome vis-à-vis des gènes codants. J'ai choisi de les présenter sous cet angle.

## i. Une transcription proche des séquences codantes

Il existe des lncRNAs transcrits à partir du brin sens des gènes codants pour des protéines, ce sont les lncRNAs dits 'sens'. Ils peuvent chevaucher un ou plusieurs exons du gène codant, voire le chevaucher entièrement en allant au-delà de ses extrémités (Ma et al., 2013).

Ce groupe comporte aussi des lncRNAs exoniques antisens, appelés « **NATs** », qui sont transcrits à partir du brin d'ADN opposé à celui du gène codant. Ces lncRNAs sont le plus souvent impliqués dans la régulation du transcrit sens correspondant, leurs niveaux d'expression étant le plus souvent anti-corrélés. Ils représentent une fraction significative (32%) des lncRNAs humains. Par exemple le NAT « PDCD4-ASI » (PDCD4-antisens RNA I) a été démontré comme régulant l'expression de son partenaire sens (PDCD4) codant pour des protéines en cis (Jadaliha et al., 2018), ou encore le NAT « Wrap53 », un ARN antisens de p53 qui peut induire l'expression de *TP53* et qui est connu pour être surexprimé dans diverses lignées cellulaires cancéreuses. En outre, ces NATs peuvent parfois constituer des gènes codants (Fang and Fullwood, 2016).

Les « **linRNAs** » sont transcrits à partir d'introns de gènes codants. Il a également été identifié des lncRNAs introniques circulaires, les « **ciRNAs** », connus pour être plus stable et pour leur rôle régulateur sur l'expression de leurs gènes parentaux grâce à leur localisation nucléaire qui s'avère abondante. Des dizaines de milliers de linRNAs ont pu être identifiés. Pour certains, il a été démontré qu'ils peuvent avoir des fonctions similaires aux autres lncRNAs, mais à ce jour, ils restent encore mal connus sur le plan fonctionnel et leur biogénèse est encore peu étudiée. On sait tout de même que les transcrits provenant d'introns sont très nombreux chez l'homme et que la transcription intronique semble avoir surtout des fonctions de régulation (Louro et al., 2009; Ma et al., 2013; St Laurent et al., 2012; Zhang et al., 2013).

Il existe également des lncRNAs nommés « **uaRNAs** », transcrits à partir de l'extrémité 3'-UTR des gènes codants, connus pour être antisens, souvent détectés comme étant non épissés, et comme agissant en *trans* sur les gènes. Ils ont un rôle régulateur sur les gènes, en agissant comme des 'decoy' pour les facteurs qui agissent en *trans*, comme des 'scaffolds' afin de localiser des protéines dans des complexes de régulation... Il existe également des similitudes dans la composition des séquences 3'UTR des gènes codants et des lncRNAs, possédant donc des sites cibles de miRNAs et pouvant donc servir d'éponge aux miRNAs. Comme pour les linRNAs, les études les concernant sont encore peu

nombreuses et ils restent encore mal connus sur le plan fonctionnel (Engelhardt and Stadler, 2015).

Il a également été décrit des ARNnc associés aux promoteurs des gènes codants, nommés « **paRNAs** », dont des lncRNAs associés aux promoteurs. Il a été montré qu'ils pouvaient réguler la transcription des gènes en question (Taft et al., 2009). Par exemple, le lncRNA PANDA est transcrit à partir du promoteur du gène *CDKN1A-p21*, et est capable de réguler négativement l'expression de ce dernier.

## ii. Une transcription éloignée des séquences codantes

Les « **lincRNAs** » sont des lncRNAs intergéniques, comme XIST ou HOTAIR et représentent la classe la plus étudiée de ces ARNnc (Khalil et al., 2009; Ulitsky and Bartel, 2013). Les loci de ces lncRNAs se situent dans des régions du génome entre quelques bases à plus de 3Mb du locus de gène codant pour des protéines. 28% des loci des lincRNAs se situent à moins de 10kb, pour une médiane de 40kb, et mesurent en général plusieurs kb. Ils sont épissés, polyadénylés et montrent le plus souvent une expression tissulaire spécifique. Ils sont connus pour agir en '*trans*', c'est-à-dire à distance de leur lieu de synthèse, en régulant le plus souvent au niveau épigénétique l'expression des gènes codants, notamment par interaction avec des complexes modifiant la chromatine comme PRC2 (Polycomb Repressive Complex 2). Ces complexes seront détaillés dans le paragraphe portant sur la description des modes d'action des lncRNAs (Cabili et al., 2011).

Il existe également les « **eRNAs** », qui sont transcrits à partir d'un enhancer et qui se limitent à environ 500-2000 pb. Ils représentent une sous-classe des lncRNA, et sont très faiblement exprimés. Ils sont transcrits dans les deux directions, alors que d'autres, nommés « **elncRNAs** », sont transcrits de façon unidirectionnelle. Ces lncRNAs régulent l'expression de divers gènes en régulant l'activité des enhancers, en formant des boucles entre enhancer et promoteur, et en ayant des effets sur les modifications des histones. Ils sont encore mal connus à ce jour (Liu et al., 2018).

Le lncRNA nommé « TERRA » est associé aux télomères par sa transcription au niveau des loci sub-télomériques. Il a été identifié comme régulateur négatif de la télomérase, régulant ainsi l'état télomérique, favorisant la recombinaison des télomères et la réplication des chromosomes (Cusanelli et al., 2013; Yu et al., 2014).

Il existe également des transcrits provenant de régions possédant des chevauchements avec des séquences répétées. Par exemple, le lncRNA PTENP1, transcrit à partir de pseudogènes, est impliqué dans la pluripotence cellulaire (Johnsson et al., 2013; Kapusta et al., 2013).

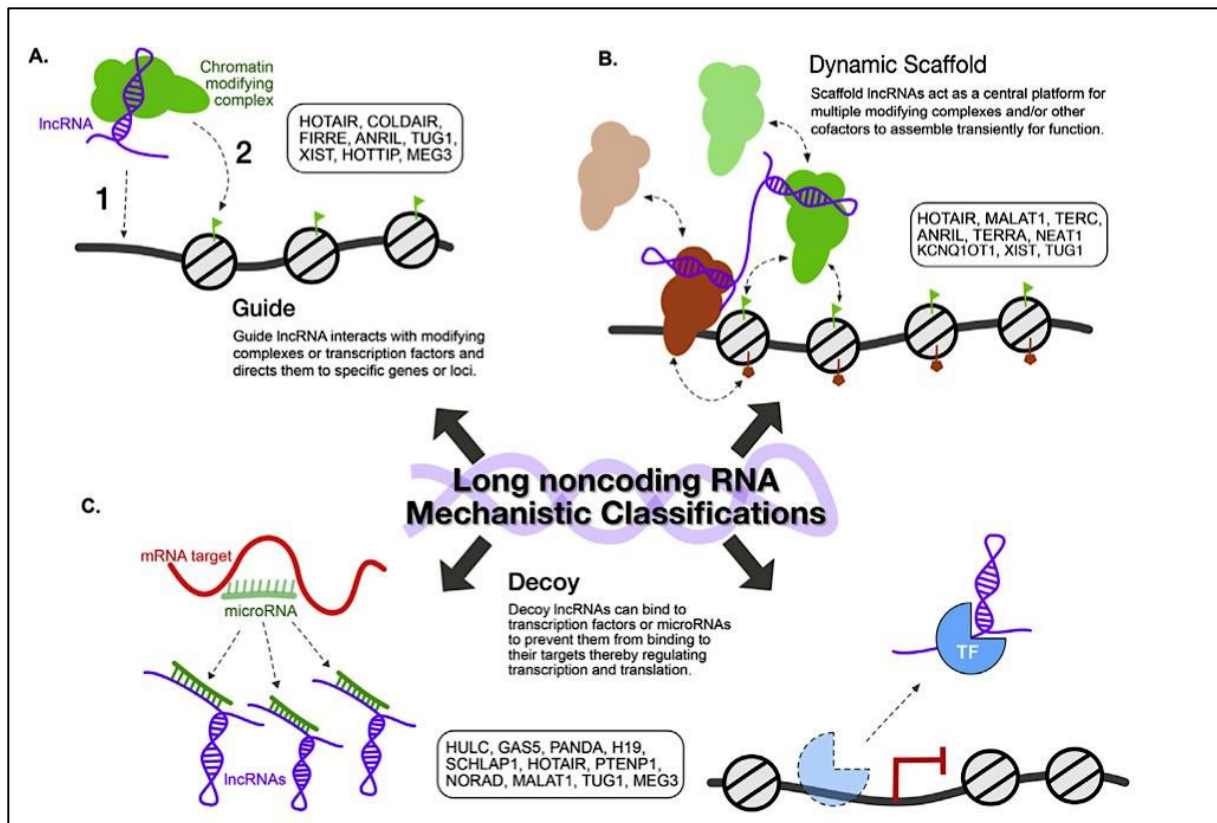
#### 4. Différents mécanismes d'action

Les lncRNAs exercent leurs fonctions par des mécanismes d'action variés, qui ne sont pas mutuellement exclusifs. En outre, ces fonctions et mécanismes reposent le plus souvent sur leur structure secondaire, et parfois sur leur séquence. A ce jour, les outils de prédiction d'interaction par complémentarité de séquence, de prédiction de structure secondaire et des interactions entre structure secondaire d'un lncRNA et une protéine ne permettent pas de prédire leurs fonctions avec seulement leur séquence nucléotidique. Ainsi, seule l'expérimentation permet de mettre en évidence avec précision les fonctions et modes d'action d'un lncRNA donné, et donc seulement une fraction des lncRNAs a pu être réellement caractérisée. A ce jour, il existe différents moyens de classer les lncRNAs tels que des classifications basées sur leurs tailles, leurs fonctions, leurs localisations... L'ensemble des classifications existantes ne sont pas nécessairement mutuellement exclusives (St Laurent et al., 2015). Le choix a été fait de classer les lncRNAs en fonction de la localisation de leur séquence vis-à-vis des gènes codants, mais il est tout de même possible de les classer en fonction de leurs divers mécanismes d'action qui ont fait l'objet d'études fonctionnelles (Fang and Fullwood, 2016).

Les lncRNAs dits « **Guide** » vont lier et amener des complexes protéiques vers des loci spécifiques (**Figure I.B4**). Les complexes impliqués dans des modifications de la chromatine et la régulation épigénétique de l'expression des gènes se lient ainsi à un grand nombre de lncRNAs qui vont permettre de cibler différentes activités enzymatiques, par exemple dans les régions promotrices des gènes. Ces lncRNAs peuvent agir soit en *Cis* (sur des gènes près de leur site de transcription) comme les eRNAs, XIST, HOTTIP, soit en *Trans* (sur des gènes à distance) comme HOTAIR, linc-p21. Il en résulte une activation transcriptionnelle lorsque des complexes tels que Trithorax (TxG) qui implique les protéines MLL, ou une répression transcriptionnelle avec des complexes répresseurs tels que les protéines du groupe Polycomb (PcG). De plus, il a été démontré que MEG3 agit comme un guide en adressant des complexes épigénétiques tels que PRC2 (Polycomb repressive complex 2) au niveau de loci spécifiques, grâce à la formation de triples hélices (Balas and Johnson, 2018).

Les lncRNAs dits « **Scaffold** » agissent également en se liant à des complexes protéiques par leur structure secondaire (**Figure I.B4**). Toutefois, contrairement aux lncRNAs « guide », ils ne sont pas impliqués dans l'adressage d'un complexe vers un locus spécifique, mais permettent la mise en relation spatiale de différents complexes protéiques, permettant ainsi de coordonner leurs actions en un même endroit. Par exemple, ANRIL se lie à la fois à PRC1 (Polycomb repressive complex 1) et PRC2, et permet donc de combiner les modifications épigénétiques induites (H2AK119ub et H3K27me3 respectivement), inhibant plus efficacement la transcription dans les régions concernées (Balas and Johnson, 2018; Wang and Chang, 2011).

Les lncRNAs dits « **Leurre ou Decoys** » agissent seulement en se liant à une cible, ARN ou protéine (**Figure I.B4**). Cela permet de séquestrer la cible en question, l'empêchant de réaliser sa fonction. Dans le noyau, les lncRNAs peuvent se lier à des facteurs de transcriptions ou des modificateurs chromatinien, permettant une régulation au niveau transcriptionnel. Dans le cytoplasme, les lncRNAs peuvent se lier à des protéines ou des miARNs. Par exemple, le lncRNA PANDA se lie à un facteur de transcription nucléaire (NK-YA), l'éloignant de son gène cible ce qui a pour conséquence une inhibition de l'expression des gènes apoptotiques. Le lncRNA TUG1 lui est capable de séquestrer des miARNs, comme par exemple le miR-145, empêchant ainsi la dégradation des ARNm MYC et SOX2, tous deux cibles du miRNA, et favorisant donc l'expression de ces deux gènes (Balas and Johnson, 2018).



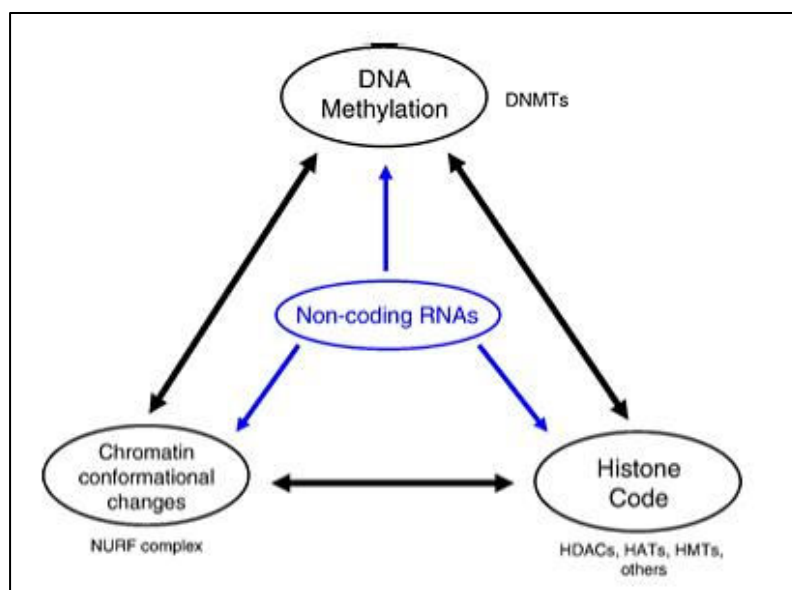
**Figure I.B4 : Autres classification des principaux mécanismes d'actions des lncRNAs.**

(A) Les lncRNAs servent de guides pour des complexes modifiant la chromatine, les amenant sur des sites génomiques spécifiques afin de réguler l'expression génique. (B) Les lncRNAs servent d'échafaudages (scaffold) permettant de mettre à proximité physique divers complexes. (C) Les lncRNAs se lient à des ARNs ou des protéines en tant que leurres (Decoy), les séquestrent loin de leurs cibles, régulant ainsi la transcription et la traduction. (Balas and Johnson, 2018).

Les lncRNAs sont impliqués dans le contrôle de l'expression des gènes par des mécanismes nombreux et variés, un même lncRNA pouvant agir à la fois comme 'guide', 'scaffold' et/ou 'decoy' (Meryet-Figuière et al., 2016; Qureshi and Mehler, 2012). Les mécanismes d'action les plus couramment d'écrits sont présentés ci-dessous.

### a) Régulation épigénétique

L'épigénétique recouvre l'ensemble des modifications de la chromatine affectant l'expression des gènes de manière stable et héritable au cours des divisions cellulaires, sans changer la séquence de l'ADN. Les modifications épigénétiques comprennent la modification post-traductionnelle des histones, la méthylation de l'ADN ou les modifications de la structure de la chromatine (**Figure I.B5**) (Costa, 2008; Peschansky and Wahlestedt, 2014).

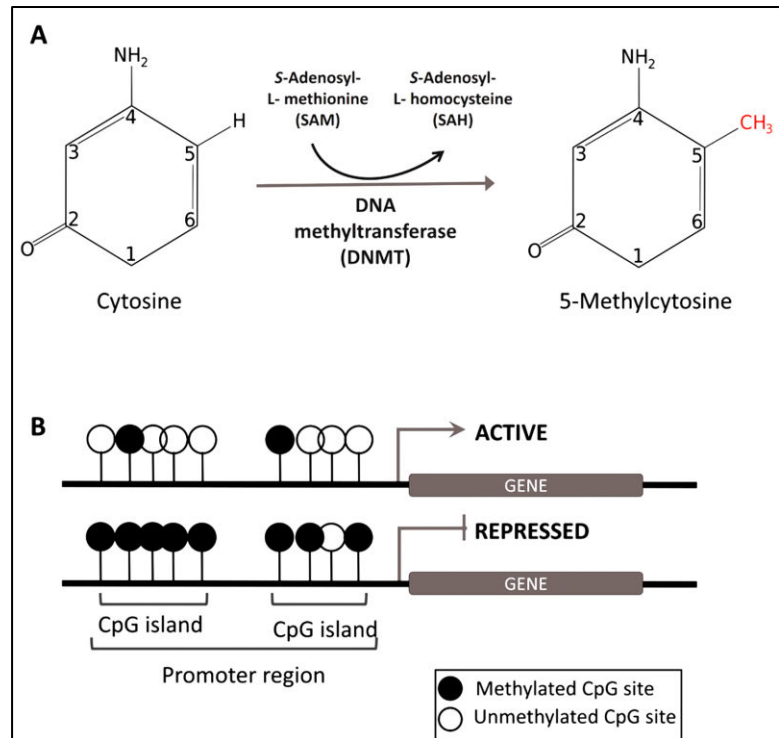


**Figure I.B5 : Rôles des ARNs non-codants dans les mécanismes épigénétiques du contrôle de l'expression des gènes, impliquant la méthylation de l'ADN, la modification des histones et le changement conformationnel de la chromatine (Costa, 2008).**

### **i. Régulation de la méthylation de l'ADN**

La méthylation de l'ADN sur les cytosines joue un rôle de contrôle de l'expression des gènes, est impliquée dans la compaction de la chromatine et limite l'accès de l'ADN aux complexes protéiques de la transcription. Elle a donc un rôle de répresseur transcriptionnel (**Figure I.B6**). Cette méthylation se fait par les ADN méthyl-transférases (DNMT) : DNMT3 a/b assure la méthylation « de novo » de l'ADN et DNMT1 assure le maintien de la méthylation de l'ADN après la réplication, en méthylant le brin d'ADN non-méthylé néosynthétisé associé au brin méthylé. La méthylation de l'ADN est présente de manière systématique – du moins en conditions physiologiques, cet état est altéré dans les cellules cancéreuses – dans les éléments transposables qui représentent au moins la moitié de notre génome. Enfin, la méthylation de l'ADN est présente dans des régions particulières appelées îlots CpG, riches en dinucléotides CG (le reste du génome est pauvre en CG), présentes dans les régions promotrices des gènes, dont environ 70% sont méthylés dans les cellules différenciées (Burns, 2017).

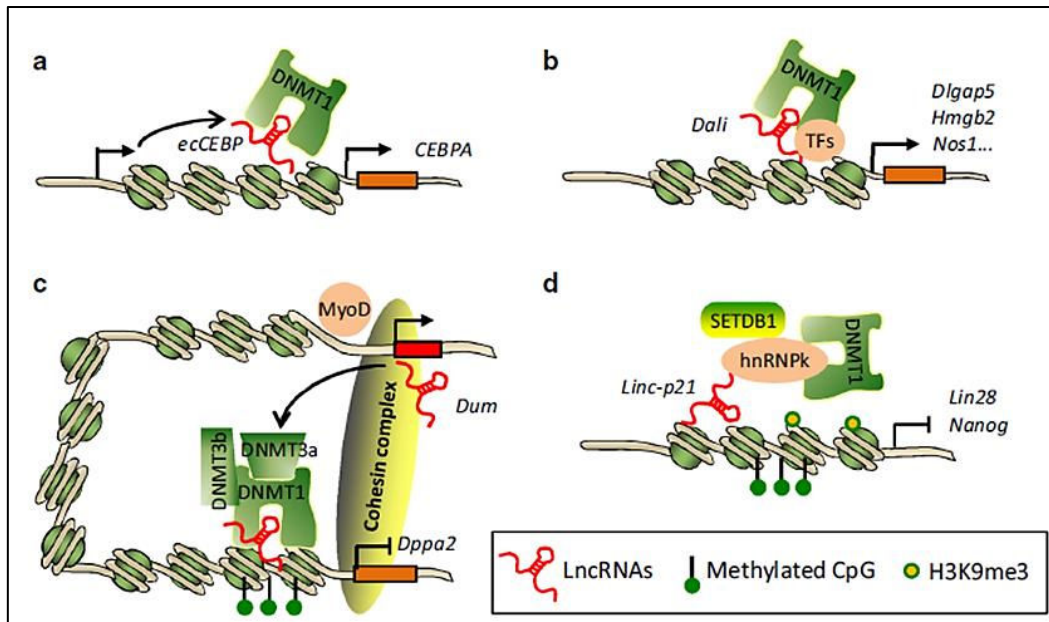




**Figure I.B6 : Méthylation de l'ADN :**

(A) Mécanisme de méthylation des CpG en position 5 des cytosines, médié par les DNMT (DNA methyltransferase). (B) La méthylation des îlots CpG, au niveau des régions promotrices, régule négativement l'expression des gènes (Alarcón et al., 2017).

Il a déjà été mis en évidence que des lncRNAs sont impliqués dans la régulation de la méthylation de l'ADN, soit en liant de façon directe des DNMTs et plus particulièrement la DNMT1, soit par liaison indirecte grâce à l'intermédiaire de protéines capables d'interagir avec l'ARN comme les hnRNP (Heterogeneous Nuclear Ribonucleoprotein) qui servent de plateforme à certaines méthyltransférases. Par exemple, il y a le lncRNA lincRNA-p21 démontré comme induit par p53 et identifié comme inhibant la reprogrammation cellulaire en favorisant le maintien de la marque H3K9me3, une marque répressive des histones, ou en maintenant la méthylation de l'ADN, par son association avec les méthyltransférases SETDB1 et DNMT1. Cette liaison est favorisée par la présence de hnRNPK, connu pour être induite suite à des dommages à l'ADN et agissant en coopération avec p53 (**Figure I.B7**) (Moumen et al., 2005; Zhao et al., 2016).



**Figure I.B7 : Régulation de la méthylation de l'ADN par les lncRNAs.**

(A) Interaction entre le lncRNA ecCEBP et la DNMT1, empêchant la méthylation de l'ADN sur le locus de CEBPA en Cis. (B) Une interaction entre le lncRNA Dali et la DNMT1 régule la méthylation de l'ADN sur des locus à distance, en Trans. (C) Régulation et maintien de la méthylation de l'ADN au niveau d'un promoteur cible, par l'interaction entre le lncRNA Dum et les trois DNMT (1, 3a et 3b). (D) Interaction entre le lncRNA Linc-p21 et via hnRNPk lié à DNMT1 et SETD1B, déposant des methyl-CpG et triméthyl H3K9 respectivement (Zhao et al., 2016).

## ii. Régulation des histones

Les histones sont des protéines nucléaires, associées à l'ADN et jouant un rôle dans la formation de la chromatine et la compaction de l'ADN. L'enroulement de 146 paires de bases d'ADN autour d'un octamère d'histones, comprenant les paires d'histones H3, H4, H2A et H2B, va permettre la formation de nucléosome, une base de la chromatine. Des modifications post-traductionnelles de ces histones (méthylation, phosphorylation, acétylation, ubiquitination...) ont des conséquences sur l'état de la compaction de la chromatine, son accessibilité aux facteurs de transcription et à la machinerie transcriptionnelle, menant à la régulation de l'expression génique (**Figure I.B8**) (Sophie Deltour, Valerie Chopin, and Dominique Leprince 2005 : Modifications épigénétiques et cancer). La méthylation des histones se fait par des histones méthyltransférases (HMT) au niveau de résidus lysine et arginine. La méthylation des lysines peut inhiber (H3K27me3, H3K9me3) ou activer la transcription (H3K4me3) alors que la méthylation des histones H3 au niveau des arginines 2, 17, 26, par CARM1 (coactivator-associated arginine methyltransferase 1) favorise la transcription. Les histones acétyltransférases (HAT) peuvent

acétyler les histones au niveau de résidus lysines ce qui stabilise la chromatine décondensée et active la transcription (Zhang and Reinberg, 2001).

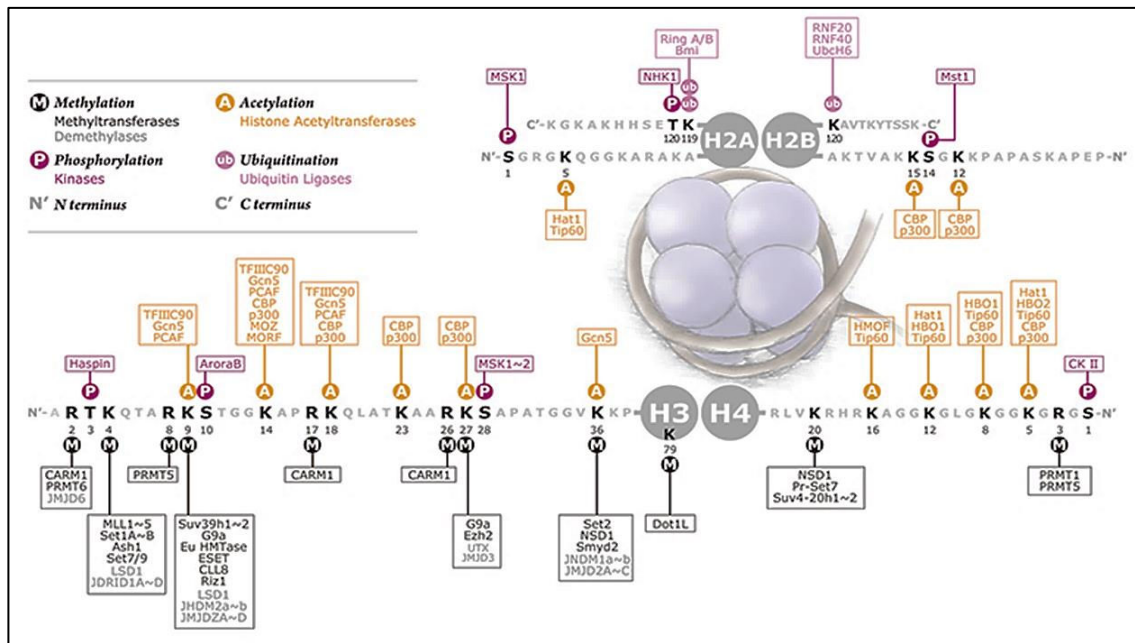
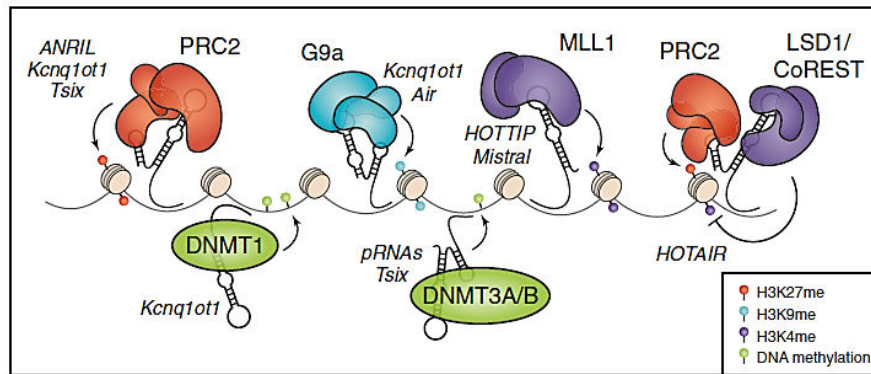


Figure I.B8 : Les modifications post-traductionnelles des histones.

L'octamère d'histone est composé de deux dimères H2A-H2B et d'un tétramère H3-H4 autour duquel s'enroule l'ADN. Ces histones subissent des modifications telles que l'acétylation, la méthylation, la phosphorylation l'ubiquitination, influençant la compaction de la chromatine et l'expression des gènes. ([https://www.genetex.com/Research/Overview/epigenetics/Histone\\_Modifications](https://www.genetex.com/Research/Overview/epigenetics/Histone_Modifications))

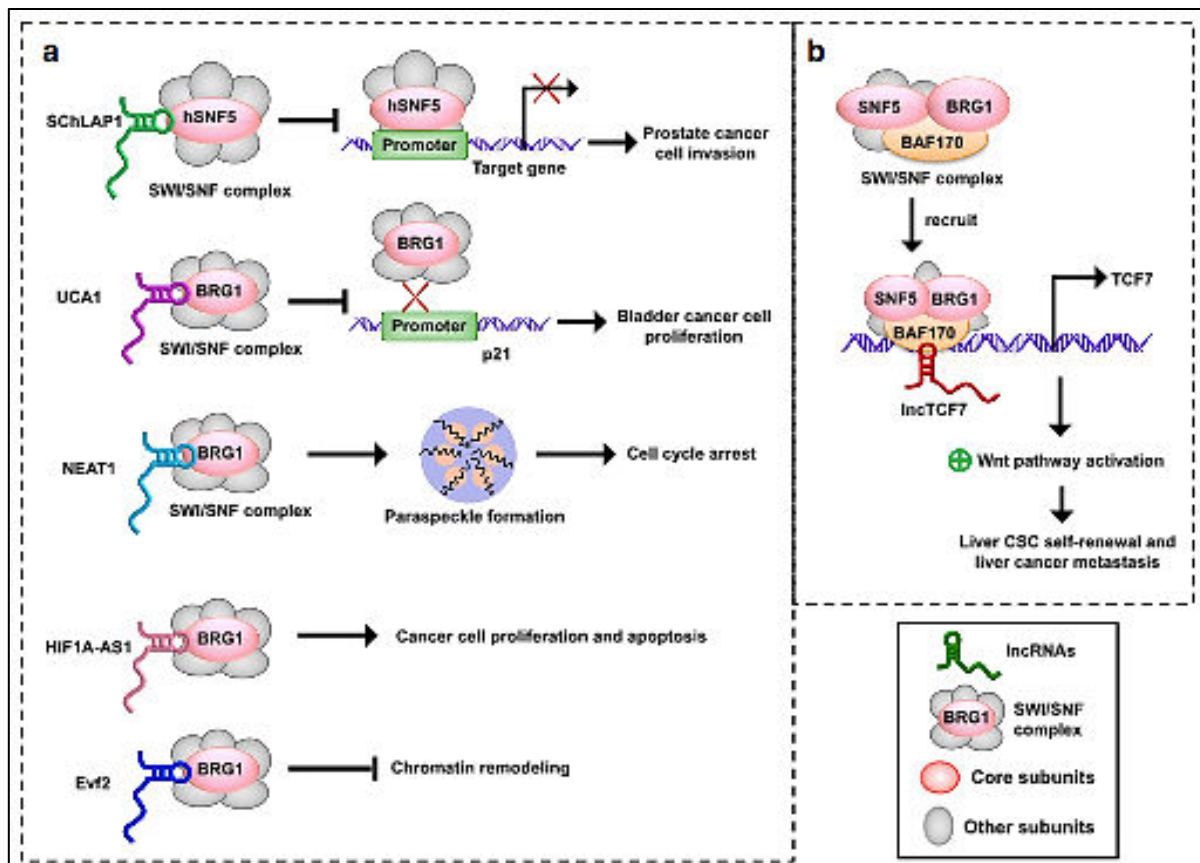
Les IncRNAs ont été démontrés comme étant impliqués dans la régulation des modifications post-traductionnelles d'histones et le remodelage de la chromatine. Grâce à leurs mécanismes d'action de 'guide', de 'scaffold' ou de 'signal', ils peuvent recruter des complexes protéiques modificateurs chromatiniens au niveau des gènes ou régions cibles et ainsi permettre la mise en place de modifications ayant pour conséquence une régulation positive ou négative de l'expression des gènes cibles (Tsai et al., 2010). Ces complexes protéiques qui comprennent les complexes PRC1 et PRC2 agissent plutôt comme des inhibiteurs par l'apport de marques répressives telles que la mono-ubiquitination de l'histone H2A 'H2AK119Ub1', ou la triméthylation de l'histone H3 'H3K27Me3'. Le complexe protéique du groupe trithorax MLL agit quant à lui comme activateur par l'apport de marque activatrice telle que H3K4Me3. Il a déjà été démontré une interactions entre la protéine EZH2, membre du complexe PRC2, et divers IncRNAs tels que HOTAIR, H19 ou MEG3, entre la protéine BMI1, membre du complexe PRC1, et le IncRNA FAL1 ou encore entre la protéine WDR5, appartenant au complexe MLL, avec le IncRNA HOTTIP (Figure I.B9) (Meryet-Figuière et al., 2016).



**Figure I.B9 : Implication des lncRNAs dans la régulation des histones.**

Les lncRNAs interagissent avec des complexes régulateurs de la chromatine (PRC2, MLL...) (Sabin et al., 2013).

D'autre part, le remodelage du positionnement des nucléosomes va modifier l'accès de l'ADN aux facteurs de transcription et à la machinerie transcriptionnelle. Ces mécanismes sont modulés par des complexes tels que ceux de la famille SWI/SNF, composés de nombreuses protéines (10 à 15) (Yen et al., 2012). Ici encore, ces complexes peuvent être régulés par des lncRNAs par fixation à certaines de leurs sous-unités, régulant ainsi leur capacité de formation au niveau de la chromatine (Zhu et al., 2013). Par exemple, il a été démontré par *Yanyan Tang et al*, que plusieurs lncRNAs sont capables de lier diverses sous-unités du complexe SWI/SNF, régulant ainsi le remodelage de la chromatine et donc l'expression de divers gènes. Le lncRNA SChLAP1 est capable de se lier à hSNF5, une des sous-unités de ce complexe, favorisant la progression tumorale. Les lncRNAs UCA1, NEAT1, Evf2 sont capables de se lier à BRG1, une des sous-unités centrale de ce complexe, endommageant son activité de remodelage de la chromatine ou son activité ATPase, favorisant ainsi le développement tumoral (**Figure I.B10**) (Tang et al., 2017).



**Figure I.B10 : Implication des lncRNAs dans le remodelage de la chromatine et dans la progression du cancer, par leur association avec les complexes SWI/SNF.**

(a) Divers lncRNAs s'associent aux sous-unités de ces complexes, empêchant leur action au niveau de gènes cibles. (b) D'autres lncRNAs recrutent ces complexes au niveau de leurs gènes cibles afin de réguler leur expression (Tang et al., 2017).

### iii. Les lncRNAs coordonnent différents modes de régulation épigénétique

De nombreux lncRNAs ont été identifiés comme étant impliqués dans 'l'empreinte parentale', par exemple le lncRNA H19, ou dans 'l'inactivation du chromosome X' avec le lncRNA XIST. Ces deux processus combinent différentes activités épigénétiques telles que : la méthylation de l'ADN et diverses modifications au niveau des histones et de la chromatine.

L'empreinte génomique se traduit fonctionnellement par l'inactivation de l'expression du gène d'un des deux allèles parentaux et s'explique par la mise en place de mécanismes épigénétiques. L'expression correcte de ces gènes subissant l'empreinte génomique est cruciale pour le bon développement embryonnaire par exemple, mais aussi pour éviter la survenue de pathologies. Les premiers gènes connus sont le gène paternel Igf2 (Insulin-like growth factor type 2), et le gène maternel H19 (Wood and Oakey, 2006). Il est également

connu que les régions subissant cette empreinte génomique sont composées de multiples gènes d'ARNnc, dont les lncRNAs. Ces lncRNAs régulent ainsi l'expression génique *via* les complexes PRC1/PRC2, agissent sur le remodelage de la chromatine et régulent l'expression transcriptionnelle par des marques répressives épigénétique, *via* leurs associations aux enhancers, aux promoteurs (Wan and Bartolomei, 2008)... Parmi ces lncRNAs, sont connus H19, un lncRNA démontré comme régulant négativement Igf2, ou encore Air, un lncRNA antisens d'Igf2r (Insulin-like growth factor type 2 receptor) et de nombreux autres (Sun et al., 2017).

Le lncRNA 'XIST', dont le gène est situé sur le chromosome X qui permet l'inactivation transcriptionnelle de l'un des deux chromosomes X chez la femme est un bon exemple de régulation épigénétique. Il apporte en effet des modifications répressives de la chromatine comme la triméthylation de l'histone H3K27, associée aux complexes Polycomb, PRC2, ou encore par la mono-ubiquitination de l'histone H2A (Leeb et al., 2009; Sun et al., 2017).

Les lncRNAs sont capables de lier physiquement les protéines et de réguler leurs activités et impacter, de ce fait, sur l'homéostasie tissulaire. Ils sont connus pour avoir une structure secondaire spécifique leur permettant de se lier à des complexes protéiques, impliqués notamment dans la régulation épigénétique de l'expression génique. C'est l'un des modes d'action les plus connus des lncRNAs. On parle alors de 'scaffolds', comme par exemple les lncRNAs HOTAIR ou ANRIL. Ils sont capables de se lier à plusieurs complexes à la fois, comme PRC1, PRC2 et MLL décrits dans la partie précédente comme favorisant la survenue de modifications post-traductionnelles des histones. Ces interactions sont essentielles à leurs fonctions et leur permettent de cibler des loci de gènes spécifiques, un mécanisme encore mal connu. Par exemple (**Figure I.B11**), le lncRNA MEG3 a été démontré comme capable de cibler le locus d'EZH2, membre du complexe PRC2, grâce à sa séquence riche en 'GA', favorisant ainsi la mise en place de structures spécifiques, des 'triplex ADN-ADN-ARN', régulés par l'apport de marque répressive telle que H3K27 (Meryet-Figuère et al., 2016). De plus, un autre lncRNA HOTAIR, est capable de remodeler la chromatine par des mécanismes de régulation épigénétique mis en place par sa liaison avec des membres du complexe PRC2, EZH2, SUZ12 et EED, favorisant le dépôt de la marque répressive de triméthylation H3K27, mais aussi en apportant une marque activatrice de déméthylation, H3K4, par l'intermédiaire de LSD1 (Lysine-specific demethylase 1), CoREST (Corepressor for repressor element-1 silencing transcription factor) et REST (Repressor element-1 silencing transcription factor) (**Figure I.B12**) (Sun et al., 2017).

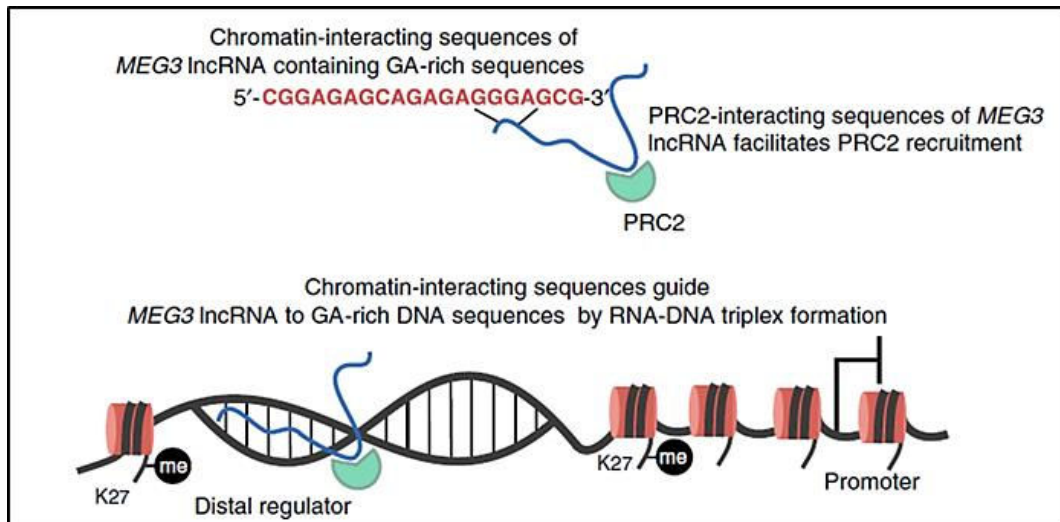


Figure I.B11: Adressage du complexe PRC2 par le lncRNA *MEG3* dans des régions en « GA » par formation de triple hélice ADN-ADN-ARN (Mondal et al., 2015).

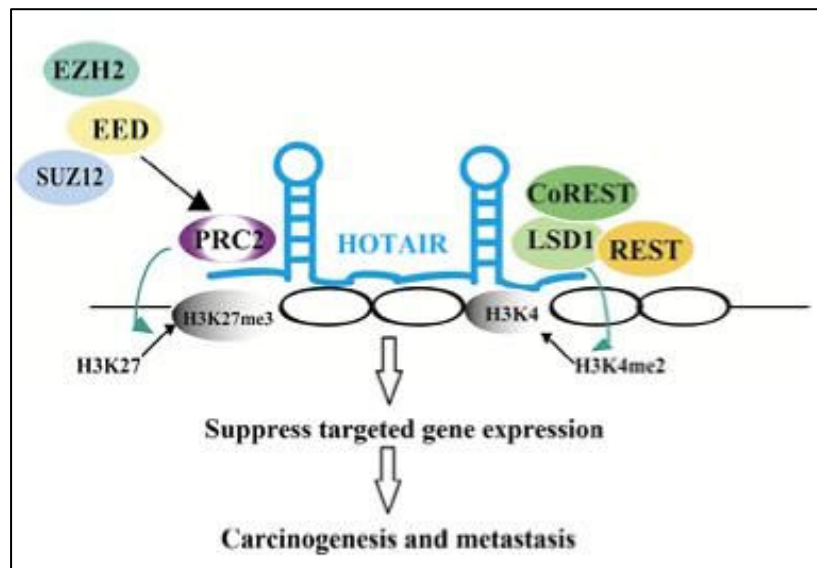


Figure I.B12: Le lncRNA *HOTAIR* permet de coordonner diverses activités épigénétiques inhibitrices de la transcription dans un même locus (Sun et al., 2017).

## b) Régulation génétique

### i. Modifications transcriptionnelles et post-transcriptionnelles

Les lncRNAs sont aussi des régulateurs transcriptionnels et post-transcriptionnels de l'expression des gènes que ce soit comme répresseur ou comme activateur, sans pour autant faire appel à des processus épigénétiques. Certains exemples seront donnés ici. Ils ont un rôle plus structural en jouant sur les corps intranucléaires, la stabilité du génome et des chromosomes, ce rôle structurant ne sera pas davantage détaillé.

Au niveau '**transcriptionnel**', les lncRNAs peuvent réguler la transcription de leurs gènes cibles de différentes manières :

De nombreux ARNnc sont capables de se lier directement à l'ARN polymérase II ou à d'autres membres impliqués dans les mécanismes de transcription, comme les facteurs de transcription, les enhancers (eRNAs), les promoteurs (pRNAs), afin de réguler la transcription. Il a également été mis en évidence qu'à son tour l'ARN polymérase II est capable d'inhiber l'effet négatif d'un ARNnc en le modifiant.

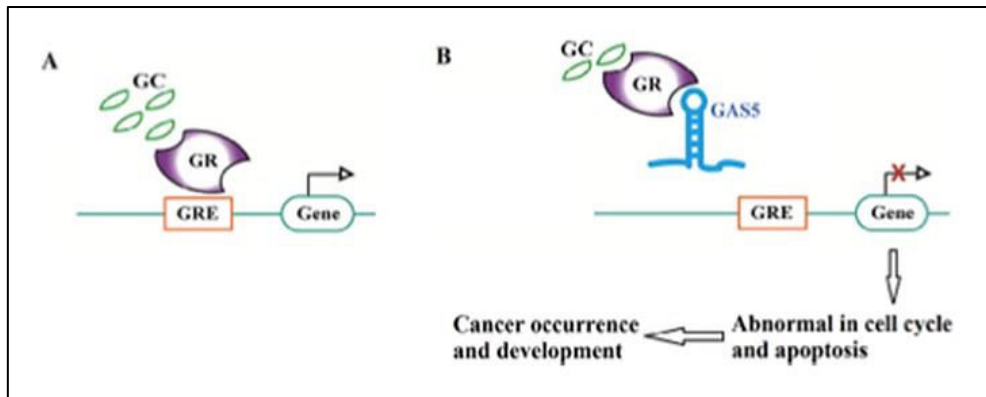
De nombreux lncRNA sont transcrits de façon bidirectionnelle à partir d'enhancer actif, ce sont les eRNAs, comme décrits précédemment, dont l'expression est corrélée avec l'activité de ces enhancers. Ils sont capables d'agir comme des 'scaffold' et de relier des complexes protéiques ainsi que les enhancer et les promoteurs de gène cible pour favoriser la transcription (Dykes and Emanuelli, 2017).

lincRNA-p21 est un lncRNA complexe ayant de multiples rôles, passant aussi bien par des mécanismes épigénétiques que d'autres mécanismes incluant son interaction avec hnRNP-K, modulant ainsi sa localisation et inhibant donc l'expression de gènes cibles (Sun et al., 2017).

Le lncRNA GAS5 est capable de contrôler la transcription en agissant comme un 'decoy' en se liant au domaine de liaison à l'ADN du récepteur aux glucocorticoïdes (GR), afin d'empêcher sa liaison sur l'ADN au niveau de GRE (glucocorticoid response element), ce qui inhibe l'expression des gènes cibles. D'autres lncRNA sont capables d'activer la transcription par ARN polymérase II en se liant aux facteurs de transcriptions en dehors de leur domaine de liaison à l'ADN (**Figure I.B13**).

Pour finir, les lncRNAs peuvent se servir de leur liaison aux protéines pour réguler la transcription. Pour cela ils modulent l'effet des facteurs de transcriptions par 'trafficking' où forment des oligomères de protéines impliqués dans les processus de transcription... (Dykes and Emanuelli, 2017; Faust et al., 2012).



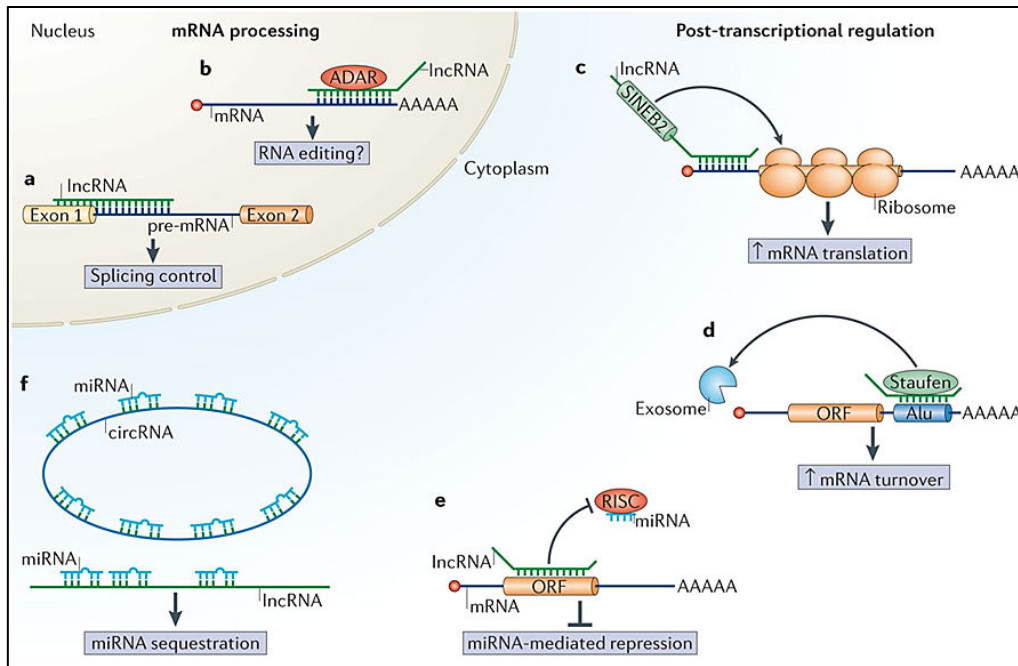


**Figure I.B13: Implication du lncRNA GAS5 dans la régulation négative de l'expression de gènes, favorisant le développement du cancer.**

(A) En l'absence de GAS5, les GC (glucocorticoids) se lient au récepteur GR (glucocorticoid receptor), qui va s'associer aux GRE (glucocorticoid response element) et activer l'expression génique. (B) GAS5 agit comme un leurre (Decoy), empêchant la fixation de GR au GRE, en se fixant au GR, ce qui régule négativement l'expression de gènes impliqués dans le cycle cellulaire et l'apoptose (Sun et al., 2017).

Au niveau '*post-transcriptionnel*', les lncRNAs régulent positivement ou négativement les ARNm à différents niveaux grâce à des interactions par complémentarité de séquences (**Figure I.B14**). Il a été mis en évidence leur implication dans les mécanismes de biogenèse, ou encore d'activité sur des ARNm, en influant sur leur coiffe, leur polyadénylation, leur épissage alternatif... (Dykes and Emanuelli, 2017; Tripathi et al., 2010). Par exemple, le lncRNA NEAT1 (Nuclear Paraspeckle Assembly Transcript 1) a été mis en évidence comme régulateur de l'épissage alternatif par sa capacité à se lier à un facteur d'épissage, le SRp40 (Serine/arginine-rich splicing factor 5). Comme pour NEAT1, le lncRNA MALAT1 a été identifié comme régulateur de l'épissage alternatif par sa capacité de liaison avec des facteurs d'épissage (SR), ce qui a pour effet une régulation de l'expression des gènes cibles au niveau post-transcriptionnel (Sun et al., 2017).

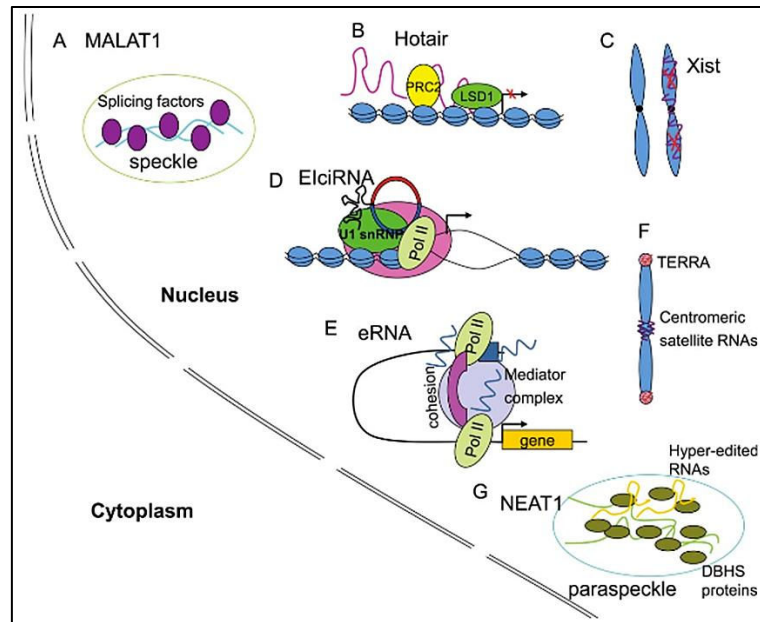
De plus, le lncRNA NEAT1 est connu pour être très abondant dans le noyau et pour être un composant majeur des paraspeckles, des corps nucléaires sensibles au stress, jouant ainsi un grand rôle dans leur assemblage (**Figure I.B15**). En plus de sa liaison aux paraspeckles, NEAT1 agit comme un 'scaffold' pour de nombreux composants moléculaires, des protéines, des ARNs. Ceci lui permet d'être impliqué dans de nombreux processus de régulation, comme celle de la traduction en retenant dans le noyau des ARNs, celle de la transcription en séquestrant des facteurs de transcription ou bien encore celle de la prise en charge des pri-miRNA (An et al., 2018).



**Figure I.B14: Les lncRNAs sont impliqués dans la régulation post-transcriptionnelle des ARNm par complémentarité de séquence.**

(a) Régulation de l'épissage par liaison avec le pré-ARNm. (b) Régulation de l'édition des ARNm par association antisens d'un lncRNA, permettant la fixation d'enzymes ADAR (Adenosine Deaminase Acting on RNA), favorisant la conversion d'adénosine en inosine dans l'ARN. (c) Régulation positive de la traduction par association avec la région 5' de l'ARNm grâce à la présence d'éléments répétés SINEB2 dans les lncRNAs. (d) Régulation négative des ARNm par association des lncRNAs aux éléments Alu des régions non traduites 3' de l'ARNm grâce à la présence d'éléments répétés Alu dans les lncRNAs. (e) Régulation négative des lncRNAs sur l'action des miRNAs en masquant leurs sites de liaisons sur leurs ARNm cibles. (f) Régulation négative par séquestration des miRNAs par les lncRNAs linéaires et circulaires (Geisler and Collier, 2013).

Les circRNAs sont de trois types, les ARN circulaires exoniques, introniques (ciRNAs) ou les ARN circulaires exon-introns (ElcircRNA). Les circulaires exoniques sont principalement dans le cytoplasme et régulent l'activité post-transcriptionnelle en agissant par exemple comme des éponges à miRNAs. Les ciRNAs et les ElcircRNA sont plutôt localisés dans le noyau et régulent la transcription, comme par exemple les ElcircRNA qui sont capables de favoriser la transcription de leurs gènes parents grâce à leur interaction avec RNAPII ou avec snRNP U1, un complexe de ribonucléoprotéines nucléaires (**Figure I.B15**). Les circRNAs, 'ciRS-7/CDR1as' et 'Sry circRNA' ont été identifiés comme des éponges à miRNAs, respectivement miR-7 et miR-138. De plus, les circRNAs peuvent aussi agir comme des 'decoy' pour les protéines RBP et sont reconnus depuis peu comme pouvant réguler l'ARN pol II (Dykes and Emanuelli, 2017; Ebbesen et al., 2016; Eidem et al., 2016).



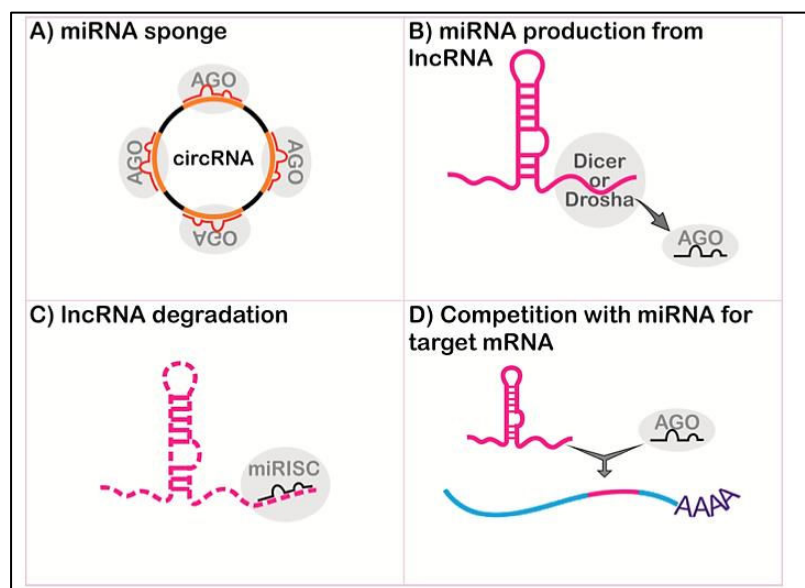
**Figure I.B15: Mécanismes d'action de divers lncRNAs nucléaires.**

(A) MALAT1 interagit avec des facteurs d'épissage et régule l'épissage dans des structures nucléaires spécifiques, les « speckle ». (B) HOTAIR se lie à des modificateurs épigénétiques. (C) XIST est responsable de l'inactivation d'un chromosome X chez la femme. (D) Les ElciRNAs influencent l'initiation de la transcription, par POL II (polymérase II) grâce à leur interaction avec snRNP U1. (E) Les eRNAs régulent positivement la transcription en cis, en favorisant la formation de la boucle chromatinienne enhancer-promoteur. (F) TERRA agit au niveau des télomères et les ARNs satellites centromériques, sur les centromères et les kinétochores. (G) NEAT1 agit au niveau des paraspeckles (Yu and Shan, 2016).

### c) Régulateurs de miARNs

Il a été démontré que les lncRNAs et les miARNs sont liés de différentes manières : certains lncRNAs sont des précurseurs de miRNA et des miARNs peuvent cibler directement des lncRNAs. Une fonction particulièrement importante des lncRNAs est leur capacité à empêcher les miARNs d'exercer leurs fonctions régulatrices sur leurs ARNm cibles en les fixant, agissant comme des éponges à miARNs : les lncRNAs sont dans ce cas qualifiés de compétiteurs endogènes 'ceRNAs' (**Figure I.B16**) (Meryet-Figuière et al., 2016; Zhang et al., 2018a).

L'un des premiers exemples de ceRNA a été identifié dans le cas du pseudogène de PTEN, PTENP1, dont le transcrit ayant perdu son rôle codant est capable de rivaliser pour la liaison à des miARNs, tels que le miR-19b et le miR-20a dans le cas de cellules cancéreuses de la prostate, avec son analogue PTEN, régulant ainsi indirectement son niveau d'expression protéique (Poliseno et al., 2010).



**Figure I.B16: Liens fonctionnels entre lncRNAs et miRNAs.**

(A) Les lncRNAs linéaires et circulaires peuvent agir comme des éponges à miRNAs, prévenant l'association miRNA-ARNm. (B) Les lncRNAs peuvent être des précurseurs de miRNAs. (C) Les lncRNAs peuvent être dégradés par la liaison d'un miRNA. (D) Les lncRNAs et les miRNAs peuvent être en compétition pour fixer leurs cibles (Fernandes et al., 2019).

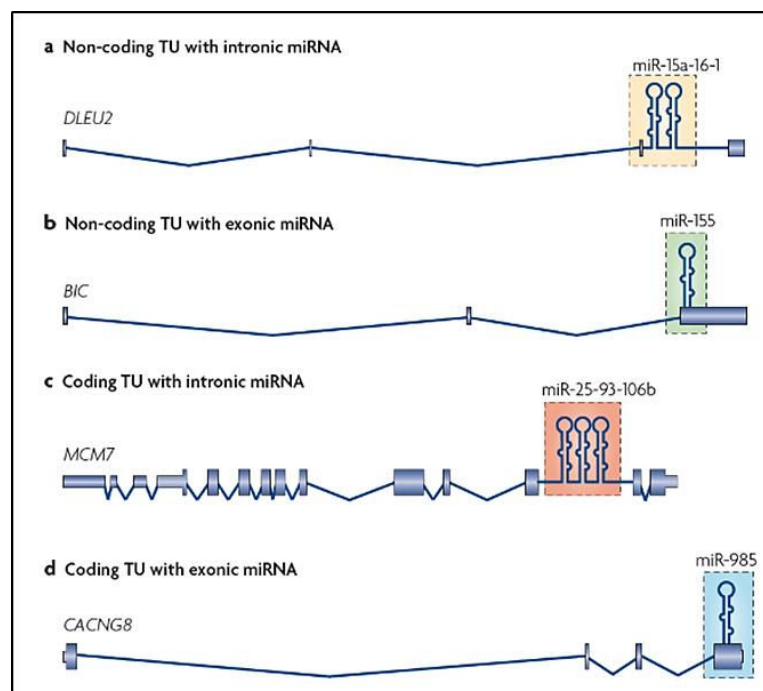
### i. L'origine des miARNs

Les miARNs existent depuis environ 400 millions d'années (Pasquinelli et al., 2000), mais leur découverte à proprement parlé remonte à la fin du XX<sup>ème</sup> siècle avec la découverte du petit ARNnc Lin-4 puis d'un second appelé Let-7, tous deux impliqués dans le développement larvaire de *C.Elegans* et conservés dans de multiples espèces dont l'homme (Lagos-Quintana et al., 2001; Lau et al., 2001; Lee and Ambros, 2001). Contrairement aux lncRNAs, les séquences d'un certain nombre de miARNs sont conservées entre espèces : environ 50% des miARNs présents chez *C. elegans* seraient conservés chez l'homme. Il en est de même pour les sites d'interaction spécifiques des miARNs dans les ARNm (Friedman et al., 2009). En 2018, 2 654 miARNs matures et 1 917 miARNs précurseurs sont recensés chez l'homme par la base de données de référence 'miRBase' (Kozomara et al., 2019) (<http://www.mirbase.org>, v22.1, octobre 2018). Leurs séquences ne représentent qu'environ 1% du génome humain (Bartel, 2009).

Les miARNs ont une origine endogène, et les gènes codants pour les miARNs peuvent provenir de différents environnements génomiques (**Figure I.B17**). Ils peuvent provenir de la séquence d'un pré-ARNm, on parle alors de miARN intragénique. Ces unités codantes peuvent elles-mêmes coder ou non des protéines et dans ce cas les miARNs sont soit introniques, soit exoniques, soit à cheval sur les deux (Kim et al., 2009; Rodriguez et al.,

2004) et leurs expressions sont connues pour être associées à la maturation de l'ARNm (Olena and Patton, 2010). Il a été mis en évidence que les miARNs introniques ne semblent pas influencer l'intégrité de l'ARNm future, tandis que les miARNs exoniques peuvent empêcher la production de cet ARNm lors de la phase de maturation et donc réguler l'expression de ces gènes. Il existe également d'autres gènes codants pour les miARNs qui sont eux connus pour être localisés dans des unités géniques dites 'indépendantes', ce sont les miARNs dits 'intergéniques' (Lagos-Quintana et al., 2001). Ils sont connus pour être isolés ou sous forme de clusters. Ces clusters représentent 50% de la population des miRNAs et se caractérisent par un promoteur commun, provenant d'un pri-miARN commun (Lagos-Quintana et al., 2001; Lau et al., 2001; Lee et al., 2002).

Le processus de maturation des miRNAs est multi-étapes, avec tout d'abord un pri-miARN (primaire) puis un pré-miARN (précurseur) pour aboutir à un miARN dit mature.



**Figure I.B17: Origines génomiques des miARNs.**

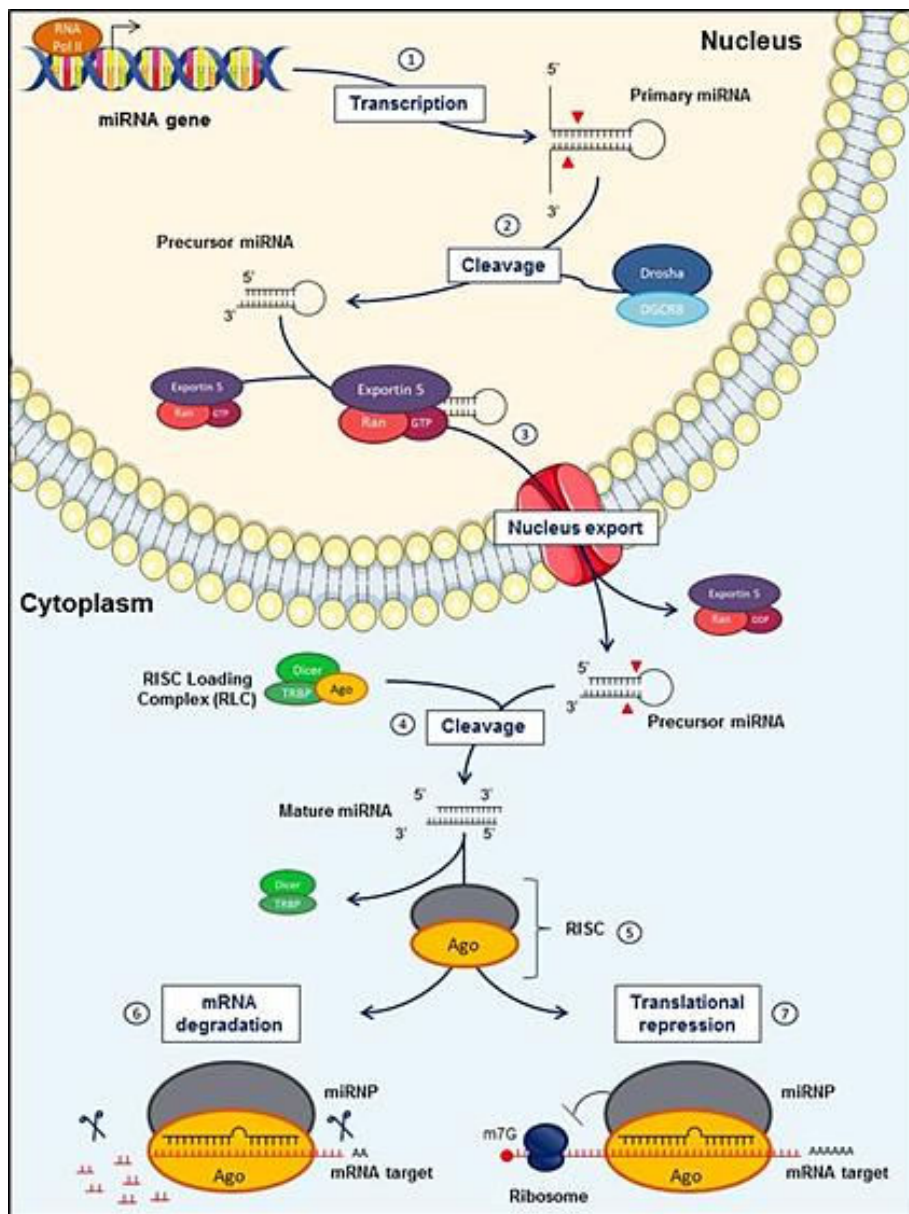
Les miARNs sont classés en 4 groupes dépendants de leur localisation génomique : les miARNs provenant de régions introniques (a) ou exoniques (b) de transcrits non codants et les miARNs issus de régions introniques (c) ou exoniques (d) de transcrits codants. (TU : «Transcription Unit» ou Unité de Transcription) (Kim et al., 2009) .

## ii. La biogenèse des miARNs

La biogenèse des miARNs s'initie dans le noyau cellulaire, avec tout d'abord une transcription du pri-miARN qui est majoritairement réalisée par l'ARN polymérase II (ARN Pol II) (**Figure I.B18**). Les transcrits primaires se caractérisent par une structure en tige-boucle mesurant plus de 1000 nucléotides, avec la présence à l'extrémité 5' d'une coiffe m7G et en 3' d'une queue poly-A comme pour les lncRNAs, deux éléments caractéristiques d'une transcription par la polymérase II (Cai et al., 2004; Lee et al., 2004).

La maturation de miRNAs consiste d'abord en un clivage des pri-miARNs par un complexe composé de Drosha et de DGCR8 (DiGeorge syndrome Critical Region gene 8) (**Figure I.B18**). Drosha reconnaît la région située entre les parties double-brin (tige-boucle) et simple brin (linéaire) du pri-miARN et s'y lie grâce au motif UG. DGCR8, lui se fixe au niveau apical de la boucle par son domaine dsRBD ainsi qu'au niveau du motif UGU grâce à leurs domaines communs 'HBD', favorisant ainsi la liaison et la stabilisation de Drosha (Denli et al., 2004; Gregory et al., 2004; Landthaler et al., 2004). Drosha possède des domaines RNase qui vont permettre le clivage de la structure tige-boucle du pri-miARN (Han et al., 2004, 2006). Ce processus libère un pré-miARN composé d'une structure en tige-boucle, avec l'extrémité 5' plus courte de 2 nucléotides que l'extrémité 3', nommée '3' overhang' (Basyuk et al., 2003).

La maturation des pré-miARNs se poursuit par une prise en charge par l'Exportine 5, ce qui les protège des nucléases (Zeng and Cullen, 2004) et permet leur export dans le cytoplasme (**Figure I.B18**) (Lund et al., 2004). Les pré-miARNs sont alors pris en charge par le complexe RLC 'Risc Loading Complex' qui comprend différentes protéines dont DICER, des protéines AGO (argonaute) et TRBP (Trans-activation response RNA binding protein) (Bernstein et al., 2001; Meister and Tuschl, 2004). DICER, comportant plusieurs domaines, va jouer un rôle central. Son domaine N-terminal, comporte une activité ARN hélicase aidant à stabiliser la protéine TRBP et à reconnaître la boucle du pré-miARN. En son centre, il présente un domaine PAZ 'Piwi-Argonaute-Zwile' qui va reconnaître l'ARN double-brin ayant une extrémité 3' protubérante comme celle des pré-miARNs. En C-terminal, son domaine dsRBD va lier l'ARN double-brin (Ha and Kim, 2014). DICER va alors pouvoir se replier et positionner ses domaines RNases pour cliver la boucle du pré-miARN au niveau proximal, donnant donc un miARN mature en duplex formé d'un ARN double-brin de 22 nucléotides environ, possédant un brin guide et un brin passager complémentaire, toujours avec une extrémité 5' phosphate plus courte et une extrémité 3' OH protubérante (**Figure I.B18**) (Svobodova et al., 2016; Zhang et al., 2004).



**Figure I.B18: La biogenèse des miRNAs.**

(1) Transcription du gène du miRNA en pri-miRNA (miRNA primaire). (2) Clivage du pri-miARN en miRNA précurseur (pré-miRNA) par Drosha et DGCR8. (3) Export du pré-miRNA vers le cytoplasme via l'exportine 5 (EXP5) par transport actif. (4) Prise en charge du pré-miRNA par le complexe «RISC Loading Complex» (RLC), suivi du clivage par DICER du pré-miRNA, donnant le miRNA mature sous la forme d'un ARN double-brin. (5) L'un des deux brins du miRNA mature, nommé brin mature, est chargé sur la protéine Argonaute (Ago) pour former le complexe «RNA Induced Silencing Complex» (RISC). (6) Ce complexe sera mené vers l'ARNm cible et favorisera sa dégradation ou (7) l'arrêt de sa traduction (Mandilaras et al., 2017).

Enfin, le duplexe miARN est pris en charge par une des 4 protéines AGO pour former un pré-complexe RISC. L'ensemble de ces protéines ont la capacité à prendre en charge les miARNs, mais uniquement AGO2, la plus exprimée, possède une activité « slicer », une activité endonucléolytique active seulement en cas d'appariement parfait entre le miRNA et son ARNm cible, notamment entre les bases 9-11 du miRNA, siège de l'activité slicer (Hammond et al., 2001; Hutvagner and Simard, 2008; Meister and Tuschl, 2004). AGO possède un domaine PAZ qui permet la reconnaissance de l'extrémité 3'OH du duplex miARN (Lingel et al., 2004), un domaine MID qui peut lui se lier à l'extrémité 5' phosphate de ce duplex, ceci orientant le duplex (Boland et al., 2011). Parmi les deux brins, celui pour lequel la stabilité d'association en 5' avec son brin complémentaire est la moins forte sera préférentiellement incorporé dans le complexe RISC et constituera donc le miRNA mature (Hutvagner, 2005). L'autre brin sera préférentiellement dégradé par le troisième domaine d'AGO, PIWI assurant une activité catalytique (Song et al., 2004). La liaison du miRNA mature avec AGO, va permettre la fixation du miRNA sur ses ARNm cibles et permettre son activité d'ARNi (**Figure I.B18**).

### iii. Leurs mécanismes d'action

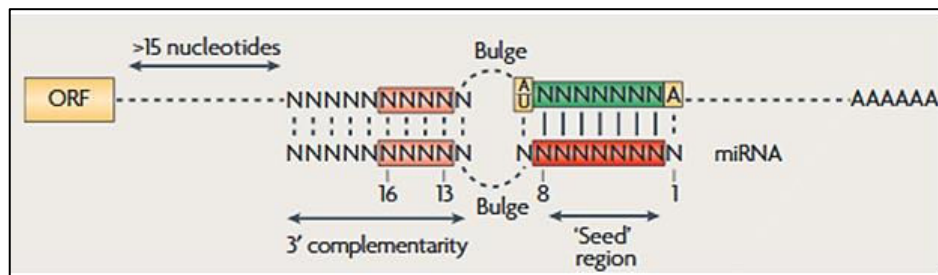
Les miARNs participent à la régulation post-transcriptionnelle de l'expression des gènes et peuvent théoriquement cibler environ 50% des gènes codant pour des protéines (Friedman et al., 2009).

Le premier déterminant de l'action d'un miARN sur sa cible est sa 'seed-region', souvent très conservée, comprenant les nucléotides en position 2 à 8 à l'extrémité 5' du miRNA (Grimson et al., 2007). C'est grâce à une complémentarité de séquence entre cette seed région et un ARNm cible, le plus souvent au niveau des séquences 3'UTR de l'ARNm, qu'un miRNA va pouvoir adresser le complexe RISC vers ses ARNm cibles (Bartel, 2009; Pasquinelli, 2012). L'efficacité d'action du miARN sur sa cible peut également dépendre de la présence d'une adénine en position 1 et/ou d'adénine ou d'uracile en position 9 (Lewis et al., 2005; Schirle et al., 2014). Dans le cas d'un appariement faible dans la région 5' du miARN, sa région 3' va jouer un rôle compensatoire et stabilisateur. Pour cela elle nécessite une complémentarité parfaite des nucléotides 13 à 16 du miRNA avec sa cible (Bartel, 2009; Brennecke et al., 2005; Grimson et al., 2007). La région nommée 'bulge', qui se situe au centre du complexe miARN-ARNm entre les bases 9 et 11, est en général non appariée chez l'homme. Cependant, lorsque c'est le cas, la présence d'AGO2 dans le complexe RISC permet le clivage et la dégradation de l'ARN cible (**Figure I.B19**).

La structure secondaire de l'ARNm et les facteurs qui lui sont associés au niveau des régions 3'UTR peuvent limiter ou empêcher l'accès aux miARNs. En revanche, la



présence de régions riches en nucléotides A proche des sites d'interactions des miARNs favoriserait la répression (Grimson et al., 2007).



**Figure I.B19: Interaction entre un miRNA et un ARNm cible.**

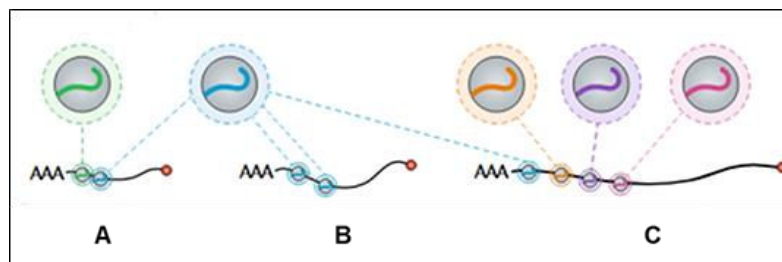
(i) La complémentarité entre le miARN et sa cible au niveau de la 'seed region' en 5' du miRNA, entre les nucléotides 2-8, est le déterminant le plus important d'une interaction fonctionnelle. (ii) Présence d'une adénine en position 1 et/ ou d'une adénine ou d'un uracile en position 9 de l'ARNm, favorisant la liaison du miRNA à sa cible. (iii) Une région 'Bulge', entre les nucléotides 9-12, empêchant le clivage endonucléolytique de l'ARNm par AGO. (iv) Appariement des bases 13 à 16, en 3' du miRNA, favorisant la stabilisation de la liaison d'après (Filipowicz et al., 2008; Gebert and MacRae, 2019).

Chacune des extrémités d'un ARNm est associée dans le cytoplasme à des protéines spécifiques : en 5' la coiffe est associée à différents facteurs d'initiation de la traduction tels que les eIF4 et en 3' la queue poly A est associée à la protéine PABP qui va permettre la circularisation de l'ARNm pour la traduction. Le mode d'action des miRNAs implique à la fois une répression traductionnelle et une action sur la stabilité des ARNm cibles.

Tout d'abord, les mécanismes d'inhibition de la traduction par les miARNs impliquent la protéine TNRC6 impliquée dans la régulation de la traduction. Cette protéine recrute le complexe CCR4-NOT qui à son tour recrute une hélicase, la DDX6, puis une des protéines EIF4, ceci inhibant l'initiation de la traduction (Bartel, 2018; Gebert and MacRae, 2019). L'inhibition traductionnelle par l'action de miRNAs, contrairement à ce qui avait été d'abord anticipé, ne jouerait en réalité qu'un rôle mineur dans la répression de l'expression des gènes.

La déstabilisation des ARNm est le mécanisme majeur de leur action. Le complexe miRISC, par l'intermédiaire de AGO, recrute la protéine TNRC6, se liant cette fois à PABP au niveau de la queue poly A de l'ARNm. L'assemblage de ces protéines va favoriser le recrutement de divers complexes de déadénylation, comme CCR4-NOT et PAN2/PAN3, réduisant la longueur de la queue poly A (Bartel, 2018; Gebert and MacRae, 2019). L'action du miRNA, en accélérant la dégradation de la queue poly-A a donc pour effet une réduction de la demi-vie des transcrits ciblés, et une réduction de l'expression des gènes associés.

Une caractéristique capitale des miRNAs est leur mode d'action dit 'multicibles' (**Figure I.B20**). Un même miRNA peut réguler des centaines d'ARNm (Bracken et al., 2016; Selbach et al., 2008), et un ARNm peut-être la cible de différents miRNAs (Grimson et al., 2007; Saetrom et al., 2007). Le plus souvent, l'effet inhibiteur d'un miRNA sur une cible unique est plutôt modeste. Toutefois sa capacité à réguler de multiples cibles d'une même voie de signalisation ou des cibles appartenant à différentes voies de signalisation mais influençant le même processus biologique va rendre son action plus déterminante (Bracken et al., 2016; Schmiedel et al., 2015).



**Figure I.B20: Les miRNAs ont un mode d'action multicible.**

(A) Plusieurs miARNs différents sont capables de réguler un même gène. Cela peut permettre la mise en place de coopération dans la régulation de ce gène. (B) Un même miARN peut réguler plusieurs gènes à la fois. (C) Un seul ARNm peut être régulé par plusieurs miARN différents, d'après (Gebert and MacRae, 2019).

#### iv. Leurs principales fonctions en cancérologie

Il apparaît évident qu'étant donné la proportion de gènes potentiellement régulés par des miRNAs, ils vont avoir un impact direct sur un ensemble de processus cellulaires physiologiques. Des altérations de leurs expressions pourront ainsi influencer l'immunité, le développement, la différenciation, la prolifération, l'apoptose ou encore la migration/invasion (**Figure I.B21**) (Acunzo et al., 2015; Bartel, 2009). De plus, les miARNs sont fréquemment dérégulés à différents niveaux (Di Leva et al., 2014), favorisant la progression tumorale ou au contraire réduisant la survenue de cancer.

Dans les cancers, l'expression des miRNAs est le plus souvent dérégulée par la présence d'anomalies génétiques (Calin et al., 2004; Zhang et al., 2006), épigénétiques (Fabbri et al., 2013; Zhang et al., 2008), de défauts de la voie de biosynthèse des miARNs (Kumar et al., 2007; Lee et al., 2008; Merritt et al., 2008), ou encore des mutations au niveau des séquences cibles de miRNAs. La perte d'expression de miRNAs suppresseurs de tumeurs ou le gain d'expression de miRNAs oncogéniques sont impliqués dans la totalité des principales caractéristiques du cancer (hallmarks du cancer) (Hanahan and Weinberg, 2011).

Le contexte cellulaire, notamment transcriptionnel, joue aussi un rôle important dans la fonction des miRNAs : un même miRNA peut avoir des effets très variés dans des contextes cellulaires et tumoraux différents, pouvant être oncogénique ou suppresseur de tumeur selon le contexte (Bracken et al., 2016; Cortez et al., 2011). La présence ou l'absence de certaines cibles d'un miRNA, et l'équilibre entre le nombre de copies d'un miRNA et de ses cibles auront une influence importante sur les effets d'un miRNA donné. La notion de « compétiteur endogène », notamment *via* la capacité de divers lncRNAs à séquestrer des miRNAs, prend une importance croissante dans l'explication des effets des miRNAs.

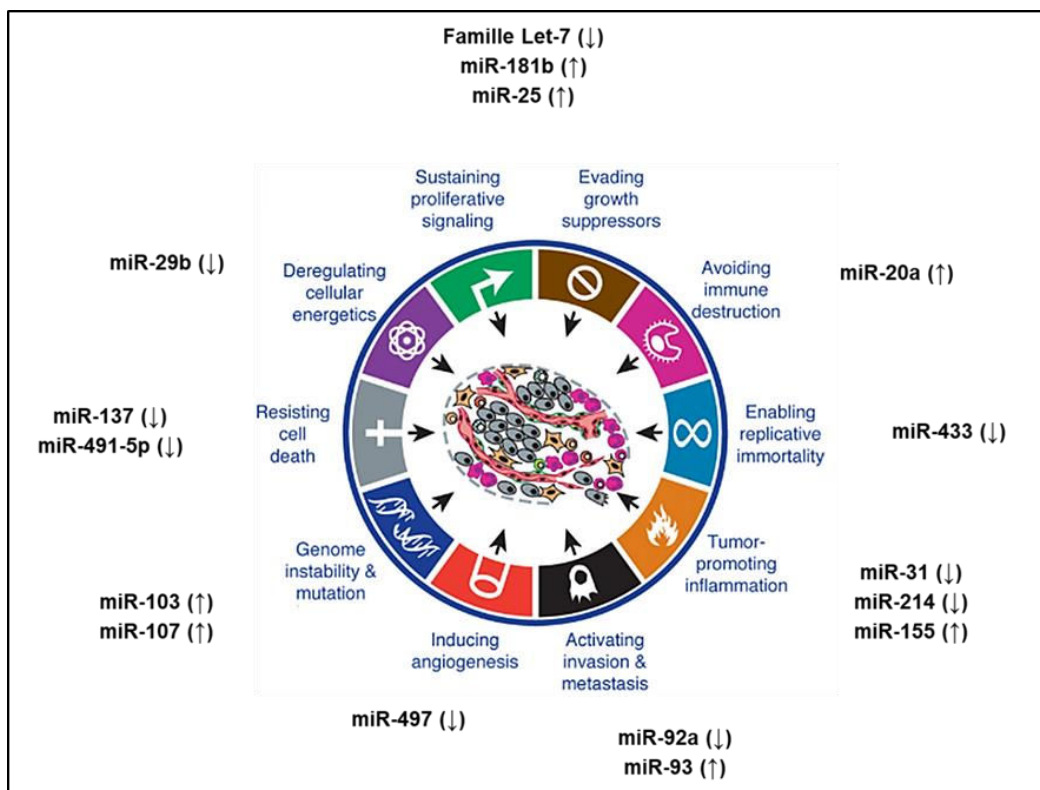


Figure I.B21: Implication des miRNAs dans les 'hallmarks' du cancer. D'après (Thèse de Mégane Vernon) et adapté de (Hanahan and Weinberg, 2011).

L'évolution scientifique a permis de faire émerger les petits et dernièrement les longs ARN non-codants et permettra probablement d'identifier encore de nouveaux ARNnc, de faire de nouvelles classifications, de mettre en évidence de nouvelles fonctions pour les lncRNAs, seuls ou en combinaison avec d'autres molécules telles que les miARNs, les ARNm, les protéines... De nos jours, de plus en plus d'études améliorent notre compréhension de la biologie des cancers ainsi que de l'implication des lncRNAs dans cette pathologie très complexe. De plus il sera peut être possible d'envisager ces ARNnc comme d'éventuels biomarqueurs diagnostiques et/ou pronostiques et/ou prédictifs des cancers afin d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques.





## II. Les lncRNAs en cancérologie

Les lncRNAs possèdent sur le plan fonctionnel un ensemble de rôles variés leur permettant d'être impliqués dans un grand nombre de phénomènes biologiques, ainsi que dans le développement de diverses pathologies comme décrit précédemment. De multiples études ont démontré une dérégulation fréquente de leur expression dans un panel de cancers tels que les cancers colorectaux, de la vessie, du sein et bien d'autres dont les cancers de l'ovaire (**Tableau II.1**).

lncRNA	CANCER														
	Head/neck	Gastric	Lung	Breast	Pancreas	Liver	Colon	Uterine	Ovarian	Osteosarc	Prostate	Bladder	Renal	SNC	Leukemia
ANRIL	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
GAS5		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
H19	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
HOTAIR	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
lincRNA-p21		x	x			x	x		x		x				x
MALAT1	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
MEG3	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
MIAT		x	x	x	x		x		x		x		x		x
NEAT1	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x		x	x	x
PANDA		x	x	x	x	x	x		x	x			x		
PVT1	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
TUG1	x	x	x	x		x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
UCA1	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x
XIST	x	x	x	x		x	x	x	x	x	x	x		x	x

**Tableau II.1 : Exemple de l'implication de multiples lncRNAs dans un panel de cancers. Adapté de (Oliveira et al., 2018).**

### A. Les « hallmarks » du cancer

#### 1. Généralités

La cancérogenèse est définie comme étant multifactorielle et complexe, combinant un ensemble de phénomènes permettant la transformation d'une cellule normale en une cellule cancéreuse, décrite par une croissance cellulaire incontrôlée, une prolifération accrue et une survie à divers dommages. Cette transformation passe par l'acquisition au cours du temps de plusieurs caractéristiques et propriétés nommées « hallmarks » menant à la formation de tumeurs (**Figure II.A1**). Ces hallmarks font partie intégrante des cancers et comprennent par exemple la capacité à induire l'angiogenèse, à résister à la mort cellulaire, à proliférer massivement... (Hanahan and Weinberg, 2011). Une tumeur ne se définit pas simplement par une masse de cellules en prolifération, mais aussi par la présence de

différents types cellulaires, dont les cellules stromales et immunitaires, communiquent entre elles et favorisant un microenvironnement propice au développement tumoral.

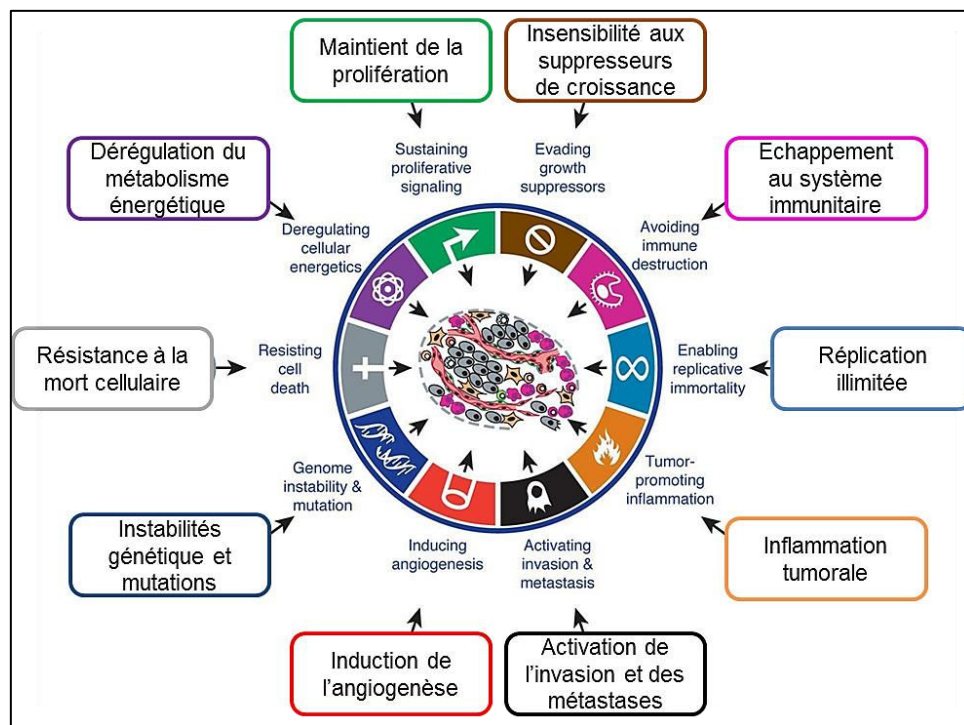


Figure II.A1 : Les différents 'hallmarks' du cancer. Adapté de (Hanahan and Weinberg, 2011).

Les hallmarks sont la conséquence du développement d'instabilités génomiques dans les cellules cancéreuses, créant des mutations aléatoires, ou encore des réarrangements chromosomiques. Comme décrit dans le chapitre précédent, les lncRNAs sont impliqués dans la régulation de l'expression des gènes à différents niveaux, et sont exprimés de façon spécifique au tissu, au stade de développement ou encore à la maladie et sont capables d'influencer de nombreux processus cellulaires. Ils sont de fait impliqués dans le processus de tumorigenèse dans de nombreux cancers et sont acteurs dans les hallmarks du cancer (**Figure II.A2**) (Gutschner and Diederichs, 2012).

Les lncRNAs peuvent se comporter soit comme des oncogènes (HOTAIR ; MALAT1 ; H19 ; UCA1...) favorisant la progression tumorale, soit comme des suppresseurs de tumeurs (MEG3, GAS5, lincRNA-p21...). Certains lncRNAs peuvent présenter un rôle d'oncogène dans un type tumoral et suppresseur de tumeur dans un autre, comme par exemple XIST, qui a un rôle suppresseur de tumeur dans les cancers de l'ovaire (Wang et al., 2018a) et un rôle d'oncogène dans le cancer du poumon non à petites cellules (Fang et al., 2016).

## 2. Implication des lncRNAs dans les « hallmarks » du cancer

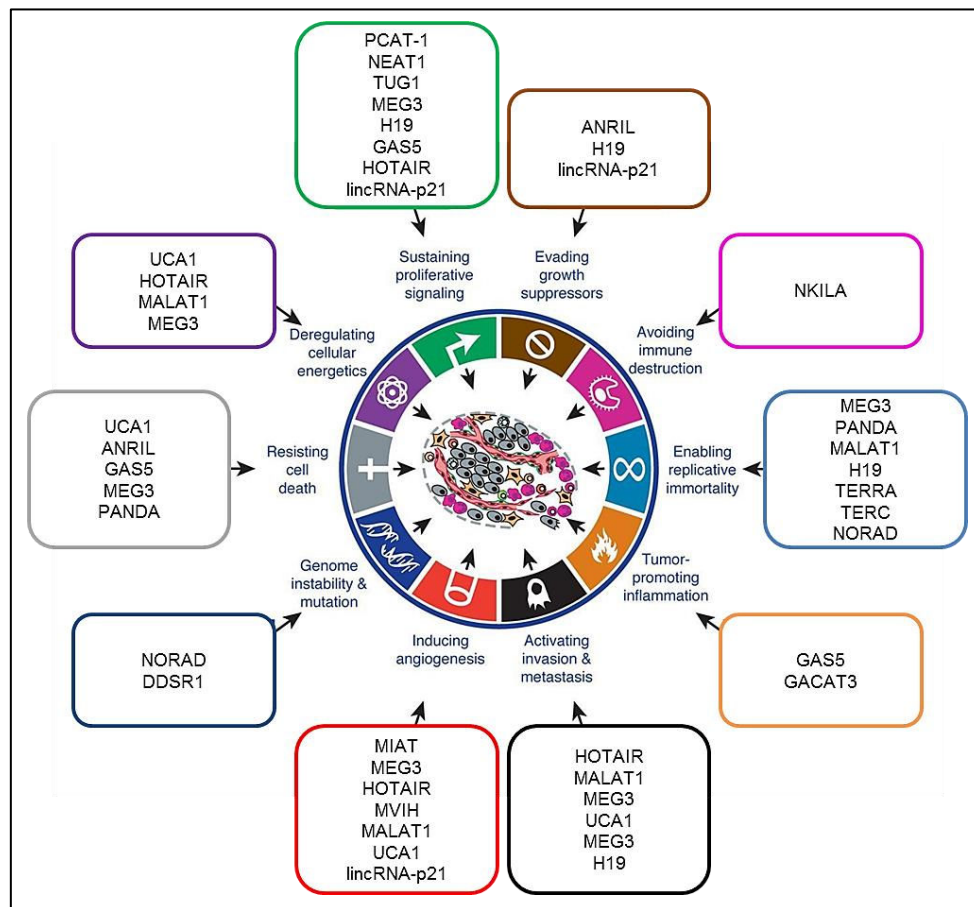


Figure II.A2 : Implication des lncRNAs dans les 'hallmarks' du cancer. Adapté (Gutschner and Diederichs, 2012; Hanahan and Weinberg, 2011; Malek et al., 2014; Oliveira et al., 2018).

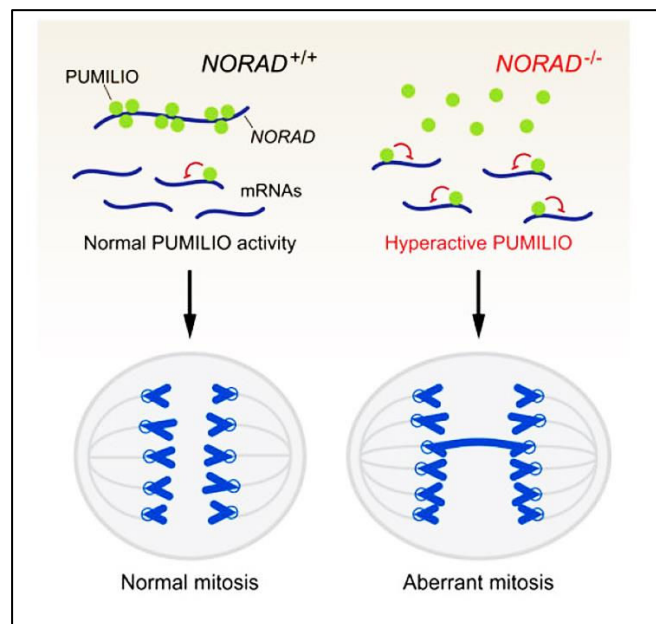
### a) Instabilités génétiques et mutations

Il est maintenant acquis que les cellules cancéreuses font preuve d'une grande instabilité génétique et possèdent de nombreuses altérations génomiques : aneuploïdies, translocations, mutations... (Negrini et al., 2010; Salk et al., 2010). Ces altérations peuvent leur conférer un avantage sélectif par rapport aux autres cellules et être la cause de l'inactivation des gènes suppresseurs de tumeurs, de l'activation des proto-oncogènes, ou encore elles peuvent compromettre les systèmes de surveillance de l'intégrité génomique et donc de permettre de contourner la réponse aux dommages à l'ADN (Jackson and Bartek, 2009).

Il a été mis en évidence l'implication du lncRNA nommé NORAD (Noncoding RNA Activated by DNA Damage) dans le maintien de l'intégrité chromosomique des cellules. L'inactivation de ce lncRNA est suffisante pour créer un phénotype d'instabilité chromosomique (CIN : Chromosomal instability), qui est caractérisé par le gain ou la perte

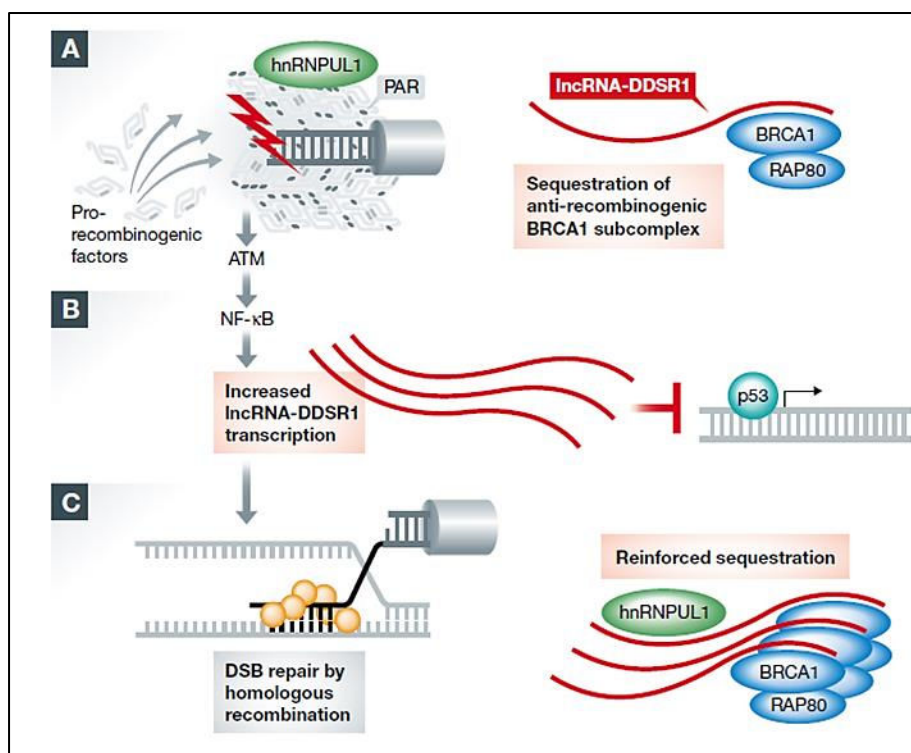


fréquente de chromosomes pendant la phase de mitose. NORAD préserve la stabilité génomique en formant une plateforme de liaison aux protéines de la famille PUMILIO, ce qui a pour effet d'inhiber leurs fonctions. Ces protéines sont des régulateurs de la stabilité génomique, connues pour se lier à l'ARNm de gènes dont l'expression est nécessaire au maintien de la stabilité chromosomique, tels que des facteurs essentiels de la mitose dont le gène CENPJ codant pour une protéine jouant un rôle au niveau de l'intégrité des centrosomes, ou des facteurs de la réparation et de la réplication de l'ADN dont les gènes sont respectivement PARP1/2 et MCM4/8 (**Figure II.A3**) (Lee et al., 2016; Oliveira et al., 2018).



**Figure II.A3** : Implication du lncRNA NORAD dans l'intégrité du génome (Lee et al., 2016).

Le lncRNA DDSR1 (DNA damage-sensitive RNA1) est induit par la voie ATM/NF- $\kappa$ B, elle-même activée par la présence de cassures double brin dans l'ADN. Il a été montré que ce lncRNA est un régulateur de l'expression génique, dont des gènes cibles de p53, et qu'il régule la réparation de l'ADN par HR (Homologous recombination) en interagissant avec les protéines BRCA1 et hnRNPUL1, toutes deux impliquées dans la réparation de l'ADN, régulant ainsi l'accès de BRCA1 et RAP80 aux cassures doubles brins. La perte d'expression de ce lncRNA va perturber la prolifération cellulaire et la signalisation de la réponse aux dommages à l'ADN, réduisant en outre la capacité de réparation de l'ADN par recombinaison homologue. Les mécanismes ne sont pas davantage détaillés (**Figure II.A4**) (Sharma et al., 2015).



**Figure II.A4 : Régulation de la réparation des cassures doubles brins par le lncRNA DDSR1.**

(A) Le recrutement transitoire d'hnRNPUL1, lors de la formation de cassures doubles brins, est modulé par le lncRNA DDSR1 qui séquestre le complexe BRCA1/RAP80. (B) Suite à la réponse aux dommages à l'ADN, la transcription du lncRNA DDSR1 est stimulée par la voie ATM-NF-κB, lui permettant le choix de la voie de réparation par HR et de réguler négativement l'expression de p53. (C) Le rôle séquestreur de DDSR1 pour BRCA1 et RAP80 favorise la réparation des cassures doubles brins par HR (Homologous recombination) (Lukas and Altmeyer, 2015).

## b) Maintien de la prolifération

Une caractéristique fondamentale des cellules cancéreuses est leur capacité à maintenir une prolifération continue sans nécessiter la présence de stimuli. Dans des conditions physiologiques, il existe un équilibre entre la production de facteurs de croissance capables de favoriser l'entrée des cellules dans le cycle cellulaire, leur croissance ou leur survie, et la production de facteurs inhibant cette croissance et favorisant la mort de ces cellules par apoptose. Cette balance permet une homéostasie du nombre de cellules et une activité tissulaire dite normale. Les cellules cancéreuses sont indépendantes de ces signaux et présentent une croissance illimitée. A cet effet, elles peuvent produire elles-mêmes des facteurs de croissance ou leurs récepteurs, favorisant ainsi leur propre prolifération. Elles peuvent également envoyer des signaux pour stimuler les cellules stromales associées à la tumeur, qui à leur tour produisent des facteurs de croissance (Cheng et al., 2008; Hanahan and Weinberg, 2000).

De multiples études ont pu mettre en évidence un rôle crucial de ces lncRNAs dans la cancérogenèse en influençant la prolifération des cellules tumorales (Gutschner and Diederichs, 2012). De nombreux lncRNAs dont l'expression est dérégulée dans les cancers sont transcrits à partir de gènes impliqués dans le cycle cellulaire et ont une expression périodique selon les phases du cycle cellulaire (Hung et al., 2011). Parmi l'ensemble des lncRNAs, certains agissent comme des oncogènes. Le lncRNA **NEAT1** a ainsi été identifié comme ayant un rôle oncogénique, notamment dans le cancer du sein où il y est surexprimé et associé à la formation de métastases, à la taille de la tumeur, au pronostic des patientes et à l'augmentation de la prolifération et de la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) des cellules cancéreuses (Zhang et al., 2017a). Il en est de même pour le lncRNA **TUG1** (taurine-upregulated gene 1) qui favorise la prolifération des cellules cancéreuses ovariennes épithéliales et inhibe leur apoptose en augmentant l'expression de la protéine Aurora kinase A (AURKA), une sérine/thréonine kinase impliquée dans le processus de division cellulaire en régulant la dynamique et la formation des fuseaux mitotique. Elle est connue pour son rôle crucial dans les processus oncogéniques de divers cancers en favorisant la prolifération, la migration, ou encore l'invasion (Li et al., 2018a).

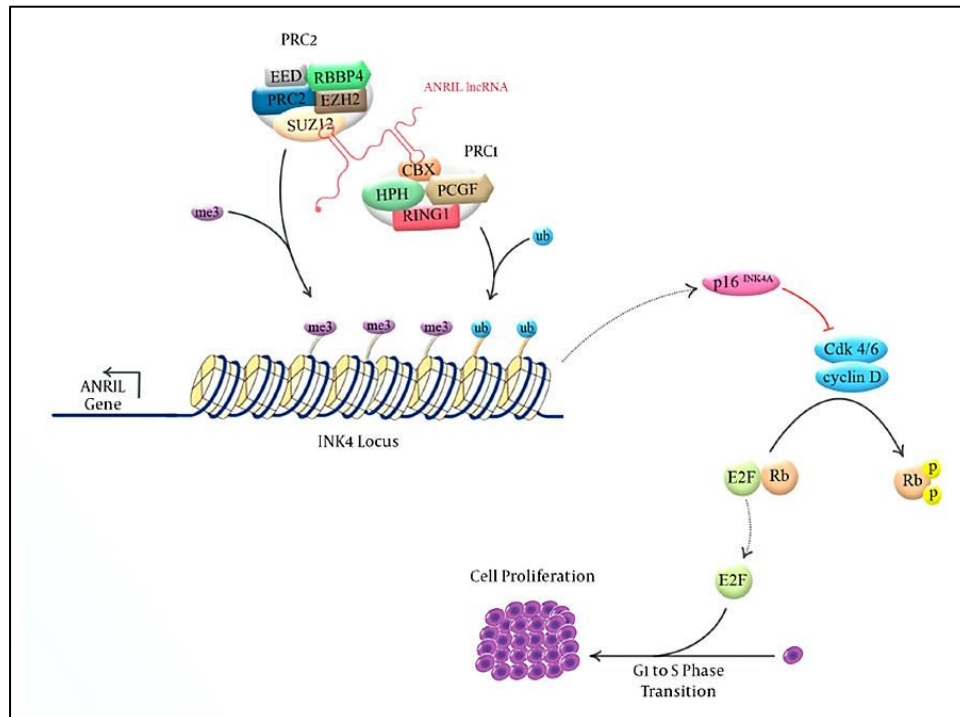
D'autres lncRNAs, dont **MEG3** (maternally expressed gene 3), sont connus pour agir comme des suppresseurs de tumeurs, en limitant le développement et la progression tumorale. Dans une étude faite par 'Wei GH and al', MEG3 a été démontré comme sous-exprimé dans le tissu cancéreux gastrique, et son expression est positivement corrélée avec la survie des patientes et négativement avec la taille de la tumeur. Il a également été mis en évidence que MEG3 est capable d'inhiber la prolifération des cellules cancéreuses gastriques, ainsi que la formation de métastases grâce une augmentation de la protéine p53 (Wei and Wang, 2017).

### c) Insensibilité aux signaux supprimant la croissance de la tumeur

Ce hallmark est en lien direct avec le précédent et concerne la faculté des cellules cancéreuses à limiter ou stopper l'activation ou l'expression de gènes suppresseurs de tumeurs, comme par exemple RB (retinoblastoma-associated), PTEN (Phosphatase and TENsin homolog) ou comme TP53 (Gutschner and Diederichs, 2012; Hanahan and Weinberg, 2011; Sherr and McCormick, 2002).

Le lncRNA **ANRIL** (antisense non-coding RNA in the INK4 locus) est un oncogène qui interagit avec SUZ12 (suppressor of zeste 12 homolog), une sous-unité du complexe de répression PRC2 impliqué dans la méthylation des histones (H3K27me3), et réprime par ce biais l'expression du gène suppresseur de tumeurs p15<sup>INK4</sup>, connu pour inhiber CDK4 et CDK6 (Cyclin-dependent kinase) (**Figure II.A5**) (Kotake et al., 2011). De plus, ANRIL est

également capable d'interagir avec une sous-unité du complexe PRC1, impliqué dans la mono-ubiquitination de l'histone H2A (H2AK119Ub1), CBX7 (chromobox homolog 7). Cette interaction lui permet d'être recruté au niveau du locus des gènes suppresseurs de tumeurs p16<sup>INK4a</sup>/p14<sup>ARF</sup>, connus pour être des régulateurs du cycle cellulaire, respectivement par liaison aux CDKs et à MDM2, une protéine associée à p53 (**Figure II.A5**) (Yap et al., 2010).



**Figure II.A5 : Le lncRNA ANRIL régule l'expression des gènes, p15/CDKN2B, p16/CDKN2A et p14/ARF (localisés sur le même locus qu'ANRIL), par le recrutement des complexes PRC2 et PRC1, via leurs sous-unités respectives SUZ12 et CBX (Taheri and Ghafouri-Fard, 2018).**

Le lncRNA H19 agit quant à lui par l'intermédiaire du miARN-675 dont il est le précurseur. Ce miRNA a pour cible l'ARNm de RB, inhibant l'expression de cette protéine suppresseur de tumeur connue pour réguler négativement le cycle cellulaire dans le cancer colorectal (Oliveira et al., 2018; Tsang et al., 2010).

Le lncRNAs LincRNA-P21 (long intergenic non-coding RNA-P21) a été identifié pour son rôle-clé dans la régulation de p21, dont l'inhibition dans le carcinome hépatocellulaire favorise la tumorigénicité. Le gène *p21*, cible de la protéine p53, est un inhibiteur de CDKs, régulant négativement le cycle cellulaire en bloquant la transition G1/S. De plus, il est impliqué dans le processus de sénescence cellulaire en association avec p53 (Gu et al., 2013; Oliveira et al., 2018; Zheng et al., 2015).

#### d) Echappement au système immunitaire

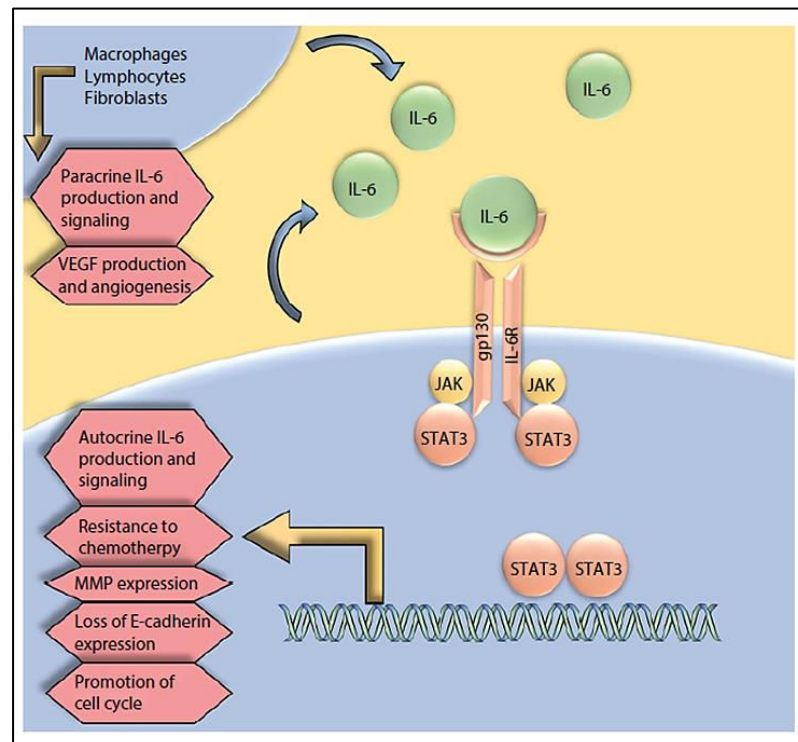
L'échappement au système immunitaire a été mis en évidence comme l'un des hallmarks du cancer, un mécanisme très complexe encore mal connu. Les cellules cancéreuses acquièrent l'aptitude à détourner les mécanismes de contrôle mis en place par le système immunitaire. Par exemple, les cellules tumorales vont inactiver les lymphocytes T grâce à la liaison entre la protéine PD-L1 située sur les cellules tumorales et le récepteur PD-1, lui présent sur les lymphocytes T. Il en découle la mise en place de traitements d'immunothérapie qui dans ce cas vont empêcher l'inactivation des lymphocytes T grâce à l'utilisation d'anti-PD-L1 ou d'anti-PD-1 (nivolumab et pembrolizumab). Plus récemment, il s'est développé une nouvelle approche d'immunothérapie appelée « thérapie cellulaire adoptive », qui a pour but une stimulation du système immunitaire du patient pour se défendre contre les cellules cancéreuses. Pour cela, il y a une sélection de lymphocytes T à partir du sang du patient. Ces lymphocytes T vont subir un ensemble de modifications génétiques, leur permettant d'exprimer ensuite des récepteurs dits « antigéniques chimériques » (CAR : Chimeric antigen receptor), ce qui va leur permettre, une fois réinjectés dans le corps du patient, de reconnaître des antigènes situés au niveau des cellules tumorales, tels que CD19, et de détruire ces cellules tumorales. Ces lymphocytes sont nommés CAR-T cells (Chen and Mellman, 2017; Hanahan and Weinberg, 2011; Turtle et al., 2016).

On sait à ce jour que certains lncRNAs vont participer à cet échappement, comme **NKILA** (NF- $\kappa$ B-interacting long noncoding RNA), un lncRNA identifié comme régulant la sensibilité des cellules T à l'AICD (Activation-induced cell death) par l'inhibition de l'activité de NF- $\kappa$ B (nuclear factor-kappa B), une voie liée à la cancérogenèse de divers types cellulaires. L'AICD est un processus permettant une élimination immunologique, souvent exploitée par les cancers pour échapper à la destruction immunologique. De plus, il a été démontré dans cette étude que l'inhibition de l'expression de NKILA favorise la thérapie des cellules-T adoptives *in vivo* dans un modèle de PDX (Huang et al., 2018; Oliveira et al., 2018).

#### e) Inflammation tumorale

Outre l'échappement au système immunitaire, les cancers agissent sur le système immunitaire par le biais de processus inflammatoires. La réponse inflammatoire est associée à la tumeur, ce qui favorise la tumorigenèse et la progression tumorale (Hanahan and Weinberg, 2011). Les cellules cancéreuses, notamment ovariennes, sécrètent des cytokines pro-inflammatoires agissant sur les cellules du microenvironnement, fibroblastes et cellules

immunitaires. En retour, ces cellules sécrètent elles aussi des cytokines. Parmi ces cytokines, l'interleukine-6 (IL-6) est impliquée dans de nombreux processus oncogéniques, tels que le remodelage de la matrice extracellulaire, l'EMT, ou l'entrée dans le cycle cellulaire, par l'activation des voies de signalisation, JAK/STAT dont les facteurs de transcriptions STAT interviennent dans l'inflammation, l'immunité et l'apoptose (**Figure II.A6**) (Browning et al., 2018). L'expression d'IL-6 est sous le contrôle de la voie NF-kb et dépend également du niveau de ROS (reactive oxygen species), en général élevé dans les cancers (Mittal et al., 2014).



**Figure II.A6 : La cytokine 'IL-6' est impliquée dans divers processus oncogénique.**

Elle est exprimée de manière autocrine par les cellules cancéreuses de l'ovaire et paracrine par les cellules du microenvironnement tumoral. Son expression favorise la résistance à la chimiothérapie, la TEM (transition épithélio-mésenchymateuse)... : MMP (matrix metalloproteinase); VEGF (vascular endothelial growth factor) (Browning et al., 2018).

Le lncRNA **GACAT3** (Gastric Cancer Associated Transcript 3) est impliqué dans l'inflammation tumorale. Le traitement par IL-6 entraîne l'expression de STAT3, appartenant à la voie JAK/STAT, surexprimée dans de nombreux cancers où elle participe à l'action de nombreuses cytokines inflammatoire, qui à son tour va activer le lncRNA GACAT3, identifié comme la cible de STAT3. Le mécanisme n'étant pas davantage détaillé (Oliveira et al., 2018; Shen et al., 2016).

Le lncRNA **GAS5** (growth arrest specific transcript 5) est également associé aux processus inflammatoires et immunitaires. Il est connu pour être sous-exprimé dans de

nombreux cancers et pour agir comme un suppresseur de tumeur. Il a été mis en évidence que sa surexpression permet l'inhibition de l'expression et de la sécrétion de cytokines, notamment l'IL-10 (interleukine-10), une protéine permettant la diminution de la réponse immunitaire. GAS5 réprime également VEGF-A (Vascular endothelial growth factor A), impliqué dans la croissance tumorale, via les voies NF-κB et ERK1/2 ce qui a pour conséquence une diminution de la prolifération tumorale (Li et al., 2017c; Oliveira et al., 2018).

#### f) Réplication illimitée

Les cellules différenciées possèdent un nombre limité de cycles de division cellulaire avant soit une entrée en sénescence, état irréversible viable mais non prolifératif, soit le déclenchement de la mort cellulaire. Le raccourcissement des télomères à chaque réplication constitue une limitation du nombre de divisions cellulaires puisque leur raccourcissement entraîne la sénescence. Dans les cellules cancéreuses, l'expression de la télomérase permet un renouvellement des télomères aux extrémités chromosomiques, favorisant ainsi une protection de l'ADN et une résistance à la sénescence et à l'apoptose (Blasco, 2005; Hanahan and Weinberg, 2011).

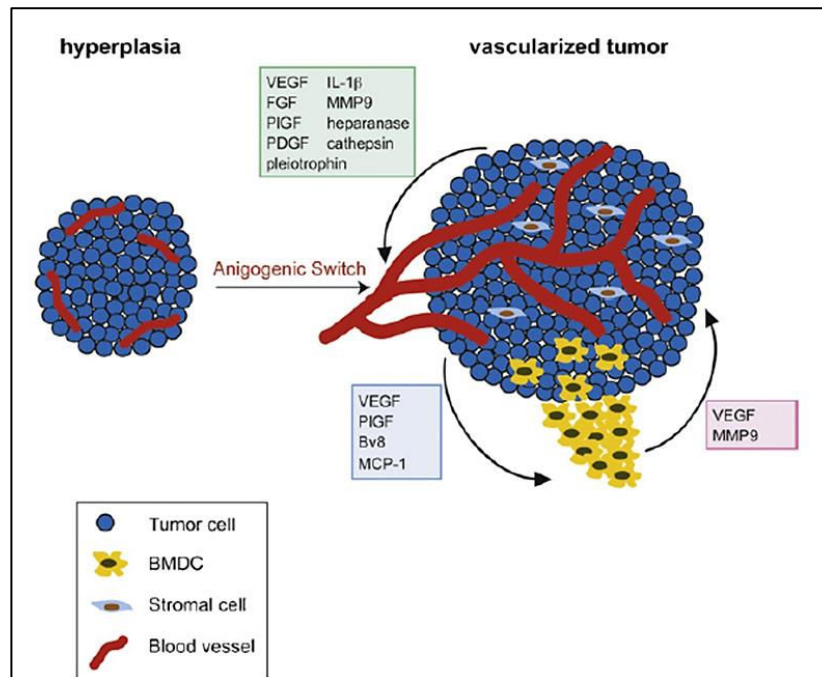
Il a été montré que le lncRNA, **TERRA** (telomeric repeat containing RNA) joue un rôle dans la régulation de l'immortalité répllicative. Ce lncRNA est transcrit à partir d'extrémités télomériques, il agit comme un suppresseur de tumeur capable d'inhiber l'activité de la télomérase et est faiblement exprimé dans diverses cellules cancéreuses (Oliveira et al., 2018; Sinha et al., 2015).

Le lncRNA, **TERC** (Telomerase RNA Component) est connu pour être amplifié dans divers cancers et pour être impliqué dans l'immortalisation répllicative. Il a été montré que la synthèse des télomères dépend de l'action de la polymérase TERT (Telomerase Reverse Transcriptase), une transcriptase inverse. Ce lncRNA est capable de former un complexe ribonucléoprotéique, en association avec TERT, en agissant comme un « scaffold » permettant d'assembler les sous-unités protéiques de la télomérase. De plus, TERC sert de matrice pour la synthèse des répétitions télomériques, lui donnant un rôle crucial dans la régulation de l'activité de la télomérase, et donc dans la synthèse et le maintien des télomères (Grammatikakis et al., 2014; Gutschner and Diederichs, 2012).

#### g) Induction de l'angiogenèse

L'angiogenèse est le processus permettant la formation de nouveaux vaisseaux sanguins. Ce processus est nécessaire pour permettre un apport en oxygène et en

nutriments à la tumeur, ainsi qu'une évacuation du dioxyde de carbone et des déchets métaboliques. L'angiogenèse est indispensable à la croissance tumorale et est favorisée par la production de facteurs de croissance par les cellules cancéreuses, comme le VEGF ou le FGF (fibroblast growth factor), et par la régulation de gènes oncogéniques (**Figure II.A7**) (Baeriswyl and Christofori, 2009; Carmeliet, 2005; Hanahan and Weinberg, 2011). Il a été mis en évidence que plusieurs lncRNAs sont impliqués dans la néo-angiogenèse associée au développement tumoral.



**Figure II.A7 : Représentation schématique du switch angiogénique se produisant suite à un déséquilibre entre les facteurs anti- et pro-angiogénique, avec une croissance tumorale stimulée par l'accumulation de facteurs pro-angiogénique.**

Cadre vert : facteurs pro-angiogénique et protéases, sécrétés par les cellules tumorales. Cadre bleu : facteurs sécrétés par les cellules tumorales, permettant le recrutement de cellules inflammatoires. Cadre rose : facteurs pro-angiogénique et protéases, sécrétés par les cellules immunitaire recrutées sur le site tumoral (Baeriswyl and Christofori, 2009).

Le lncRNA MIAT (myocardial infarction-associated transcript) a été identifié par 'YAN *B and al*' comme régulant l'expression du 'VEGF' par son rôle de compétiteur endogène vis-à-vis du miR-150-5p. Ce miARN est un répresseur de la traduction de l'ARNm du VEGF, donc sa séquestration permet aux VEGF d'induire la formation de nouveaux vaisseaux sanguins (Yan et al., 2015).

Le lncRNA MEG3 dont l'expression est inhibée dans divers cancers et également associée à l'angiogenèse. Son inhibition induit une augmentation de l'expression des facteurs de croissance impliqués dans la formation de vaisseaux sanguins, VEGF-A et



VEGFR-1 (Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 1), en partie en lien avec la voie p53. La protéine p53 est connue pour inhiber l'angiogenèse tumorale et MEG3 pour augmenter l'expression de p53 et donc de ses gènes cibles (Pfaff et al., 2018; Zhou et al., 2012).

Plusieurs autres lncRNAs oncogéniques ont été identifiés comme favorisant l'angiogenèse : HOTAIR régule le VEGF dans le gliome (Ma et al., 2017), et MVIH (lncRNA associated with microvascular invasion in HCC) inhibe la sécrétion de la protéine PGK1 (phosphoglycerate kinase 1), un inhibiteur de l'angiogénèse, dans le carcinome hépatocellulaire (HCC) (Oliveira et al., 2018; Yuan et al., 2012).

## h) Résistance à la mort cellulaire

La mort cellulaire programmée par apoptose représente une barrière naturelle à la progression du cancer puisqu'elle peut se déclencher suite à divers stress oncogéniques que subissent les cellules cancéreuses pendant la tumorigenèse, comme l'accumulation de dommages à l'ADN, ou encore suite à un traitement anticancéreux. Les cellules tumorales parviennent à échapper à l'apoptose de multiples manières, soit par des altérations des voies de signalisation, de survie ou de mort menant à des modifications d'expression des protéines pro- et anti-apoptotiques de la famille Bcl-2, soit par des altérations touchant directement les membres de la familles Bcl-2. Au final, une diminution d'expression des protéines pro-apoptotiques (BIM, Puma...), ou à l'inverse une surexpression de protéines anti-apoptotiques (Bcl-2, Bcl-xL...) (**Figure II.A8**) (Adams and Cory, 2007; Hanahan and Weinberg, 2011; Junntila and Evan, 2009) permettra une résistance des cellules cancéreuses au stress oncogénique.

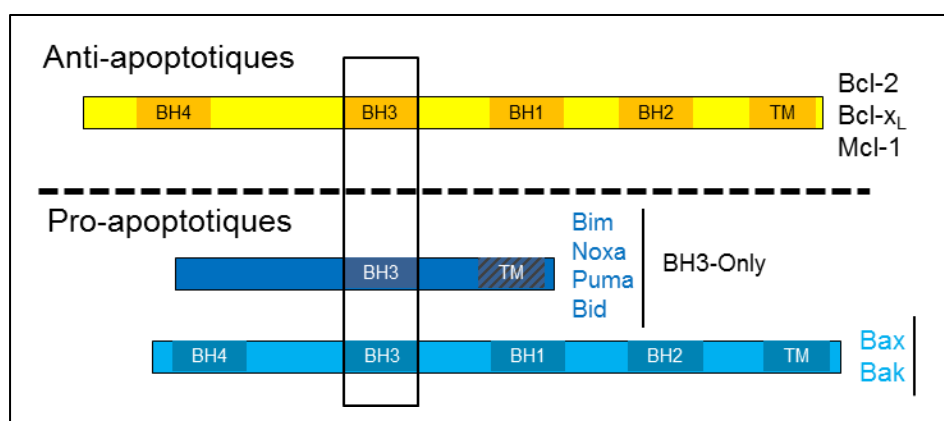


Figure II.A8 : Représentation schématique des protéines de la famille Bcl-2. Adapté de (Adams and Cory, 2007).

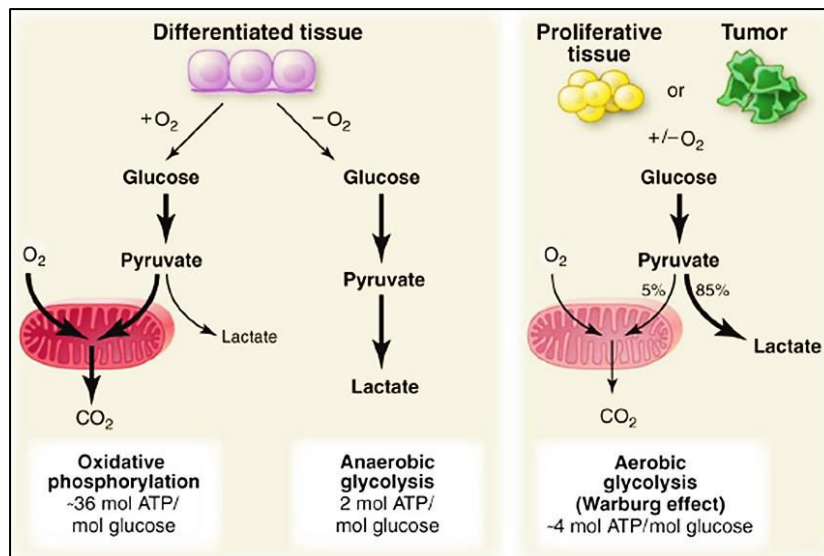
Divers lncRNAs sont impliqués dans le développement d'une résistance à la mort cellulaire par apoptose (Oliveira et al., 2018). Certains lncRNAs, vont agir comme des oncogènes, c'est le cas d'UCA1 qui est impliqué dans l'inhibition de l'apoptose dans le cancer colorectal où le mécanisme d'action n'est pas précisé (Han et al., 2014), ou dans l'activation de la voie de survie AKT dans le cancer de la vessie, où le contrôle transcriptionnel d'UCA1 dépend du facteur de transcription Ets-2 (Wu et al., 2013a). Il favorise aussi la chimiorésistance en induisant la surexpression de gènes anti-apoptotiques tel que BCL-2, de gènes oncogéniques tel que RAB22A, ainsi que par l'activation des voies de signalisation telles que la voie Wnt ou AKT/mTOR (Cheng et al., 2015; Fan et al., 2014a), toutes deux très dérégulées dans les cancers.

Le lncRNA ANRIL a aussi été associé à l'apoptose et à la prolifération cellulaire dans plusieurs tumeurs malignes. Ses effets sur la régulation de l'apoptose sont de natures variées. Il peut, dans le cancer gastrique, inhiber l'expression du suppresseur de tumeur P15<sup>INK4B</sup> et augmenter l'expression de BCL-2 (anti-apoptotique), Il peut également inhiber la transcription du miR-99a et du miR-449a, impliqués dans l'apoptose, par régulation épigénétique en association à PRC2 (Wang et al., 2018b). Dans le cancer du poumon non à petites cellules, ANRIL joue sur l'apoptose en inhibant la transcription de p21 et KLF2 (Kruppel-like factor 2), deux suppresseurs de tumeurs, par un mécanisme épigénétique en association avec EZH2, membre du complexe PRC2 (Nie et al., 2015). Dans le cancer de la vessie, ce lncRNA joue également un rôle sur la prolifération et l'apoptose : il peut réprimer l'expression des protéines PARP (poly(ADP-ribose) polymérase) et bax (pro-apoptotique), inhiber le clivage des caspases 3/9 et augmenter l'expression de BCL2 (Zhu et al., 2015).

D'autres lncRNA vont avoir une fonction de suppresseurs de tumeurs, par exemple le lncRNA GAS5 impliqué dans l'inhibition de la prolifération, dans le cancer de la vessie, par une corrélation négative entre l'expression de ce lncRNA et l'expression de la CDK6 (Cyclin-dependent kinase 6) et de la cycline D1, ainsi qu'une corrélation positive entre GAS5 et p21. C'est une régulation post-transcriptionnelle mais les mécanismes précis n'ont pas été décrits. De plus, il est impliqué dans l'activation de l'apoptose dans le cancer du poumon non à petites cellules, *via* la régulation post-transcriptionnelle de p53, le mécanisme n'ayant pas été décrit (Pickard and Williams, 2015). De plus, le lncRNA MEG3 décrit plus haut, a été identifié comme capable d'induire l'apoptose par l'activation de P53, par inhibition de MDM2, une E3 ubiquitine ligase connue pour ubiquitinyler P53; les interactions directes ou indirectes ainsi que le mécanisme précis, ne sont pas décrits ici (Lu et al., 2013).

## i) Dérégulation du métabolisme énergétique

Une autre des altérations majeures des cellules tumorales est la présence d'altérations au niveau du métabolisme énergétique (Hsu and Sabatini, 2008; Vander Heiden et al., 2009). Dans les cellules normales, la voie métabolique privilégiée est la voie oxydative, alors qu'au fur et à mesure que la tumeur se développe, les cellules cancéreuses vont favoriser l'utilisation de la voie glycolytique malgré la présence d'oxygène (**Figure II.A9**) (Hay, 2016). Ces cellules ne présentent pas de modifications géniques essentielles pouvant expliquer ce choix métabolique, en revanche, elles semblent adapter leurs capacités métaboliques à leurs principaux besoins. Toutefois, les voies métaboliques régulant le passage de la phosphorylation oxydative à la glycolyse, impliquant par exemple PI3K, AMPK (AMP-activated protein kinase), P53 ou encore HIF-1 (Hypoxia Inducible Factors 1), sont sous l'influence de divers facteurs dont des oncogènes. En outre, la néoangiogenèse tumorale donne lieu à des vaisseaux anormaux et à une oxygénation imparfaite. Il en résulte une hypoxie chronique dans la tumeur, entraînant la stabilisation du facteur HIF1, ce qui explique au moins en partie cette orientation glycolytique des tumeurs (Semenza, 2010).



**Figure II.A9 : Représentation schématique des différentes voies métaboliques utilisées par les cellules non proliférantes (normales) et les cellules proliférantes, normales ou tumorales (Effet warburg).**

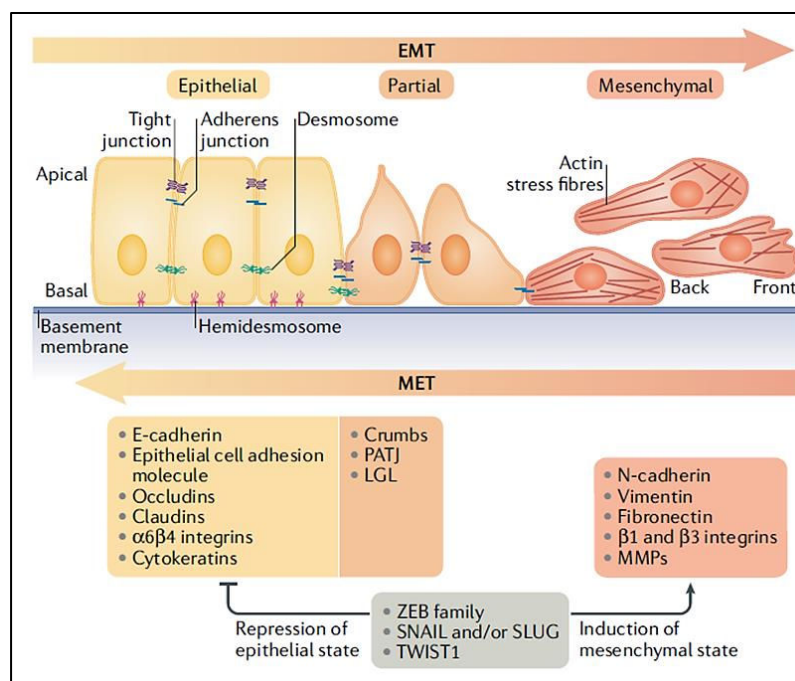
Les cellules non proliférantes en présence d'oxygènes favorisent la phosphorylation oxydative, produisant beaucoup d'ATP. Si l'oxygène est limitant, elles favorisent la glycolyse anaérobie avec une faible production d'ATP. Les cellules proliférantes, dont les cellules cancéreuses, privilégient la glycolyse aérobie en présence ou non d'oxygène, produisant peu d'ATP mais maintiennent fonctionnelles les mitochondries (Vander Heiden et al., 2009).

Divers lncRNAs ont été décrits comme ayant un rôle sur le métabolisme du glucose et ce de deux manières, soit en ciblant indirectement les voies clés de ce processus, soit en ciblant directement les enzymes de la glycolyse (Oliveira et al., 2018). Par exemple, le lncRNA UCA1 est connu pour activer la voie PI3K/AKT dans divers cancers, dont le cancer de la vessie (Wu et al., 2013a). AKT est un activateur de l'expression de GLUT1 et GLUT3, des transporteurs de glucose, et de la translocation de GLUT4 (Glucose transporter 1/3/4), favorisant ainsi l'absorption du glucose (Kohn et al., 1996). Cette voie de signalisation est aussi régulée par HOTAIR dans le carcinome épidermoïde du larynx, démontré comme régulant négativement le suppresseur de tumeur 'PTEN', un antagoniste de PI3K, par modification épigénétique, favorisant ainsi l'activation d'AKT (Li et al., 2013, 2017b).

Les lncRNAs MALAT1 et MEG3 ont été démontrés comme directement associés à la dérégulation du métabolisme énergétique des cellules cancéreuses en dérégulant l'expression de p53, respectivement comme inhibiteur et comme activateur. P53 est connu pour inhiber GLUT1, GLUT4 et la phosphoglycérate mutase, une enzyme essentielle pour la voie glycolytique (Tripathi et al., 2013; Zhang et al., 2010).

## j) Invasion et formation de métastases

Les cellules tumorales présentent des altérations, morphologiques de la dynamique d'adhésion/migration et de leur attachement aux autres cellules, ainsi qu'à la matrice extracellulaire (MEC). La transition épithélio-mésenchymateuse est mise en place, leur permettant d'acquérir un degré de malignité supérieure se traduisant par le développement d'une capacité invasive, à former des métastases à distance, à résister à l'apoptose et à envahir divers tissus (Hanahan and Weinberg, 2011; Klymkowsky and Savagner, 2009). Cette TEM se caractérise par une transformation des cellules épithéliales en cellules mésenchymateuses, plus mobiles. Ceci est permis notamment par une perte de l'expression des protéines de la famille des cadhérines dont l'E-cadhérine (Peinado et al., 2004) impliquées dans l'adhésion intercellulaire et par une activation des gènes associés à la mobilité et à l'invasion cellulaire. Dans le cas de cellules cancéreuses, cette transformation n'est pas nécessairement complète, elles peuvent présenter des caractéristiques propres aux deux phénotypes : épithélial et mésenchymateux. Les processus d'invasion et de métastases sont une cause majeure de récurrence du cancer et sont largement associés à des taux de mortalité élevés, et plusieurs ARNnc ont été observés dans le mécanisme métastatique (**Figure II.A10**).



**Figure II.A10 : Représentation schématique de la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM ou EMT) et des facteurs associés au phénotypes épithélial ou mésenchymateux (Dongre and Weinberg, 2018).**

Parmi ses nombreuses fonctions, **HOTAIR** (HOX Transcript Antisense RNA), un lncRNA oncogénique, est capable de favoriser la TEM (Battistelli et al., 2017) dans divers cancers dont les cancers de l'ovaire (Qiu et al., 2014). Il est capable d'inhiber d'une part l'expression de nombreux gènes associés à l'adhésion cellulaire comme la Claudin-11 (CLDN11) ou les protocadhérines- $\alpha$  (PCDHA), d'autre part il agit comme régulateur négatif d'inhibiteurs de ce processus tels que PTEN ou WIF-1 (WNT inhibitory factor 1) par des mécanismes de régulation épigénétique faisant intervenir le complexe PRC2. HOTAIR permet également la régulation de l'expression de métalloprotéinases capable de dégrader la MEC et de favoriser l'invasion mais le mécanisme exact n'est pas davantage détaillé (Oliveira et al., 2018).

**MALAT1** (Metastasis Associated Lung Adenocarcinoma Transcript 1) est connu pour être surexprimé dans de nombreux cancers où il présente des fonctions oncogéniques. Il a été mis en évidence qu'il joue un rôle dans la formation des métastases, la TEM, la migration des cellules cancéreuses et donc dans le développement tumoral. Il agit comme répresseur de l'E-cadhérine et activateur de la N-cadhérine et de la fibronectine par des mécanismes épigénétiques impliquant SUZ12, un membre du complexe PRC2. Il régule également positivement des marqueurs de TEM à la hausse comme SLUG, ZEB1/2 (Zinc Finger E-Box Binding Homeobox 1/2)... (Fan et al., 2014b; Oliveira et al., 2018; Ying et al., 2012).

**UCA1** (Urothelial Cancer Associated 1) est impliqué dans la régulation de l'invasion et des métastases, mais aussi dans de nombreux autres processus favorisant la croissance

tumorale et ce dans divers cancers. Il a été mis en évidence qu'il est capable d'agir comme une éponge pour plusieurs miARNs, régulant ainsi des gènes de la TEM. Par exemple, le lien direct entre UCA1 et miR-135a permet d'augmenter l'expression des MMP-2 et MMP-9 (Zhang et al., 2017b). Il agit aussi sur d'autres miARNs tels que miR-1, miR-204-5p, miR-193a-3p, miR-145 et miR-216. De plus, l'augmentation de l'expression d'UCA1 favorise l'invasion et les métastases par l'activation de voies de signalisation impliquées dans la progression tumorale, FGFR1/ERK et ZEB1/2-FSCN1 (fascin homologue 1) (Oliveira et al., 2018) et dans les cancers de l'ovaire, par l'activation de la MMP-14 (matrix metallopeptidase 14) grâce à son rôle d'éponge sur le miR-485-5p (Yang et al., 2016).

Cette liste n'est pas exhaustive car de nombreux autres lncRNAs ont déjà été associés à l'invasion et aux métastases dans diverses tumeurs, tels que NEAT1 (Zhang et al., 2017a) comme oncogène, MEG3 (Wei and Wang, 2017) comme suppresseur de tumeur.

La première définition des hallmarks du cancer par Hanahan et Weinberg en 2000 ne comptait que 6 hallmarks (Hanahan and Weinberg, 2000). Une mise à jour parue en 2011 en comptait 10 (Hanahan and Weinberg, 2011). La définition des hallmarks du cancer n'est pas une classification figée, mais rend compte de l'état d'avancement des connaissances de la biologie des cancers. L'évolution rapide des connaissances, grâce notamment aux progrès techniques mis en place depuis 2011 permet d'envisager une évolution prochaine de cette définition. La mise en évidence de l'importance des mécanismes épigénétiques et de l'ampleur de leurs altérations dans les cancers, notamment en lien avec les lncRNAs, souligne la pertinence de considérer à l'avenir les perturbations des mécanismes épigénétiques de régulation de l'expression des gènes comme un nouveau « hallmark » du cancer.

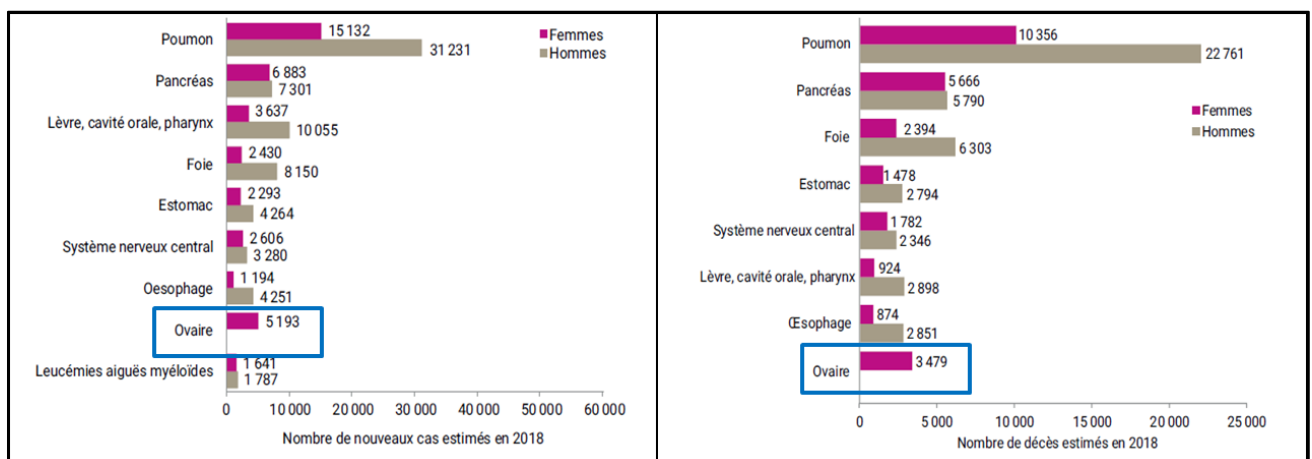
Outre l'implication majeure des lncRNAs dans les mécanismes épigénétiques, un grand nombre d'études ont décrit de multiples lncRNAs associés aux hallmarks, et cela dans presque tous les types de tumeurs, soulignant leur rôle essentiel dans le développement tumoral. Certains lncRNAs sont impliqués dans la majorité des cancers tels que HOTAIR ou MALAT1, tandis que d'autres ont des rôles plus spécifiques à un type de tumeur comme PCA3 dans le cancer de la prostate. A ce titre, les lncRNAs constituent aujourd'hui de potentiels biomarqueurs, diagnostiques et pronostiques, et d'éventuelles cibles thérapeutiques afin d'améliorer la prise en charge des cancers. De la même manière que dans l'ensemble des types tumoraux, un nombre croissant de lncRNAs voit leur implication mise en évidence dans les cancers de l'ovaire, qui constituent le sujet majeur des recherches menées au laboratoire. Les principales caractéristiques de ce type tumoral sont décrites ci-après.

## B. Les cancers de l’ovaire

### 1. Epidémiologie

Les cancers de l’ovaire représentent le 7<sup>ème</sup> cancer le plus souvent diagnostiqué chez les femmes dans le monde, et sont responsables d’environ 240 000 nouveaux cas par an et d’environ 152 000 décès (Brett M. et al., 2017; 2019). La survie globale à 5 ans, après le dépistage, dans le monde est de l’ordre de 46% et n’a connu que très peu de progrès depuis 1995.

En France en 2018, 5193 nouveaux cas, ainsi que 3479 décès ont été recensés d’après les données de l’Institut national de Veille Sanitaire (InVS) (**Figure II.B1**). Ces cancers présentent un *ratio mortalité/incidence* particulièrement élevé, traduisant la nécessité de mettre en place de nouvelles stratégies thérapeutiques pour une meilleure prise en charge de ces patientes.



**Figure II.B1 : Estimation de l’incidence et de la mortalité des cancers de l’ovaire en France en 2018. (Institut national de Veille Sanitaire (InVS))**

Les cancers de l’ovaire représentent la 1<sup>ère</sup> cause de décès par cancer gynécologique ainsi que la 4<sup>ème</sup> cause de décès par cancer chez la femme d’après les chiffres 2018, et la moyenne d’âge pour le dépistage des patientes est d’environ 68 ans. Ce cancer est le plus souvent asymptomatique, les patientes pouvant présenter une gêne abdominale, de la constipation ou encore un gonflement du ventre. Ces symptômes entraînent un diagnostic le plus souvent tardif de la pathologie à des stades avancés avec une dissémination tumorale importante (stade III/IV FIGO), se traduisant par une mortalité importante (Alvarez et al., 2016). Seulement 15% des patientes sont diagnostiquées à un stade dit précoce (stade I) avec un taux de survie d’environ 90% alors que la majorité des

cas est détectée tardivement, 75% au stade III, avec une survie globale à 5 ans d'environ 30% (Shao et al., 2018; Webb and Jordan, 2017). Ce cancer se définit également par la présence de récurrences fréquentes dans un délai plus ou moins court, ainsi que d'une chimiorésistance présente initialement ou apparaissant au cours du traitement. Cette résistance constitue la principale cause d'échec thérapeutique, contribuant au sombre pronostic de cette maladie (Colombo et al., 2014; Cornelison et al., 2017).

## 2. Les facteurs de risques

Les cancers de l'ovaire, comme de nombreux cancers, présentent des facteurs de risques multiples et très variés (**Tableau II.B1**) comme l'âge des patientes, un âge supérieur à 64 ans étant prédictif de la mortalité (Momenimovahed et al., 2019). L'hérédité, les antécédents familiaux, l'historique hormonal de la patiente, l'hormonothérapie substitutive mais aussi l'environnement, l'obésité, l'absence d'activité physique, le tabagisme, la consommation d'alcool, la prise de drogue ou encore les facteurs environnementaux, tous en lien les uns avec les autres, sont associés à un risque plus important de développer ce cancer (Brett M. et al., 2017; Matulonis et al., 2016). Par exemple, le risque de développer un cancer de l'ovaire est associé à un taux élevé de cholestérol (OR : 1,42 (1,03-1,97)), et l'obésité associée à l'augmentation de la mort en lien avec ce cancer (HR : 0,58 (0,35-0,96) (Momenimovahed et al., 2019).

Il existe une corrélation entre un risque accru de développer un cancer de l'ovaire et une 'ovulation incessante' de la femme, une relation inverse entre le risque de développer un cancer de l'ovaire et les cycles d'ovulation, avec un ratio pour les cycle d'ovulation de 2,8 (quartile le plus élevé par rapport au plus bas) (Momenimovahed et al., 2019). Ainsi, tout élément pouvant contribuer à la réduction de l'ovulation, telle que l'apparition d'une puberté tardive, la prise de contraceptifs, la grossesse, l'infertilité, une ménopause prématurée, pourront prévenir le risque de survenue du cancer. Par exemple, l'allaitement permet de réduire le risque de la survenue du cancer de l'ovaire de 22% (OR : 0,78 (0,64-0,96) et ce de façon plus marquée si l'allaitement se prolonge (Brett M. et al., 2017; Momenimovahed et al., 2019). De façon controversée, il existe également des facteurs gynécologiques influençant la survenue de ce cancer, comme les maladies inflammatoires pelviennes, l'endométriose, les kystes ovariens qui même bénins pourraient jouer un rôle de précurseur pour les tumeurs ovariennes malignes (Momenimovahed et al., 2019). Sur ce dernier point, la mise en évidence récente que les cancers de l'ovaire ont pour origine les trompes de Fallope (Devouassoux-Shisheboran et al., 2016; Soong et al., 2019) et non l'épithélium ovarien de surface, est un argument en défaveur du lien entre kystes ovariens et cancers de l'ovaire.



Des facteurs génétiques ont été démontrés comme ayant une implication dans la survenue des cancers de l'ovaire, dont 1/5<sup>ème</sup> sont dus à des mutations dans des gènes suppresseurs de tumeurs. La présence de mutations de divers gènes comme les gènes de la voie de réparation MMR (mismatch repair), comprenant *MSH2* (MutS Homolog 2), *MLH1* (MutL Homolog 1), *MSH6* (MutS Homolog 6) ou encore *PMS2* (PMS1 Homolog 2) est retrouvée dans 10 à 15% des cas de cancers de l'ovaire. Ces mutations font partie des facteurs définissant le syndrome de Lynch. Ce syndrome autosomique dominant de prédisposition au cancer est responsable de 10 à 15% des cancers de l'ovaire héréditaire (Momenimovahed et al., 2019). Des mutations dans les gènes *BRIP1* (BRCA1 Interacting Protein C-Terminal Helicase 1) et *RAD51* (Webb and Jordan, 2017) ou encore *TP53* sont également des facteurs de risque de cancer de l'ovaire.

Quand des antécédents familiaux de la maladie sont connus chez la patiente, le risque de la survenue du cancer est de 3 à 7 fois plus élevé et est associé à un risque d'apparition précoce de la maladie, 43-47 ans au lieu de 65-68 ans en moyenne. De plus, il existe des facteurs de prédisposition génétique à ce cancer dont une partie des cas (5 à 10%) est héréditaire. Ce facteur héréditaire dépend majoritairement (65-85%) (Momenimovahed et al., 2019) de mutations liées aux gènes *BRCA1* (BRCA1 Interacting Protein C-Terminal Helicase 1) et *BRCA2* (BRCA2 Interacting Protein C-Terminal Helicase 2), deux protéines impliquées dans la réparation de cassures double-brin de l'ADN par la voie HR et qui jouent un rôle majeur dans de nombreux autres cancers comme le cancer du sein, le cancer colorectal... Les patientes ayant des mutations de *BRCA1* et *BRCA2* ont des risques de développer un cancer de l'ovaire de respectivement 49% et 21% au cours de leur vie (Lynch et al., 2009; Momenimovahed et al., 2019; Pal et al., 2005).

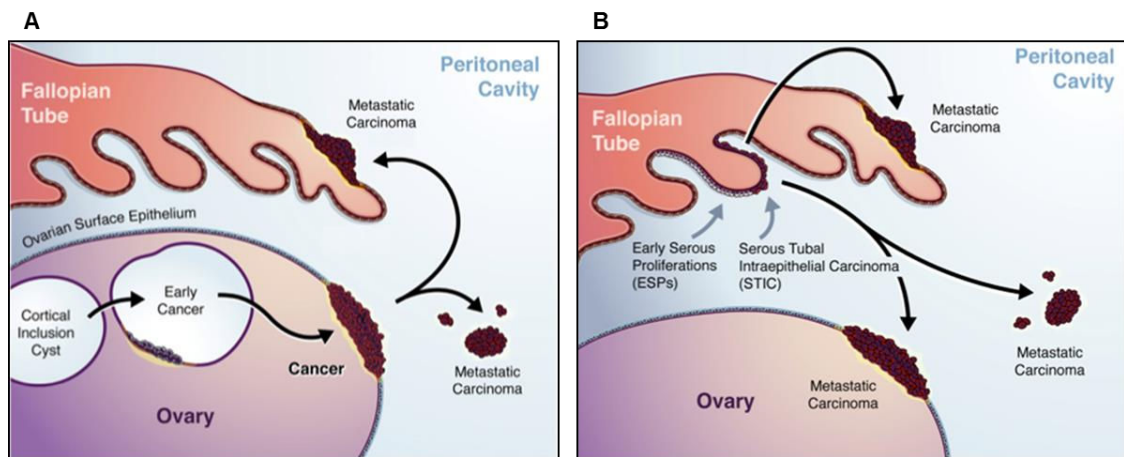
Factors		Protective	Predisposing	Controversial
<b>Demographic</b> <b>Reproductive</b>	Age		✓	
	Menstrual-related factors		✓	
	Age of menarche and menopause			✓
	Parity	✓		
<b>Gynecologic</b>	Pregnancy characteristics			✓
	Higher age of childbirth	✓		
	Pelvic inflammatory disease			✓
<b>Hormonal</b>	Endometriosis		✓	
	Contraceptive methods	✓		
<b>Genetic</b>	Hormone Replacement Therapy (HRT)			✓
	Infertility treatments			✓
	Family history		✓	
<b>Lifestyle</b>	BRCA mutations		✓	
	Lynch syndrome		✓	
	Nutrition and Diet			✓
<b>Other</b>	Obesity and physical activity			✓
	Alcohol, caffeine and cigarettes			✓
	Lactation	✓		
	Lower socioeconomic status		✓	

**Tableau II.B1 : Ensemble des facteurs de risques ayant une influence positive ou négative sur la survenue des cancers de l’ovaire (Momenimovahed et al., 2019).**

### 3. Les caractéristiques des cancers de l’ovaire

#### a) L’origine du cancer de l’ovaire

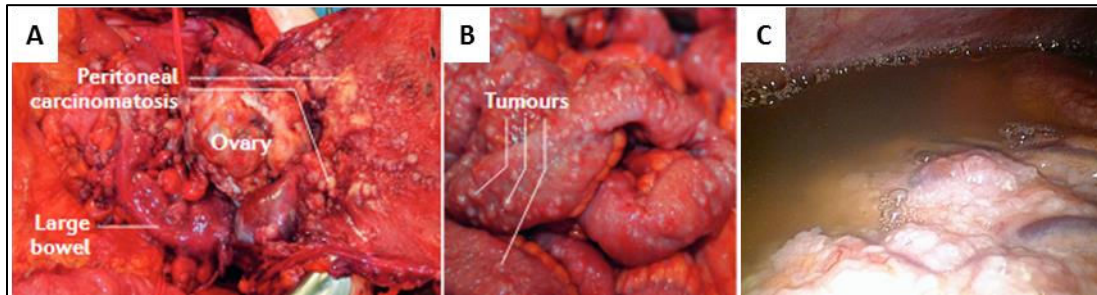
L’origine cellulaire ainsi que la pathogénicité de ce cancer restent encore mal comprises. L’hypothèse d’une provenance tumorale associée à d’autres tissus gynécologiques a été soulevée ces dernières années, n’impliquant l’ovaire que dans un second temps (Brett M. et al., 2017). L’avancée des études morphologiques et génétiques ont permis d’émettre l’hypothèse que les tumeurs séreuses de l’ovaire (bas grade ou haut grade) seraient toutes deux issues de l’épithélium des trompes de Fallope (ou épithélium tubaire) par des voies séparées, avant de se déposer sur l’ovaire. Une morphologie et des signatures moléculaires se sont avérées similaires entre ce tissu initial et les HGSO (high grade serous ovarian cancer) (**Figure II.B2**) (Devouassoux-Shisheboran et al., 2016; Lheureux et al., 2019; Soong et al., 2019).



**Figure II.B2 : L'origine des cancers de l'ovaire.**

(A) Représentation schématique de la théorie prônant l'origine de la carcinogenèse à partir de l'épithélium de surface ovarien ou du développement de kystes à inclusion corticale. (B) Représentation schématique de la seconde théorie prônant l'origine de la carcinogenèse à partir des cellules épithéliales des trompes de Fallope (Soong et al., 2019).

Les cancers de l'ovaire peuvent également se développer, mais de façon plus rare, à partir de cellules germinales dans 5-6% des cas ou de cellules stromales dans 3% des cas. De façon plus générale, les cellules cancéreuses vont se transformer et se multiplier de façon anarchique pour former une tumeur maligne dite primaire. Plus la tumeur grossit, plus le risque d'échappement des cellules cancéreuses dans la cavité pelvienne est grand, leur permettant d'atteindre des organes voisins. Ceci s'accompagne d'une extension plus grande vers le péritoine associée aux métastases dites régionales (nodules de carcinose) et à un liquide inflammatoire parfois abondant, le liquide d'ascite, dans lequel se trouvent le plus souvent des cellules tumorales et des cellules inflammatoires. Ces métastases peuvent atteindre des organes plus éloignés (foie, poumons...) en passant par la circulation sanguine et lymphatique, ce sont les métastases dites à distance (**Figure II.B3**) (Brett M. et al., 2017).



**Figure II.B3 : Les tumeurs de l'ovaire.**

(A et B) Photos pré-opératoire d'une tumeur primitive localisée au niveau d'un des ovaires, avec la présence de nodules de carcinoses péritonéales. Ces nodules sont disséminés dans la cavité pelvienne, atteignant les organes voisins tels que la surface de l'intestin (Matulonis et al., 2016). (C) Photo du liquide ascitique présent dans l'abdomen de la patiente (Thèse de Mégane Vernon).

### **b) Stades et grades**

Le degré d'extension de la tumeur permet de définir le stade de progression du cancer de l'ovaire. C'est la fédération Internationale de Gynécologie et d'Obstétrique (FIGO) (créée en 1998) qui a défini ce classement en 4 stades bien distincts, la dernière mise à jour de cette classification datant de 2014 (**Tableau II.B2**). Le 'stade I' correspond à une tumeur primaire limitée aux ovaires et/ou aux trompes de Fallope, le 'stade II' se caractérise par une extension pelvienne de la tumeur, le 'stade III' correspond à une dissémination péritonéale et/ou à la présence de métastases au niveau des ganglions lymphatiques, puis le 'stade IV' se définit par la présence de métastases à distance. Chacun de ces stades comprend plusieurs classifications intermédiaires définissant plus précisément le degré de dissémination (Mutch and Prat, 2014). Le traitement mis en place pour la patiente dépendra directement du stade de la tumeur, si celle-ci est limitée ou étendue, si d'autres organes sont touchés ou non et si des métastases sont présentes ou non.

<b>Stade I : Tumeur limitée aux ovaires ou aux trompes de Fallope (ou un les deux)</b>	
IA	Atteinte d'un seul ovaire (capsule intacte) ou d'une trompe de Fallope. Pas de végétation externe, ni de cellules malignes dans l'ascite ou dans le liquide péritonéal
IB	Atteinte des deux ovaires (capsules intactes) ou des trompes de Fallope. Pas de végétation externe, ni de cellules malignes dans l'ascite ou dans le liquide péritonéal
IC	Tumeur limitée à un ou deux ovaires ou à une ou deux des trompes de Fallope
-IC1	Rupture per-opératoire
-IC2	Rupture pré-opération ou végétation en surface
-IC3	Cellules malignes dans l'ascite ou dans le liquide péritonéal
<b>Stade II : Tumeur atteignant les ovaires ou les trompes de Fallope (un ou les deux) avec extension pelvienne (en dessous des détroits pelviens) ou cancer péritonéal primaire</b>	
IIA	Extension et/ou implants au niveau de l'utérus et/ou des trompes de Fallope et/ou des ovaires
IIB	Extension à d'autres tissus intrapéritonéaux pelviens
<b>Stade III : Dissémination péritonéale confirmée cytologiquement ou histologiquement en dehors du pelvis et/ou métastases au niveau des ganglions lymphatiques</b>	
IIIA1	Uniquement adénopathies rétropéritonéales positives (démonstrées par cytologie ou histologie)
-IIIA1 (i)	Métastases $\leq$ 10 mm
-IIIA1 (ii)	Métastases $>$ 10 mm
IIIA2	Atteintes péritonéales microscopiques extra-pelviennes (au-delà des détroits pelviens) $\pm$ adénopathies rétropéritonéales positives
IIIB	Métastases péritonéales macroscopiques extra-pelviennes $\leq$ 2 cm $\pm$ adénopathies métastatiques rétropéritonéales positives
IIIC	Métastases péritonéales macroscopiques extra-pelviennes $>$ 2 cm $\pm$ adénopathies métastatiques rétropéritonéales positives (incluant une extension tumorale aux capsules hépatique et splénique sans atteinte parenchymateuse de chaque organe)
<b>Stade IV : Métastases à distance excluant les métastases péritonéales</b>	
IVA	Epanchement pleural avec cytologie positive
IVB	Métastases parenchymateuses et métastases extra-abdominales (incluant les ganglions lymphatiques inguinaux et les ganglions lymphatiques situés en dehors de la cavité abdominale)

**Tableau II.B2 : Les 4 stades des cancers regroupant, les ovaires, les trompes de Fallope et le péritoine, suivant la classification FIGO de 2014 (Mutch and Prat, 2014).**

En parallèle de l'identification de ces différents stades, une analyse des cellules cancéreuses prélevées par biopsie ou au cours de la chirurgie cytoréductrice va permettre d'identifier la vitesse de multiplication de celles-ci, leur degré de différenciation morphologique, et *in fine* leur degré de malignité afin de leur assigner un grade. Le premier grade dit de 'bas grade' va correspondre aux tumeurs moins agressives, dont les cellules se divisent lentement et sont bien différenciées. Le second grade correspond à un grade dit de 'haut grade', il représente les tumeurs agressives, peu différenciées, avec beaucoup de divisions cellulaires.

Le cancer épithélial de l'ovaire est le sous-type pathologique qui prédomine (90%), il comprend 5 sous-types histologiques de tumeurs épithéliales qui diffèrent par leur

pathogénicité, leurs altérations moléculaires, leurs facteurs de risque et leur pronostic (Brett M. et al., 2017). Parmi ces sous-types, il y a le 'séreux de haut grade' (75%) qui est majoritaire et le plus agressif, le sous-type dit 'endométriöide' (ENOC, 10%), celui 'à cellules claires' (CCOC, 10%), le mucineux (MOC, 3%) et le 'séreux de bas grade' (5%) (Prat, 2015). En plus de ces critères, il est possible de classer les cancers épithéiaux en deux groupes. Tout d'abord le type I composé de tumeurs de bas grade, comprenant les séreux de bas grade, les mucineux, les endométriöides et les cellules claires de bas grade. Elles sont souvent diagnostiquées à un stade précoce, ont une progression lente et sont bien différenciées. Le type II comprend les tumeurs de hauts grades dont les séreux de haut grade et sont diagnostiquées à des stades avancés (75% des cas). Elles sont souvent accompagnées d'ascite, et sont connues pour leur croissance rapide. Elles ont un taux de prolifération important, une forte agressivité et sont indifférenciées, tout en ayant une meilleure réponse initiale à la chimiothérapie (**Tableau II.B3**) (Devouassoux-Shisheboran et al., 2016; Kurman and Shih, 2016).

	Carcinomes				
	Séreux – haut grade	Séreux – bas grade	Mucineux	Endométriöide	Cellules claires
Fréquence, %	70	< 5	3	10	5-10
Facteurs de risque	BRCA1/2	?	?	HNPCC	HNPCC ±
Précurseur	STIC	Borderline séreux	Borderline mucineux	Endométriöse	Endométriöse
Anomalies moléculaires	P53 (96 %) BRCA (22 %)	BRAF (5-38 %) KRAS (19 %)	KRAS (86 %) HER2 (18 %)	B-caténine (48 %) PTEN (20 %) ARID1A (33 %) MSI (19 %)	HNF1b (95 %) ARID1A (46 %) PIK3CA (33 %) MET (24 %)
Extension	Rapide trans-cœlomique	Trans-cœlomique	Plutôt confiné à l'ovaire	Plutôt confiné au pelvis	Plutôt confiné au pelvis
Chimio-sensibilité	Haute	Intermédiaire	Faible	Haute	Faible
Pronostic	Défavorable	Intermédiaire	Favorable	Favorable	Intermédiaire

**Tableau II.B3 : Les 5 sous-types histologiques des carcinomes ovariens (Devouassoux-Shisheboran et al., 2016).**

### c) Hétérogénéité moléculaire

Les tumeurs ovariennes possèdent des caractéristiques moléculaires variées dont la caractérisation a amplement profité du développement des techniques « omiques » ces dernières années. Au-delà des classifications habituelles basées sur le stade, le grade et la morphologie cellulaire et tissulaire, de nouveaux types de classifications prenant en compte les données moléculaires sont en train d'émerger. La classification des tumeurs ovariennes en tumeurs de type I et de type II constitue de ce point de vue une tentative intéressante et

prometteuse, et ces types de classification dans le futur pourraient s'avérer déterminants pour la stratification des patientes vis-à-vis des thérapies ciblées.

### i. Les tumeurs de type I

Les tumeurs ovariennes de type I sont génétiquement stables, caractérisées par de rares mutations du gène *TP53* et associées à un certain nombre de mutations au niveau d'oncogènes et de suppresseurs de tumeurs. *BRAF* et *KRAS* sont ainsi fréquemment mutés dans ces tumeurs. Ils sont suractivés et agissent comme activateurs de la voie de survie MAPK/ERK (Muinao et al., 2018). *ARID1A* (AT-Rich Interaction Domain 1A) (Altucci, 2017) et *PPP2R1A* (Protein Phosphatase 2 Regulatory subunit 1A) subissent quant à eux des mutations favorisant la tumorigénicité de ce cancer (Wang et al., 2013). Les mutations au niveau de *ERBB2* (Erb-B2 Receptor Tyrosine Kinase 2), un récepteur tyrosine-kinase de l'EGF, et de *PTEN*, vont jouer un rôle sur divers processus cellulaires tels que la prolifération, la migration ou la formation de métastases (Liu et al., 2019; Luo et al., 2018). Par ailleurs, bien d'autres mutations ont pu être identifiées dans ces tumeurs de type I (**Figure II.B4**) (Kurman and Shih, 2011; Matulonis et al., 2016; Muinao et al., 2018).

### ii. Les tumeurs de type II

Les tumeurs de type II concernent notamment les carcinomes séreux de haut grade et présentent un taux de mutations très important de *TP53* (96%) (Devouassoux-Shisheboran et al., 2016; Matulonis et al., 2016). Elles présentent également une grande instabilité génétique, notamment en lien avec les mutations constitutionnelles des gènes, *BRCA1* et *BRCA2*. Ces tumeurs présentent dans environ 50% des cas un phénotype HRD (Homologous Recombination Deficiency), c'est à dire un défaut de la réparation de l'ADN par HR (Matulonis et al., 2016). Outre les mutations de *BRCA1* et *BRCA2* (40-50%), ce déficit de HR peut également s'expliquer par une hyperméthylation du promoteur de *BRCA1*, une délétion de *PTEN* (7% des cas), des mutations d'*ATM* (Ataxia Telangiectasia Mutated), d'*ATR* (Ataxia Telangiectasia and Rad3 Related Protein), de *RAD51C* et *RAD51D*, des paralogues de RAD51, tous impliqués dans les cascades de régulation de la réparation des cassures double-brin par HR (Devouassoux-Shisheboran et al., 2016). Les tumeurs de type II possèdent également des mutations sur de nombreux autres gènes comme *c-MYC* (>20%) qui joue un rôle dans divers processus cellulaires (prolifération, croissance, apoptose...) (Reyes-González et al., 2015), et *mTOR* (mammalian target of rapamycin) une enzyme impliquée dans la prolifération, l'apoptose, la résistance au cisplatine (**Figure II.B4**) (Aziz et al., 2018).

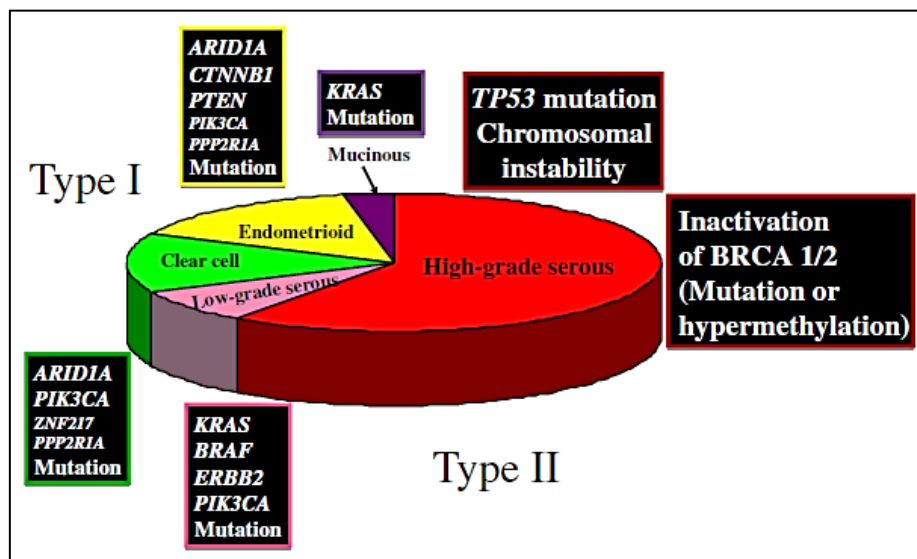


Figure II.B4 : Répartition des types histologiques des cancers épithéliaux de l’ovaire et de leurs altérations génétiques les plus fréquentes dans les cancers de type I ou de type II (Kurman and Shih, 2011).

Ces différences en termes de sous-types histologiques ou moléculaires mettent en évidence la complexité et l’hétérogénéité des cancers de l’ovaire, dont l’appellation regroupe en réalité des maladies différentes, qui sont pourtant prises en charge de manière globalement identique.

#### d) La prise en charge des cancers de l’ovaire

Le traitement des cancers de l’ovaire consiste tout d’abord à la réalisation d’une chirurgie cytoréductrice, la plus complète possible suivie d’un traitement chimiothérapeutique adjuvant de référence associant sel de platine et taxane sur 6 cycles par voie intraveineuse. Le résidu tumoral après chirurgie constitue l’un des facteurs pronostique majoritaire et corrélé à la survie globale et à la survie sans progression (**Figure II.B5**). Dans le cas d’une résection complète difficilement réalisable, un traitement néo-adjuvant est appliqué (trois cycles de sel de platine associé au taxane) afin de réduire la charge tumorale et d’augmenter les chances de résection totale, suivi par trois cycles de traitements supplémentaires après la chirurgie (Coleman, 2016; Coleman et al., 2013).



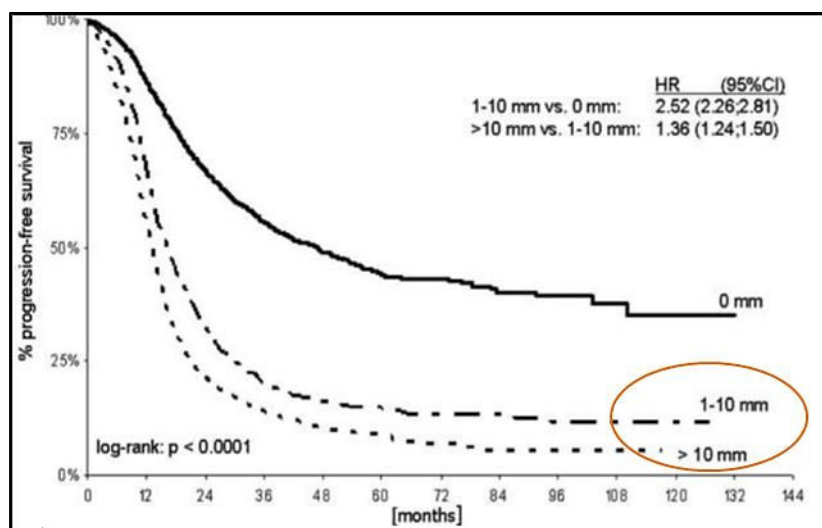


Figure II.B5 : Impact de la taille du résidu tumoral post-chirurgical sur la survie globale (du Bois et al., 2009).

Malgré un bon taux de réponse initial à cette thérapie combinatoire de première ligne (environ 75%), une récurrence survient dans la plupart des cas, accompagnée d'une résistance au traitement (Cortez et al., 2018), qui représente la principale cause d'échec thérapeutique (Matsuo et al., 2010). Selon le délai écoulé avant l'apparition de la rechute, les tumeurs sont définies comme 'réfractaire au platine' si la rechute a lieu au cours du traitement, 'résistante au platine' si elle se déclare dans les 6 mois suivant le traitement initial et 'sensible au platine' si elle a lieu au moins 6 mois après le traitement. Les traitements de deuxième et troisième ligne dépendront de ce statut de la tumeur, et consistera en une association de carboplatine au paclitaxel, à la doxorubicine liposomale ou à la gemcitabine dans le cas de tumeurs sensibles au platine, ou à une monothérapie sans platine dans le cas de tumeurs réfractaires ou résistantes au platine (Cortez et al., 2018).

Ces dernières années, de nouvelles approches et de nombreux essais cliniques ont été mis en œuvre pour développer de nouveaux agents et schémas thérapeutiques visant à retarder les récurrences, améliorer la réponse des patientes à la chimiothérapie et stabiliser la maladie. La mise en œuvre de thérapies ciblées dans le traitement du cancer de l'ovaire a pris du retard par rapport aux autres tumeurs malignes. Cependant, le bevacizumab, un anti-angiogénique, a été approuvé aux États-Unis par la FDA "Food and Drug Administration" et en France par la HAS "Haute Autorité de Santé" et est indiqué soit comme traitement néoadjuvant pour réduire la taille de la tumeur avant la chirurgie de résection, soit comme traitement de première ligne pour les stades avancés (III B, III C et IV) en association avec Carboplatine et Paclitaxel ou en traitement d'entretien (essais cliniques: ICON7, GOG0218). Il est également indiqué pour les récurrences sensibles (essais cliniques OCEANS, GOG0213) et les récurrences résistantes (essai clinique AURELIA) si le patient n'a pas déjà été traité au

préalable avec un autre agent anti-angiogénique (Cortez et al., 2018; Grunewald and Ledermann, 2017; Mullen et al., 2018). Une amélioration de la survie sans progression (PFS) a été observée, mais aucun gain à long terme de l'OS n'a été obtenu avec les molécules anti-angiogéniques dans le cancer de l'ovaire. Plus récemment, plusieurs inhibiteurs de PARP (PARPi) ont été approuvés par la FDA en tant que traitement d'entretien pour les patientes «sensibles au platine» nouvellement diagnostiqués ou après une rechute. Cette option de traitement nouvellement approuvée est très prometteuse pour l'amélioration des soins thérapeutiques chez le sous-groupe de patientes présentant des altérations de BRCA1/2, ou plus largement des altérations de la voie de réparation de la recombinaison homologue des lésions de l'ADN.

Les lncRNAs en lien avec la réponse aux traitements utilisés dans les cancers de l'ovaire font l'objet d'une revue bibliographique destinée à être publiée dans un journal à comité de lecture, dont le manuscrit est présenté dans la partie Résultats « I. Revue: "The influence of long non-coding RNAs in response to treatment in ovarian cancer" ».

#### **4. Les lncRNAs dans la biologie des cancers de l'ovaire**

Dans les cancers de l'ovaire comme dans la plupart des types tumoraux, un nombre croissant de publications démontre des liens entre les cancers de l'ovaire et des lncRNAs et ont identifié des surexpressions ou sous expressions de lncRNAs en lien avec le pronostic de la maladie (Chen et al., 2019; Worku et al., 2017; Zhan et al., 2018).

La mise en évidence de biomarqueurs prédictifs de la survie, et plus encore de la réponse aux traitements, constitue une nécessité afin d'améliorer la prise en charge des cancers de l'ovaire. A cet effet, la définition de profils de lncRNAs prédictifs de la réponse est une possibilité séduisante. Toutefois, à ce jour aucune des signatures décrites dans la littérature n'a donné lieu à un transfert en clinique. Une des limites principales des études disponibles est la recherche de profils sur des cohortes incluant des tumeurs de stades, grades, voire de sous-types histologiques et moléculaires variés. Les mêmes limites sont rencontrées pour la définition de profils de miRNAs prédictifs de la réponse ou de la survie. Néanmoins, il apparaît que l'étude des profils d'expression de lncRNAs dans les cancers de l'ovaire permet de discriminer les différents sous-types transcriptionnels identifiés par analyse transcriptomique dans la cohorte du TCGA, ce qui constitue une donnée encourageante. En effet, suite à une étude regroupant les profils d'expression de 10 207 lncRNAs de divers cancers, il a été démontré que 1749 lncRNAs possédaient une expression spécifique de l'un des 4 sous-types transcriptionnels du cancer de l'ovaire, qui incluent le sous-type différencié, prolifératif, immunoréactif et mésenchymateux. Une autre

étude a démontré que 455 lncRNAs, dont UCA1 et NEAT1, étaient régulés négativement ou positivement selon le sous-type transcriptionnel à partir des données du TCGA (Meryet-Figuère et al., 2016).

Un certain nombre d'études se sont également intéressées aux implications fonctionnelles des lncRNAs dans les cancers de l'ovaire, mais dans une majorité de cas, les mécanismes d'action des lncRNAs étudiés n'ont pas encore été mis en évidence. Les exemples ci-dessous présentent les liens de certains des lncRNAs les plus étudiés avec les cancers de l'ovaire (Figure II.B6).

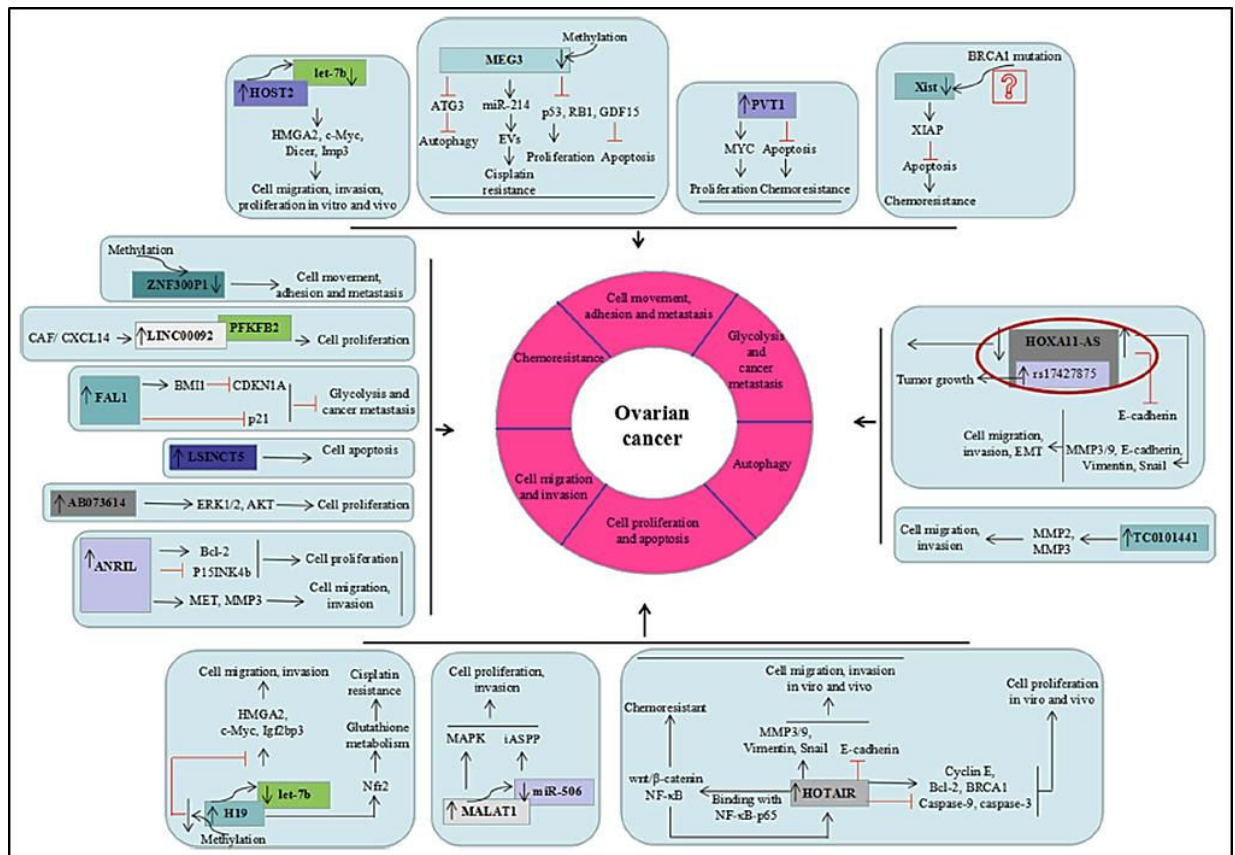


Figure II.B6 : lncRNAs ayant un rôle dans les cancers de l'ovaire et leurs mécanismes associés. (Figure non exhaustive) (Zhan et al., 2018).

**HOTAIR** est l'un des lncRNAs possédant des fonctions oncogéniques dans de nombreux cancers. Il est surexprimé dans le cancer épithélial de l'ovaire et dans le sous type séreux, et favorise l'invasion, la migration, la prolifération, la croissance tumorale, la formation de métastases et la résistance aux chimiothérapies. A l'inverse, il réprime l'apoptose des cellules cancéreuses ovariennes. Il est corrélé positivement avec les stades avancés (FIGO), les grades histologiques et une plus faible survie globale. De plus, il a été suggéré qu'il puisse être utilisé comme facteur indépendant de pronostic pour prédire la survie globale

(OS: Overall survival) et la survie sans maladie (DFS: Disease-free survival) (Meryet-Figuière et al., 2016; Nikpayam et al., 2017; Worku et al., 2017; Zhan et al., 2018).

**MALAT1** a été identifié comme surexprimé dans le cancer de l’ovaire, et agit comme un oncogène favorisant la prolifération, la migration, l’invasion, la formation de métastases, la TEM et la croissance des cellules tumorales ovariennes. Sa surexpression prédit de manière indépendante la survie et est associée à une faible DFS dans une cohorte regroupant 47 patientes avec un cancer épithélial de l’ovaire et des métastases, 47 patientes avec ce cancer sans métastases et 41 femmes saines (Nikpayam et al., 2017; Worku et al., 2017; Zhan et al., 2018).

**H19**, un autre lncRNA avec des fonctions oncogéniques, est fréquemment surexprimé dans les cancers de l’ovaire. Il est associé à la migration, à l’invasion, à la prolifération des cellules cancéreuses, la formation des métastases, à la répression de la mort cellulaire par apoptose. Il a été identifié comme étant corrélé aux stades et à la taille de la tumeur et associé avec l’OS et la DFS dans deux cohortes ‘GSE30161’ et ‘GSE9891’, comprenant 311 patientes atteintes du cancer de l’ovaire, principalement séreux de stade avancé (Meryet-Figuière et al., 2016; Nikpayam et al., 2017; Yang et al., 2017; Zhan et al., 2018).

**ANRIL**, fréquemment surexprimé dans les cancers de l’ovaire, a lui aussi une fonction oncogénique en stimulant la migration, l’invasion, et la prolifération des cellules cancéreuses ovariennes. Il a été identifié comme associé à une survie globale plus courte et comme facteur de mauvais pronostic indépendant ; ce lncRNA constitue un potentiel biomarqueur pronostic dans les cancers de l’ovaire et est corrélé aux stades (FIGO), aux grades et à la formation de métastases comme HOTAIR. Il est associé à une faible OS suite à une première étude comprenant 68 tissus de patientes atteintes d’un cancer de l’ovaire séreux et 30 tissus de patientes contrôles ainsi que dans une seconde étude comprenant 102 tissus épithéliaux cancéreux ovariens, dont 68 tissus cancéreux séreux, 20 mucineux et 14 endométrioïdes (Meryet-Figuière et al., 2016; Nikpayam et al., 2017; Worku et al., 2017; Zhan et al., 2018).

**PVT1** agit également comme un oncogène capable de favoriser la prolifération, la résistance à certains agents chimiothérapeutiques et de réprimer l’apoptose des cellules cancéreuses ovariennes. Son expression est associée à une OS et à une PFS plus courte dans une cohorte de 2002 patientes atteintes d’un cancer de stade I, dont 47 patientes en rechute (Meryet-Figuière et al., 2016; Nikpayam et al., 2017; Worku et al., 2017; Zhan et al., 2018; Zhong et al., 2016).

**MEG3** est un lncRNA suppresseur de tumeur qui dans les cancers de l’ovaire est en général sous-exprimé. Il est capable d’inhiber la prolifération, la TEM, et de favoriser l’apoptose et l’autophagie des cellules cancéreuses (Meryet-Figuière et al., 2016; Nikpayam et al., 2017; Zhan et al., 2018).

De nombreux autres lncRNAs ont été impliqués à différents niveaux dans les cancers de l’ovaire, comprenant des oncogènes comme XIST, NEAT1, TUG1, HOST2, FAL1... ou des suppresseurs de tumeurs tels que GAS5 ou BC200 (Meryet-Figuière et al., 2016; Worku et al., 2017; Zhan et al., 2018).

### C. UCA1: un lncRNA aux multiples fonctions

Parmi l’ensemble des lncRNAs présentés précédemment dans le manuscrit, traitant des liens entre lncRNAs et la biologie des cancers de l’ovaire, nous nous sommes plus particulièrement intéressés au lncRNA UCA1 (Urothelial Cancer Associated 1), qui a fait l’objet de la majeure partie de mes travaux de thèse.

Ce lncRNA a tout d’abord été découvert dans les cancers de la vessie par *Wang and al* en 2006 (Wang, 2006). UCA1 est localisé sur le brin positif du chromosome humain 19p13.12. Il a une taille de 1,4kb et est composé de 3 exons, de deux introns, avec un nombre important de codons stop sur sa séquence, ainsi qu’une queue poly A à son extrémité 3’. Il a été identifié comme étant non-codant puisque son ORF code pour une protéine de 58 acides aminés, d’une taille de 6,3 kDA, non détectée par western-blot. Sa séquence est flanquée par de longues régions terminales répétées (LTR7A) (**Figure II.D1**).

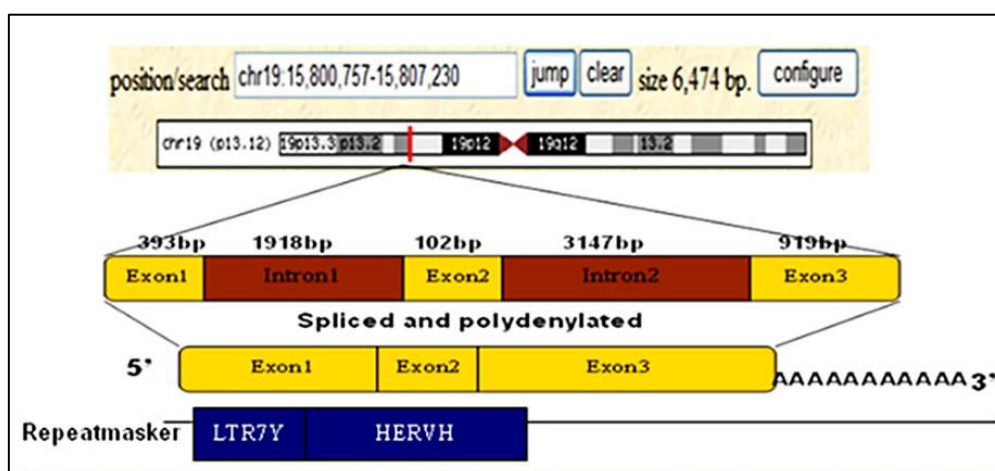
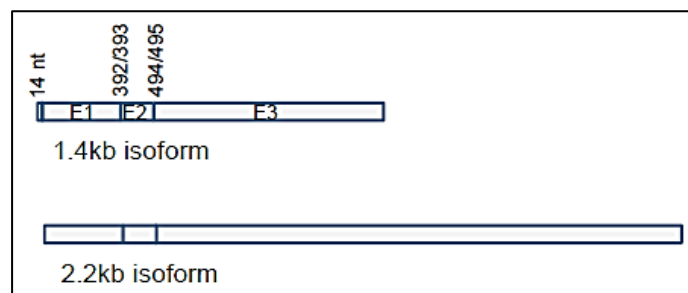


Figure II.C1 : Cartographie du gène d’UCA1 sur le chromosome 19p13.12 (Wang et al., 2008).

En 2008 est paru un nouvel article décrivant UCA1 de manière plus détaillée (Wang et al., 2008). Il a été mis en évidence que son expression varie de façon spatio-temporelle, avec une surexpression dans les stades précoces du développement embryonnaire à la fois dans les tissus embryonnaires et extra-embryonnaires (placenta), suivie d'une diminution de son expression après 28 semaines de développement. Chez l'adulte, son expression est absente dans les conditions physiologiques à l'exception du cœur et de la rate. UCA1 est toutefois ré-exprimé dans de nombreux tissus tumoraux, le classant parmi les transcrits oncofoetaux. UCA1 comporte 3 isoformes de tailles différentes. Le transcrit majoritaire mesure 1,4kb. Le second transcrit reconnu est celui de 2,2kb, dit isoforme longue et nommé CUDR (Cancer Upregulated Drug Resistant transcript). Il possède une séquence commune avec le transcrit de 1,4kb sur 1,265bp, tronqué pour les 14 premiers nucléotides et dont la plus grande taille repose sur un allongement de l'exon 3 (**Figure II.D2**) (Huang et al., 2014). Pour finir, il existe un transcrit de 2.7kb pour lequel il n'existe pas d'autres données spécifiques (Li, 2012).



**Figure II.C2** : Les deux principales isoformes du lncRNA UCA1 (Huang et al., 2014).

Le nombre d'études concernant UCA1 est en constante évolution depuis ces dernières années (**Figure II.D3**). L'ensemble de ces études a permis de mettre en évidence l'implication d'UCA1 en tant qu'oncogène dans de nombreux cancers. Son isoforme courte de 1,4kb, prénommée « UCA1 », est à ce jour beaucoup plus étudié que son isoforme longue « CUDR ». Toutefois, peu d'études relatives à UCA1 montrent que les effets étudiés sont indépendants de CUDR.

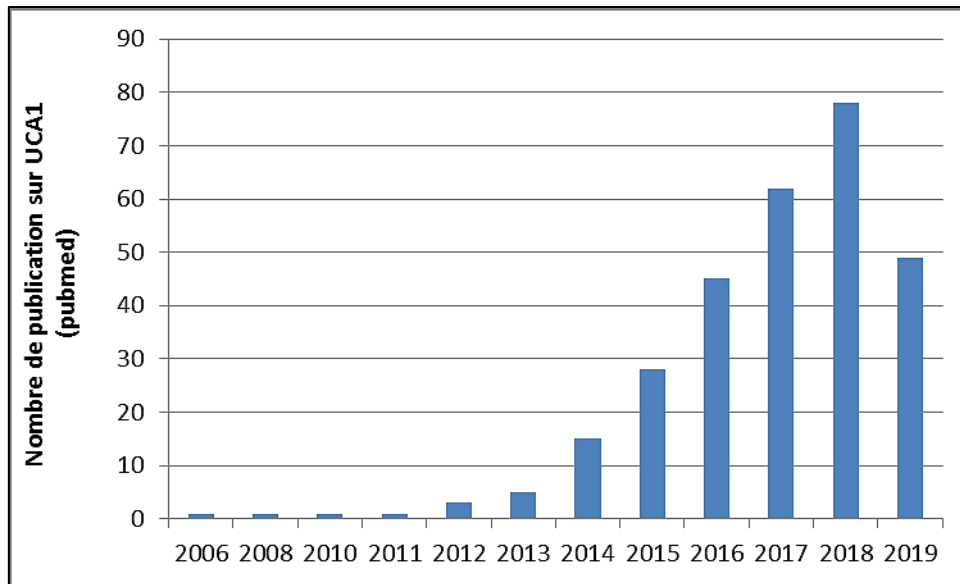


Figure II.C3 : Evolution du nombre de publication concernant le lncRNA UCA1. (Pubmed)

## 1. UCA1 dans divers cancers

Le long ARN non-codant UCA1 a été identifié comme impliqué dans la carcinogenèse de multiples cancers où son niveau d'expression est apparu comme inversement corrélé à la survie globale. De plus, son expression a été associée négativement avec l'OS et la PFS dans divers cancers dont le cancer colorectal, le cancer gastrique, le cancer du poumon non à petites cellules et le cancer de l'ovaire (Hong et al., 2016). UCA1 a été identifié comme marqueur prédictif de la survie et du pronostic des carcinomes de l'appareil digestif et du cancer colorectal (Liu et al., 2017; Ni et al., 2015), et est corrélé au grade et au pronostic dans le gliome et envisagé comme biomarqueur de malignité et pronostique dans cette pathologie (Zhao et al., 2017). Dans le cancer du poumon, UCA1 pourrait également être biomarqueur pronostique et diagnostique (Wang et al., 2015c).

Outre ces liens entre l'expression d'UCA1 et le pronostic dans de nombreuses localisations cancéreuses comme le cancer de la vessie (Lebrun et al., 2018), le cancer du pancréas (Zhang et al., 2018b), le cancer du poumon (Wang et al., 2015c), le cancer cervical (Yan et al., 2018) et bien d'autres, son expression est impliquée dans divers processus biologiques tumoraux dont la prolifération, la migration/invasion, la formation de métastases, la TEM, la résistance au traitement, ou encore la mort cellulaire (Wang et al., 2017a).

## 2. Les mécanismes d'action connus d'UCA1

Comme décrit précédemment, les lncRNAs sont capables de réguler l'expression de nombreux gènes par la mise en place de modifications épigénétiques, par des liaisons directes à des protéines spécifiques, ou par séquestration de miARNs. Les informations concernant les mécanismes d'action d'UCA1 ne sont pas toujours décrites. Il a toutefois déjà été mis en évidence qu'il peut exercer des fonctions de différentes manières *via* son interaction avec des complexes épigénétiques de modification de la chromatine ou par une action de compétiteur endogène vis-à-vis de nombreux miRNAs (**Figure II.D4**).

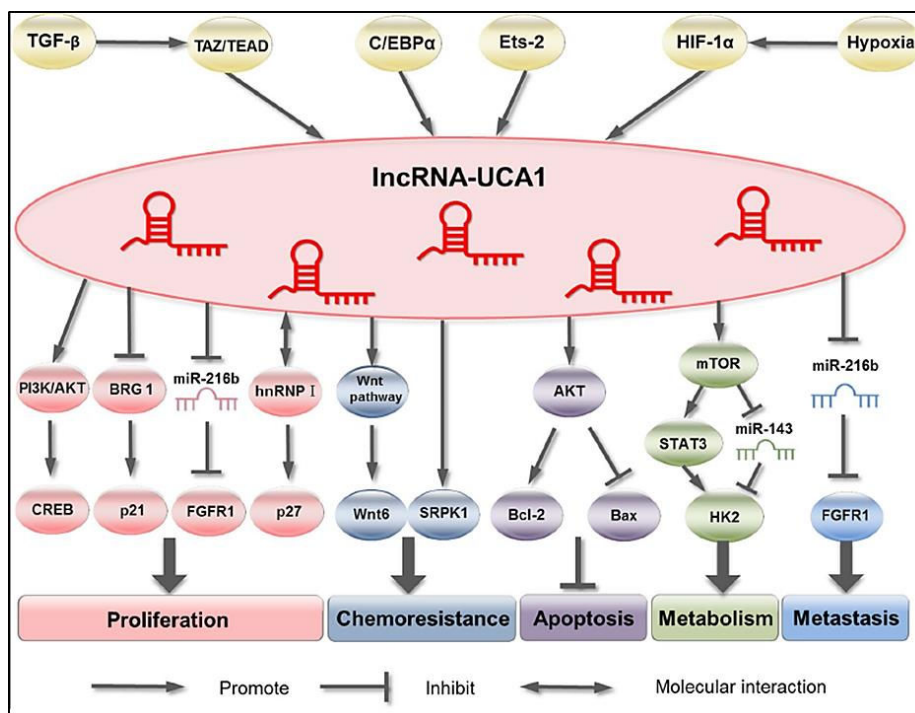


Figure II.C4 : Divers mécanismes moléculaires oncogéniques dans lesquels le lncRNA UCA1 est impliqué (Xue et al., 2016).

### a) Interaction avec des complexes modifiant la chromatine

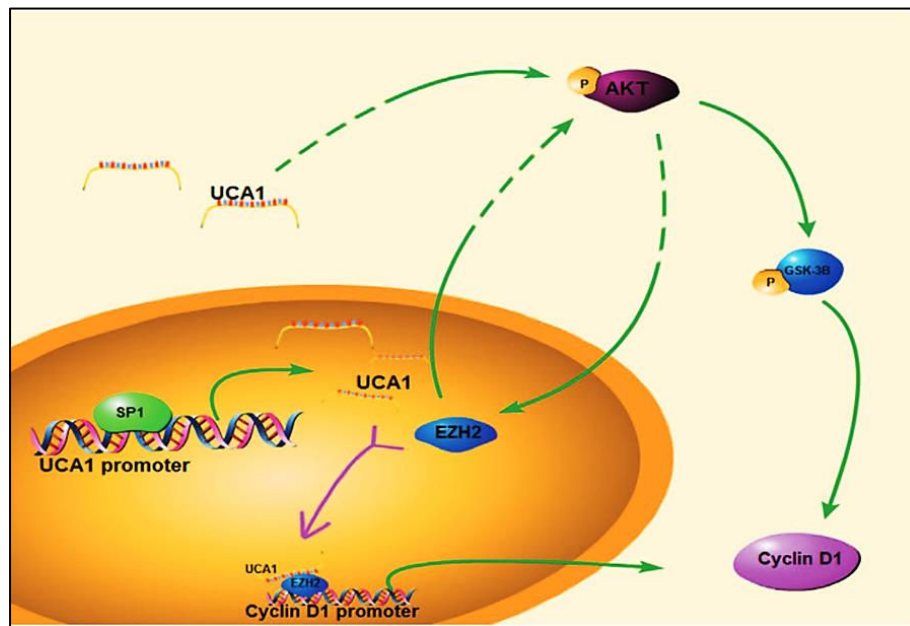
Quatre études ont permis de démontrer une interaction physique entre UCA1 et EZH2. EZH2 appartient au complexe répressif PRC2, responsable de la méthylation des histones en H3K27me3.

*Jiano-Jiano HU and al* ont démontré l'interaction entre UCA1 et EZH2 dans le carcinome hépatocellulaire, où UCA1 est surexprimé et où il agit comme un oncogène. Cette association directe va permettre d'inhiber la transcription du gène *p27Kip1* *via* la méthylation des histones dans sa région promotrice, ce qui va empêcher l'inhibition de l'expression de la



cycline D1 et de la CDK2 et ainsi favoriser le passage du checkpoint G1/S, et l'entrée dans le cycle cellulaire (Hu et al., 2016).

Dans une autre étude portant sur les cancers gastriques, les auteurs ont décrit la surexpression d'UCA1 *via* le facteur de transcription SP1 (specificity protein 1) (Wang et al., 2017c). Ils ont démontré qu'UCA1 interagit directement avec EZH2 ce qui va entraîner la régulation positive de l'expression de la cycline D1 et donc favoriser là encore la transition G0/G1 dans le cycle cellulaire. Cela permet également l'activation de la voie de survie AKT, ce qui promeut la prolifération des cellules cancéreuses gastriques (**Figure II.D5**).



**Figure II.C5 : Représentation schématique du mécanisme moléculaire associant UCA1 et EZH2 dans l'activation de la prolifération cellulaire et dans la progression du cancer gastrique (Wang et al., 2017c).**

Dans le cancer de la vésicule biliaire, UCA1 a été également identifié comme surexprimé et positivement corrélé à la taille de la tumeur, à la formation de métastases, aux stades avancés et à une survie plus courte (Cai et al., 2017). UCA1 a été mis en évidence comme favorisant la prolifération des cellules tumorales et la formation de métastases par son association directe avec EZH2. Ceci ayant pour conséquence l'inhibition épigénétique de l'expression de p21 et de l'E-cadhérine, un marqueur épithélial ayant un rôle de suppresseur de tumeur.

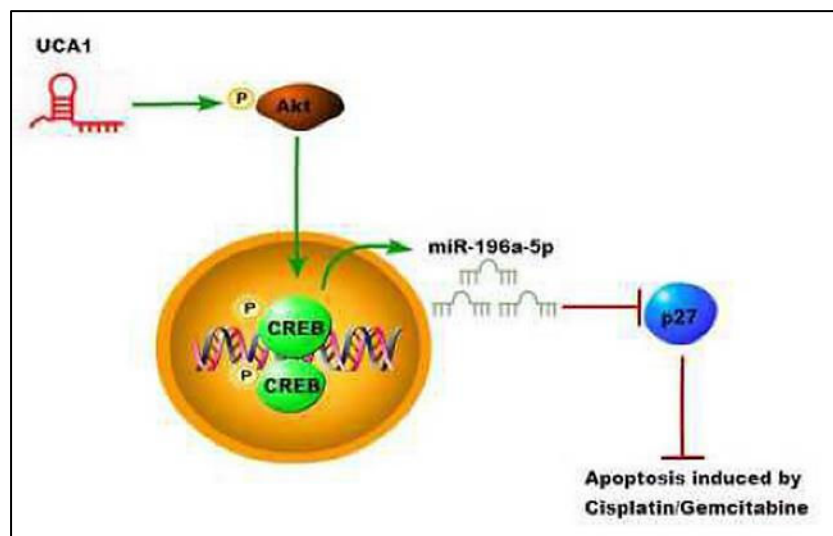
Une dernière étude a à nouveau mis en évidence cette interaction physique et son rôle dans la résistance au tamoxifène dans les cancers du sein par la régulation de p21 et de la voie PI3K/AKT (Li et al., 2019b).

UCA1 a également été identifié comme jouant un rôle dans un autre processus épigénétique par son interaction avec un facteur de remodelage de la chromatine dans des cellules cancéreuses de la vessie. Il interagit de façon directe avec la protéine BRG1 (Brahma related gene 1), un suppresseur de tumeur appartenant au complexe de remodelage de la chromatine SWI/SNF. Ce complexe, en s'associant au promoteur de *p21*, un suppresseur de tumeur inhibiteur de CDK, permet d'augmenter son expression. La liaison d'UCA1 à BRG1 le séquestre dans le compartiment cytoplasmique, l'empêchant ainsi d'activer la transcription de *p21*, et mettant ainsi en évidence une autre facette des fonctions oncogéniques d'UCA1 (Wang et al., 2014b).

### b) Liaison à d'autres facteurs protéiques

UCA1 parvient également à cibler directement des protéines ou diverses autres molécules pour réguler un ensemble de gènes et de voies de signalisation.

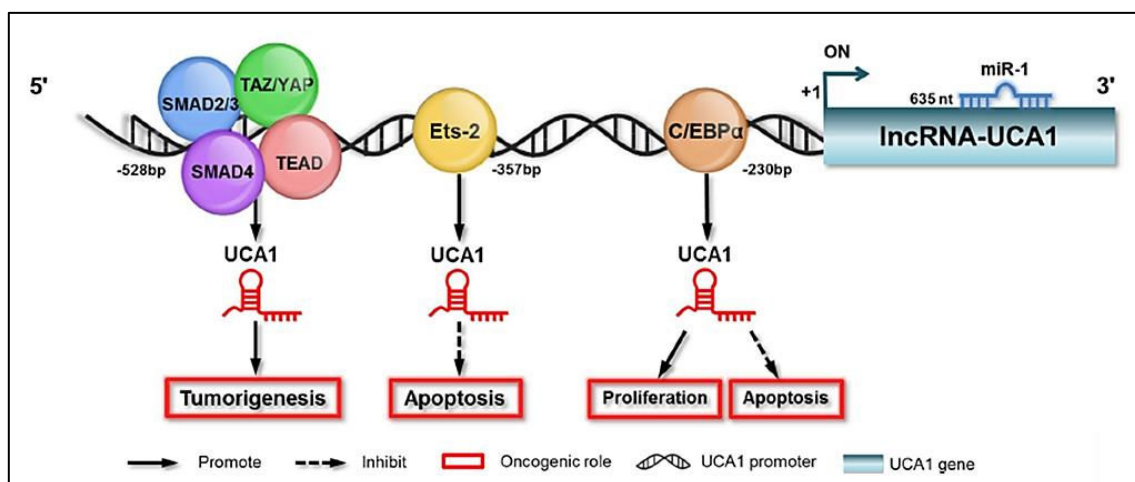
UCA1 est aussi impliqué dans l'acquisition de chimiorésistance au cisplatine et à la gemcitabine dans le cancer de la vessie par une action activatrice du facteur de transcription CREB (cAMP-response element binding protein). CREB va à son tour activer le miR-196a-5p, connu pour être oncogénique, en se liant à son promoteur. Ce miRNA va ensuite pouvoir inhiber sa cible *p27Kip1*, un suppresseur de tumeur inhibiteur de CDK (**Figure II.D6**) (Pan et al., 2016).



**Figure II.C6 : Représentation schématique d'UCA1 régulant négativement l'apoptose induite par le cisplatine et la gemcitabine, en association avec CREB et le miR-196a-5p (Pan et al., 2016).**

De la même manière, dans le cancer du sein, UCA1 participe à la croissance et à la chimiorésistance des cellules cancéreuses à la doxorubicine par son association avec hnRNP1 (heterogeneous nuclear ribonucleoprotein I), connu pour son rôle dans l'épissage des ARNm. UCA1 en se liant à hnRNP1 va empêcher ainsi l'interaction entre hnRNP1 et p27Kip1, diminuant ainsi le niveau de traduction de cette protéine impliquée dans l'arrêt du cycle (Huang et al., 2014).

Dans le cancer pancréatique, UCA1 agit comme un oncogène et favorise le phénotype malin des cellules cancéreuses pancréatiques par la régulation négative de la voie de signalisation Hippo, une voie connue pour être composée de kinases contrôlant la prolifération, la formation de métastases, la différenciation en réponse à divers changements au niveau intra-extra-cellulaire des tumeurs. Pour cela, UCA1 interagit avec YAP, Lats1 et MOB1, membres de cette voie de signalisation. L'interaction d'UCA1 avec ces protéines les protège, empêche leur phosphorylation et permet également la translocation nucléaire de YAP qui va se lier aux protéines TEAD, favorisant la prolifération des cellules (**Figure II.D7**) (Zhang et al., 2018b).



**Figure II.C7 : Régulation positive de l'expression d'UCA1 par divers facteurs de transcriptions (Xue et al., 2016).**

### c) Compétition endogène pour la liaison à des miARNs

A ce jour, environ 70 études relatives aux interactions d'UCA1 avec des miRNAs, soulignent le rôle majeur de ce lncRNA comme compétiteur endogène de miRNAs.

Dans le carcinome hépatocellulaire, UCA1 a également été démontré comme surexprimé et agissant comme un oncogène favorisant la progression de ce cancer en lien avec un ensemble de processus cellulaires comme la prolifération, l'invasion, la migration ou encore la croissance tumorale, par son rôle inhibiteur sur le miR-216b. UCA1 interagit de

façon directe avec ce miARN et agit comme un compétiteur endogène (ceRNA), ce qui a pour conséquence une activation de la voie FGFR1 (fibroblast growth factor receptor 1)/ERK (extracellular signal regulated Kinase) par l'abolition de la répression exercée par le miARN sur sa cible FGFR1 (Wang et al., 2015a).

UCA1 a également été démontré comme surexprimé dans les tissus et lignées cellulaires du cancer du pancréas où il est capable d'agir comme un oncogène en favorisant la migration/invasion, la formation de métastases et la prolifération des cellules cancéreuses pancréatiques. Pour cela, il se comporte comme une éponge pour le miR-135a, permettant ainsi d'augmenter l'expression des métalloprotéases MMP-2 et MMP-9, deux protéines impliquées dans la TEM (Zhang et al., 2017b).

Dans le gliome, l'expression d'UCA1 a été démontrée comme induite par le TGF- $\beta$ , connu pour favoriser la TEM et le caractère souche des cellules, et comme capable d'induire à son tour l'expression de la protéine Slug, un effecteur du TGF- $\beta$  en aval par son rôle de ceRNA pour les miRNAs miR-1 et miR-203a. Cette étude met en évidence un rôle oncogénique d'UCA1 dans le gliome en favorisant la TEM des cellules du gliome ainsi que leur caractère souche (Li et al., 2018b).

Il est aussi capable de favoriser l'expression d'ERBB4, un récepteur tyrosine kinase de la famille des EGFR impliqué dans de nombreux cancers, en agissant comme une éponge pour le miR-193a-3p et donc de permettre la prolifération et la croissance des cellules de cancer du poumon non à petites cellules. UCA1 est surexprimé dans ce cancer et agit comme un oncogène (Nie et al., 2016).

Dans le cancer colorectal, UCA1 est également surexprimé dans les tissus tumoraux et se comporte comme un oncogène en favorisant la prolifération cellulaire et la chimiorésistance au 5-FU (5-Fluoro-Uracile) par son rôle d'éponge pour le miR-204-5p, inhibant ainsi son rôle de tumeur suppresseur. L'inhibition de ce miRNAs permet une augmentation de l'expression de sa cible, CREB1, ainsi que de ses autres cibles BCL2 et RAB22A, tous agissant comme des oncogènes favorisant la tumorigenèse de ce cancer (Bian et al., 2016).

#### **d) Autres fonctions aux mécanismes non définis**

Dans les cancers du sein, UCA1 a été démontré comme ayant une implication dans la régulation positive de la voie WNT/ $\beta$ -catenin et dans la résistance au tamoxifène en stimulant la translocation de la  $\beta$ -caténine vers le noyau (Liu et al., 2016). Dans une autre étude, il favorise la TEM des cellules cancéreuses de ce cancer en favorisant la même voie de signalisation (Xiao et al., 2016). Dans le cancer de la vessie, UCA1 participe à la résistance au cisplatine par sa capacité à augmenter l'expression de Wnt6 et à activer cette

voie de signalisation WNT/ $\beta$ -catenin. Les mécanismes d'actions ne sont pas davantage décrits dans ces trois études.

Dans le cancer du sein, il a été mis en évidence l'implication d'UCA1 dans la résistance au tamoxifène par l'activation de la voie de signalisation mTOR (AKT-mTOR). Il est décrit que l'inhibition de l'expression d'UCA1 conduit à une diminution de la phosphorylation de p-AKT et p-mTOR mais les mécanismes précis ne sont pas décrits (Wu and Luo, 2016).

### 3. UCA1 dans les cancers de l'ovaire

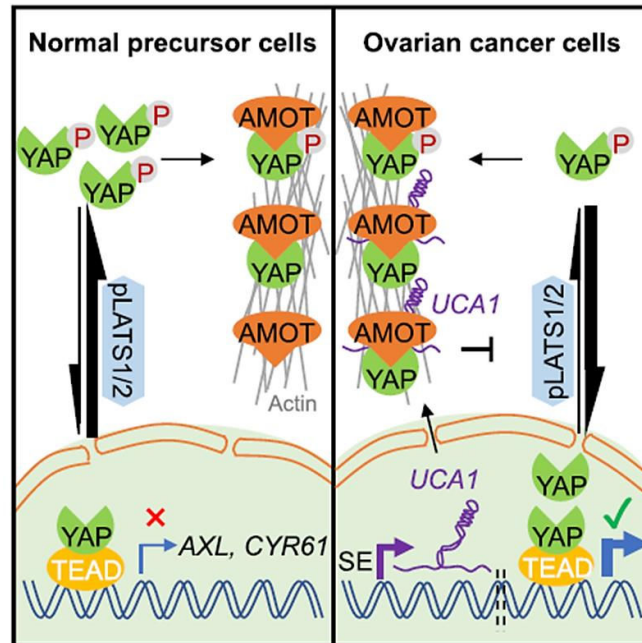
Parmi les études concernant les rôles d'UCA1 dans les cancers, seule une petite dizaine se sont intéressées aux fonctions de ce lncRNA dans les cancers de l'ovaire. UCA1 a été identifié dans la mise en place de la résistance à certains agents chimiothérapeutiques utilisés dans la prise en charge des patientes atteintes d'un cancer ovarien ou encore comme activant les processus de migration et d'invasion.

Le lncRNA UCA1 a été identifié comme un facteur de risque associé à une réduction de la survie globale et de la survie sans progression dans les cancers, suite à une méta-analyse, réalisée sur 12 études, comprenant 954 patientes, dont des patientes atteintes du cancer de l'ovaire, représenté par 2 études, il a été révélé une association négative significative entre les niveaux d'UCA1 et de l'OS (HR 1.89, 95% CI 1.14–3.12) (Hong et al., 2016; Worku et al., 2017). Dans une étude réalisée par *Zhang and al*, la surexpression d'UCA1 dans le cancer de l'ovaire a été associée à la formation de métastases, au stade de la maladie (FIGO) et à une mauvaise réponse au traitement (Zhang et al., 2016). Ces deux études soulignent le rôle potentiel d'UCA1 comme marqueur pronostique dans les cancers de l'ovaire.

Dans une étude réalisée par *Yang and al*, UCA1 a été identifié comme surexprimé dans le cancer épithélial de l'ovaire et capable d'agir comme un compétiteur endogène pour le miR-485-5p par une interaction directe, activant ainsi l'expression de la MMP-14 (matrix metalloproteinase 14), une cible directe du miR-485-5p. MMP-14 appartient à la famille des MMP (matrix metalloproteinase) et sa surexpression est impliquée dans l'invasion et la formation de métastases dans divers cancers, y compris dans les cellules cancéreuses de l'ovaire ayant fait l'objet de cette étude (Yang et al., 2016).

Une étude récente réalisée par '*Xianzhi Lin and al*' en 2019 a permis de démontrer l'implication oncogénique d'UCA1 dans la voie de signalisation Hippo-YAP dans les cancers de l'ovaire, comme cela a été décrit plus haut dans le cancer pancréatique. Le rôle joué par

UCA1 passe par son interaction directe avec une protéine appelée AMOT (angiomotin), connue pour jouer un rôle dans cette même voie de signalisation en régulant en partie la localisation subcellulaire du co-activateur YAP. UCA1 va ainsi favoriser la liaison entre AMOT et YAP, la déphosphorylation de YAP et sa translocation nucléaire, et donc l'expression d'oncogènes (**Figure II.D8**) (Lin et al., 2019).



**Figure II.C8 : Mode de régulation de la voie de signalisation Hippo-YAP par UCA1 dans les cancers de l'ovaire (Lin et al., 2019).**

Plusieurs études se sont particulièrement intéressées à UCA1 comme acteur de la résistance au cisplatine et au paclitaxel.

*F.Wang and al* ont montré que la surexpression d'UCA1 dans le cancer de l'ovaire a pour effet de favoriser la migration, l'invasion et la résistance des cellules cancéreuses au cisplatine. Dans ce modèle, la surexpression d'UCA1 entraîne une augmentation de l'expression de SRPK1 et de l'anti-apoptotique Bcl2 et l'inhibition de l'expression des protéines caspases 3 et 9, effectrices de l'apoptose, ainsi que du pro-apoptotique bax. SRPK1 est une kinase de la famille des SR kinases qui régule l'épissage des pre-ARNm et donc l'expression des gènes. Elle a déjà été identifiée comme inductrice de la résistance au cisplatine dans le cancer de l'ovaire (Wang et al., 2015b). Bien que les résultats de cette étude soient intéressants, les auteurs ne proposent aucune hypothèse quant au mécanisme impliqué.

UCA1 a également été identifié comme étant surexprimé dans les cellules cancéreuses ovariennes résistantes au cisplatine, ainsi que dans les tissus de patientes atteintes par ce cancer. De plus, il a été démontré comme acteur de la résistance au

cisplatine dans le cancer de l'ovaire grâce à sa fonction de compétiteur endogène du miR-143 par une liaison directe. Ce miRNA a été identifié comme sous-exprimé dans les cellules cancéreuses ovariennes résistantes au cisplatine comparé aux cellules sensibles. La répression de FOSL2 par le miR-143 est ainsi levée, celui-ci favorisant la prolifération et la différenciation des cellules cancéreuses (Li et al., 2019c).

UCA1 a également été identifié comme favorisant la résistance des cellules cancéreuses au paclitaxel grâce à son interaction avec le miR-129. Cette interaction va permettre d'augmenter le niveau de la protéine ABCB1, une cible directe du miR-129. ABCB1 est une pompe à efflux qui favorise la sortie de molécules anticancéreuses de la cellule, constituant l'un des mécanismes majeurs de la chimiorésistance (Wang et al., 2018c).

Un nombre d'études important ont permis de démontrer le rôle important d'UCA1 dans de multiples cancers, y compris dans les cancers de l'ovaire. Paradoxalement, du fait de la description souvent très incomplète des mécanismes mis en jeu, l'ensemble de ces résultats souligne l'intérêt d'étudier de façon plus détaillée les rôles et surtout les fonctions de ce lncRNA, notamment dans la biologie des cancers de l'ovaire et plus particulièrement du point de vue de la réponse aux traitements chimiothérapeutiques.







# Résultats

---

## I. Revue: “*The influence of long non-coding RNAs in response to treatment in ovarian cancer*”

(Soumission prévue fin 2019, première auteure)

La résistance aux traitements des cancers de l’ovaire constitue la première cause d’échecs thérapeutiques. La compréhension des processus biologiques impliqués dans ces phénomènes de résistance constitue un enjeu majeur pour l’amélioration de la prise en charge des patientes, par la définition de marqueurs prédictifs de la réponse ou par l’identification de vulnérabilités mettant en évidence de potentielles stratégies thérapeutiques innovantes. Ces aspects ont d’ores et déjà fait l’objet d’un nombre important de travaux dans les cancers de l’ovaire.

La mise en évidence récente de dizaines de milliers de longs ARNs non-codants (lncRNAs) a ouvert la voie à un nouveau champ de recherche dont l’étendue promet d’être considérable. Cependant, les fonctions des lncRNAs restent encore majoritairement obscures, du fait non seulement de la relative nouveauté de ce champ d’étude, mais aussi de leur grande diversité, et parfois de leur complexité. Néanmoins, la littérature disponible a permis de mettre en évidence l’implication des lncRNAs dans l’ensemble des fonctions et processus biologiques tant physiologiques que pathologiques, soulignant l’importance de leurs fonctions.

Il a été démontré que les lncRNAs peuvent avoir des fonctions d’oncogènes ou de suppresseurs de tumeurs dans la plupart des pathologies cancéreuses, y compris dans les cancers de l’ovaire. Entre autres fonctions, il a été démontré qu’un certain nombre de lncRNAs sont impliqués dans des mécanismes en lien direct ou indirect avec la réponse au traitement.

La revue de la littérature présentée ci-après reprend l’essentiel des connaissances actuelles sur l’implication de lncRNAs dans la réponse des cellules cancéreuses ovariennes au traitement chimiothérapeutique de référence, associant un sel de platine à un taxane. Des éléments plus indirects suggèrent aussi fortement leur implication dans la réponse aux traitements de seconde ligne. De manière intéressante, il peut être raisonnablement attendu que des lncRNAs seront également impliqués dans la réponse aux inhibiteurs de PARP, récemment introduits dans le traitement des cancers de l’ovaire chez les patientes porteuses de mutations *BRCA1/2*.

# The influence of long non-coding RNAs in response to treatment in ovarian cancer

Anaïs Wambecke<sup>1,2,3,4</sup>, Mohammad Ramadan Abdelsatar Ahmad<sup>1,2,3,4</sup>, Bernard Lambert<sup>1,2,3,4,5</sup>, Laurent Poulain<sup>1,2,3,4</sup>, Christophe Denoyelle<sup>1,2,3,4</sup> and Matthieu Meryet-Figuere<sup>1,2,3,4#</sup>.

## Authors affiliations

<sup>1</sup>Normandie Univ, France

<sup>2</sup>UNICAEN, ANTICIPE (Interdisciplinary Research Unit for the Prevention and Treatment of Cancer), BioTICLA (Biology and Innovative Therapies of Ovarian Cancers), Caen, France

<sup>3</sup>Inserm, UMR 1086 ANTICIPE, BioTICLA, Caen, France

<sup>4</sup>Cancer Centre François Baclesse, UNICANCER, Caen, France

<sup>5</sup>CNRS, Normandy Regional Delegation, Caen, France

## #To whom correspondence should be addressed:

Dr Matthieu Meryet-Figuère

Inserm U1086 ANTICIPE

Interdisciplinary Research Unit for the Prevention and Treatment of Cancer

BioTICLA (Biology and Innovative Therapies of Ovarian Cancer)

Research building, François Baclesse Cancer Centre

3 Avenue général Harris, BP 45026,

14 076 Caen cedex 05

France

Email: [m.meryet-figuiere@baclesse.unicancer.fr](mailto:m.meryet-figuiere@baclesse.unicancer.fr)

Phone: 33 (0)2-31-45-52-29

Fax: 33 (0)2-31-45-51-72

## **Abstract**

With 240,000 new cases and 152 000 deaths per year, ovarian cancer is the leading cause of death from gynecologic malignancies. Late diagnosis because of asymptomatic development in early stages and resistance to existing treatments are the major causes of therapeutic failure in ovarian cancer. The recent discovery of tens of thousands of long non-coding RNAs and their action as oncogenes or tumor suppressors in pathways matching all the hallmarks of cancer in most – if not all - malignancies has attracted attention of the scientific community. A growing number of studies have implicated lncRNAs in diverse aspects of ovarian carcinoma biology. We present the lncRNAs which have been involved in response to the different drugs currently used for the treatment of ovarian cancers, from first-line platinum salts and taxanes to the newly available PARP inhibitors. Mechanistic insights underline their wide variety of functions and modes of action. The data already available supports the potential use of several lncRNAs, alone or in combination with other molecules, as potential biomarkers for the prediction of response to treatment and potentially as future therapeutic targets.

## Introduction

Ovarian cancer is the leading cause of death from gynecologic malignancies. It represents around 240,000 new cases and 152 000 deaths per year in the world<sup>1</sup>. The majority of patients are diagnosed in advanced stages (75% in stage III/IV FIGO) in view of the asymptomatic nature of the disease. The overall survival at 5-years is influenced by the stage of the disease at diagnosis, ranging from 90% for stage I to less than 40% for advanced stages (III/IV FIGO)<sup>2</sup>. The standard treatment for advanced epithelial ovarian cancers consists of a cytoreductive surgery followed by an adjuvant reference treatment combining platinum salt and taxane for 6 cycles. The tumoral residue after surgery (macroscopically visible or not visible) constitute one of the strongest prognosis factor available, therefore achieving surgery without any visible tumoral residue left is a major goal<sup>3,4</sup>. This is why when complete resection does not seem likely to be readily achievable, a neoadjuvant treatment comprising 3 to 4 cycles of Carboplatin and Paclitaxel is applied before surgery, in order to reduce tumor burden and increase the likeliness of complete surgical resection during interval surgery. In that scenario another 3 to 4 cycles of Carboplatin and Paclitaxel are given post-surgery.

Despite a good response rate to this usual first-line combination therapy (around 75%), recurrence occurs in most cases, together with resistance to treatment<sup>5</sup>, which is the major cause of therapeutic failure<sup>6</sup>. A relapse during the first-line of treatment defines 'platinum refractory' tumors. If it appears within 6 months after the first-line treatment, it will be considered as 'platinum-resistant' tumor and if it appears at least 6 months after first-line, it is termed 'platinum-sensitive'. Second or third line therapy for platinum-sensitive patients combines carboplatin and another drug such as paclitaxel, liposomal doxorubicin or gemcitabine, depending on patient's characteristics. For platinum refractory or resistant patients, for whom the prognosis is quite bad, platinum-free monochemotherapy is preferred<sup>5</sup>.

In recent years, new approaches and numerous clinical trials have been implemented to develop new therapeutic agents and treatment regimens to delay recurrence, improve patient response to chemotherapy and stabilize the disease. The implementation of targeted therapies in the treatment of ovarian cancer has lagged behind when compared with other malignancies.

However, the anti-angiogenic Bevacizumab<sup>5,7</sup> has received approval in the United States from the FDA "Food and Drug Administration" and in France from the HAS "Haute Autorité de Santé" and is indicated either as a neoadjuvant treatment to reduce tumor size prior to

resection surgery, or as a first-line treatment for the advanced stages (III B, III C and IV) in combination with Carboplatin and Paclitaxel or as a maintenance treatment (clinical trials: ICON7, GOG0218). It is also indicated for sensitive relapses (OCEANS, GOG0213 clinical trials) and resistant relapses (AURELIA clinical trial) if the patient has not previously been treated with another anti-angiogenic agent<sup>8</sup>. An improvement in PFS (progression-free survival) was observed, but no long-term OS gains have been achieved with anti-angiogenic molecules in ovarian cancer.

More recently, several PARP inhibitors (PARPi) have been approved by FDA as a maintenance treatment for 'platinum-sensitive' patients, newly diagnosed or after relapse. This newly approved treatment option hold great promise for the improvement of therapeutic care for the subset of patients presenting alterations in the homologous recombination repair pathway of DNA damage, for instance those with BRCA1/2 alterations.

The mechanisms involved in the response or resistance to treatment have been the focus of many studies. A better understanding of these mechanisms is necessary for the development of new therapeutic strategies to predict and/or counter resistance. Resistance of ovarian tumors to various chemotherapeutic agents is a multifactorial process, including but not limited to increased drug efflux, tolerance to oxidative stress, alterations of DNA repair mechanisms, resistance to apoptosis... Both genetic and epigenetic alterations have been implicated in the alteration of biological pathways related to resistance mechanisms<sup>9</sup>.

The recent advances of high-throughput transcriptomic studies have led to the identification of tens of thousands of non-protein coding RNA transcripts<sup>10</sup> and these non-coding RNAs (ncRNAs) have been demonstrated to regulated gene expression through many mechanisms including genetic and epigenetic modulation<sup>11</sup>. Among these ncRNAs, the long non-coding RNA (lncRNA) are defined by the absence of an open reading frame (ORF) and a length above 200 nucleotides<sup>12</sup>. They are usually transcribed by Pol II, spliced and polyadenylated. LncRNAs regulation of gene expression is mediated through four mechanisms: they can act as decoys, guides, scaffolds and signals. Furthermore, some of them can regulate splicing or act as competing endogenous RNAs for the binding of miRNAs, preventing their effect upon mRNA targets<sup>13</sup>. LncRNAs have functions in many cancers, if not all, biological processes such as imprinting, differentiation, development,<sup>14</sup> but also in all the hallmarks of cancer where they can act as oncogenes or tumor suppressors<sup>15</sup>. Several studies have demonstrated the essential roles of lncRNAs in the resistance of various tumors to chemotherapeutic agents<sup>16</sup> including in ovarian cancer<sup>17</sup>.

The objective of this review is to present the lncRNAs involved in resistance or response to the chemotherapeutic agents and targeted therapies used in the treatment of ovarian cancer. The study of lncRNAs will help to better understand the determinants of the response to these treatments in order to propose new innovative therapies and also provide new diagnostic and/or prognostic tools.

## **lncRNAs involved in response to chemotherapeutic treatment**

### **1st line chemotherapeutic treatment: Platinum salts and Taxanes**

The deregulation of numerous lncRNAs in ovarian cancers and their involvement in mechanisms modulating the response of ovarian cancer cells to the action of taxanes and platinum salts has now been acknowledged in many studies<sup>18-20</sup>. Resistance to taxanes and platinum salts occurs frequently and is the main cause of therapeutic failure.

Paclitaxel (taxol) was the first agent of the taxane class to be used in cancer chemotherapy. It binds to beta-tubulin which stabilizes microtubules, preventing their depolymerization and therefore blocking cancer cells in the G2/M phase. Paclitaxel is used in first-line therapy in ovarian cancer as well as in many other malignancies such as lung, liver, brain or breast cancer<sup>21,22</sup>. Specific side effects of paclitaxel are peripheral neuropathy, hypotension, and hypersensitivity<sup>19,20</sup>. Docetaxel is another taxane which has a chemical nature and mode of action similar to those of Paclitaxel. The Scottish Randomized Trial (SCOTROC) results indicated that Docetaxel is not more effective than Paclitaxel but reduces side effects such as peripheral neuropathy in ovarian cancer<sup>23</sup>, as well as in breast cancer<sup>21</sup>.

Initially Cisplatin was the first platinum compound to be used in the treatment of ovarian cancer. Cisplatin, cis-diammine dichloridoplatinum(II), is an alkylating agent able to interact with nucleophilic sites of purine in DNA and to form DNA adducts. This generates DNA damage, mitosis inhibition and induces signals leading to inflammatory state and eventually apoptosis<sup>18,21</sup>. Cisplatin is one of the most effective and widely used anti-cancer treatments, hence its use against many cancers such as ovarian, bladder, prostate, testicular, cervical, breast cancer. Unfortunately, this anti-cancer agent produces many adverse effects such as nephrotoxicity and gastrointestinal tract toxicity<sup>10,24</sup>. Carboplatin, cis-diammine cyclobutane-1,1-dicarboxylate-O,O' platinum(II), is the second platinum complex



used in ovarian cancer treatment. It is known to have the same ability to form DNA adducts, but with lower side effects, less toxicity and a slower reactivity<sup>10</sup>.

**UCA1** (Urothelial carcinoma-associated 1) is located on human chromosome 19p13.12, is composed of three exons and two introns and presents three isoforms. These isoforms are different by their sizes: 1.4Kb, 2.2Kb and 2.7Kb. The 1.4Kb isoform is the most studied isoform and is involved in the development of several cancers<sup>25</sup>. UCA1 is an oncofetal lncRNA expressed mainly in embryonic tissues and physiologically only at apparently low levels in cardiac tissue in adults<sup>26</sup>. It has been proved that UCA1 is re-expressed and has an oncogenic role in hepatocellular carcinoma, gastric, bladder<sup>27</sup>, breast, colorectal and ovarian cancer<sup>28</sup>. UCA1 is able to promote proliferation, metastasis, and invasion<sup>29</sup>. Moreover, UCA1 has been shown to contribute to the development of resistance to many chemotherapeutic treatments including Cisplatin or Paclitaxel in ovarian cancer<sup>25,30</sup>.

*F. WANG and al* have demonstrated that UCA1 expression is upregulated in ovarian cancer and this overexpression promotes cell migration, invasion and cisplatin resistance by the involvement of SRPK1 and proteinso of apoptosis pathway<sup>31</sup>. UCA1 promotes upregulation of SRPK1 and Bcl-2 (an anti-apoptotic protein) expression and decreases expression of many pro-apoptotic factors such as Bax, Caspase-3 and Caspase-9. SRPK1 belongs to the SR kinase family and is able to regulate gene expression by a role on pre-mRNA splicing. It has been previously shown that SRPK1 play a role in Cisplatin resistance in ovarian cancer<sup>32</sup>.

It has been also described that UCA1 is overexpressed in Paclitaxel-resistant ovarian cancer cells and promotes the acquisition of resistance to this agent by its role of sponge on miR-129, therefore upregulating ABCB1 protein, a direct target of miR-129<sup>30</sup>. MiR-129 is known to be involved in drug sensitivity in many cancers, such as breast cancer<sup>33</sup>. ABCB1/Pglycoprotein (P-gp) is an efflux pump and plays a role in the elimination of chemotherapeutic agents and therefore participates in resistance mechanisms in ovarian cancer cells<sup>34,35</sup>.

In oral squamous cell carcinoma, UCA1 is also involved in the resistance to Cisplatin, through sponging miR-184<sup>36</sup>. Interestingly, it has been shown that high miR-184 levels in ovarian cancer cells represses proliferation and induces apoptosis, suggesting a possible role in resistance to chemoresistance as well<sup>37</sup>.

UCA1 has also been identified in the resistance mechanisms to Docetaxel in prostate cancer by its sponging role on miR-204<sup>38</sup>. Although there are not reported connection between Docetaxel response and miR-204 in ovarian cancer, this miRNA is involved in Cisplatin resistance of ovarian cancer cells, by targeting IL6R and inhibiting IL6-induced resistance to Cisplatin.

**HOTAIR** is one of the most studied lncRNAs. It is an antisense RNA transcribed from the mammalian HOXC gene cluster<sup>39</sup>. This oncogenic lncRNA is involved in many malignant cancers such as gastric cancer<sup>40</sup>, colorectal cancer<sup>41</sup>, breast cancer or ovarian cancer<sup>39</sup>, through a large number of action mechanisms which have been described. HOTAIR has been shown to be involved in the development of resistance to various chemotherapeutic agents such as Cisplatin in ovarian cancer<sup>42</sup>.

It was demonstrated that overexpression of HOTAIR in ovarian cancer cells promotes cell cycle, cell proliferation, invasion, metastasis and the acquisition of Cisplatin resistance<sup>42</sup>. An initial study has demonstrated that the overexpression of HOTAIR promotes Cisplatin resistance in ovarian cancer by the activation of Wnt/ $\beta$ -catenin pathway<sup>39</sup>. HOTAIR is able to modulate the expression of cyclin D1, its ligand CDK4 and  $\beta$ -catenin, thus activating the wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway, which is often deregulated in cancers including ovarian cancer<sup>43,44</sup>.

**HOTAIR** was identified in three studies as playing a role in Cisplatin chemoresistance in gastric cancer by activation of PI3K/AKT/MRP1 pathway via its inhibiting role on miR-126<sup>45</sup>, which could be relevant in ovarian cancer because of the prominent role of PI3K/AKT pathways in chemoresistance of ovarian cancer cells.

In lung adenocarcinoma HOTAIR downregulates p21 and therefore promotes resistance to cisplatin<sup>46</sup>. A similar mechanism could promote ovarian cancer chemoresistance as well, since p21 downregulation triggers resistance to cisplatin in ovarian cancer cells<sup>47</sup>.

**PVT1** (plasmacytoma variant translocation 1) is a long non-coding RNA located on chromosome 8q24<sup>17</sup> near the MYC locus<sup>48</sup>. It is known to have an oncogenic role with involvement in various mechanisms that promote tumor growth, proliferation, invasion, and metastasis and repress apoptosis in various cancers. PVT1 is also known for its involvement in the resistance to Cisplatin in ovarian cancer<sup>49</sup>.

It has been described as regulating the apoptotic pathway of ovarian cancer cells leading to Cisplatin chemoresistance<sup>48</sup>. The expression of PVT1 has been shown to be increased in tumor tissues of Cisplatin-resistant patients and in ovarian cancer cells, and its inhibition has allowed sensitizing to cisplatin action, most likely through the modulation of Caspase 3 expression. The mechanisms of action by which PVT1 mediates its effects remain to be elucidated.

PVT1 has also been identified as being involved in the response of ovarian cancer cells to treatment combining Carboplatin and Docetaxel<sup>50</sup>. In this study of *Liu and al*, PVT1 has been described as a tumor suppressor, promoting the anticancer action of these chemotherapeutic agents by an upregulation of P53 and TIMP1 expression. P53 is the best known tumor

suppressor, but it is inactivated in more than 95% of high-grade serous ovarian cancers, thus the action of PVT1 through P53 is most likely minor in this context<sup>51</sup>. TIMP1 is part of the MMP pathway and is involved in the progression of many cancers including ovarian<sup>52</sup>.

Another possible role of PVT1 in chemoresistance could be through its ability to repress miR-195 expression by mediating H3K27 trimethylation in its promoter, which has been demonstrated in cervical cancer cells<sup>53</sup> whereas in ovarian cancer cells miR-195 reduces cisplatin resistance<sup>54</sup>.

**XIST** (X-inactive specific transcript) originates from the XIST gene on X chromosome and is a major player of the X inactivation in women<sup>55</sup>. XIST expression is present in all normal female cells but can be decreased or absent in female cancer cell lines, such as breast, cervical and ovarian cancers<sup>56</sup>. XIST functions in cancer depends on the context: it is known to act as a tumor suppressor in ovarian cancer with an inhibitory role on many tumor processes such as proliferation, invasion and resistance to Cisplatin<sup>57</sup>, whereas Xist acts as an oncogene in non-small cell lung cancer<sup>58</sup>.

*Changhong Wang and al*, have shown in epithelial ovarian cancer (EOC) cells (CAOV3/OVCAR3) that XIST is lowly expressed and that the upregulation of its expression promotes anticancer effects through its sponging role of miR-214-3p through a direct interaction<sup>57</sup>. MiR-214-3p has an oncogenic role in EOC, at least partly through its ability to target PTEN<sup>59</sup>.

**H19** is an oncofoetal gene located on the human chromosome 11p15.5<sup>60</sup>, which is known to play an essential role in embryonic development and cancer progression<sup>49</sup>. It is deregulated in many cancers such as bladder, breast, colorectal, esophageal and ovarian cancers<sup>56</sup>. This lncRNA acts as an oncogene by promoting tumor development, metastasis, epithelial-mesenchymal transition, or by allowing the acquisition of chemoresistance to multiple chemotherapeutic drugs, including Cisplatin in lung adenocarcinoma<sup>61</sup>.

In a study of *Zhi-Guo Zheng and al*, it is demonstrated that H19 expression was triggered after cisplatin treatment in sensitive cells and upregulated in Cisplatin-resistant cells and its inhibition promotes the sensitivity to Cisplatin. H19 seems to have a role in Cisplatin resistance of ovarian cancer cells by regulating oxidative-stress through glutathione (GSH) metabolism and NRF2 targets<sup>62</sup>. The oxidative stress pathway involves genes regulated by NRF2, a regulator of various antioxidant molecules<sup>63</sup> belonging to the GSH pathway and involved in Cisplatin resistance<sup>64,65</sup>.

H19 has also been shown to have a role in Paclitaxel resistance through the regulation of the AKT signaling pathway. Although this study was made in a triple negative breast cancer cells model, this could constitute another course of action active in an ovarian cancer setting<sup>20</sup>.

**BC200** is described as playing a role in chemoresistance of ovarian cancer<sup>66</sup> and specifically in carboplatin resistance. BC200 is a small cytoplasmic non-messenger RNA of about 200 nucleotides. This lncRNA is physiologically expressed in the human nervous system. It has been demonstrated that BC200 expression is associated with cancer cells from malignancies originating from various tissues such as breast, esophagus, lungs, cervix and ovaries. In breast cancer BC200 is more expressed in invasive carcinomas and associated with tumor growth<sup>67</sup>.

In the study from Wu et al<sup>66</sup>, it has been shown that the expression of BC200 is decreased in ovarian cancer cells compared to normal cells, promoting cell proliferation and Carboplatin resistance. In addition, it has been shown that Carboplatin induces BC200 expression, thus promoting the sensitivity of cancer cells and highlighting a tumor suppressor role for BC 200. The mechanism through which BC200 operates remains to be elucidated.

**NEAT1** (Nuclear paraspeckle assembly transcript 1), is located on human chromosome 11<sup>68</sup>. It is a nuclear lncRNA composed of two isoforms 3.7 kb and 23 kb named respectively NEAT1-1 and NEAT1-2. This lncRNA is known for its oncogenic role in many cancers including ovarian cancer, where it promotes cell proliferation<sup>69</sup>, migration and resistance to chemotherapeutic treatments such as doxorubicin in gastric cancer<sup>70</sup>.

*An et al*, have demonstrated that NEAT1 is increased in Paclitaxel-resistant ovarian cancer cells and tissues and an increase of its expression is involved in the acquisition of resistance. It is explained by its ability to induce ZEB1 (zinc finger E-box-binding homeobox 1) expression through sponging miR-194, this latter one targeting directly ZEB1<sup>68</sup>. Downregulation of miR-194 has already been demonstrated in Paclitaxel resistant ovarian cancer cells<sup>71</sup>. It has been also demonstrated that ZEB1 plays an important role in many cancers' progression including ovarian cancer, and that ZEB1 is involved in the resistance to many drugs such as doxorubicin, gemcitabine and paclitaxel<sup>72</sup>.

NEAT1 has been implicated in the acquisition of Paclitaxel chemoresistance in another instance by an activation of the AKT/mTOR pathway in non-small cell lung cancer<sup>73</sup>, which could be relevant in ovarian cancer setting given the importance of AKT pathway in drug resistance mechanisms.

**FER1L4** (Fer-1-like protein 4) is downregulated in various cancers such as osteosarcoma, gastric cancer and endometrial carcinoma, where it displays a tumor suppressor role<sup>74-76</sup>.

A role of FER1L4 in Paclitaxel tolerance in ovarian cancer cells was demonstrated<sup>77</sup>. Low expression of FER1L4 allows tumor growth and the development of chemoresistance by the

regulation of MAPK signaling pathway, although the mechanisms of FER1L4 action are not precisely described. MAPK signaling pathway roles in Cisplatin chemoresistance of ovarian cancer<sup>78,79</sup> as well as in colon cancer, metastatic melanoma<sup>80,81</sup> have been widely documented.

**MALAT1** (metastasis-associated lung adenocarcinoma transcript 1), also named NEAT2 (nuclear-enriched abundant transcript 2), is known to be overexpressed in ovarian cancer<sup>82</sup> and implicated in its progression by different mechanisms such as the regulation of PI3K-AKT pathway<sup>83</sup>. Although MALAT1 has not been formally involved in chemoresistance in ovarian cancer cells, its effects for instance on the PI3K/AKT pathway would likely have an influence on drug response in this model.

**MEG3** (maternally expressed gene 3) is located on the chromosome 14q32<sup>17</sup> and is known as a tumor suppressor. Its expression is mainly inhibited in cancers, but when expressed MEG3 is able to inhibit the growth of ovarian cancer cells<sup>84</sup>. It was demonstrated, although not in ovarian carcinoma but in lung adenocarcinoma<sup>85</sup> or lung cancer cells<sup>86</sup>, that MEG3 is implicated in the control of Cisplatin chemoresistance, respectively by the regulation of p53 and Bcl-xL expression and by the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway activation. Both the control of Bcl-xL expression and of Wnt/ $\beta$ -catenin pathway, if under the control of MEG3 in ovarian cancer models as well, will have an influence on the response to cisplatin<sup>87,88</sup>.

### **Anti-angiogenic and Bevacizumab**

The biological process of angiogenesis is one of the pivotal hallmarks of cancer. It directly induces tumor development through the formation of new vessels. This neovascularization will depend on the regulation of a balance between pro- and anti-angiogenic factors. The key angiogenic growth factors are vascular endothelial growth factor (VEGF), platelet derivative growth factor (PDGF) and fibroblast growth factor (FGF), and their receptors. These are positively regulated in tumors, thus promoting their growth, hence the relevance of the design of targeted therapeutics to counteract tumor neo-angiogenesis. The anti-angiogenic agent currently used in the treatment of ovarian cancer is bevacizumab. It is a recombinant humanized monoclonal antibody that inhibits the action of VEGF by binding its specific VEGFR receptor<sup>5,7,8</sup>.

To date, no study to our knowledge has demonstrated the involvement of lncRNAs in regulating the response of cancer cells to anti-angiogenic action, which is not surprising given the difficulty of reliably reproducing the angiogenesis mechanisms in vitro. On the other

hand, several studies have shown the involvement of lncRNAs in the regulation of angiogenesis in many cancers such as bladder, breast cancer, liver cells, glioblastoma and ovarian cancer<sup>89,90</sup>.

To our knowledge, only one study has demonstrated a direct link between a lncRNA and angiogenesis in ovarian cancer, while only a few other studies have reported such a connection in other malignancies.

**MALAT1** has been identified as being transferred by epithelial ovarian cancer (EOC) cells to HUVECS (human umbilical vein endothelial cells) via exosomes. This transfer not only stimulates tumor growth but also the expression of pro-angiogenic genes such as VEGF and FGF, and increases angiogenesis in tumors *in vivo* in nude mice. It has been shown that a high level of exosomal MALAT1 in serum is associated with a poor prognosis in patients with cervical, lung or breast cancers<sup>90</sup>.

On the same line, MALAT1 is overexpressed in neuroblastoma and osteosarcoma cells under hypoxic conditions. In both models, MALAT1 overexpression leads to an increase of FGF2 and VEGF expression and therefore favors angiogenesis<sup>91,92</sup>.

**H19** has been shown to be overexpressed in microvessels and their associated endothelial cells in a glioma model, and is involved in the progression of glioma through promoting angiogenesis by sponging miR-29a, a miRNA able to directly target vasohibin2 (VASH2)<sup>93</sup>. This mode of action could add to the deleterious effects of H19 regarding the response to cisplatin in ovarian cancer cells. Moreover, independently of its role in angiogenesis, down regulation of miR-29a has been shown to also promote Cisplatin resistance in ovarian cancer cells<sup>94</sup>.

## **2<sup>nd</sup> and 3<sup>rd</sup> line chemotherapeutic treatment**

Second and third line treatments are indicated depending on the patient's response to first-line treatments. For platinum-sensitive patients, therapy combining platinum salt and Paclitaxel or liposomal Doxorubicin or Gemcitabine is indicated. For patients refractory or resistant to platinum, platinum-free monochemotherapy is recommended, with Paclitaxel, Doxorubicin, Topotecan or Gemcitabine.

Doxorubicin (liposomal pegylated doxorubicin; Adriamycin) is a cytotoxic antibiotic belonging to the anthracycline family, it is used in the treatment of many cancers, including breast and ovarian cancers<sup>95</sup>. Anthracyclines are known to have many mechanisms of action,

their anti-tumor effect mainly depends on an ability to inhibit the action of topoisomerase II by stabilizing the DNA-topoisomerase II complex and thus create DNA damage and apoptosis of cancer cells<sup>96</sup>.

Gemcitabine is a pyrimidine nucleoside antimetabolite analog (20,20-Difluoro 20-deoxycytidine, dFdC) able to replace cytidine during DNA replication and therefore inhibit DNA synthesis, tumor growth and cause apoptosis<sup>21,97</sup>. Gemcitabine is used as chemotherapeutic treatment in several malignancies such as bladder, breast<sup>98</sup>, pancreas or ovarian cancers.

Topotecan is a topoisomerase I (TOP1) inhibitor utilized for the treatment of ovarian cancer and lung cancer. TOP1 relaxes DNA supercoiling by inducing reversible single strand breaks. Topotecan is known to bind TOP1-DNA cleavage complex and prevents relegation of these single strand breaks. This complex between topotecan-TOP1-DNA interferes with the replication fork and leads to apoptosis of the cells<sup>99</sup>.

To date, no studies have identified, in ovarian cancer the involvement of lncRNAs in the mechanisms regulating the resistance of these drugs, which is not entirely surprising, since they play a minor role compared to platinum salts in the treatment of patients with ovarian cancers. However, in other malignancies, several lncRNAs have been shown to play a role in the response to these drugs. The mechanisms of action those could be relevant in ovarian cancer are presented below.

**UCA1** in breast cancer cells promotes Doxorubicin chemoresistance through a mechanism involving the heterogeneous nuclear ribonucleoprotein I (hnRNPI) and P27 (Kip1)<sup>100</sup>. HnRNPI is located in the cytoplasm after Doxorubicin treatment and binds to p27 (Kip1) mRNA, a known tumor suppressor, to promote its translation<sup>101,102</sup>. It has been demonstrated that hnRNPI is able to bind UCA1 creating a competition between p27 and UCA1. UCA1 overexpression therefore leads to a decrease of p27 protein level.

**PVT1** has been shown to increase the resistance of osteosarcoma cells to Gemcitabine<sup>103</sup>. PVT1 is able to directly bind miR-152 titrating it from its target c-Met<sup>104</sup>. In ovarian cancer cells, targeting c-Met has been shown to enhance sensitivity to Paclitaxel<sup>105</sup>. Interestingly, c-MET inhibition also prevents PARP1 phosphorylation, thereby enhancing breast cancer cells response to PARP inhibitors. In addition to other roles of PVT1 in chemoresistance of ovarian cancer cells, this other pathway might be of significant value to predict ovarian cancer response to the newly introduced PARP inhibitors<sup>106</sup>.

**TUG1** expression is upregulated in pancreatic ductal adenocarcinoma tissues<sup>107</sup> where it promotes Gemcitabine resistance and inhibits apoptosis. ERK pathway inhibition resensitizes pancreatic cancer cells to gemcitabine, in the presence of TUG1, evidencing the role of ERK pathway, which is also involved in ovarian cancer cells resistance to cisplatin, in TUG1-induced resistance<sup>108–110</sup>.

TUG1 has also been identified as upregulated in bladder urothelial carcinoma (BUC) where it is associated with a poor response to doxorubicin chemotherapy<sup>111</sup>. TUG1 influences Doxorubicin resistance in this cancer by the regulation of Wnt/ $\beta$ -catenin pathway, which is known to be involved in tumorigenesis of many cancers such as lung cancer<sup>86</sup>, colorectal cancer<sup>112</sup> and ovarian cancer as well<sup>39</sup>.

**H19** is upregulated in Doxorubicin resistant breast cancer cells, and plays a leading role in this resistance by regulating the expression of ABCB1/MDR1, a drug efflux factor involved in drug resistance in different context, including ovarian cancer<sup>113,114</sup>. H19 is able to increase ABCB1/MDR1 expression, therefore increasing Doxorubicin resistance.

**GAS5** was shown, by *Liu and al.* to be able to suppress Gemcitabine resistance in pancreatic cancer<sup>115</sup>. GAS5 is downregulated in pancreatic cancer and is positively correlated with SOCS3 expression, a target of miR-221. GAS5 acts as a competing endogenous RNA for miR-221 which is directly targeting SOCS3. Interestingly, miR-221 is known to act as an oncogene in several cancers such as gastric<sup>116</sup>, breast<sup>117</sup>, or ovarian cancers<sup>118</sup>.

## **PARP inhibitors**

The study of DNA damage response and manipulation of this process is now recognized as an important area of research and could lead to an improvement of ovarian cancer therapeutic care. PARP (Poly-ADP ribose polymerase) has an important role in the repair of single-strand DNA breaks (SSB) and the use of PARP inhibitors (PARPi) can result in double-strand breaks (DSB). DSB normally would be repaired by Homologous Recombination (HR) DNA repair pathway which is a complex process involving many proteins, notably BRCA1 and BRCA2. In HR-deficient (HRD) tumors, alternative DNA repair by non-homologous end joining (NEHJ), a low fidelity repair mechanism, eventually results in cell death<sup>119,120</sup>.

Several PARPi have obtained FDA and/or EMA approval as maintenance therapy for newly diagnosed and recurrent ovarian carcinoma patients who responded to their last platinum based treatment (platinum free-interval  $\geq$  6 months). PARPi have been identified as



a particularly beneficial treatment for patients bearing germline/somatic mutations of *BRCA1/2* (g/s*BRCAMt*). However, they represent only a small portion of high-grade serous ovarian cancer cases (HGSOC)<sup>121</sup>. Importantly, patients with g/s*BRCAMt* achieved longer progression-free survival (PFS) than those without them, although results among patients without g/s*BRCAMt* treated by PARPi were better than those with placebo. These evidences suggest that patients with other defects (regardless of BRCA status) in the HR DNA repair system (HRD patients), such as alterations in ATM, CHEK2, PALB2, RAD51C, RAD51D, etc., may also benefit from PARPi<sup>122</sup>.

Germline and somatic mutations in HR genes are present in approximately one-third of ovarian cancers and also predict a better response to primary platinum-chemotherapy. More broadly, the HRD status reflects all alterations leading to HR abnormalities and conferring sensitivity to platinum and PARPi. To date, the HRD status has been partially determined through the analysis of gene mutations *via* multigene panel testing or through different HRD assays, some of them studying genomic instability. However, the determinants of response to PARPi remain incompletely characterized, and important efforts are made to identify molecular signatures as well as functional assays able to predict the response to PARPi.

To date, lncRNAs involved in HR or NHEJ have not been documented in OC. However, given the large number of lncRNAs and their diverse functions, it is not surprising that several lncRNAs play intricate roles in genome integrity maintenance and in the DNA damage response, and more particularly in double-strand break DNA (DSB) repair<sup>123</sup>.

**PCAT-1** (Prostate Cancer Associated Transcript 1) overexpressed in prostate cancer<sup>124</sup>, downregulate BRCA2 and impairs HR, which, in turn, sensitize prostate cancer cells to PARP inhibitor<sup>125</sup>. The mechanism by which PCAT-1 down-regulates BRCA2 is at least in part by a post-transcriptional repression of the 3' untranslated region (UTR) of BRCA2 mRNA. Interestingly, PCAT-1 levels are inversely correlated with RAD51 foci formation when prostate cancer cells are treated with PARPi. Two recent studies have shown that this lncRNA, overexpressed in OC cell lines and tumors, could be involved in the development and progression of OC<sup>126,127</sup>. However, no information was provided regarding the response to platinum-based chemotherapy or innovative treatments such as PARPi.

**DDSR1** (DNA Damage-Sensitive RNA1) has been proposed to have a role in modulating DNA repair by HR<sup>128</sup>. DDSR1 expression is induced by ATM in immortalized human skin fibroblasts. Moreover, DDSR1-depleted cells present a defective HR and show increased sensitivity to PARPi. The HR defect in the absence of DDSR1 is noticeable by aberrant accumulation of BRCA1 and RAP80 at DSB sites. In agreement with a role in

regulating HR, DDSR1 interacts with BRCA1 and hnRNPUL1, an RNA-binding protein involved in DNA end resection. To our knowledge, this lncRNA has never been studied in OC.

**NEAT1** levels in cholangiocarcinoma (CCA) are negatively correlated with BAP1 (BRCA-1 associated protein-1), a member of the ubiquitin C-terminal hydrolase superfamily that plays a critical role in chromatin remodeling<sup>129</sup>. Using TCGA (Tumor Cancer Genome Atlas) dataset, it was shown that the knockdown of BAP1 by upregulating NEAT1 expression sensitizes CCA cells to chemotherapy and PARPi.

In another study, this time in an ovarian cancer model, NEAT1 functioned as a competing endogenous RNA (ceRNA) for miR-506 to promote cell proliferation and migration<sup>130</sup>. MiR-506 systemic delivery in nude mice improved the response to cisplatin and olaparib<sup>131</sup>.

**NORAD** (non-coding RNA activated by DNA damage) is located on chromosome 20q11 and its length is 5.3 kb. NORAD is expressed abundantly, ubiquitously and is necessary to maintain genomic stability<sup>132 133</sup>.

*Munschauer M and al.* identified NORAD as being involved in genome stability through the interaction with RBMX, an element of the response to DNA damage. This RNP complex associates with other proteins including topoisomerase 1 (TOP1), an important mediator of genomic stability. NORAD inhibition induces defects in DNA replication and chromosome segregation<sup>134</sup>. It has also been shown that NORAD sequesters PUMILIO proteins, which otherwise repress DNA repair and induces genomic instability<sup>135</sup>. Oncogenic roles of NORAD have been shown in cancer cells from different origins, including in ovarian cancer where NORAD downregulation inhibits cell growth and progression through the cell cycle<sup>136</sup>.

**Table1: LncRNAs whose deregulation is related to first line chemotherapeutic agents in ovarian cancer**

Therapeutic Molecule	LncRNA		References
	Up	Down	
Platinum salts	UCA1		30,31
	HOTAIR		39,42
	PVT1		49,137
		XIST	57
	H19		62
		B200	66
	NEAT1		69
Taxanes	UCA1		30
	NEAT1		68
		FER1L4	77
Anti-angiogenic	MALAT1		90

## Conclusions and perspectives

In summary, the mechanisms by which lncRNAs modulate response to the drugs used for the treatment of ovarian cancer are diverse and can occur at every step of the action of chemotherapeutic drugs: from drug efflux to diverse pro-survival or anti-apoptotic pathways, including the management of genome stability and the response to DNA damage.

While many studies, reviewed elsewhere<sup>14,138</sup>, have correlated altered expression of lncRNAs with the prediction of disease-free survival and overall survival in ovarian cancer, none of these candidate have been turned so far into reliable and clinically useable biomarkers able to predict patient's survival and response to available treatments.

The definition of such biomarkers will need an increased number of studies on discovery and validation studies, preferably in cohorts of homogenous subtypes of ovarian cancer. Since the different histologies and subtypes of ovarian cancer constitute different diseases at the histological and molecular levels, it is expected that no common biomarker will be defined for the full range of ovarian cancer subtypes. In this regard, lncRNAs for which a role in the response to treatment has been identified might constitute valuable candidates, not only for the definition of biomarkers able to predict the response to treatment, but also to refine the predictive value of such biomarkers. For instance, a given lncRNA with a role as ceRNA for a specific miRNA might hold a predictive value only in light of the expression level of its interacting miRNA.

Although the study of lncRNAs is still in its infancy, these growing evidence suggests that lncRNAs, alone or in combination with other factors (protein coding genes, lncRNAs, miRNAs, ...) may serve as biomarkers that are highly valuable and desirable for prognosis and prediction of the response to the therapies, including the newly available and highly promising PARP inhibitors in OC.

Further studies will have also to determine the interest of these lncRNA, or the genes whom expression they modulate, as molecular targets for cancer therapy, alone or through sensitization to existing ones.

## **Acknowledgments**

We apologize for our inability to cite all the contributing literature.

This work was supported by the « Ligue Contre le Cancer » (Calvados and Seine-Maritime committees), the “Conseil Régional de Basse-Normandie”, the French State, INSERM (National Institute for Health and Medical Research), the University of Caen Normandy and the Cancer Center F. Baclesse (Caen, France). A.W. is a recipient of a doctoral fellowship from the “Conseil Régional de Basse-Normandie”. MRA.A is a recipient of a doctoral fellowship from Egyptian Ministry of Higher Education and Scientific Research.

## **Conflict of interest**

The authors declare no conflict of interest

## References

1. Reid, B. M., Permuth, J. B. & Sellers, T. A. Epidemiology of ovarian cancer: a review. *Cancer Biol. Med.* **14**, 9 (2017).
2. Shao, Y., Li, H., Du, R., Meng, J. & Yang, G. Involvement of non-coding RNAs in chemotherapy resistance of ovarian cancer. *J. Cancer* **9**, 1966–1972 (2018).
3. Coleman, R. L., Monk, B. J., Sood, A. K. & Herzog, T. J. Latest research and treatment of advanced-stage epithelial ovarian cancer. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **10**, 211–224 (2013).
4. Coleman, R. L. Ovarian cancer in 2015: Insights into strategies for optimizing ovarian cancer care. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **13**, 71–72 (2016).
5. Cortez, A. J., Tudrej, P., Kujawa, K. A. & Lisowska, K. M. Advances in ovarian cancer therapy. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **81**, 17–38 (2018).
6. Matsuo, K., Lin, Y. G., Roman, L. D. & Sood, A. K. Overcoming platinum resistance in ovarian carcinoma. *Expert Opin. Investig. Drugs* **19**, 1339–1354 (2010).
7. Mullen, M. M., Kuroki, L. M. & Thaker, P. H. Novel treatment options in platinum-sensitive recurrent ovarian cancer: a review. *Gynecol. Oncol.* (2018).
8. Grunewald, T. & Ledermann, J. A. Targeted therapies for ovarian cancer. *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* **41**, 139–152 (2017).
9. Kim, S. *et al.* Tumor evolution and chemoresistance in ovarian cancer. *Npj Precis. Oncol.* **2**, 20 (2018).
10. Biersack, B. Relations between approved platinum drugs and non-coding RNAs in mesothelioma. *Non-Coding RNA Res.* **3**, 161–173 (2018).
11. Wei, J.-W., Huang, K., Yang, C. & Kang, C.-S. Non-coding RNAs as regulators in epigenetics (Review). *Oncol. Rep.* **37**, 3–9 (2017).
12. Arun, G., Diermeier, S. D. & Spector, D. L. Therapeutic Targeting of Long Non-Coding RNAs in Cancer. *Trends Mol. Med.* **24**, 257–277 (2018).
13. Wang, K. C. & Chang, H. Y. Molecular Mechanisms of Long Noncoding RNAs. *Mol. Cell* **43**, 904–914 (2011).
14. Meryet-Figuière, M. *et al.* An overview of long non-coding RNAs in ovarian cancers. *Oncotarget* **7**, 44719 (2016).
15. Gutschner, T. & Diederichs, S. The hallmarks of cancer: A long non-coding RNA point of view. *RNA Biol.* **9**, 703–719 (2012).

16. Chen, Q., Wei, C., Wang, Z. & Sun, M. Long non-coding RNAs in anti-cancer drug resistance. *Oncotarget* **8**, 1925 (2017).
17. Zhan, L., Li, J. & Wei, B. Long non-coding RNAs in ovarian cancer. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **37**, (2018).
18. Hu, Y. *et al.* Emerging role of long non-coding RNAs in cisplatin resistance. *OncoTargets Ther.* **Volume 11**, 3185–3194 (2018).
19. Wang, R., Zhang, T., Yang, Z., Jiang, C. & Seng, J. Long non-coding RNA FTH 1P3 activates paclitaxel resistance in breast cancer through miR-206/ ABCB 1. *J. Cell. Mol. Med.* **22**, 4068–4075 (2018).
20. Han, J. *et al.* Knockdown of lncRNA H19 restores chemo-sensitivity in paclitaxel-resistant triple-negative breast cancer through triggering apoptosis and regulating Akt signaling pathway. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **359**, 55–61 (2018).
21. Campos-Parra, A. *et al.* Long Non-Coding RNAs as New Master Regulators of Resistance to Systemic Treatments in Breast Cancer. *Int. J. Mol. Sci.* **19**, 2711 (2018).
22. Wang, F., Porter, M., Konstantopoulos, A., Zhang, P. & Cui, H. Preclinical development of drug delivery systems for paclitaxel-based cancer chemotherapy. *J. Controlled Release* **267**, 100–118 (2017).
23. Montero, A., Fossella, F., Hortobagyi, G. & Valero, V. Docetaxel for treatment of solid tumours: a systematic review of clinical data. *Lancet Oncol.* **6**, 229–239 (2005).
24. Cavaletti, G. Peripheral neurotoxicity of platinum-based chemotherapy. *Nat. Rev. Cancer* **8**, 1p following 71; author reply 1p following 71 (2008).
25. Wang, H. *et al.* lncRNA UCA1 in anti-cancer drug resistance. *Oncotarget* **8**, (2017).
26. Wang, F., Li, X., Xie, X., Zhao, L. & Chen, W. UCA1, a non-protein-coding RNA up-regulated in bladder carcinoma and embryo, influencing cell growth and promoting invasion. *FEBS Lett.* **582**, 1919–1927 (2008).
27. Lebrun, L. *et al.* UCA1 overexpression is associated with less aggressive subtypes of bladder cancer. *Oncol. Rep.* (2018). doi:10.3892/or.2018.6697
28. Yang, Y. *et al.* UCA1 functions as a competing endogenous RNA to suppress epithelial ovarian cancer metastasis. *Tumor Biol.* **37**, 10633–10641 (2016).
29. Xue, M., Chen, W. & Li, X. Urothelial cancer associated 1: a long noncoding RNA with a crucial role in cancer. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **142**, 1407–1419 (2016).
30. Wang, J., Ye, C., Liu, J. & Hu, Y. UCA1 confers paclitaxel resistance to ovarian

cancer through miR-129/ABCB1 axis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **501**, 1034–1040 (2018).

31. Wang, F. *et al.* Involvement of SRPK1 in cisplatin resistance related to long non-coding RNA UCA1 in human ovarian cancer cells. *Neoplasma* **62**, 432–438 (2015).
32. Odunsi, K. *et al.* Elevated Expression of the Serine-Arginine Protein Kinase 1 Gene in Ovarian Cancer and Its Role in Cisplatin Cytotoxicity In Vitro. *PLoS ONE* **7**, e51030 (2012).
33. Luan, Q.-X., Zhang, B.-G., Li, X.-J. & Guo, M.-Y. MiR-129-5p is downregulated in breast cancer cells partly due to promoter H3K27m3 modification and regulates epithelial-mesenchymal transition and multi-drug resistance. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* **20**, 4257–4265 (2016).
34. Vaidyanathan, A. *et al.* ABCB1 (MDR1) induction defines a common resistance mechanism in paclitaxel- and olaparib-resistant ovarian cancer cells. *Br. J. Cancer* **115**, 431–441 (2016).
35. Li, X., Meng, X.-N., Yan, J. & Zong, Z. MicroRNA-873 mediates multidrug resistance in ovarian cancer cells by targeting ABCB1. *Tumor Biol.* **37**, 10499–10506 (2016).
36. Fang, Z. *et al.* LncRNA UCA1 promotes proliferation and cisplatin resistance of oral squamous cell carcinoma by suppressing miR-184 expression. *Cancer Med.* **6**, 2897–2908 (2017).
37. Qin, C.-Z. *et al.* MicroRNA-184 acts as a potential diagnostic and prognostic marker in epithelial ovarian cancer and regulates cell proliferation, apoptosis and inflammation. *Pharm.* **70**, 668–673 (2015).
38. Wang, X., Yang, B. & Ma, B. The UCA1/miR-204/Sirt1 axis modulates docetaxel sensitivity of prostate cancer cells. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **78**, 1025–1031 (2016).
39. Li, J. *et al.* Overexpression of long non-coding RNA HOTAIR leads to chemoresistance by activating the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway in human ovarian cancer. *Tumor Biol.* **37**, 2057–2065 (2016).
40. Endo, H. *et al.* Enhanced Expression of Long Non-Coding RNA HOTAIR Is Associated with the Development of Gastric Cancer. *PLoS ONE* **8**, e77070 (2013).
41. Xiao, Z. *et al.* LncRNA HOTAIR is a Prognostic Biomarker for the Proliferation and Chemoresistance of Colorectal Cancer via MiR-203a-3p-Mediated Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling Pathway. *Cell. Physiol. Biochem.* **46**, 1275–1285 (2018).
42. Wang, Y. *et al.* HOTAIR is a potential target for the treatment of cisplatin-resistant ovarian cancer. *Mol. Med. Rep.* (2015). doi:10.3892/mmr.2015.3562



43. Bodnar, L. *et al.* Wnt/ $\beta$ -catenin pathway as a potential prognostic and predictive marker in patients with advanced ovarian cancer. *J. Ovarian Res.* **7**, 16 (2014).
44. Karim, R. Z., Tse, G. M. K., Putti, T. C., Scolyer, R. A. & Soon Lee, C. The significance of the Wnt pathway in the pathology of human cancers. *Pathology (Phila.)* **36**, 120–128 (2004).
45. Yan, J., Dang, Y., Liu, S., Zhang, Y. & Zhang, G. LncRNA HOTAIR promotes cisplatin resistance in gastric cancer by targeting miR-126 to activate the PI3K/AKT/MRP1 genes. *Tumor Biol.* **37**, 16345–16355 (2016).
46. Liu, Z. *et al.* The Long Noncoding RNA HOTAIR Contributes to Cisplatin Resistance of Human Lung Adenocarcinoma Cells via downregulation of p21WAF1/CIP1 Expression. *PLoS ONE* **8**, e77293 (2013).
47. Lincet, H. *et al.* The p21cip1/waf1 cyclin-dependent kinase inhibitor enhances the cytotoxic effect of cisplatin in human ovarian carcinoma cells. *Cancer Lett.* **161**, 17–26 (2000).
48. Liu, E., Liu, Z., Zhou, Y., Mi, R. & Wang, D. Overexpression of long non-coding RNA PVT1 in ovarian cancer cells promotes cisplatin resistance by regulating apoptotic pathways. *Int. J. Clin. Exp. Med.* **8**, 20565–20572 (2015).
49. Abu, N., Hon, K. W., Jeyaraman, S. & Jamal, R. Long noncoding RNAs as biotargets in cisplatin-based drug resistance. *Future Oncol.* **14**, 3085–3095 (2018).
50. Liu, E., Liu, Z. & Zhou, Y. Carboplatin-docetaxel-induced activity against ovarian cancer is dependent on up-regulated lncRNA PVT1. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **8**, 3803 (2015).
51. Cole, A. J. *et al.* Assessing mutant p53 in primary high-grade serous ovarian cancer using immunohistochemistry and massively parallel sequencing. *Sci. Rep.* **6**, 26191 (2016).
52. Jackson, H. W., Defamie, V., Waterhouse, P. & Khokha, R. TIMPs: versatile extracellular regulators in cancer. *Nat. Rev. Cancer* **17**, 38–53 (2017).
53. Shen, C.-J., Cheng, Y.-M. & Wang, C.-L. LncRNA PVT1 epigenetically silences miR-195 and modulates EMT and chemoresistance in cervical cancer cells. *J. Drug Target.* **25**, 637–644 (2017).
54. Dai, J., Wei, R., Zhang, P. & Kong, B. Overexpression of microRNA-195-5p reduces cisplatin resistance and angiogenesis in ovarian cancer by inhibiting the PSAT1-dependent GSK3 $\beta$ / $\beta$ -catenin signaling pathway. *J. Transl. Med.* **17**, 190 (2019).
55. Briggs, S. F. & Reijo Pera, R. A. X chromosome inactivation: recent advances and a look forward. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **28**, 78–82 (2014).

56. Zhong, Y., Gao, D., He, S., Shuai, C. & Peng, S. Dysregulated Expression of Long Noncoding RNAs in Ovarian Cancer. *Int. J. Gynecol. Cancer* **26**, 1564–1570 (2016).
57. Wang, C. *et al.* Upregulation of long non-coding RNA XIST has anticancer effects on epithelial ovarian cancer cells through inverse downregulation of hsa-miR-214-3p. *J. Gynecol. Oncol.* **29**, e99 (2018).
58. Fang, J., Sun, C.-C. & Gong, C. Long noncoding RNA XIST acts as an oncogene in non-small cell lung cancer by epigenetically repressing KLF2 expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **478**, 811–817 (2016).
59. Yang, H. *et al.* MicroRNA expression profiling in human ovarian cancer: miR-214 induces cell survival and cisplatin resistance by targeting PTEN. *Cancer Res.* **68**, 425–433 (2008).
60. Li, H. *et al.* Overexpression of lncRNA H19 enhances carcinogenesis and metastasis of gastric cancer. *Oncotarget* **5**, 2318 (2014).
61. Wang, Q. *et al.* Correlation of long non-coding RNA H19 expression with cisplatin-resistance and clinical outcome in lung adenocarcinoma. *Oncotarget* **8**, (2017).
62. Zheng, Z.-G. *et al.* The essential role of H19 contributing to cisplatin resistance by regulating glutathione metabolism in high-grade serous ovarian cancer. *Sci. Rep.* **6**, 26093 (2016).
63. Sporn, M. B. & Libby, K. T. NRF2 and cancer: the good, the bad and the importance of context. *Nat. Rev. Cancer* **12**, 564–571 (2012).
64. Godwin, A. K. *et al.* High resistance to cisplatin in human ovarian cancer cell lines is associated with marked increase of glutathione synthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **89**, 3070–3074 (1992).
65. Chen, H. H. W. & Kuo, M. T. Role of Glutathione in the Regulation of Cisplatin Resistance in Cancer Chemotherapy. *Met.-Based Drugs* **2010**, 1–7 (2010).
66. Wu, D. *et al.* Downregulation of BC200 in ovarian cancer contributes to cancer cell proliferation and chemoresistance to carboplatin. *Oncol. Lett.* (2015). doi:10.3892/ol.2015.3983
67. Iacoangeli, A. BC200 RNA in invasive and preinvasive breast cancer. *Carcinogenesis* **25**, 2125–2133 (2004).
68. An, J., Lv, W. & Zhang, Y. LncRNA NEAT1 contributes to paclitaxel resistance of ovarian cancer cells by regulating ZEB1 expression via miR-194. *OncoTargets Ther.* **Volume 10**, 5377–5390 (2017).

69. Ding, N., Wu, H., Tao, T. & Peng, E. NEAT1 regulates cell proliferation and apoptosis of ovarian cancer by miR-34a-5p/BCL2. *OncoTargets Ther.* **Volume 10**, 4905–4915 (2017).
70. Zhang, J. *et al.* Silence of Long Noncoding RNA NEAT1 Inhibits Malignant Biological Behaviors and Chemotherapy Resistance in Gastric Cancer. *Pathol. Oncol. Res.* **24**, 109–113 (2018).
71. Nakamura, K. *et al.* Downregulation of miR-194-5p induces paclitaxel resistance in ovarian cancer cells by altering MDM2 expression. *Oncotarget* **10**, (2019).
72. Sakata, J. *et al.* Inhibition of ZEB1 leads to inversion of metastatic characteristics and restoration of paclitaxel sensitivity of chronic chemoresistant ovarian carcinoma cells. *Oncotarget* **8**, (2017).
73. Li, B., Gu, W. & Zhu, X. NEAT1 mediates paclitaxel-resistance of non-small cell of lung cancer through activation of Akt/mTOR signalling pathway. *J. Drug Target.* 1–7 (2019). doi:10.1080/1061186X.2019.1585437
74. Fei, D. *et al.* Long Noncoding RNA FER1L4 Suppresses Tumorigenesis by Regulating the Expression of PTEN Targeting miR-18a-5p in Osteosarcoma. *Cell. Physiol. Biochem.* **51**, 1364–1375 (2018).
75. Liu, Z. *et al.* Clinical significance of the low expression of FER1L4 in gastric cancer patients. *Tumor Biol.* **35**, 9613–9617 (2014).
76. Qiao, Q. & Li, H. LncRNA FER1L4 suppresses cancer cell proliferation and cycle by regulating PTEN expression in endometrial carcinoma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **478**, 507–512 (2016).
77. Liu, S. *et al.* Overexpression of the lncRNA FER1L4 inhibits paclitaxel tolerance of ovarian cancer cells via the regulation of the MAPK signaling pathway. *J. Cell. Biochem.* **120**, 7581–7589 (2019).
78. Xie, Y. *et al.* Metformin combined with p38 MAPK inhibitor improves cisplatin sensitivity in cisplatin-resistant ovarian cancer. *Mol. Med. Rep.* **10**, 2346–2350 (2014).
79. Villedieu, M. *et al.* Acquisition of chemoresistance following discontinuous exposures to cisplatin is associated in ovarian carcinoma cells with progressive alteration of FAK, ERK and p38 activation in response to treatment. *Gynecol. Oncol.* **101**, 507–519 (2006).
80. Shi, X. *et al.* AQP5 silencing suppresses p38 MAPK signaling and improves drug resistance in colon cancer cells. *Tumor Biol.* **35**, 7035–7045 (2014).
81. Long, G. V. *et al.* Increased MAPK reactivation in early resistance to dabrafenib/trametinib combination therapy of BRAF-mutant metastatic melanoma. *Nat.*

*Commun.* **5**, 5694 (2014).

82. Lin, Q. *et al.* MALAT1 affects ovarian cancer cell behavior and patient survival. *Oncol. Rep.* (2018). doi:10.3892/or.2018.6384

83. Jin, Y., Feng, S. J., Qiu, S., Shao, N. & Zheng, J. H. LncRNA MALAT1 promotes proliferation and metastasis in epithelial ovarian cancer via the PI3K-AKT pathway. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* **21**, 3176–3184 (2017).

84. Sheng, X. *et al.* Promoter hypermethylation influences the suppressive role of maternally expressed 3, a long non-coding RNA, in the development of epithelial ovarian cancer. *Oncol. Rep.* **32**, 277–285 (2014).

85. Liu, J. *et al.* The Long Noncoding RNA MEG3 Contributes to Cisplatin Resistance of Human Lung Adenocarcinoma. *PLOS ONE* **10**, e0114586 (2015).

86. Xia, Y., He, Z., Liu, B., Wang, P. & Chen, Y. Downregulation of Meg3 enhances cisplatin resistance of lung cancer cells through activation of the WNT/ $\beta$ -catenin signaling pathway. *Mol. Med. Rep.* **12**, 4530–4537 (2015).

87. Brotin, E. *et al.* Bcl-XL and MCL-1 constitute pertinent targets in ovarian carcinoma and their concomitant inhibition is sufficient to induce apoptosis. *Int. J. Cancer* **126**, 885–895 (2010).

88. Zhang, C., Zhang, Z., Zhang, S., Wang, W. & Hu, P. Targeting of Wnt/ $\beta$ -Catenin by Anthelmintic Drug Pyrvinium Enhances Sensitivity of Ovarian Cancer Cells to Chemotherapy. *Med. Sci. Monit. Int. Med. J. Exp. Clin. Res.* **23**, 266–275 (2017).

89. Sheng, S.-R., Wu, J.-S., Tang, Y.-L. & Liang, X.-H. Long noncoding RNAs: emerging regulators of tumor angiogenesis. *Future Oncol.* **13**, 1551–1562 (2017).

90. Qiu, J.-J. *et al.* Exosomal Metastasis-Associated Lung Adenocarcinoma Transcript 1 Promotes Angiogenesis and Predicts Poor Prognosis in Epithelial Ovarian Cancer. *Int. J. Biol. Sci.* **14**, 1960 (2018).

91. Tee, A. E. *et al.* The long noncoding RNA MALAT1 promotes tumor-driven angiogenesis by up-regulating pro-angiogenic gene expression. *Oncotarget* **7**, 8663 (2016).

92. Zhang, Z.-C. *et al.* Targeting the long noncoding RNA MALAT1 blocks the pro-angiogenic effects of osteosarcoma and suppresses tumour growth. *Int. J. Biol. Sci.* **13**, 1398 (2017).

93. Jia, P. *et al.* Long non-coding RNA H19 regulates glioma angiogenesis and the biological behavior of glioma-associated endothelial cells by inhibiting microRNA-29a. *Cancer Lett.* **381**, 359–369 (2016).

94. Yu, P.-N. *et al.* Downregulation of miR-29 contributes to cisplatin resistance of ovarian cancer cells. *Int. J. Cancer* **134**, 542–551 (2014).
95. Zhang, Z., Yu, X., Wang, Z., Wu, P. & Huang, J. Anthracyclines potentiate anti-tumor immunity: A new opportunity for chemoimmunotherapy. *Cancer Lett.* **369**, 331–335 (2015).
96. Minotti, G. Anthracyclines: Molecular Advances and Pharmacologic Developments in Antitumor Activity and Cardiotoxicity. *Pharmacol. Rev.* **56**, 185–229 (2004).
97. Wong, A., Soo, R. A., Yong, W.-P. & Innocenti, F. Clinical pharmacology and pharmacogenetics of gemcitabine. *Drug Metab. Rev.* **41**, 77–88 (2009).
98. Park, I. H. *et al.* Phase II study of gemcitabine in combination with vinorelbine versus gemcitabine followed by vinorelbine for metastatic breast cancer. *Invest. New Drugs* **28**, 659–669 (2010).
99. Pommier, Y. Topoisomerase I inhibitors: camptothecins and beyond. *Nat. Rev. Cancer* **6**, 789 (2006).
100. Huang, J. *et al.* Long non-coding RNA UCA1 promotes breast tumor growth by suppression of p27 (Kip1). *Cell Death Dis.* **5**, e1008 (2014).
101. Wander, S. A., Zhao, D. & Slingerland, J. M. p27: A Barometer of Signaling Deregulation and Potential Predictor of Response to Targeted Therapies. *Clin. Cancer Res.* **17**, 12–18 (2011).
102. Hengst, L. & Reed, S. I. Translational control of p27Kip1 accumulation during the cell cycle. *Science* **271**, 1861–1864 (1996).
103. Sun, Z.-Y., Jian, Y.-K., Zhu, H.-Y. & Li, B. lncRNAPVT1 targets miR-152 to enhance chemoresistance of osteosarcoma to gemcitabine through activating c-MET/PI3K/AKT pathway. *Pathol. - Res. Pract.* **215**, 555–563 (2019).
104. Li, M. *et al.* Function of miR-152 as tumor suppressor in oral squamous cell carcinoma cells by targeting c-MET. *Oncol. Rep.* (2017). doi:10.3892/or.2017.6157
105. Wang, J. & Cheng, J.-X. c-Met inhibition enhances chemosensitivity of human ovarian cancer cells. *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* **44**, 79–87 (2017).
106. Du, Y. *et al.* Blocking c-Met-mediated PARP1 phosphorylation enhances anti-tumor effects of PARP inhibitors. *Nat. Med.* **22**, 194–201 (2016).
107. Yang, F., Li, X., Zhang, L., Cheng, L. & Li, X. LncRNA TUG1 promoted viability and associated with gemcitabine resistant in pancreatic ductal adenocarcinoma. *J. Pharmacol. Sci.* **137**, 116–121 (2018).

108. Zhang, P. *et al.* Targeting CDK1 and MEK/ERK Overcomes Apoptotic Resistance in BRAF-Mutant Human Colorectal Cancer. *Mol. Cancer Res.* **16**, 378–389 (2018).
109. Dang, J. *et al.* Metformin in combination with cisplatin inhibits cell viability and induces apoptosis of human ovarian cancer cells by inactivating ERK 1/2. *Oncol. Lett.* (2017). doi:10.3892/ol.2017.7176
110. Liu, S., Zha, J. & Lei, M. Inhibiting ERK/Mnk/eIF4E broadly sensitizes ovarian cancer response to chemotherapy. *Clin. Transl. Oncol.* (2017). doi:10.1007/s12094-017-1724-0
111. Xie, D., Zhang, H., Hu, X. & Shang, C. Knockdown of long non-coding RNA Taurine Up-Regulated 1 inhibited doxorubicin resistance of bladder urothelial carcinoma via Wnt/ $\beta$ -catenin pathway. *Oncotarget* **8**, (2017).
112. Song, J., Shu, H., Zhang, L. & Xiong, J. Long noncoding RNA GAS5 inhibits angiogenesis and metastasis of colorectal cancer through the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway. *J. Cell. Biochem.* **120**, 6937–6951 (2019).
113. Zhu, Q.-N. *et al.* LncRNA H19 is a major mediator of doxorubicin chemoresistance in breast cancer cells through a cullin4A-MDR1 pathway. *Oncotarget* **8**, (2017).
114. Ween, M. P., Armstrong, M. A., Oehler, M. K. & Ricciardelli, C. The role of ABC transporters in ovarian cancer progression and chemoresistance. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **96**, 220–256 (2015).
115. Liu, B. *et al.* lncRNA GAS5 Reverses EMT and Tumor Stem Cell-Mediated Gemcitabine Resistance and Metastasis by Targeting miR-221/SOCS3 in Pancreatic Cancer. *Mol. Ther. - Nucleic Acids* **13**, 472–482 (2018).
116. Ma, M. *et al.* miRNA-221 of exosomes originating from bone marrow mesenchymal stem cells promotes oncogenic activity in gastric cancer. *OncoTargets Ther.* **Volume 10**, 4161–4171 (2017).
117. Deng, L. *et al.* Downregulation of miR-221-3p and upregulation of its target gene PARP1 are prognostic biomarkers for triple negative breast cancer patients and associated with poor prognosis. *Oncotarget* **8**, (2017).
118. Xie, X., Huang, Y., Chen, L. & Wang, J. miR-221 regulates proliferation and apoptosis of ovarian cancer cells by targeting BMF. *Oncol. Lett.* (2018). doi:10.3892/ol.2018.9446
119. Pilié, P. G., Gay, C. M., Byers, L. A., O'Connor, M. J. & Yap, T. A. PARP Inhibitors: Extending Benefit Beyond BRCA-Mutant Cancers. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **25**, 3759–3771 (2019).

120. Madariaga, A., Lheureux, S. & Oza, A. M. Tailoring Ovarian Cancer Treatment: Implications of BRCA1/2 Mutations. *Cancers* **11**, (2019).
121. Morgan, R. D., Clamp, A. R., Evans, D. G. R., Edmondson, R. J. & Jayson, G. C. PARP inhibitors in platinum-sensitive high-grade serous ovarian cancer. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **81**, 647–658 (2018).
122. Hoppe, M. M., Sundar, R., Tan, D. S. P. & Jeyasekharan, A. D. Biomarkers for Homologous Recombination Deficiency in Cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* **110**, 704–713 (2018).
123. Thapar, R. Regulation of DNA Double-Strand Break Repair by Non-Coding RNAs. *Molecules* **23**, 2789 (2018).
124. Prensner, J. R. *et al.* Transcriptome sequencing across a prostate cancer cohort identifies PCAT-1, an unannotated lincRNA implicated in disease progression. *Nat. Biotechnol.* **29**, 742–749 (2011).
125. Prensner, J. R. *et al.* PCAT-1, a Long Noncoding RNA, Regulates BRCA2 and Controls Homologous Recombination in Cancer. *Cancer Res.* **74**, 1651–1660 (2014).
126. Liu, H. P. *et al.* Long noncoding RNA PCAT-1 promoted ovarian cancer cell proliferation and invasion by suppressing KLF6. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* **23**, 4650–4655 (2019).
127. Gu, L.-P. *et al.* Long non-coding RNA PCAT-1 promotes tumor progression by inhibiting miR-129-5p in human ovarian cancer. *Arch. Med. Sci. AMS* **15**, 513–521 (2019).
128. Sharma, V. *et al.* A BRCA1-interacting lincRNA regulates homologous recombination. *EMBO Rep.* **16**, 1520–1534 (2015).
129. Jiang, F. & Ling, X. The Advancement of Long Non-Coding RNAs in Cholangiocarcinoma Development. *J. Cancer* **10**, 2407–2414 (2019).
130. Yong, W. *et al.* Long noncoding RNA NEAT1, regulated by LIN28B, promotes cell proliferation and migration through sponging miR-506 in high-grade serous ovarian cancer. *Cell Death Dis.* **9**, 861 (2018).
131. Liu, G. *et al.* Augmentation of response to chemotherapy by microRNA-506 through regulation of RAD51 in serous ovarian cancers. *J. Natl. Cancer Inst.* **107**, (2015).
132. Tan, B.-S. *et al.* LncRNA NORAD is repressed by the YAP pathway and suppresses lung and breast cancer metastasis by sequestering S100P. *Oncogene* (2019). doi:10.1038/s41388-019-0812-8
133. Yang, Z. *et al.* Noncoding RNA activated by DNA damage (NORAD): Biologic function and mechanisms in human cancers. *Clin. Chim. Acta* **489**, 5–9 (2019).

134. Munschauer, M. *et al.* The NORAD lncRNA assembles a topoisomerase complex critical for genome stability. *Nature* **561**, 132 (2018).
135. Lee, S. *et al.* Noncoding RNA NORAD Regulates Genomic Stability by Sequestering PUMILIO Proteins. *Cell* **164**, 69–80 (2016).
136. Tong, L. *et al.* Long noncoding RNA NORAD is upregulated in epithelial ovarian cancer and its downregulation suppressed cancer cell functions by competing with miR-155-5p. *Cancer Med.* (2019). doi:10.1002/cam4.2350
137. Zhang, X., Bu, P., Liu, L., Zhang, X. & Li, J. Overexpression of long non-coding RNA PVT1 in gastric cancer cells promotes the development of multidrug resistance. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **462**, 227–232 (2015).
138. Wang, J., Lu, A. & Chen, L. LncRNAs in ovarian cancer. *Clin. Chim. Acta* (2018).



Cette revue de la littérature fait apparaître un rôle important des lncRNAs dans la réponse aux traitements des cancers de l'ovaire. L'accumulation rapide des connaissances relative à ce champ d'études nouveau laisse présager que ce lien devrait s'approfondir prochainement.

La mise en évidence de nouveaux liens entre lncRNAs et réponse aux traitements et le renforcement des preuves concernant les liens déjà identifiés, pourraient permettre de définir de nouveaux biomarqueurs utilisables dans la pratique clinique, permettant de prédire la réponse au traitement et/ou de prévoir la récurrence. Dans le cas du traitement de première ligne, de tels outils pourraient éviter la prescription d'un traitement aux effets secondaires importants s'il ne devait pas être accompagné d'un bénéfice clinique pour les patientes. Dans le cas des inhibiteurs de PARP, la définition d'outils prédictifs de la réponse en complément de l'étude des mutations *BRCA1/2* constitue un enjeu majeur afin d'identifier un maximum de patientes pouvant bénéficier de ces traitements très prometteurs.

En outre, l'étude des mécanismes d'action des lncRNAs pourrait permettre d'identifier des vulnérabilités particulières pouvant suggérer des stratégies thérapeutiques novatrices, en ciblant les voies de régulation de certains lncRNAs, ou bien l'expression et/ou l'activité des gènes qu'ils régulent.

## II. Article: *“The long non-coding RNA ‘UCA1’ modulates the response to chemotherapy of ovarian cancer through direct binding to miR-27a-5p and control of UBE2N levels.”*

(Soumission prévue fin 2019, première auteure)

### **Contexte de la publication**

Le long ARN non-codant (lncRNA) UCA1 est un transcrite oncofoetal présentant des fonctions oncogéniques diverses dans de nombreuses pathologies cancéreuses. Son expression a ainsi été associée à la prolifération et à la capacité à former des métastases dans les cancers de la vessie où, à l’instar du gliome et du cancer colorectal, il est également un facteur de mauvais pronostic. Il a également été associé à la résistance à la chimiothérapie, y compris au cisplatine dans les cancers de l’ovaire.

Toutefois, seulement une minorité des publications concernant UCA1 apporte des éléments mécanistiques précis visant à expliquer ses modes d’action. Dans des cancers de la vessie, il a été montré qu’il peut se lier à BRG1, un membre du complexe SWI/SNF de remodelage de la chromatine. Il a également été montré qu’UCA1 peut se lier à plusieurs miRNAs, assurant ainsi une fonction d’ARN compétiteur endogène (ceRNA) empêchant les miRNAs ainsi séquestrés d’agir sur leurs mRNAs cibles, dans plusieurs types de cancers dont les cancers de l’ovaire.

Les données issues d’une analyse transcriptomique réalisée au laboratoire nous ont indiqué qu’UCA1 est fortement surexprimé dans la lignée cancéreuse de l’ovaire chimiorésistance OAW42-R par comparaison avec sa contrepartie sensible à l’action du cisplatine OAW42. En outre, un haut niveau d’expression d’UCA1 est un facteur de mauvais pronostic dans deux cohortes indépendantes dont les résultats d’analyse transcriptomique sur tissu tumoral sont en accès libre. Nous avons ainsi décidé d’étudier les possibles fonctions d’UCA1, et ses mécanismes d’action, dans la réponse au cisplatine de lignées cellulaires tumorales ovariennes.

# The long non-coding RNA 'UCA1' modulates the response to chemotherapy of ovarian cancer through direct binding to miR-27a-5p and control of UBE2N levels

Anaïs Wambecke<sup>1,2,3,4</sup>, Mohammad Ramadan Abdelsatar Ahmad<sup>1,2,3,4</sup>, Pierre-Marie Morice<sup>1,2,3,4</sup>, Bernard Lambert<sup>1,2,3,4,5</sup>, Louis-Bastien Weiswald<sup>1,2,3,4</sup>, Mégane Vernon<sup>1,2,3,4</sup>, Nicolas Vigneron<sup>1,2,3,4</sup>, , Florence Giffard<sup>1,2,3,4</sup>, Edwige Abeilard<sup>1,2,3,4</sup>, Emilie Brotin<sup>1,2,3,4,6</sup>, Martin Figeac<sup>7</sup>, Juliette Bertorello<sup>1,2,3,4</sup>, Pascal Gauduchon<sup>1,2,3,4</sup>, Laurent Poulain<sup>1,2,3,4</sup>, Christophe Denoyelle<sup>1,2,3,4,6</sup> and Matthieu Meryet-Figuere<sup>1,2,3,4#</sup>.

## Authors affiliations

<sup>1</sup>Normandie Univ, France

<sup>2</sup>UNICAEN, ANTICIPE (Interdisciplinary Research Unit for the Prevention and Treatment of Cancer), BioTICLA (Biology and Innovative Therapies of Ovarian Cancers), Caen, France

<sup>3</sup>Inserm, UMR 1086 ANTICIPE, BioTICLA, Caen, France

<sup>4</sup>Cancer Centre François Baclesse, UNICANCER, Caen, France

<sup>5</sup>CNRS, Normandy Regional Delegation, Caen, France

<sup>6</sup>ImpedanCELL core facility, Federative Structure 4206 ICORE, UNICAEN, Caen, France

<sup>7</sup>Functional and structural genomics platform · Institute for Cancer Research, Lille Univ, Lille, France

## #To whom correspondence should be addressed:

Dr Matthieu Meryet-Figuère

Inserm U1086 ANTICIPE

Interdisciplinary Research Unit for the Prevention and Treatment of Cancer

BioTICLA (Biology and Innovative Therapies of Ovarian Cancer)

Research building, François Baclesse Cancer Centre

3 Avenue général Harris, BP 45026,

14 076 Caen cedex 05

France

Email: [m.meryet-figuiere@baclesse.unicancer.fr](mailto:m.meryet-figuiere@baclesse.unicancer.fr)

Phone: 33 (0)2-31-45-52-29

Fax: 33 (0)2-31-45-51-72

**Short title:** UCA1 binds to miR-27a-5p and modulates chemoresistance in ovarian cancer

**Keywords:** lncRNA, UCA1, chemoresistance, miR-27a-5p, ovarian cancer

**List of abbreviations:** EOC: Epithelial Ovarian Cancer, FIGO: International Federation of Gynaecologists and Obstetricians, lncRNA: long non-coding RNA, miRNA: microRNA, UCA1 (Urothelial Cancer Associated 1), PFS: Platinum Free Survival, DEGs: Differentially expressed genes, ceRNA: Competing endogenous RNA, GO-BP: Gene Ontology-Biological Process, GSEA: Gene Set Enrichment Analysis, KM-plot: Kaplan Meier-plotter.

## Abstract

Ovarian cancers present a 5-year survival rate below 40% and are the leading cause of death from gynecological cancer worldwide. This poor prognosis is explained by a late diagnosis (due to asymptomatic development in the early stages) and resistance to existing treatments, and highlights the need to develop new therapeutic approaches. The recent discovery of a significant number of lncRNAs has opened up new opportunities for oncology research. Few studies have so far explored their involvement in chemoresistance, let alone ovarian cancer. UCA1 lncRNA is oncogenic in several malignancies, and is a factor of poor prognosis in ovarian cancers. However, the mechanisms of UCA1 action are only poorly understood yet, particularly in ovarian cancer. We did show that the downregulation of UCA1 short isoform leads to BIM upregulation which sensitizes ovarian cancer cells to cisplatin. UCA1 is a ceRNA to miR-27a-5p through direct binding. Upon release from UCA1, miR-27a-5p downregulates the expression of UBE2N, a direct target of this miRNA. UBE2N downregulation leads to BIM upregulation, which sensitizes ovarian cancer cells to cisplatin. UBE2N was reported to be an actor in several pathways, including DNA repair and NF- $\kappa$ B signalling, and its inhibition might constitute a promising strategy at multiple levels in ovarian cancer. Indeed, we could show that UBE2N inhibition could sensitize to platinum salts several patient-derived 3 dimensional organoid cultures, a study model believed to faithfully mimic patient's response to therapy. This enlightens an innovative new potential therapeutic strategy to counter chemoresistance in ovarian cancer.

## Introduction

Ovarian cancers are the leading cause of death from gynecologic malignancies, they represent the 7<sup>th</sup> most frequently diagnosed cancer in women worldwide, and are responsible for around 240 000 new cases per year and 152 000 deaths<sup>1-3</sup>. The standard treatment for EOC (Epithelial ovarian cancers) patients consists in cytoreductive surgery and platinum salts/taxane chemotherapy<sup>4,5</sup>. The asymptomatic nature of this disease during the early stages generally leads to a late diagnosis at a time when it has already spread to the entire peritoneal cavity. Despite good initial response rate, the overall 5-year survival rate is below 40% for the advanced FIGO stages (III/IV) because of recurrence and resistance to conventional therapy, leading to a therapeutic dead-end<sup>3,6,7</sup>. In recent years, several malignancies have benefited of the introduction of innovative and targeted therapies, but the therapeutic care of ovarian cancer patients lagged behind. The addition of anti-angiogenic bevacizumab has only marginally improved outcome<sup>8</sup>, and the newly introduced PARP inhibitors are highly promising, but to only a subset of BRCA1/2 mutated and/or homologous DNA repair deficient patients, who still show sensitivity to platinum salts chemotherapy<sup>9</sup>. Many efforts are set up to counter the chemoresistance of ovarian cancer, which remains the major hurdle for a significant improvement of patient's outcome.

The identification of the roles and functions of noncoding RNAs has thrown new light on the regulation of gene expression. At first, the discovery of miRNAs and the subsequent characterization of their functions evidenced their crucial roles in all of the main biological processes: development, differentiation, apoptosis, cell cycle, and diseases including cancer. More recently, a large number of long non-coding RNAs (lncRNAs) have been described. 16,000 curated records are present in the current Gencode release (v.23), and 127 802 transcripts and 5 946 lncRNA genes were identified in the LNCipedia database<sup>10,11</sup>. LncRNAs are characterized by the absence of a significant ORF and by a length greater than 200 nucleotides<sup>12,13</sup>. Many studies have reported lncRNAs involvement in many cellular contexts biological processes such as imprinting, development, DNA damage through multiple modes of regulation mediated. They are able to regulate gene expression at many levels, such as epigenetic level with the regulation of DNA methylation and histone post-translational modification, or through the regulation of gene expression at the transcriptional and post-transcriptional levels. Furthermore lncRNAs have the ability to prevent miRNAs from performing their regulatory functions on their target mRNAs by fixing them, acting as sponges of miRNAs: lncRNAs are in this case qualified as endogenous competitors "ceRNAs"<sup>14,15</sup>. Owing to their central role in the control of gene expression, deregulation of

their expression is associated with tumorigenesis, metastasis, and prognosis in many cancers, including ovarian carcinoma<sup>16,17</sup>, where they can act as oncogenes or tumor suppressors.

Human urothelial carcinoma associated 1 (UCA1) was first isolated by *Wang et al*<sup>18</sup> in 2006, in bladder cancer. UCA1 transcript has 3 exons, and isoforms have been described of 1.4 kb, 2.2 kb and 2.7 kb, differing by the length of the 3<sup>rd</sup> exon. Studies exploring UCA1 functions have been expanding rapidly in the recent years, although most of them do not attribute UCA1 functions to a specific isoform. UCA1 is an oncofoetal gene with oncogenic functions reported in many cancers<sup>19</sup>, it has been shown that UCA1 increased expression promotes proliferation and metastases formation in bladder cancer<sup>20</sup>, and is a factor of poor prognosis in colorectal cancer and glioma<sup>21,22</sup>. UCA1 has been involved in resistance to several chemotherapeutic drugs<sup>19</sup>, including in ovarian cancer, where it has also been identified as promoting the migration and invasion of ovarian cancer cells<sup>23</sup>.

Out of the several studies about UCA1 functions, a majority does not propose mechanistic explanations for the observed effects. It has however been demonstrated that UCA1 is capable of interacting with BGR1, a member of the SWI/SNF chromatin-modifying epigenetic complex<sup>24</sup>, or to act as a competing endogenous RNA for several miRNAs<sup>25,26</sup>. Studies have shown its role as a sponge at miRNAs, as in human leukemic cells where it sponges miR-216, resulting in the proliferation and migration/invasion of these cells<sup>27</sup>. In ovarian cancer, UCA1 has been shown to directly interact with miR-129 and thus control the expression of coding gene for ABCB1 protein, promoting the resistance to paclitaxel<sup>28</sup>.

In this study, UCA1 was identified as promoting the chemoresistance of ovarian cancers. We showed that UCA1 binds directly to miR-27a-5p. Upon UCA1 downregulation, miR-27a-5p is released and thus free to downregulate UBE2N expression through direct targeting, resulting in the upregulation of pro-apoptotic Bcl-2 family protein BIM. BIM upregulation efficiently sensitizes ovarian cancer cells lines to the action of cisplatin. Additionally, we showed that UBE2N inhibition in patient-derived organoid 3 dimensional cultures also triggers sensitization to cisplatin.

## **Material and methods**

### ***Ovarian cancer cell lines***

The cisplatin-sensitive OAW42 serous ovarian cancer cell line was obtained from ECACC (Sigma Aldrich, St Quentin-Fallavier, France). Its cisplatin-resistant counterpart OAW42-R was obtained as previously described<sup>29,30</sup>. Briefly, OAW42 cells were exposed to increased concentrations of cisplatin and were allowed to recover in-between treatments. Over time, acquired resistance to cisplatin was established and the resultant cell line was termed "OAW42-R". OAW42 and OAW42-R cells were grown in DMEM medium supplemented with 4500 mg/l glucose, 2mM Glutamax™, 1 mM sodium pyruvate, 10% fetal calf serum, 33 mM sodium bicarbonate (Gibco BRL, Lyon, France) and 20 UI/l recombinant human insulin (NovoRapid (insuline asparte); Novo Nordisk). OVCAR3 ovarian cancer cell line was obtained from ATCC (LGS Standards, Molsheim, France) and was grown in RPMI1640 medium supplemented with 2 mM Glutamax™, 10% fetal calf serum, 20 mM HEPES and 33 mM sodium bicarbonate . All cells lines were maintained at 37 °C in a 5% CO2 humidified atmosphere.

### ***Organoids***

#### ***Patient samples***

Fresh ascitic samples were collected from patients treated at Centre Francois Baclesse (Unicancer center, Normandy) for High-Grade Serous Ovarian Cancer between May 2018 and January 2019. Informed consent forms were signed by all patients (n = 3) and were obtained by Biological Resource Centre (CRB OvaResources NF S96-900), in accordance with ethical committee and European law.

#### ***Ascites processing and organoid culture***

Sterile ascites samples were centrifuged at 2000 rpm for 5 min. Pellets containing cells were resuspended in 20 mL of RPMI 1640 medium (Fisher Scientific) supplemented with 10 UI/mL penicillin, 10 µg/mL streptomycin (Fisher Scientific) and 1% BSA (Sigma). Suspension were strained successively in 300 µm and 50 µm filters (Endecotts). Remaining cells or spheroids were digested in 2 mL of TrypLE Express (Fisher Scientific) at 37°C for 30-60 min. Dissociated cells were collected in Advanced DMEM (Fisher Scientific) supplemented with 10 UI/mL penicillin, 10 µg/mL streptomycin, 1% GlutaMAX-1 (Fisher Scientific) and pelleted (2,000 rpm for 5 min). 10 000 cells were resuspended in 50/50 of growth factor reduced matrigel (Corning)/organoid media and seeded in a pre-warmed 24-well plate (Eppendorf). After polymerization (37°C, 5% CO2, 15 min), each drop was immersed with 500 µL of



organoid media, renewed every 3 days. Once harvested with advanced DMEM/penicillin-streptomycin supplemented with 1% BSA, organoids were dissociated using TrypLE Express (37°C for 30-60 min). Isolated cells were seeded or biobanked (Coolcell, -80°C) in 500 µL Recovery cell culture-freezing medium (Fisher Scientific) for future use.

### ***Organoid media***

Patient-derived organoids were cultured in Advanced DMEM (Fisher Scientific) with 10 UI/mL penicillin, 10 µg/mL streptomycin (Fisher Scientific), 1% GlutaMAX-1 (Fisher Scientific) and supplemented with B27 (Fischer Scientific, 200 µL/mL), N-Acetyl-L-cystein (Sigma, 1.25mM), EGF (Miltenyi, 50ng/mL), FGF-10 (Peprotech, 20ng/mL), FgF-basic (Miltenyi, 1ng/mL), A-83-01 (Peprotech, 500nM), Y27632 (Selleckchem, 10µM), SB202190 (Peprotech, 1µM), Nicotinamide (Sigma, 10mM), PGE2 (Sigma, 1µM), Primocin (InvivoGen, 100 µg/mL), cultrex HA-R-Spondin-1-Fc 293T (AMS Bio, 50% V/V) and cultrex L-WRN (AMS Bio, 10% V/V).

### ***UBE2Ni assays***

Cancer-derived organoids were harvested and resuspended in adapted organoid media (primocine, NAC and Y27632-free) with 2% matrigel. 200 organoids/well were seeded on pre-coated 96-well plates (45µL of coating volume/well: 50/50 of matrigel/organoid media). UBE2N inhibitor (SantaCruz, NSC697923) was added in triplicate wells 1h after plating organoids. 3 days post-seeding, media was replaced by a final volume of 200µL supplemented with UBE2Ni alone (or DMSO, Sigma), or with a combination of UBE2Ni and a range of carboplatin concentration (Accord) (or with DMSO, Sigma) diluted in adapted organoid media. 8 days later, ATP levels were quantified using the CellTiter-Glo (Promega, according to the manufacturer's protocol) and measured using Centro XS3 LB 960 (Berthold technologies) with Miko Win 2000 software. All viability results were normalized to DMSO. Real time monitoring of organoids (growth, size and morphology) was performed by the IncuCyte S3 (Sartorius).

### ***Transfection***

Exponentially growing cells were seeded at 150 000 cells (OAW42 and OAW42-R cells) or 350 000 cells (OVCAR3) per 25 cm<sup>2</sup> flask. 24h after seeding, siRNA or miRNA were diluted in OptiMEM<sup>®</sup> (Gibco) and transfection complexes were formed with INTERFERin<sup>™</sup> (Polyplus-Transfection, Strasbourg, France). We used a negative siRNA control (Lincode Non-targeting Pool; D-001320-10-05 Dharmacon) noted sictrl, siRNAs targeting UCA1 were labeled as follows: "siUCA1 or siUCA1-total" constituted of both siUCA1(2) and siUCA1(4) targeting both the short and long isoforms and siUCA1-long constituted of siUCA1(3) targeting specifically the long isoform. siRNA targeting UBE2N was noted siUBE2N. SiRNA

were purchased from Dharmacon (Horizon Discovery, Cambridge, UK). siRNA targeting BIM is noted siBIM was purchased from Eurogentec (Liège, Belgium). Human miRNA hsa-miR-27a-5p-Mimic (C-301028-01-0005) and mimic negative controls cel-miR-67 (CN-001000-01-XX) were purchased from Dharmacon.

**Table 1: siRNAs and miRNA sequences**

Genes	siRNA	Target sequence (5'-3')
Short/long isoform UCA1	siUCA1(2)	5'-caccuagcuggacgauca-3'
Short/long isoform UCA1	siUCA1(4)	5'-gauuaggccgagagccgau-3'
Long isoform of UCA1	siUCA(3)	5'-accuagacccgaaacuua-3'
UBE2N	siUBE2N	5'-gcacaguucugcuaucgau-3'
BIM	siBIM	5'- gguuaucuuacgacuguaa-3'
Cel-miR-67-mimic	Cel-miR-67	5'ucacaaccuccuagaaagaguaga-3''
hsa-miR-27a-5p-mimic	miR-27a-5p	5'-agggcuuagcugcuugugagca-3'

### **Drug treatments**

OAW42 and OAW42-R cells were reseeded at 250 000 cells per 25cm<sup>2</sup> flask 48h after transfection. Next day, 72h after transfection, they were treated with Cisplatin and the sensitization was monitored 72h later (6 days after transfection). OVCAR3 Cells were treated 24H after transfection and the sensitization was monitored seventy-two hours after transfection. Cisplatin was obtained from Mylan (Merck, France). For Cisplatin treatment conditions, cells were exposed to serum-free CISPLATIN supplemented medium for 2 hours (or serum-free medium for control conditions), and then were incubated back again in the complete growth medium during the indicated time. OAW42 was treated with 5µg/ml of Cisplatin, OAW42-R with 20µg/mL of Cisplatin and OVCAR3 with 2.5µg/ml of Cisplatin.

UBE2N inhibitor (noted UBE2Ni) was purchased from Santa cruz (NSC697923; ref: SC-391107), stock solution was prepared in sterile dimethyl sulfoxide (DMSO; Sigma-Aldrich) according to the manufacturer's instructions, with a final concentration of 10.10<sup>3</sup>µM and stored at -20°C. OAW42-R were treated with continuous exposure of UBE2Ni-supplemented growth medium (DMSO supplemented for control conditions), starting from the time of transfection onwards.

### **Western blotting**

Proteins were extracted as follows: cells were washed with ice-cold PBS 1X, lysed in Lysis buffer (15 mM HEPES, 50 mM KCl, 10 mM NaCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.25% glycerol, 0.5% n-Dodecyl-β-D-maltopyranoside (DDM) (Affymetrix), 5µM GDP (Sigma-Aldrich), 1µM

microcystin (EnzoLifeSciences), 1mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub> (Sigma-Aldrich) and Complete Protease Inhibitor Cocktail (Roche)) and incubated on ice for 30min. After centrifugation (10 000 rpm; 10 min) to remove cell debris, proteins were quantified using the Bradford assay (Bio-Rad, Hercules, USA). Fifteen micrograms of proteins were separated by SDS– PAGE (Biorad) on a 4-15% gradient polyacrylamide Mini-PROTEAN<sup>®</sup> TGX™ precast gel (Bio-Rad) and transferred to PVDF-membranes (Bio-Rad). After blocking during 1h at RT with 5% (v/v) non-fat dry milk in TBS with 0.05% (v/v) Tween20 (T-TBS), membranes were incubated overnight at 4°C with the following primary antibodies: anti-actin (MAB1501, Merk Millipore), anti-BIM (2819, Cell Signaling Technology), anti-UBC13 (UBE2N) (37-1100; thermoFisher). Membranes were then incubated with the appropriate horseradish peroxidase-conjugated anti-rabbit (70745; Cell Signaling Technology) or anti-mouse (NA931V; Amersham) secondary antibodies. Signals were revealed using EleCtroLuminescence (ECL) Prime Western Blot detection reagent (GE Healthcare Life Sciences, France) under ImageQuant<sup>®</sup> Las4000Series imager (GE Healthcare Life Sciences), and then quantified by pixel densitometry using the ImageJ<sup>®</sup> software. Western-blot shown are from one experiment representative of at least three independent experiments.

### ***Cell cycle and apoptosis analysis by flow cytometry***

Cells were detached with trypsin, harvested and washed with 1X PBS (phosphate-buffered saline), fixed in 70% ethanol and stored at -20°C. Before the analysis, fixed cells were centrifuged (4000 rpm, 5 min) and incubated for 30 min at 37°C in PBS. After centrifugation, cell pellets were dissociated and incubated with RNase and propidium iodide using the DNA-Prep Coulter Reagent kit (Beckman Coulter, Villepinte, France) and were analyzed with a Gallios flow cytometer (Beckman Coulter). A computerized gating was applied on the side and front diffusion to exclude small debris and on a pulse width and an integral red fluorescence peak to remove aggregates. The data were analyzed by the Kaluza<sup>®</sup> acquisition software (Beckman Coulter).

### ***Wound-healing assay (IncuCyte technology)***

IncuCyte<sup>®</sup> S3 system (Sartorius, Goettingen, Germany) is an automated imaging platform providing real-time images and quantitative data generated throughout the wound-closing process. 24 hours after transfection, a total of 25.10<sup>3</sup> OAW42-R cells per well were seeded in 96-wells IncuCyte<sup>®</sup> ImageLock Plates (Sartorius) at a confluency of 70 to 80%. A single scratch wound was then created in each well using the IncuCyte<sup>®</sup> Woundmaker™ (Sartorius) to create homogeneous scratch wounds in each well. Dead cells and other debris produced by the scratch were immediately washed with growth media. Cells were then placed into the IncuCyte<sup>®</sup> S3 located inside a CO2 incubator for 24 hours. Images were

analysed to quantify wound healing by the IncuCyte scratch wound assay software according to the manufacturers' instructions. Data were expressed as wound confluence percentage and the migrating distance was measured for 20h.

### ***RNA extraction and real-time quantitative reverse transcription PCR (RT-qPCR)***

Total RNA was isolated from cells using a NucleoSpin RNA+ kit (Macherey-Nagel; 74098450) according to the manufacturer's instructions. RNA was eluted from columns in nuclease-free water, dosed and quality-controlled on a NanoDrop™ 2000 spectrophotometer (ThermoScientific). Gene expressions were determined by RT-qPCR, at first 1µg of total RNA extracted was reverse-transcribed with Omniscript® reverse transcriptase kit (Qiagen, France), Buffer 10X, dNTPs, RTase (enzyme Omniscript Reverse Transcriptase 4unités/20µl), random hexamers primers (Invitrogen; 48190.011) and RNase inhibitor (RNasOUT; 100000840; Invitrogen). RNA in solution were incubated at 65 °C for 5 minutes, cooled rapidly and incubated at 4 ° C for 5 minutes. The reaction mix was then added and RT reaction took place at 37 ° C for 60 minutes and was stopped at 93 ° C for 5 minutes. PCR amplification was performed in triplicate, 5µl of MIX 2X (Light Cycler®480 SYBR® Green I Master, Roche, 04707516001), 1.9µl of water, 0.3µl of each forward and reverse primers (Eurogentec) and 2.5µl of cDNA for a 10µl final reaction volume. PCR program was as follow: 95°C 5 minutes, 40X (95°C 15s, 60°C 30s, 72°C 30s). Melting curves were established in the end. All PCR amplification reactions were carried on a Light Cycler®480 Real-Time PCR instrument and analysis was done with the **Light Cycler®480** software release 1.5.1.62.. Data are representative of three independent experiments performed in triplicate and relative changes expressions were calculated by the  $2^{-\Delta\Delta Cq}$  with SDHA as a control gene.

**Table 2: primer sequences**

Genes	Primers	Sequence (5'-3')
UCA1c short/long isoform	Forward	5'cagatccttgcccattggtgt3'
	Reverse	5'ctgaggctggcaaagagtga3'
UCA1lg long isoform	Forward	5'gacaggaacctcaacccaaa3'
	Reverse	5'aaaccacatgaaacgcctct3'
SDHA	Forward	5'tggaacaagagggcatctg3'
	Reverse	5'ccaccactgcatcaaattcatg3'
BIM	Forward	5'gcttgccgcccttatgatg3'
	Reverse	5'gcctgccagactgagtttct3'
UBE2N	Forward	5'aacgagtgccagtgtgtga3'
	Reverse	5'tttcaactgctgccttggc3'

**Pull Down Assay**

Three 25cm<sup>2</sup> flasks of OAW42-R cells (200,000 count) were transfected with 3'-Biotin-labelled miRNAs (Biotin-Cel-miR-67-3p (Control) or Biotin-miR-27a-5p) at a final concentration of 60 nM. T1 streptavidin beads (Invitrogen) were washed with 1X washing buffer (20mM Tris-HCl, pH=7.5, 5mM MgCl<sub>2</sub>, 100mM KCl, 0.3% Igepal CA-630) and incubated with rotation for 2h at 4°C using 1x blocking buffer (1X washing buffer, 50mg/ml BSA, 10mg/ml yeast t-RNA) before pull-down. Twenty-four hours after transfection, cells were harvested and lysed (lysis buffer: 1X washing buffer, 50X protease inhibitor, 100U RNase inhibitor). Cell lysate was rotated with blocked beads for 4h at 4°C then beads were washed twice in washing buffer and captured RNA was extracted using Trizol reagent. RT-qPCR was performed for RNA samples and pull down fold enrichment was calculated with respect to SDHA as a control gene. Fold enrichment calculation was as follow: (Biotin-miR-27a-5p pulldown/ Biotin-miR-27a-5p input) / (Biotin Cel-miR-67 pulldown/Biotin Cel-miR-67 input). This pull-down protocol for biotinylated miRNA bound RNAs was first published by Lal et al<sup>31</sup>.

**Microarray**

Total RNA from sictrl or siUCA1 transfected cells (72 hours after transfection) from 4 independent experiments was isolated from ovarian cancer cell lines using a NucleoSpin RNA+ kit (Macherey-Nagel; 74098450). RNA was resuspended in nuclease-free water, dosed and quality-controlled on a NanoDrop™ 2000 spectrophotometer (ThermoScientific), RIN value was determined on a bioanalyzer 2000 with the RNA Pico kit. . Samples were

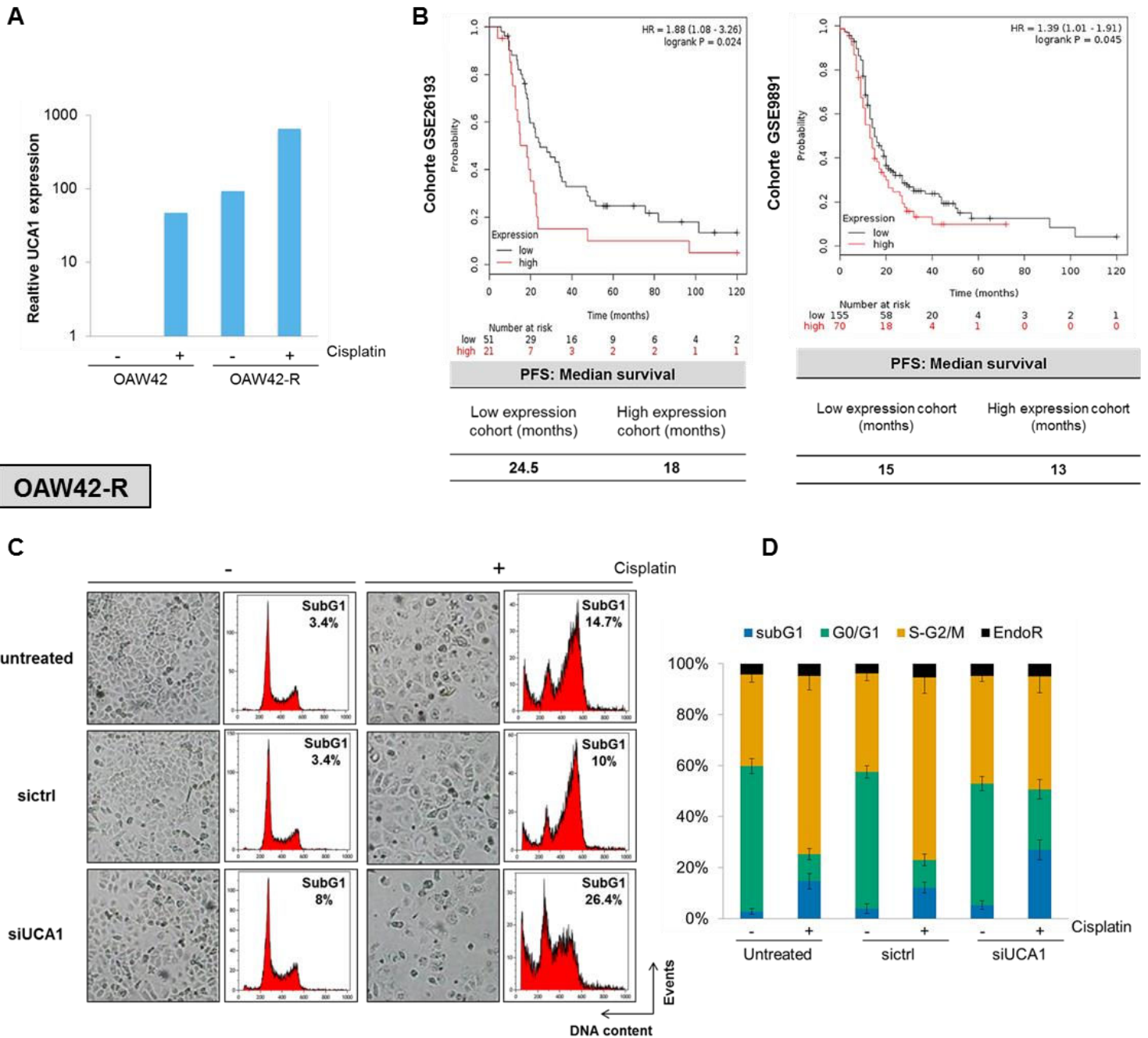
retro-transcribed and hybridized in quadruplicate on an Agilent 8x60k chip. P-values for differential expression were corrected with Benjamini-Hochberg.

### ***Bioinformatics***

Pathway analysis for DEGs after UCA1 downregulation was performed at DAVID<sup>32,33</sup> website (V6.7) and interrogated Gene Ontology Biological Database.

Enrichment of miRNAs seed regions in the 3'UTR of DEGs was performed on GSEA<sup>34,35</sup> website (C3 section: motif gene sets, MIR: microRNA targets).

Predicted miRNAs binding sites in UCA1 sequences was performed with the union of results from RegRNA 2.0, MiRTarBase (microRNA-target interactions database), starbase and RNA22 v2 websites and of manual literature search on Pubmed for reported direct interaction between UCA1 and miRNAs.



**Figure 1: UCA1 high expression is a poor prognosis factor and its inhibition sensitizes OAW42-R cell line to cisplatin.**

(A) UCA1 expression levels (RT-qPCR) for OAW42 and OAW42-R cells 72 hours after plating, with or without cisplatin treatment (5  $\mu\text{g}/\text{ml}$  and 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  for OAW42 and OAW42-R respectively), relative to untreated OAW42, normalized with SDHA. (B) Kaplan Meier curves generated with KM-plot<sup>41</sup> (Kaplan Meier-plotter) software, showing the Progression Free Survival (PFS), for two cohorts of patients with serous ovarian cancer, treatment contains platinum. Source data deposited in GEO platform (accession No. GSE26193 and No. GSE9891). (C) Picture from cell layer and DNA content. Representative pictures and plots from 3 experiments are shown. (D) DNA content histograms expressed as mean  $\pm$  SEM of 3 experiments.

## Results

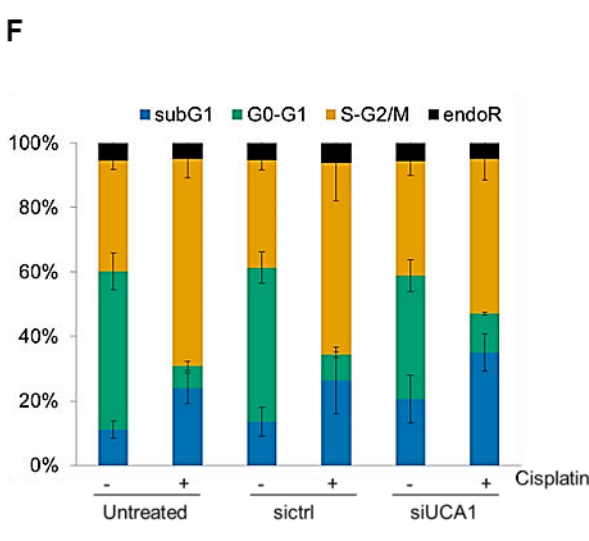
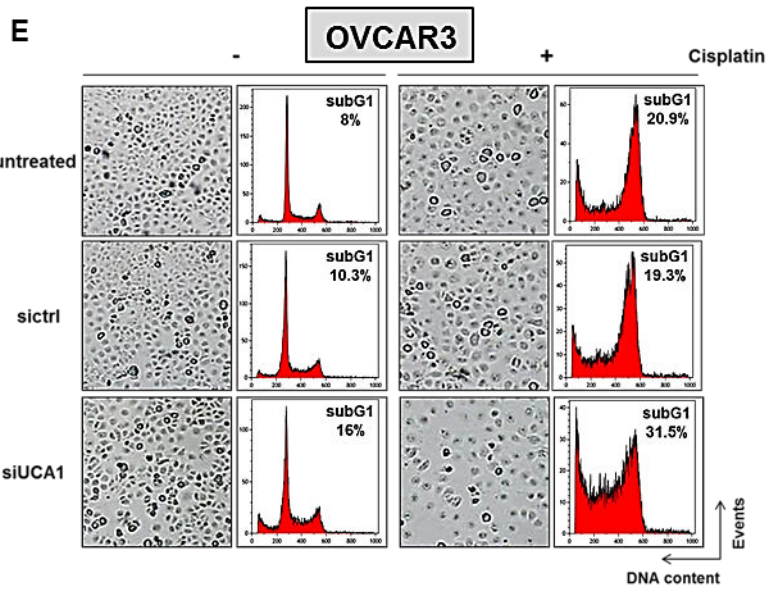
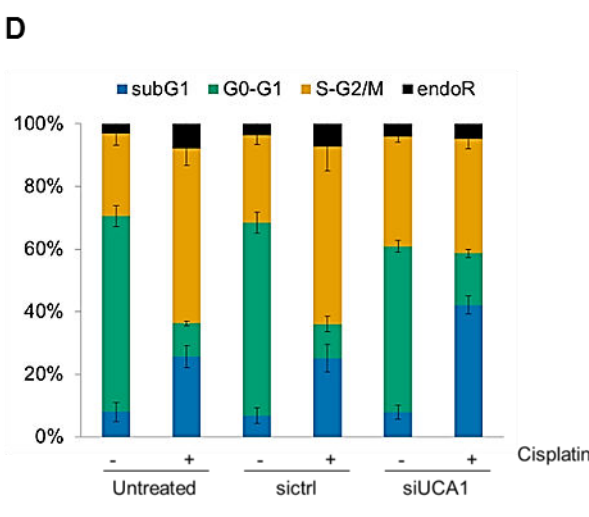
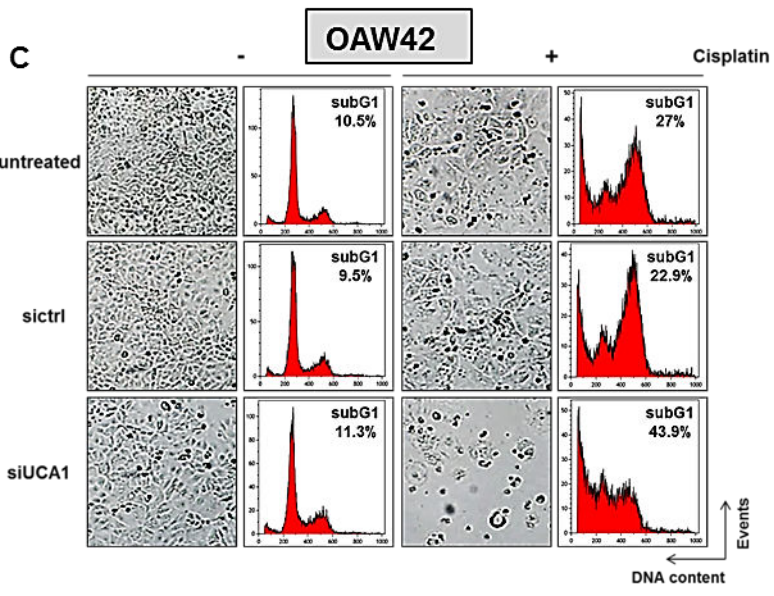
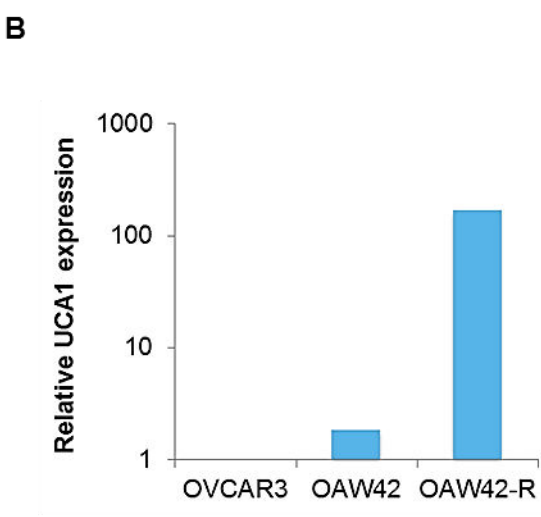
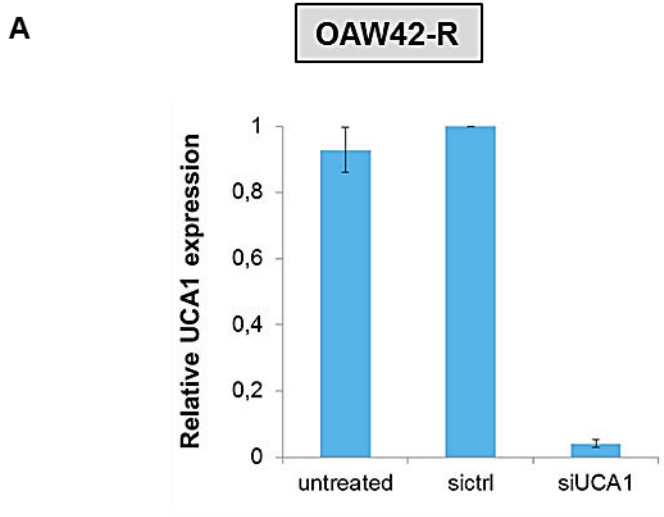
*LncRNA UCA1 high expression is a factor of bad prognosis and its downregulation sensitizes chemoresistant ovarian cancer cells to cisplatin.*

We compared the transcriptomic profiles between an ovarian cancer cell line sensitive to cisplatin treatment (OAW42) and its resistant counterpart (OAW42-R). Out of the 1717 differentially expressed genes (DEGs), 1207 were upregulated and 509 downregulated in the OAW42-R compared to OAW42 cell line, including 11 and 5 lncRNAs respectively upregulated and downregulated. UCA1 was the most upregulated lncRNA in the resistant cell line, with a fold change of 40, compared to sensitive cell line. This was validated by RT-qPCR, with a relative UCA1 expression around 100 fold higher in OAW42-R cells compared to OAW42 cells (**Figure 1A**). In addition, UCA1 expression is increased following cisplatin treatment in both these cell lines (**Figure 1A**).

We explored UCA1 expression levels in ovarian cancer tissues in previously published data sets from two cohorts. For GSE26193 cohort, low expression group for UCA1 presents a median Platinum Free Survival (PFS) of 24.5 months versus 18 months for high expression group of UCA1 ( $p=0.024$ ). For GSE9891 cohort a similar observation was made with PFS of 15 months versus 13 months ( $p=0.045$ ) for low and high UCA1 expression groups respectively (**Figure 1B**).

We next studied the effect of the UCA1 inhibition on the response to cisplatin of OAW42-R cell line. A cocktail of two siRNAs targeting specifically UCA1, termed “siUCA1” was able to decrease UCA1 levels by 96% (**Supplementary Figure 1A**). UCA1 inhibition only triggered a slight decrease of the number of cells, as seen by a less confluent cell layer, compared to untreated and control siRNA (sictrl) conditions (**Figure 1C**). After cisplatin treatment, OAW42-R cells, in controls conditions, have undergone a phenotypic change characterized by cell swelling and are mostly blocked at the S/G2-M phase of the cell cycle. A moderate increase in the percentage of subG1 events in flow cytometry was also evidenced with 15% and 10 % for untreated and sictrl conditions when treated with cisplatin versus 3% when untreated. In contrast, upon UCA1 inhibition, cisplatin treatment triggered an important decrease of cell layer, and an increase of cell death as shown by an increase in the percentage of subG1 events with 27% compared to 15% or 10% in untreated and sictrl conditions respectively. UCA1 inhibition also led to a decrease of the proportion of cells blocked in S/G2-M phase (**Figure 1C and 1D**).





***Supplementary Figure 1: UCA1 inhibition sensitizes to cisplatin OAW42 and OVCAR3 cell lines***

(A) UCA1 transcript inhibition (RT-qPCR) after transfection with siUCA1. (B) UCA1 expression levels (RT-qPCR) in OVCAR3, OAW42 and OAW42-R cell lines, relative to OVCAR3, normalized with SDHA. (C) OAW42 cells: picture from cell layer and DNA content. Representative pictures and plots from 3 experiments are shown. (D) OAW42 cells: DNA content histograms expressed as mean  $\pm$  SEM of at least three independent experiments. (E) OVCAR3 cells: picture from cell layer and DNA content. Representative pictures and plots from 3 experiments are shown. (F) OVCAR3 cells: DNA content histograms expressed as mean  $\pm$  SEM of at least three independent experiments.

We analyzed the effects of UCA1 inhibition in two other ovarian cancer cell lines, OAW42 and OVCAR3, both sensitive to cisplatin treatment. Steady-state UCA1 expression levels in OAW42-R are around 100 and 200 fold higher than in OAW42 and OVCAR3 (**Supplementary Figure 1B**).

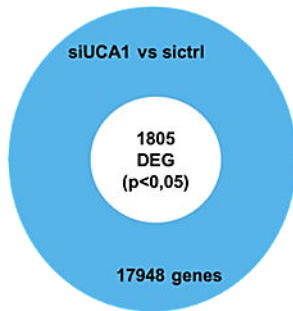
In both these cell lines UCA1 inhibition also sensitizes to the effects of cisplatin. After cisplatin treatment, UCA1 inhibition decreased the confluency of cell layer, and increased cell death with a higher percentage of subG1 events compared to untreated and sitrl conditions. For OAW42 cells, siUCA1 leads to 43.9% sub-G1 events versus 27% and 22.9% for untreated and sitrl conditions upon cisplatin treatment (**Supplementary Figure 1C and 1D**). For OVCAR3 cells siUCA1 leads to 31.5% sub-G1 events versus 20.9% and 19.3% in untreated and sitrl conditions (**Supplementary Figure 1E and 1F**). The effects on cell morphology and on the reduction of cells in the S/G2-M phase are also similar for OAW42 and OVCAR3 cells to those observed in OAW42-R cells upon UCA1 inhibition and cisplatin treatment.

*UCA1 inhibition affects cell death and cell migration related pathways.*

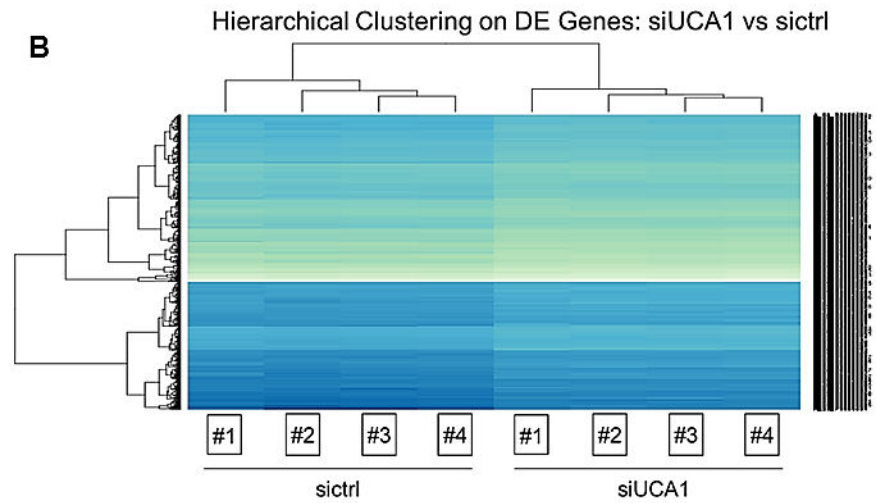
We next aimed to determine how UCA1 acts on the chemoresistance of ovarian cancer cells. We compared the transcriptomic profiles of OAW42-R cells 3 days after transfection with sitrl or siUCA1 using microarray technology. We could analyze the expression of 19753 genes, of which 1805 were differentially expressed genes (DEGs) significantly ( $q < 0.05$ ) (**Figure 2A and B, Supplementary file 1** for the full list of genes). We ran an analysis of the most enriched Biological Processes in our DEGs with the Gene Ontology-Biological Processes (GO-BP) tool from the DAVID<sup>32,33</sup> website.

OAW42-R

A



B



C

Terms	P-Value
GO:0006796~phosphate metabolic process	7.35E-5
GO:0006793~phosphorus metabolic process	7.35E-5
<b>GO:0016044~membrane organization</b>	<b>1.83E-4</b>
<b>GO:0008219~cell death</b>	<b>2.64E-4</b>
<b>GO:0016265~death</b>	<b>3.22E-4</b>
GO:0031327~negative regulation of cellular biosynthetic process	3.385E-4
GO:0016192~vesicle-mediated transport	3.91E-4
<b>GO:0051270~regulation of cell motion</b>	<b>4.08E-4</b>
GO:0000165~MAPKKK cascade	4.43E-4
GO:0010558~negative regulation of macromolecule biosynthetic process	5.19E-4
GO:0009890~negative regulation of biosynthetic process	5.78E-4
GO:0010629~negative regulation of gene expression	6.07E-4
GO:0044093~positive regulation of molecular function	6.21E-4
<b>GO:0030334~regulation of cell migration</b>	<b>6.73E-4</b>

**Figure 2: UCA1 inhibition influences cell death and migration related pathways.**

(A) Out of 19753 genes whose expression was quantified on microarrays, 1805 were differentially expressed (Benjamini-Hochberg corrected  $p$ -value  $< 0.05$ ) after siUCA1 transfection in OAW42-R cells. (B) Hierarchical clustering of quadruplicate runs on microarray. (C) Top-16 enriched GO-BP terms in the 1805 DEGs.

Among the most significantly enriched GO terms were some related to cell death (GO terms 'cell death' and 'death') and to cell migration (GO terms 'membrane organization', 'regulation of cell motion', and 'regulation of cell migration') (**Figure 2C**).

While alterations in cell death upon UCA1 downregulation are already validated by our previous experiments, we sought to investigate a possible role on cell migration. A wound-healing assay revealed that siUCA1, decreased the ability of these cells to reinvest the wound area with a wound-healing recovery of 17% after 20h of migration, compared to 38% and 35% respectively in untreated and sictrl conditions (**Supplementary Figure 2A and 2B**).

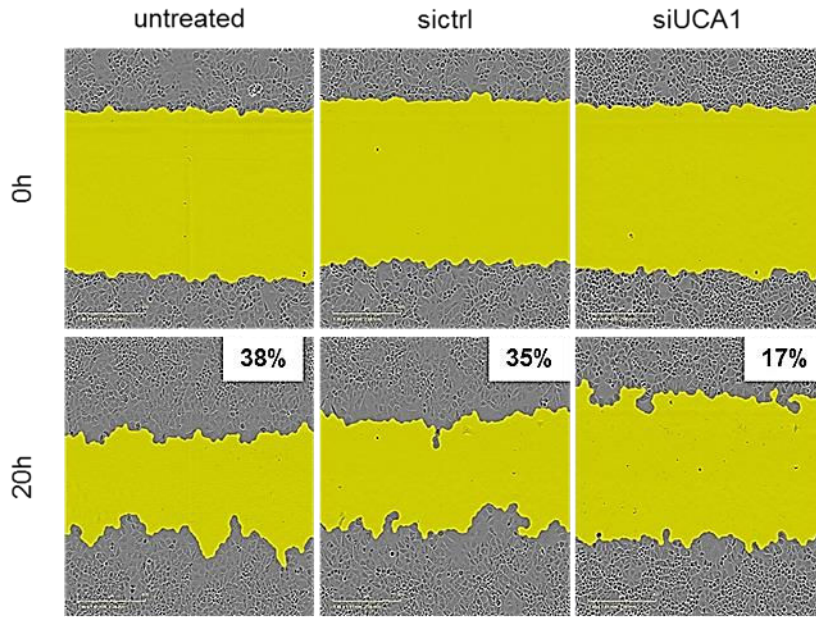
*Cisplatin sensitization through UCA1 downregulation relies on BIM up-regulation.*

Among the cell death related DEGs, '*BIM*', a pro-apoptotic gene belonging to the Bcl-2 family, is significantly upregulated with a fold change (FC) of 1.9 ( $p=0,003$ ) (**Supplementary file 1**). We validated that BIM transcript (1.9 fold) and protein (1.6 fold) expression levels are increased 3 days after inhibition of UCA1 compared with control conditions (**Figure 3A and 3B**). We then looked for the possible involvement of BIM overexpression in the sensitization of OAW42-R cells to cisplatin caused by UCA1 inhibition. The transfection of a specific siRNA targeting BIM, annotated siBIM successfully downregulated its target (**Figure 3A and 3B**), and did not induce any phenotype when used alone, and had no influence on OAW42-R cells response to cisplatin (**Figure 3C and 3D**). However, when siBIM was used in combination with siUCA1, it abrogated the sensitization to cisplatin otherwise observed upon UCA1 downregulation alone. Indeed cell layer confluency and proportion of Sub-G1 events show similar levels between control conditions and siUCA1 associated with siBIM (**Figure 3A; Figure 3B** presents a truncated western blot membrane for clarity, the full membrane is shown in **Supplementary Figure 3**).

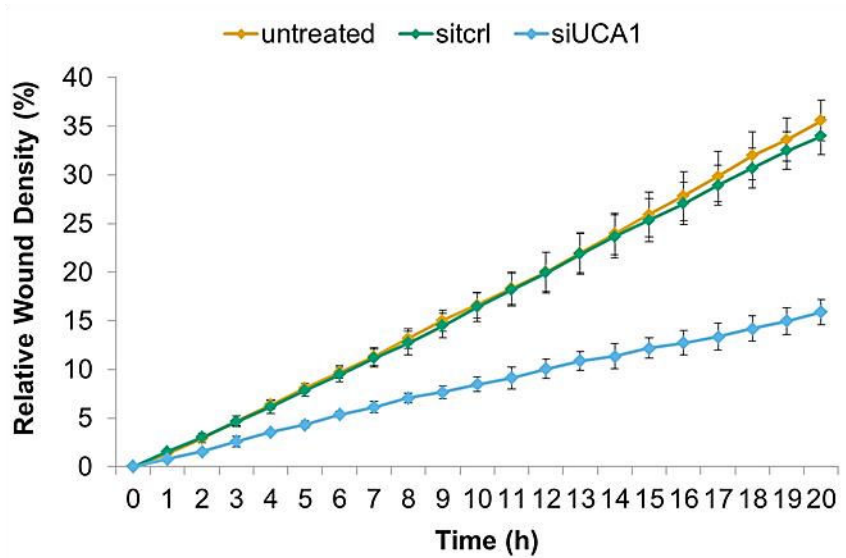
***Figure 3: Cisplatin sensitization through UCA1 downregulation relies on BIM up-regulation***

(A) UCA1 and BIM transcripts expression (RT-qPCR) after indicated siRNAs transfection in OAW42-R cells, relative to sictrl, normalized with SDHA. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM of three independent experiments. (B) BIM protein levels (western blot), quantified (lower lines) with actin, representative of the mean about 3 experiments, after indicated siRNAs transfection in OAW42-R cells. Actin was used as a loading control. Western blot membrane has been cut for clarity. Full membrane is presented in Supplementary Figure 3. A representative western blot is shown of 3 experiments. (C) Picture from cell layer and DNA content. Representative pictures and plots are shown. (D) DNA content histograms expressed as mean  $\pm$  SEM of 3 experiments.

**A**

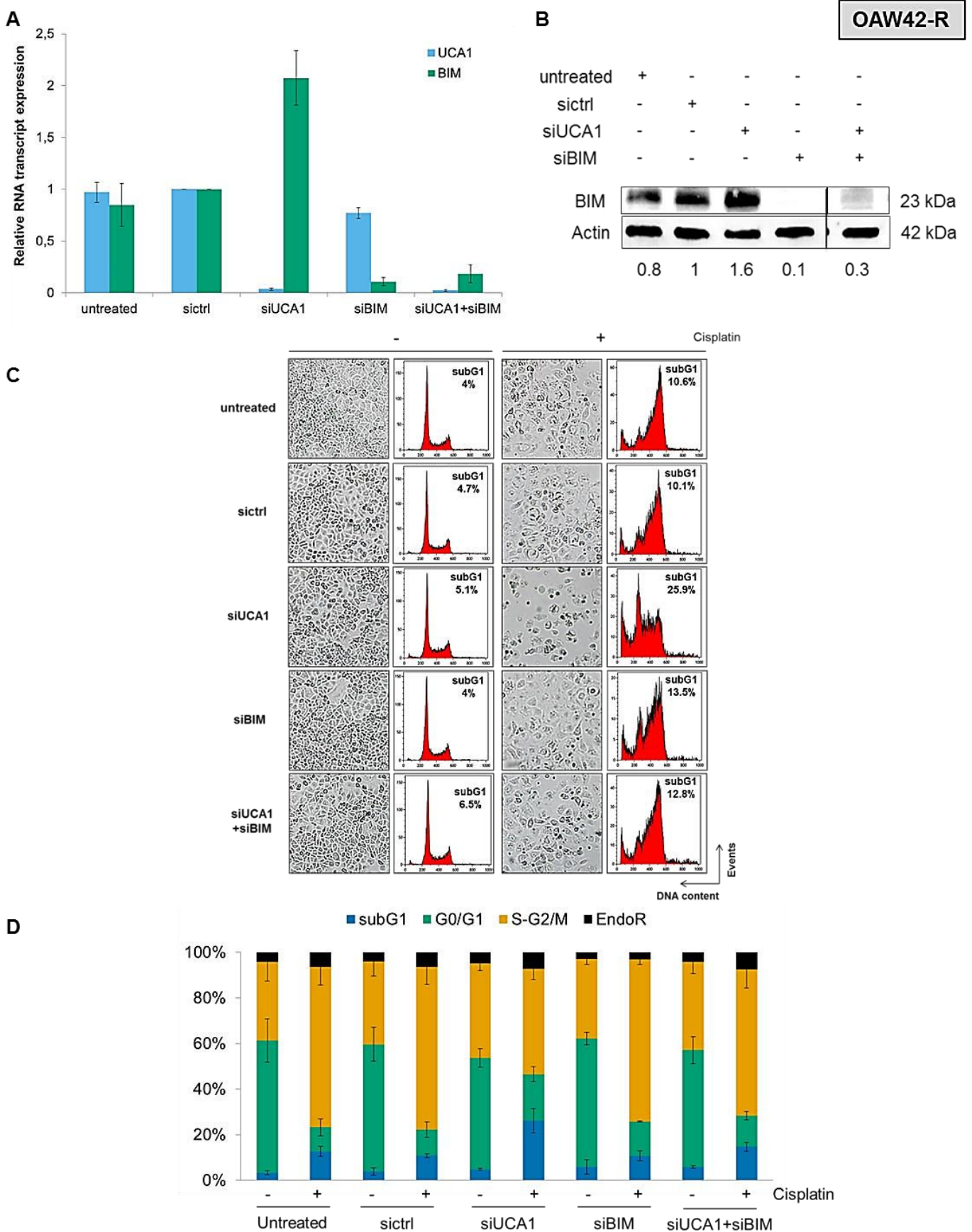


**B**

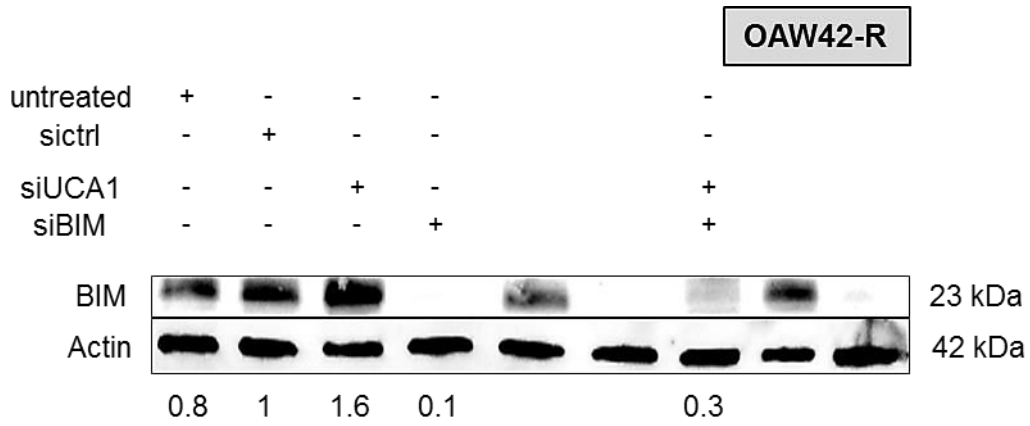


***Supplementary Figure 2: UCA1 inhibition impairs wound healing.***

(A) 20 hours post-wound endpoint pictures of wound-healing assay after siUCA1 transfection in OAW42-R cells. Wound area colored for clarity. Representative pictures from 3 experiments are presented. (B) Real-time wound healing, percentage of wound healed. For each point, mean value  $\pm$  SEM of each triplicate, three experiments have been run.



**Figure 3: Cisplatin sensitization through UCA1 downregulation relies on BIM up-regulation.**



***Supplementary Figure 3: Cisplatin sensitization through UCA1 downregulation relies on BIM up-regulation.***

Full uncut western blot membrane shown in Figure 3B, with wells 5 and 6 corresponding to conditions not presented here.

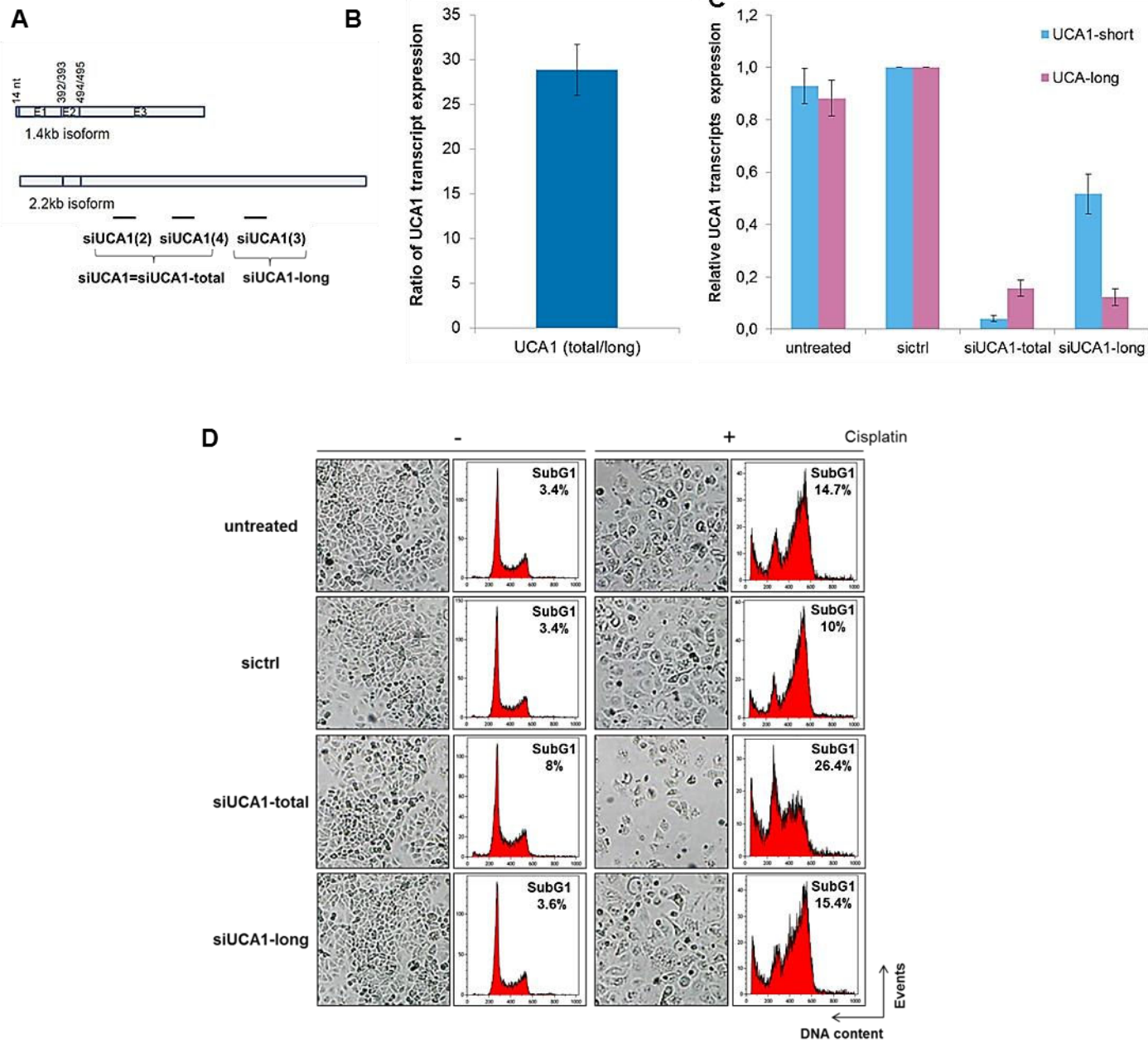




*UCA1 short isoform inhibition, and not that of UCA1 long isoform, is responsible for sensitization to cisplatin.*

At least 2 isoforms of UCA1 have been described in the literature, both with 3 exons<sup>20</sup>: the shorter one measures 1.4kb and we termed it “short isoform”, the longer one measures 2.2kb and is sometimes called CUDR (Cancer Upregulated Drug Resistant transcript), we termed it “long isoform” in this study. The difference in length between these two isoforms is due to a different 3' size of the 3<sup>rd</sup> exon. The short isoform also presents a 5' extension of 14 nucleotides compared to the long isoform<sup>36</sup> (**Figure 4A**). In order to discriminate their expression levels and the consequences of their respective inhibitions, we wanted to use siRNAs and primers able to target either each isoforms independently (**Figure 4A**). We attempted to target the short isoform only by designing siRNAs and primers encompassing the unique 5' extension of 14nt, but it did not work (**data not shown**). By comparing the “total” versus “long only” expression levels, we could demonstrate in OAW42-R cells that the short isoform of UCA1 is predominantly expressed compared to the long isoform, by approximately 29 fold (**Figure 4B**) with raw Cq for UCA1-total and UCA1-long of 22 and 27 respectively. As a consequence, we can estimate that the majority of the signal amplified by “UCA1 total” primers represent the short isoform, and provide a suitable proxy short isoform-only studies, while primers for “UCA1” are specific for the long isoform.

Since our commonly used siRNA cocktail targets and downregulates both UCA1 isoforms with 96% and 84% inhibition for short and long isoform respectively (**Figure 4C**), we designed a siRNA able to target the long isoform only, with 88% downregulation efficiency, which only moderately downregulated the short isoform by 48% (**Figure 4C**). We thus determined which isoform of UCA1 was involved in cisplatin sensitization in OAW42-R cells. UCA1 long isoform inhibition before cisplatin treatment did not induce any change in the cell layer or proportion of Sub-G1 events (15%) compared to control conditions (15% and 10% for untreated and sictrl respectively), while the inhibition of both isoforms did induce sensitization, as usually seen, with a reduced cell layer confluency and increased Sub-G1 fraction (26%) (**Figure 4D**). Since the downregulation of only the long isoform did not induce a response to cisplatin different from those of the control conditions, while inhibition of both short and long isoforms efficiently sensitized OAW42 cells to cisplatin, we can conclude that the inhibition of the short isoform of UCA1 is responsible for the sensitization of OAW42-R cells to cisplatin.



**Figure 4: UCA1-short isoform inhibition is responsible for cisplatin sensitization.**

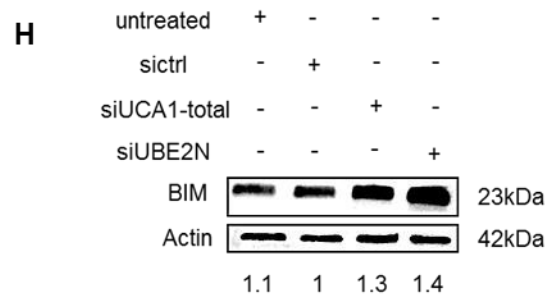
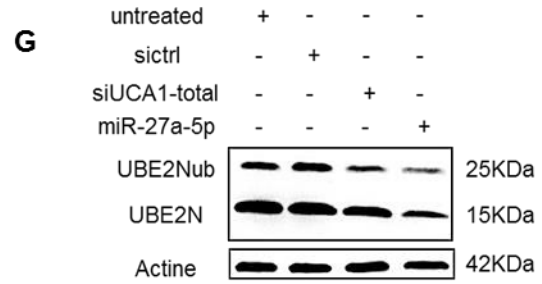
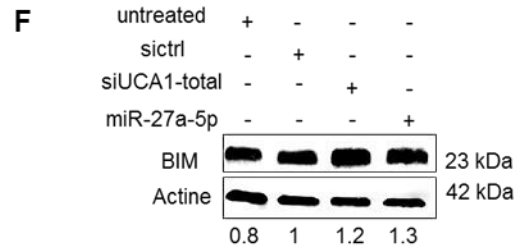
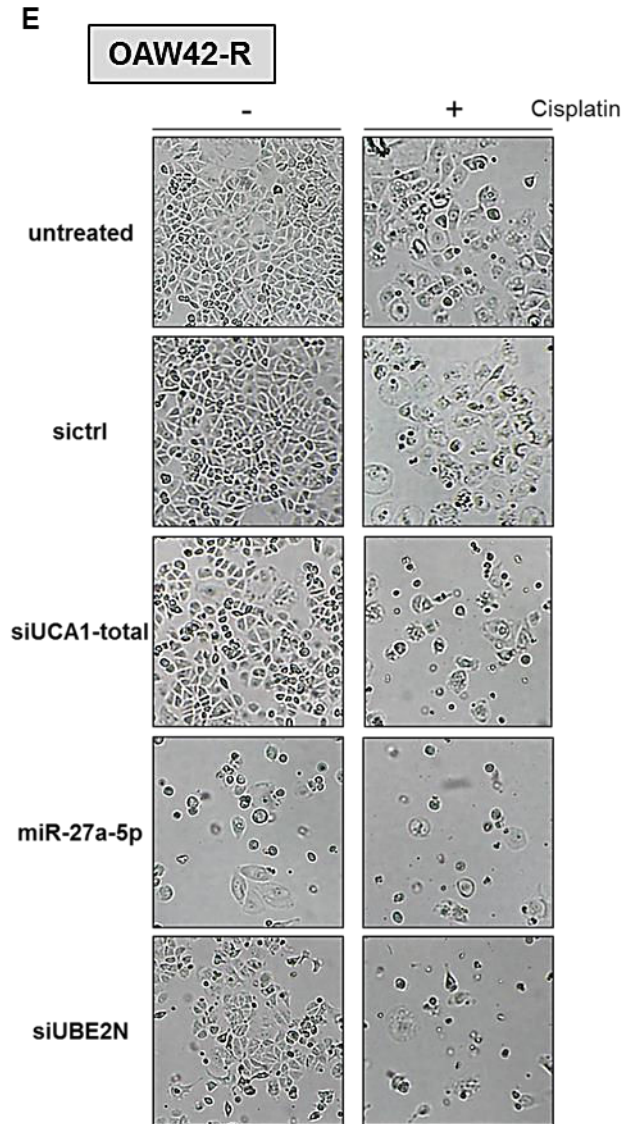
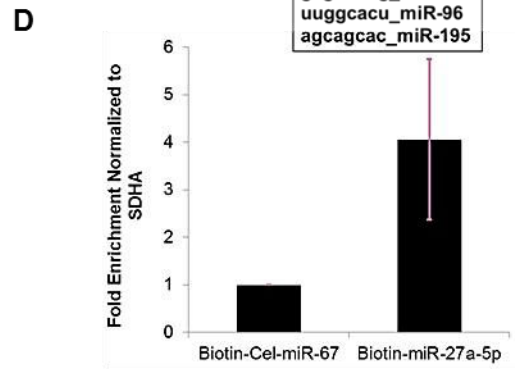
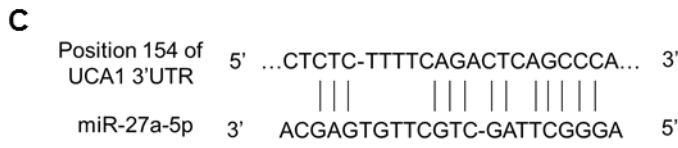
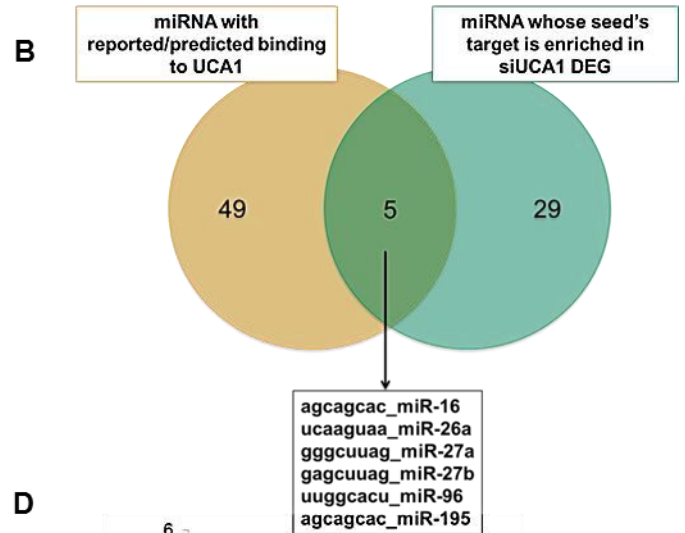
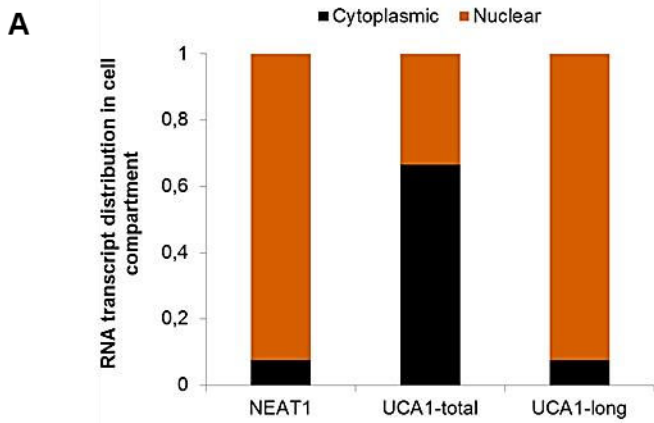
(A) A schematic representation of the short and long isoforms of UCA1, respectively 1.4kb and 2.2kb, with the location of siRNAs used in this study. We used a siRNA pool composed of 2 siRNAs annotated ‘siUCA1(2)’ and ‘siUCA1(4)’, both targeting UCA1 short and long isoforms and named ‘siUCA1’, or ‘siUCA1-total’ for clarity from this point. We used also a siRNA targeting only the long isoform, annotated ‘siUCA1(3)’ and named ‘siUCA1-long’. (B) Ratio of UCA1-total and UCA1-long transcripts expression (RT-qPCR) normalized to SDHA in OAW42-R cells. Data are expressed as mean ± SEM of at least three independent experiments. Data is mean +/- SEM from 3 experiments. (C) Relative UCA1-total and UCA1-long transcripts expressions (RT-qPCR), normalized to SDHA, relative to sictrl in OAW42-R cells, 72 hours after transfection with indicated siRNAs. Data are expressed as mean ± SEM of 3 experiments. (D) Pictures from cell layer and DNA content. Representative pictures and plots are shown. Data is representative of 3 experiments.

*UCA1 is a ceRNA to miR-27a-5p, which downregulates UBE2N protein levels to increase BIM expression and sensitize OAW42-R cells to cisplatin.*

As a first step to understand UCA1 mode of action, we checked its subcellular localization by nuclear/cytoplasmic cell fractionation followed by RT-qPCR, using nuclear localized NEAT1 as a control for nuclear/cytoplasmic fractionation. While UCA1 long isoform was mainly nuclear, UCA1 short isoform appeared to be cytoplasmic, enabling it to potentially act as a competing endogenous RNA (ceRNA) (**Figure 5A**). We then compared (i) all reported miRNAs reported in the literature or predicted by various softwares (see methods section) as being potentially able to bind UCA1, with (ii) miRNAs whose seed regions are enriched in the 3'UTR regions of differentially expressed genes after UCA1 inhibition, as identified by GSEA (Supplementary File 2 for full list of enriched miRNAs seeds). The overlap of those 2 lists of miRNAs identified the 6 following miRNAs: miR-16, miR-26a, miR-27b, miR-96, miR-195 and miR-27a (**Figure 5B and Supplementary Figure 4A**). Among those, miR-27a-5p has sequence complementarity with UCA1 on 13 bases, including a 5 bases stretch from base 2 to base 6 in miR-27a-5p seed region, followed by bases 8 and 9 (**Figure 5C**). We next investigated whether a direct interaction exists between miR-27a-5p and lncRNA UCA1. We transfected a 3' biotinylated miR-27a-5p in OAW42-R cells, and pulled-down directly interacting RNAs on streptavidin beads. RT-qPCR on pulled-down RNAs revealed a 4-fold enrichment of UCA1 short isoform, demonstrating direct interaction with miR-27a-5p (**Figure 5D**).

***Figure 5: UCA1 inhibition releases miR-27a-5p which downregulates UBE2N and induces BIM***

(A) Relative transcript distribution of UCA1 short and long isoforms (RT-qPCR) in nuclear and cytoplasmic compartments in OAW42-R cells. NEAT1 was used a nuclear transcript positive control. Normalized to total cellular transcript levels. (B) Venn diagram and overlapping miRNAs between miRNAs reported/predicted to bind UCA1 (left) and miRNAs whose seed is enriched in DEGs after UCA1 downregulation in OAW42-R cells. (C) Schematic representation of short isoform of UCA1 and miR-27a-5p sequence complementarity as predicted by RNA22 v2 software. (D) Fold enrichment of UCA1 after Biotin miR-27a-5p pull-down relative to Biotin Cel-miR-67 pull-down. Data is mean +/- SEM from 3 experiments. (E) Pictures from cell layer. Data is representative of 3 experiments. (F, G and H) BIM or UBE2N (unmodified and ubiquitinated) protein levels (western blot), quantified (lower lines) with actin, representative of the mean about 3 experiments, after indicated siRNAs or miRNA transfection in OAW42-R cells. Actin was used as a loading control. Representative western blot are shown of 3 experiments.



We next transfected miR-27a-5p in OAW42-R cells, which already decreased cell layer confluency after 2 days (**Supplementary Figure 4B**). Six days after transfection, the cell layer in miR-27a-5p treated cells is greatly reduced compared to control and siUCA1 conditions. Upon cisplatin treatment, siUCA1 transfected cells show the usual sensitization compared to controls. For miR-27a-5p transfected cells, sensitization also occurs with almost no remaining viable cells attached to the surface of the culture plate. (**Figure 5E**), Moreover, interestingly, miR-27a-5p transfection allowed an increase of BIM protein expression as shown by western-blot, similarly to the inhibition of UCA1 (**Figure 5F**). This confirms a common implication in sensitizing ovarian cancer cells OAW42-R to the action of cisplatin, by increasing pro-apoptotic BIM.

In the set of genes differentially expressed after UCA1 inhibition and holding 3'UTR sequences complementary to miR-27a-5p seed region are UBE2N and UBE2NL (a UBE2N pseudogene) (**Supplementary Figure 4C**) downregulated by 6 fold ( $p < 0.007$ ) and 1.5 fold ( $p < 0.012$ ) (**Supplementary File 1**). Interestingly, it has already been demonstrated that UBE2N is a direct target of miR-27a-5p<sup>37</sup>. We then showed that upon miR-27a-5p transfection or UCA1 inhibition total UBE2N protein levels are indeed downregulated (**Figure 5G**). We next aimed to determine if the strong UBE2N inhibition triggered by a specific siRNA termed siUBE2N (**Supplementary Figure 4D**), could sensitize OAW42-R cells to cisplatin and increase BIM expression in the same way as miR-27a-5p and UCA1 inhibition. Two days after siUBE2N transfection the cell layer is not different from the control or siUCA1 conditions (**Supplementary Figure 4B**), while 6 days after transfection the cell layer confluency appears as moderately decreased compared to control conditions and slightly decreased compared to siUCA1. When siUBE2N transfection is combined with cisplatin treatment however, sensitization occurs strongly with almost no remaining viable cells attached to the surface of the culture plate (**Figure 5E**), which is in line with the observed induction of BIM which occurred 2 days after siUBE2N transfection (**Figure 5H**). This suggests that UBE2N inhibition constitutes a relevant strategy to sensitize ovarian cancer cells to cisplatin.

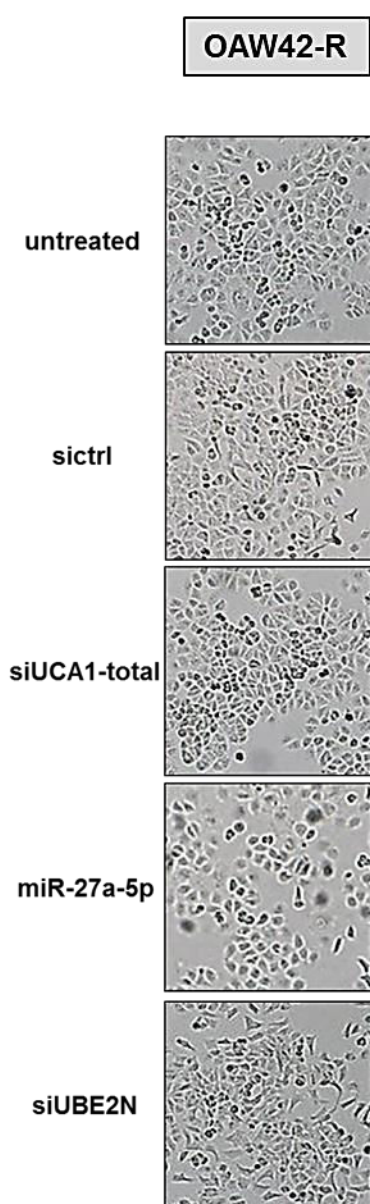
***Supplementary Figure 4: UCA1 inhibition releases miR-27a-5p which downregulates UBE2N and induces BIM***

(A) Table showing the full list of miRNAs from the Venn diagram in Figure 5B. (B) Pictures from cell layer 48 h after transfection with indicated siRNAs or miRNA. Data is representative of 3 experiments. (C) Table showing DEGs after UCA1 downregulation bearing miR-27a-5p seeds in their 3'UTR region. (D) UBE2N (unmodified and ubiquitinated) protein levels (western blot), quantified (lower lines) with actin, representative of the mean about 3 experiments, after indicated siRNAs transfection in OAW42-R cells. Actin was used as a loading control. A representative western blot is shown of 3 experiments.

**A**

miRNA with reported/predicted binding to UCA1					miRNA whose seed's target is enriched in siUCA1 DEG				overlap
miR-1	miR-135a	miR-214	miR-582	miR-4640	miR-15a	<b>miR-27b</b>	miR-181a	miR-519c	<b>miR-16</b>
<b>miR-16</b>	miR-143	miR-216b	miR-613	miR-4644	miR-15b	miR-30a	miR-181b	miR-519d	<b>miR-26a</b>
miR-18a	miR-145	miR-296	miR-624	miR-4726	<b>miR-16</b>	miR-30b	miR-181c		<b>miR-27a</b>
miR-18b	miR-182	miR-331	miR-665	miR-4735	miR-17	miR-30c	miR-181d		<b>miR-27b</b>
<b>miR-26a</b>	miR-184	miR-429	miR-873	miR-4761	miR-19a	miR-30d	<b>miR-195</b>		<b>miR-96</b>
<b>miR-27a</b>	miR-185	miR-485	miR-1271	miR-4770	miR-19b	miR-30e	miR-301		<b>miR-195</b>
<b>miR-27b</b>	miR-193a	miR-495	miR-1914	miR-5000	miR-20a	<b>miR-96</b>	miR-424		
<b>miR-96</b>	<b>miR-195</b>	miR-499b	miR-2467	miR-5194	miR-20b	miR-106a	miR-497		
miR-99b	miR-203	miR-507	miR-4306	miR-6088	<b>miR-26a</b>	miR-106b	miR-506		
miR-122	miR-204	miR-513a	miR-4436a	miR-6738	miR-26b	miR-130a	miR-519a		
miR-129	miR-206	miR-513b	miR-4510		<b>miR-27a</b>	miR-130b	miR-519b		

**B**

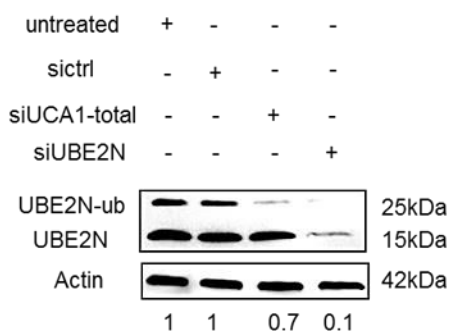


**C**

**DEGs after UCA1 downregulation bearing miR-27a-5p seeds in their 3'UTR region**

SPTY2D1	AK2	CSRNP1
PARD6B	KCNK2	NAV2
CAMTA1	AMMECR1L	C11orf57
ABCA1	FLRT3	AGPAT4
ZNF800	CTDSP2	RMND5A
TMCC1	LIF	RGPD5
FAM134C	CBFA2T3	GCC2
SIPA1L3	ATP11C	GOSR2
DNAJC27	DNAJC13	CD2AP
UNKL	CCNK	CCNG1
N4BP1	TSC1	MAP2K7
E2F7	ARMC8	<b>UBE2N</b>
PGM2L1	CLCN5	C17orf85
MYT1	PPARG	DOT1L
ENAH	ZHX1	RNFT1
BTG2	RELN	PPME1
ZCCHC24	GATAD2A	ELFN2
SH3RF1	NEK6	ING5
SLC7A11	HBEGF	<b>UBE2NL</b>
APPBP2	SFRP1	PANK1
B4GALT3	EGFR	SLC39A11
AQP11	INSR	

**D**

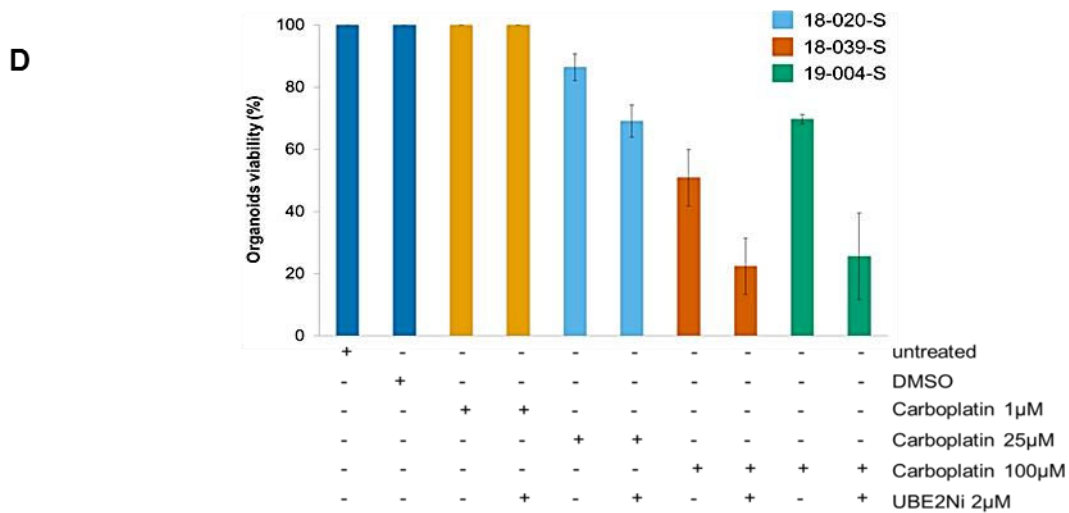
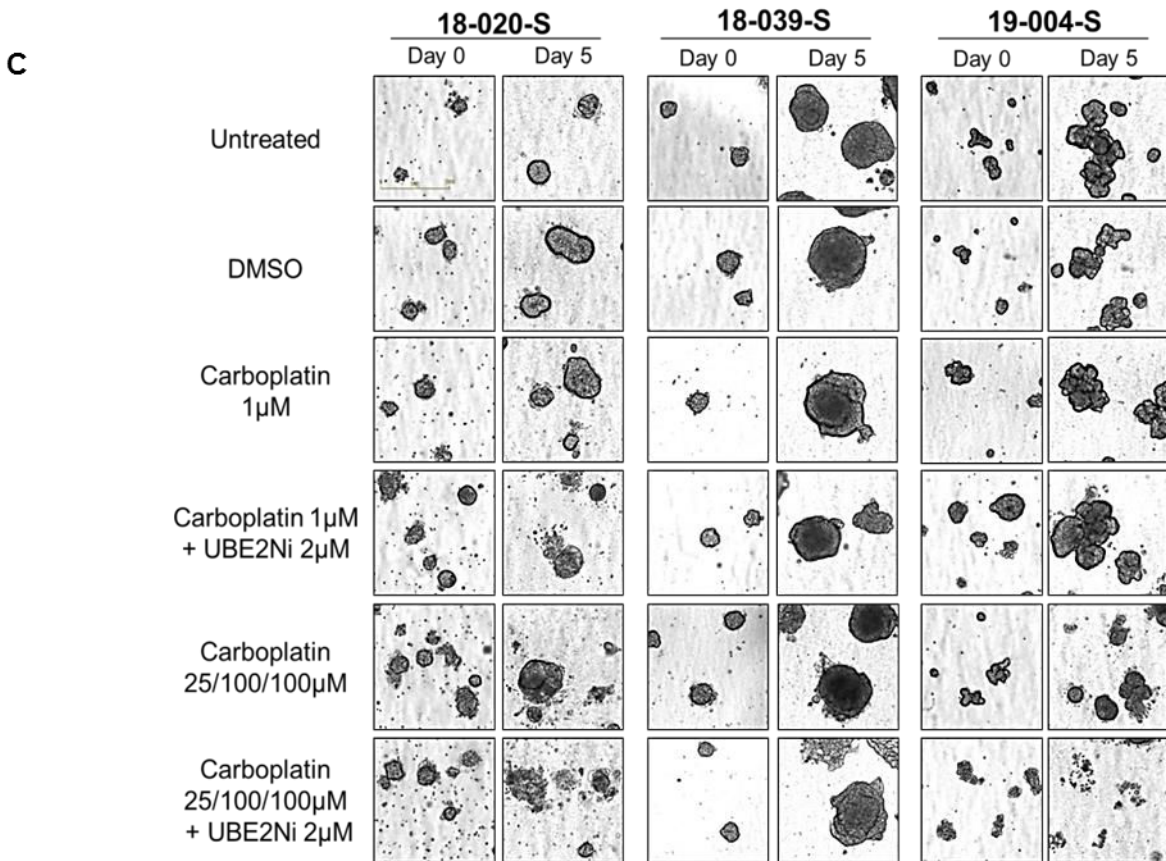
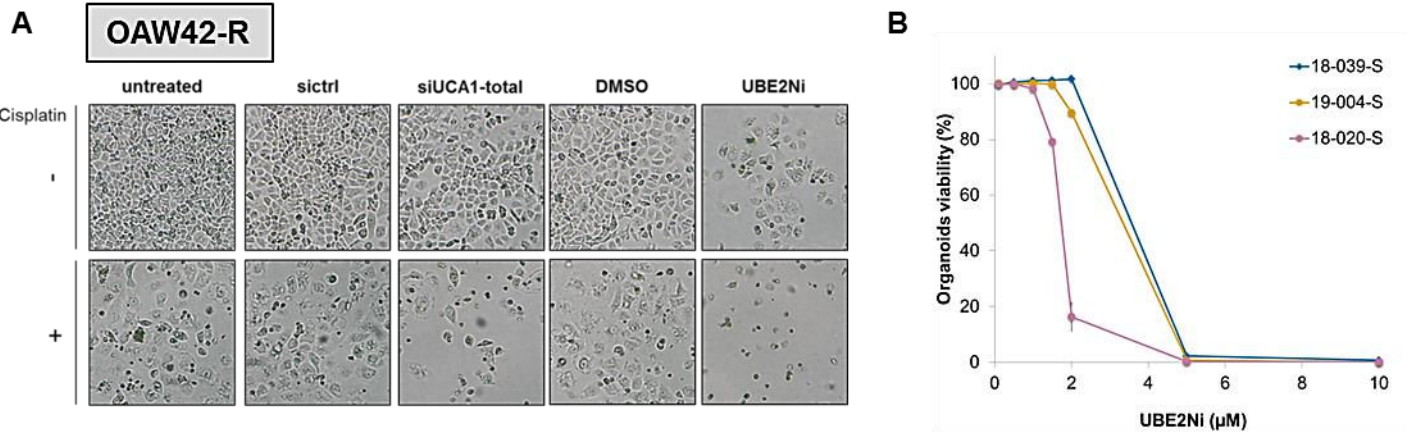


*UBE2N inhibitor sensitized patients derived organoids culture to carboplatin.*

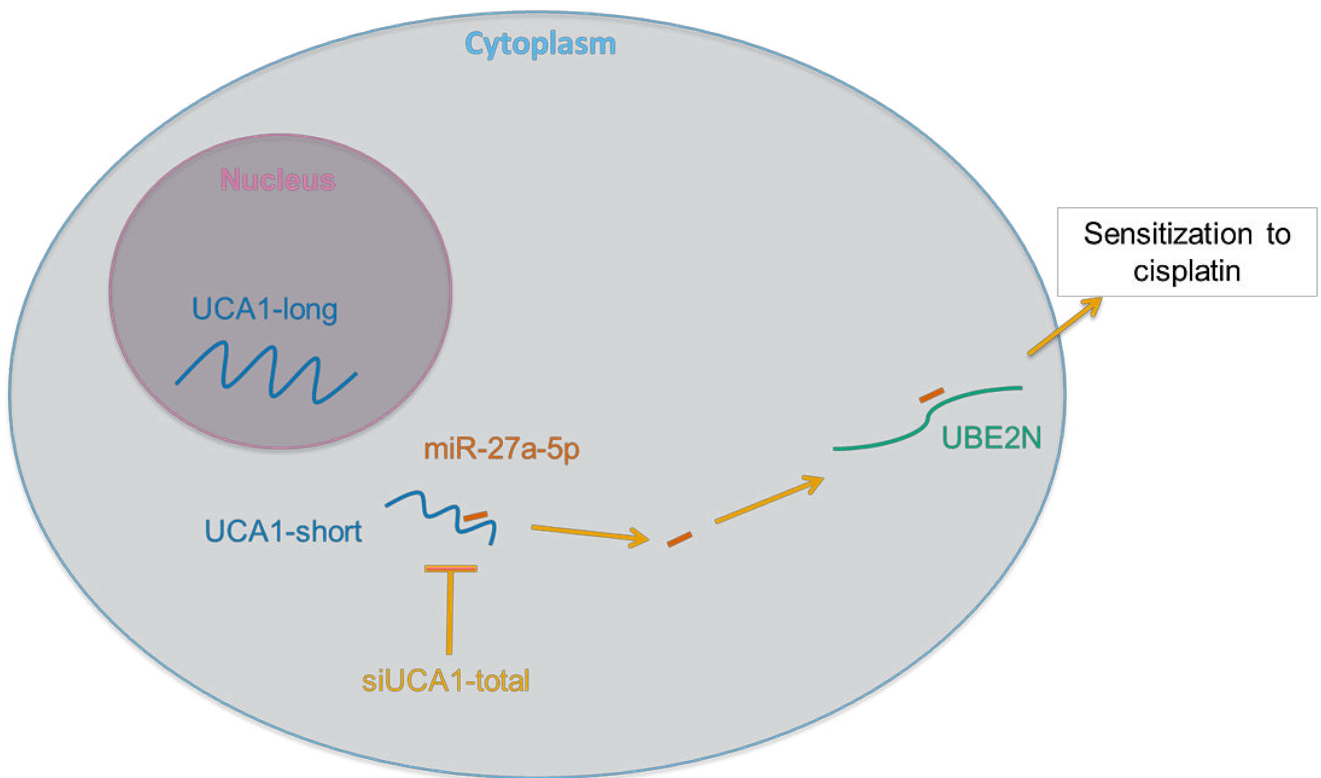
We developed several organoid 3-dimensional cultures derived from patient material. This model is a better proxy of tumor heterogeneity than common cell lines and might faithfully match the response to treatment of the patient of origin<sup>38,39</sup>. We firstly used a previously validated UBE2N inhibitor, termed UBE2Ni<sup>40</sup> to successfully sensitized in OAW42-R cells to cisplatin, in view of the almost complete disappearance of the cell layer in the flasks, even more pronounced than in siUCA1 condition (**Figure 6A**). We treated with increasing concentrations of UBE2Ni 3 organoid lines named, '18-020-S', '19-004-S' and '18-039-S'. UBE2Ni was able to strongly decrease viability of all 3 organoids, with IC50 of respectively 1.8  $\mu$ M, 2.05  $\mu$ M and 4.37  $\mu$ M (**Figure 6B**). We then assessed the ability of UBE2Ni to sensitize organoid lines to the action of carboplatin, an analogue of cisplatin commonly used in patients. Treatment with 1 $\mu$ M of carboplatin alone or in combination with 2 $\mu$ M UBE2Ni did not affect organoid lines viability, which was similar to control conditions. With increasing concentrations of carboplatin we could evidence sensitization to this agent by the concomitant treatment with UBE2Ni. Sensitization occurred at 25  $\mu$ M carboplatin for 18-020-S, resulting in 86% versus 69% viability in carboplatin versus carboplatin + UBE2Ni condition; 100  $\mu$ M carboplatin for 18-039-S, resulting in 51% versus 22% viability in carboplatin versus carboplatin + UBE2Ni condition and 100  $\mu$ M carboplatin for 19-004-S, resulting in 70% versus 26% viability in carboplatin versus carboplatin + UBE2Ni condition (**Figure 6C and 6D**).

***Figure 6: UBE2N inhibition sensitizes patient-derived 3 dimensional organoid lines to carboplatin***

(A) Pictures from cell layer 72 h after indicated siRNA transfection or treatment. Data is representative of 3 experiments. (B) Viability of 3 patient-derived organoid lines after treatment with increasing doses of UBE2Ni. (C and D) Representative, pictures and quantification, of viability of 3 patient-derived organoid lines after indicated treatments. Data is mean +/- SEM of triplicate wells.







**Main findings:**

UCA1 cytoplasmic short isoform is acting as a competing endogenous RNA for miR-27a-5p. Upon UCA1 down-regulation, miR-27a-5p is released and downregulates its direct target UBE2N. UBE2N inhibition triggers BIM upregulation, which sensitizes cells to the cytotoxic action of platinum drugs.

## Discussion

With this study, we have unraveled a new pathway through which UCA1 displays oncogenic functions, in ovarian cancer. Although there are an increasing number of studies having studied UCA1 oncogenic functions in many malignancies<sup>42-44</sup>, the underlying mechanisms are quite often only poorly understood.

There are other examples of lncRNAs displaying functions through several different mechanisms, one of the best known is H19, acting both as an epigenetic regulator and as a precursor for miR-675<sup>45-48</sup>. UCA1 has been shown to bind to EZH2<sup>49-52</sup>, a member of the PRC2 epigenetic regulator complex, or to BRG1<sup>53</sup>, a member of the SWI/SNF chromatin remodeling complex. But UCA1 has been most frequently described to act as a ceRNA, with many miRNAs involved.

It is likely that UCA1 different isoforms are at least in part responsible for its varied mechanisms of action. We have shown for the first time that the long isoform (also known as CUDR) is nuclear while the short isoform is exported to the cytoplasmic compartment, and that they have different functions. One can then hypothesize that the main mode of action of the long isoform would be through its binding of EZH2, although it did not display any phenotype in our study, and that the short isoform would act mainly through its ceRNA functions. Further studies will be needed to assign a specific mode of action to the long isoform. Even though several studies refer to it (CUDR) specifically, they mostly perform CUDR inhibition with RNA interference using siRNA or shRNA sequences targeting both isoforms, and therefore do not discriminate between the two isoforms' functions<sup>54-57</sup>.

There are two predicted binding sites for miR-27a-5p in UCA transcript, one in the common part of both isoforms of UCA1, and one present in the long isoform only. Although we did not formally identify through which of these sites miR-27a-5p binds to UCA1, since the long isoform is nuclear, and mature miRNAs exert their canonical functions in the cytoplasmic compartment, we hypothesize miR-27a-5p binds to UCA1 at the one site present in the short isoform.

According to the set of differentially expressed genes after UCA1 downregulation, several miRNAs might be bound to UCA1 and released upon its downregulation, destabilizing targeted mRNA transcripts. We however showed that miR-27a-5p transfection mimics UCA1-induced BIM induction, which we have shown is a necessary condition for ovarian cancer

cells sensitization to cisplatin. Its release from UCA1 upon the lncRNA downregulation (miR-27a-5p is expressed in the ovarian cancer cells we used in this study – data not shown) is therefore the main event leading to BIM upregulation. BIM is a BH3-only pro-apoptotic member of the Bcl-2 family. This family of proteins, divided between pro- and anti-apoptotic members, dictates the fate of cells toward death or survival. Upregulation of BIM tips this balance towards cell death, and thus efficiently sensitizes cells to various chemotherapeutic agents<sup>58,59</sup>.

It has been shown that miR-27a-5p has potential tumor suppressive function in lung adenocarcinoma<sup>60</sup> and small cell lung cancer<sup>61</sup>. It also targets EGFR in head and neck cancer<sup>62,63</sup>, which is only moderately downregulated in our model (1.42 fold). Interestingly, we have shown previously that EGFR inhibition leads to BIM upregulation in ovarian cancer cells. We however demonstrated that UBE2N, which have been shown previously to be a direct target of miR-27a-5p<sup>37</sup>, is also downregulated by UCA1 inhibition or miR-27a-5p transfection, and that its downregulation is responsible for BIM upregulation to an extent comparable to UCA1 inhibition. EGFR moderate inhibition in response to UCA1 inhibition might be a worthy addition to UBE2N inhibition for inducing BIM expression, since UBE2N inhibition after UCA1 downregulation remains incomplete.

UBE2N is a E2 ubiquitin ligase, which upon ubiquitin loading by a E1 ubiquitin ligase is able to ubiquitinylate specific substrates, addressing to which is performed with the help of a RING E3 ubiquitin ligase. There are two possible pathways through which UBE2N downregulation might lead to BIM upregulation, either by cytoplasmic or nuclear functions. First, UBE2N in the cytoplasm is bound to Uev1A and can ubiquitinylate IRAK1 and TRAF6, leading to IKK phosphorylation and subsequent NF- $\kappa$ B activation<sup>64–68</sup>. UBE2N inhibition might then promote BIM upregulation through NF- $\kappa$ B inhibition, as it was shown by *J.C Godbersen et al*<sup>69</sup>. Second, UBE2N in the nucleus is an important mediator of the DNA damage response to double strand breaks by homologous recombination (HR)<sup>70–72</sup>, but also of the response to replication stress. DNA damage tolerance pathways are activated when the replication machinery encounters DNA damage either through error prone (translesion DNA synthesis) or error free (template switching, TS) pathways. Mms2-bound UBE2N is an essential mediator of the TS pathway. Altogether, UBE2N inhibition leads to genomic instability and increases the persistence of DNA damage, which is known to trigger BIM upregulation<sup>73–75</sup>.

Interestingly, we have shown that UBE2N inhibition efficiently sensitizes to cisplatin patient-derived organoid3D cultures ovarian cancer cells. These models are more faithful than

typical monolayer cell lines to mimic the response to treatment for a number of malignancies, including ovarian cancer<sup>76,77</sup>, and they constitute highly promising tools to predict patients' response to treatment.

Altogether, because of its actions on both NF- $\kappa$ B and DNA repair pathways, UBE2N might constitute a highly relevant target to improve ovarian cancer patients' therapeutic care, not only because of the upregulation of BIM. NF- $\kappa$ B activation upregulates PDL1, a negative regulator of immune response to tumoral cells<sup>78,79</sup>, and UBE2N inhibition might then elicit immune-mediated anti-tumoral response *in vivo*, or sensitize to anti-PDL1 therapies currently studied in ovarian cancer<sup>80-82</sup>. Moreover, UBE2N inhibition and subsequent impairment of HR DNA repair pathway could sensitize to the newly available PARPi molecules<sup>83,84</sup>, whose activity relies on defects in HR<sup>85</sup>. Our work might therefore pave the way to new therapeutic opportunities for the treatment of ovarian cancer.

## **Acknowledgments**

This work was supported by the « Ligue Contre le Cancer » (Calvados and Seine-Maritime committees), the “Conseil Régional de Basse-Normandie”, the French State, INSERM (National Institute for Health and Medical Research), the University of Caen Normandy and the Cancer Center F. Baclesse (Caen, France). A.W. is a recipient of a doctoral fellowship from the “Conseil Régional de Basse-Normandie”. MRA.A is a recipient of a doctoral fellowship from Egyptian Ministry of Higher Education and Scientific Research. Real-time cell assays were run at the ImpedanCELL core facility, Federative Structure 4206 ICORE, UNICAEN, Caen, France.

## **Conflict of interest**

The authors declare no conflict of interest

## References

1. Reid, B. M., Permuth, J. B. & Sellers, T. A. Epidemiology of ovarian cancer: a review. *Cancer Biol. Med.* **14**, 9 (2017).
2. Lheureux, S., Braunstein, M. & Oza, A. M. Epithelial ovarian cancer: Evolution of management in the era of precision medicine. *CA. Cancer J. Clin.* **69**, 280–304 (2019).
3. Alvarez, R. D., Karlan, B. Y. & Strauss, J. F. 'Ovarian cancers: Evolving paradigms in research and care': Report from the Institute of Medicine. *Gynecol. Oncol.* **141**, 413–415 (2016).
4. Coleman, R. L., Monk, B. J., Sood, A. K. & Herzog, T. J. Latest research and treatment of advanced-stage epithelial ovarian cancer. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **10**, 211–224 (2013).
5. Coleman, R. L. Ovarian cancer in 2015: Insights into strategies for optimizing ovarian cancer care. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* **13**, 71–72 (2016).
6. Webb, P. M. & Jordan, S. J. Epidemiology of epithelial ovarian cancer. *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* **41**, 3–14 (2017).
7. Colombo, P.-E. *et al.* Sensitivity and resistance to treatment in the primary management of epithelial ovarian cancer. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **89**, 207–216 (2014).
8. Cortez, A. J., Tudrej, P., Kujawa, K. A. & Lisowska, K. M. Advances in ovarian cancer therapy. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **81**, 17–38 (2018).
9. Mullen, M. M., Kuroki, L. M. & Thaker, P. H. Novel treatment options in platinum-sensitive recurrent ovarian cancer: a review. *Gynecol. Oncol.* (2018).
10. Bartonicek, N., Maag, J. L. V. & Dinger, M. E. Long noncoding RNAs in cancer: mechanisms of action and technological advancements. *Mol. Cancer* **15**, (2016).
11. Volders, P.-J. *et al.* LNCipedia 5: towards a reference set of human long non-coding RNAs. *Nucleic Acids Res.* **47**, D135–D139 (2019).
12. Wang, K. C. & Chang, H. Y. Molecular Mechanisms of Long Noncoding RNAs. *Mol. Cell* **43**, 904–914 (2011).
13. Cech, T. R. & Steitz, J. A. The Noncoding RNA Revolution—Trashing Old Rules to Forge New Ones. *Cell* **157**, 77–94 (2014).

14. Meryet-Figuière, M. *et al.* An overview of long non-coding RNAs in ovarian cancers. *Oncotarget* **7**, 44719 (2016).
15. Zhang, J., Liu, L., Li, J. & Le, T. D. LncmiRSRN: identification and analysis of long non-coding RNA related miRNA sponge regulatory network in human cancer. *Bioinforma. Oxf. Engl.* **34**, 4232–4240 (2018).
16. Gutschner, T. & Diederichs, S. The hallmarks of cancer: A long non-coding RNA point of view. *RNA Biol.* **9**, 703–719 (2012).
17. Lou, Y. *et al.* Gene microarray analysis of lncRNA and mRNA expression profiles in patients with high-grade ovarian serous cancer. *Int. J. Mol. Med.* (2018). doi:10.3892/ijmm.2018.3588
18. Wang, X.-S. Rapid Identification of UCA1 as a Very Sensitive and Specific Unique Marker for Human Bladder Carcinoma. *Clin. Cancer Res.* **12**, 4851–4858 (2006).
19. Wang, H. *et al.* LncRNA UCA1 in anti-cancer drug resistance. *Oncotarget* **8**, (2017).
20. Wang, F., Li, X., Xie, X., Zhao, L. & Chen, W. UCA1, a non-protein-coding RNA up-regulated in bladder carcinoma and embryo, influencing cell growth and promoting invasion. *FEBS Lett.* **582**, 1919–1927 (2008).
21. Ni, B. *et al.* Increased urothelial cancer associated 1 is associated with tumor proliferation and metastasis and predicts poor prognosis in colorectal cancer. *Int. J. Oncol.* **47**, 1329–1338 (2015).
22. Zhao, W., Sun, C. & Cui, Z. A long noncoding RNA UCA1 promotes proliferation and predicts poor prognosis in glioma. *Clin. Transl. Oncol.* (2017). doi:10.1007/s12094-016-1597-7
23. Wang, F. *et al.* Involvement of SRPK1 in cisplatin resistance related to long non-coding RNA UCA1 in human ovarian cancer cells. *Neoplasma* **62**, 432–438 (2015).
24. Wang, X. *et al.* Long non-coding RNA urothelial carcinoma associated 1 induces cell replication by inhibiting BRG1 in 5637 cells. *Oncol. Rep.* (2014). doi:10.3892/or.2014.3309
25. Wang, F. *et al.* Upregulated lncRNA-UCA1 contributes to progression of hepatocellular carcinoma through inhibition of miR-216b and activation of FGFR1/ERK signaling pathway. *Oncotarget* **6**, 7899 (2015).

26. Zhang, X. *et al.* UCA1 Regulates the Growth and Metastasis of Pancreatic Cancer by Sponging miR-135a. *Oncol. Res.* **25**, 1529–1541 (2017).
27. Sun, M.-D., Zheng, Y.-Q., Wang, L.-P., Zhao, H.-T. & Yang, S. Long noncoding RNA UCA1 promotes cell proliferation, migration and invasion of human leukemia cells via sponging miR-126. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* **22**, 2233–2245 (2018).
28. Wang, J., Ye, C., Liu, J. & Hu, Y. UCA1 confers paclitaxel resistance to ovarian cancer through miR-129/ABCB1 axis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **501**, 1034–1040 (2018).
29. Villedieu, M. *et al.* Absence of Bcl-xL down-regulation in response to cisplatin is associated with chemoresistance in ovarian carcinoma cells☆. *Gynecol. Oncol.* **105**, 31–44 (2007).
30. Poulain, L. *et al.* Acquisition of chemoresistance in a human ovarian carcinoma cell is linked to a defect in cell cycle control. *Int. J. Cancer* **78**, 454–463 (1998).
31. Lal, A. *et al.* Capture of microRNA-bound mRNAs identifies the tumor suppressor miR-34a as a regulator of growth factor signaling. *PLoS Genet.* **7**, e1002363 (2011).
32. Huang, D. W., Sherman, B. T. & Lempicki, R. A. Bioinformatics enrichment tools: paths toward the comprehensive functional analysis of large gene lists. *Nucleic Acids Res.* **37**, 1–13 (2009).
33. Huang, D. W., Sherman, B. T. & Lempicki, R. A. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources. *Nat. Protoc.* **4**, 44–57 (2008).
34. Mootha, V. K. *et al.* PGC-1alpha-responsive genes involved in oxidative phosphorylation are coordinately downregulated in human diabetes. *Nat. Genet.* **34**, 267–273 (2003).
35. Subramanian, A. *et al.* Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **102**, 15545–15550 (2005).
36. Huang, J. *et al.* Long non-coding RNA UCA1 promotes breast tumor growth by suppression of p27 (Kip1). *Cell Death Dis.* **5**, e1008 (2014).
37. Romay, M. C. *et al.* Regulation of NF-κB signaling by oxidized glycerophospholipid and IL-1β induced miRs-21-3p and -27a-5p in human aortic endothelial cells. *J. Lipid Res.* **56**, 38–



50 (2015).

38. Kopper, O. *et al.* An organoid platform for ovarian cancer captures intra- and interpatient heterogeneity. *Nat. Med.* **25**, 838–849 (2019).

39. Maru, Y. & Hippo, Y. Current Status of Patient-Derived Ovarian Cancer Models. *Cells* **8**, (2019).

40. Pulvino, M. *et al.* Inhibition of proliferation and survival of diffuse large B-cell lymphoma cells by a small-molecule inhibitor of the ubiquitin-conjugating enzyme Ubc13-Uev1A. *Blood* **120**, 1668–1677 (2012).

41. Nagy, Á., Lánckzy, A., Menyhárt, O. & Gyórfy, B. Author Correction: Validation of miRNA prognostic power in hepatocellular carcinoma using expression data of independent datasets. *Sci. Rep.* **8**, 11515 (2018).

42. Wang, H.-M., Lu, J.-H., Chen, W.-Y. & Gu, A.-Q. Upregulated lncRNA-UCA1 contributes to progression of lung cancer and is closely related to clinical diagnosis as a predictive biomarker in plasma. *Int. J. Clin. Exp. Med.* **8**, 11824–11830 (2015).

43. Zhang, M. *et al.* LncRNA UCA1 promotes migration and invasion in pancreatic cancer cells via the Hippo pathway. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.* **1864**, 1770–1782 (2018).

44. Xue, M., Chen, W. & Li, X. Urothelial cancer associated 1: a long noncoding RNA with a crucial role in cancer. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **142**, 1407–1419 (2016).

45. Wood, A. J. & Oakey, R. J. Genomic imprinting in mammals: emerging themes and established theories. *PLoS Genet.* **2**, e147 (2006).

46. Wan, L.-B. & Bartolomei, M. S. Regulation of imprinting in clusters: noncoding RNAs versus insulators. *Adv. Genet.* **61**, 207–223 (2008).

47. Sun, W., Yang, Y., Xu, C. & Guo, J. Regulatory mechanisms of long noncoding RNAs on gene expression in cancers. *Cancer Genet.* **216–217**, 105–110 (2017).

48. Vennin, C. *et al.* H19 non coding RNA-derived miR-675 enhances tumorigenesis and metastasis of breast cancer cells by downregulating c-Cbl and Cbl-b. *Oncotarget* **6**, 29209 (2015).

49. Hu, J.-J. *et al.* HBx-upregulated lncRNA UCA1 promotes cell growth and tumorigenesis

- by recruiting EZH2 and repressing p27Kip1/CDK2 signaling. *Sci. Rep.* **6**, 23521 (2016).
50. Wang, Z.-Q. *et al.* Long noncoding RNA UCA1 induced by SP1 promotes cell proliferation via recruiting EZH2 and activating AKT pathway in gastric cancer. *Cell Death Dis.* **8**, e2839 (2017).
51. Cai, Q. *et al.* Long non-coding RNA UCA1 promotes gallbladder cancer progression by epigenetically repressing p21 and E-cadherin expression. *Oncotarget* **8**, 47957–47968 (2017).
52. Li, Z., Yu, D., Li, H., Lv, Y. & Li, S. Long non-coding RNA UCA1 confers tamoxifen resistance in breast cancer endocrinotherapy through regulation of the EZH2/p21 axis and the PI3K/AKT signaling pathway. *Int. J. Oncol.* **54**, 1033–1042 (2019).
53. Wang, X. *et al.* Long non-coding RNA urothelial carcinoma associated 1 induces cell replication by inhibiting BRG1 in 5637 cells. *Oncol. Rep.* **32**, 1281–1290 (2014).
54. Liang, X. *et al.* Long non-coding RNA CUDR promotes malignant phenotypes in pancreatic ductal adenocarcinoma via activating AKT and ERK signaling pathways. *Int. J. Oncol.* **53**, 2671–2682 (2018).
55. Zheng, Z.-K. *et al.* Serum long noncoding RNA urothelial carcinoma-associated 1: A novel biomarker for diagnosis and prognosis of hepatocellular carcinoma. *J. Int. Med. Res.* **46**, 348–356 (2018).
56. Pu, H. *et al.* CUDR promotes liver cancer stem cell growth through upregulating TERT and C-Myc. *Oncotarget* **6**, 40775 (2015).
57. Xin, X. *et al.* Inflammatory-Related P62 Triggers Malignant Transformation of Mesenchymal Stem Cells through the Cascade of CUDR-CTCF-IGFII-RAS Signaling. *Mol. Ther. Nucleic Acids* **11**, 367–381 (2018).
58. Pétigny-Lechartier, C. *et al.* The mTORC1/2 Inhibitor AZD8055 Strengthens the Efficiency of the MEK Inhibitor Trametinib to Reduce the Mcl-1/[Bim and Puma] ratio and to Sensitize Ovarian Carcinoma Cells to ABT-737. *Mol. Cancer Ther.* **16**, 102–115 (2017).
59. Lheureux, S. *et al.* Identification of predictive factors of response to the BH3-mimetic molecule ABT-737: an ex vivo experiment in human serous ovarian carcinoma. *Int. J. Cancer* **136**, E340-350 (2015).
60. Yu, N. *et al.* Identification of tumor suppressor miRNAs by integrative miRNA and

mRNA sequencing of matched tumor-normal samples in lung adenocarcinoma. *Mol. Oncol.* **13**, 1356–1368 (2019).

61. Mizuno, K. *et al.* The microRNA expression signature of small cell lung cancer: tumor suppressors of miR-27a-5p and miR-34b-3p and their targeted oncogenes. *J. Hum. Genet.* **62**, 671–678 (2017).

62. Wu, X. *et al.* Coordinated targeting of the EGFR signaling axis by microRNA-27a\*. *Oncotarget* **4**, 1388–1398 (2013).

63. Chari, N. S. *et al.* Disruption of TP63-miR-27a\* feedback loop by mutant TP53 in head and neck cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* (2019). doi:10.1093/jnci/djz097

64. Hofmann, R. M. & Pickart, C. M. Noncanonical MMS2-encoded ubiquitin-conjugating enzyme functions in assembly of novel polyubiquitin chains for DNA repair. *Cell* **96**, 645–653 (1999).

65. Wooff, J., Pastushok, L., Hanna, M., Fu, Y. & Xiao, W. The TRAF6 RING finger domain mediates physical interaction with Ubc13. *FEBS Lett.* **566**, 229–233 (2004).

66. Ordureau, A. *et al.* The IRAK-catalysed activation of the E3 ligase function of Pellino isoforms induces the Lys63-linked polyubiquitination of IRAK1. *Biochem. J.* **409**, 43–52 (2008).

67. Lamothe, B. *et al.* Site-specific Lys-63-linked tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 auto-ubiquitination is a critical determinant of I kappa B kinase activation. *J. Biol. Chem.* **282**, 4102–4112 (2007).

68. Hodge, C. D., Spyrapoulos, L. & Glover, J. M. Ubc13: the Lys63 ubiquitin chain building machine. *Oncotarget* **7**, 64471 (2016).

69. Godbersen, J. C. *et al.* The Nedd8-activating enzyme inhibitor MLN4924 thwarts microenvironment-driven NF- $\kappa$ B activation and induces apoptosis in chronic lymphocytic leukemia B cells. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **20**, 1576–1589 (2014).

70. Kolas, N. K. *et al.* Orchestration of the DNA-damage response by the RNF8 ubiquitin ligase. *Science* **318**, 1637–1640 (2007).

71. Wang, B. & Elledge, S. J. Ubc13/Rnf8 ubiquitin ligases control foci formation of the Rap80/Abraxas/Brca1/Brcc36 complex in response to DNA damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.*

S. A. **104**, 20759–20763 (2007).

72. Thorslund, T. *et al.* Histone H1 couples initiation and amplification of ubiquitin signalling after DNA damage. *Nature* **527**, 389 (2015).

73. Delbridge, A. R. D. *et al.* RAG-induced DNA lesions activate proapoptotic BIM to suppress lymphomagenesis in p53-deficient mice. *J. Exp. Med.* **213**, 2039–2048 (2016).

74. Garrison, S. P. *et al.* Genetically defining the mechanism of Puma- and Bim-induced apoptosis. *Cell Death Differ.* **19**, 642–649 (2012).

75. Happo, L. *et al.* Maximal killing of lymphoma cells by DNA damage-inducing therapy requires not only the p53 targets Puma and Noxa, but also Bim. *Blood* **116**, 5256–5267 (2010).

76. Jabs, J. *et al.* Screening drug effects in patient-derived cancer cells links organoid responses to genome alterations. *Mol. Syst. Biol.* **13**, 955 (2017).

77. Kondo, J. & Inoue, M. Application of Cancer Organoid Model for Drug Screening and Personalized Therapy. *Cells* **8**, (2019).

78. Lucas, J., Hsieh, T.-C., Halicka, H. D., Darzynkiewicz, Z. & Wu, J. M. Upregulation of PD-L1 expression by resveratrol and piceatannol in breast and colorectal cancer cells occurs via HDAC3/p300-mediated NF- $\kappa$ B signaling. *Int. J. Oncol.* **53**, 1469–1480 (2018).

79. Pogge von Strandmann, E., Reinartz, S., Wager, U. & Müller, R. Tumor-Host Cell Interactions in Ovarian Cancer: Pathways to Therapy Failure. *Trends Cancer* **3**, 137–148 (2017).

80. Mandai, M. *et al.* Anti-PD-L1/PD-1 immune therapies in ovarian cancer: basic mechanism and future clinical application. *Int. J. Clin. Oncol.* **21**, 456–461 (2016).

81. Pujade-Lauraine, E., Fujiwara, K., Dychter, S. S., Devgan, G. & Monk, B. J. Avelumab (anti-PD-L1) in platinum-resistant/refractory ovarian cancer: JAVELIN Ovarian 200 Phase III study design. *Future Oncol. Lond. Engl.* **14**, 2103–2113 (2018).

82. Mittica, G., Genta, S., Aglietta, M. & Valabrega, G. Immune Checkpoint Inhibitors: A New Opportunity in the Treatment of Ovarian Cancer? *Int. J. Mol. Sci.* **17**, (2016).

83. Madariaga, A., Lheureux, S. & Oza, A. M. Tailoring Ovarian Cancer Treatment:

Implications of BRCA1/2 Mutations. *Cancers* **11**, (2019).

84. Morgan, R. D., Clamp, A. R., Evans, D. G. R., Edmondson, R. J. & Jayson, G. C. PARP inhibitors in platinum-sensitive high-grade serous ovarian cancer. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **81**, 647–658 (2018).

85. Pilié, P. G., Gay, C. M., Byers, L. A., O'Connor, M. J. & Yap, T. A. PARP Inhibitors: Extending Benefit Beyond BRCA-Mutant Cancers. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* **25**, 3759–3771 (2019).

## Conclusion

Nos travaux nous ont permis de mettre en évidence que l'inhibition de l'expression d'UCA1, en entraînant une augmentation de l'expression du pro-apoptotique BH3-only BIM, permet de sensibiliser à l'action du cisplatine plusieurs lignées cancéreuses ovariennes, qu'elles soient à l'origine chimiorésistantes ou chimiosensibles.

Cette sensibilisation repose sur l'inhibition de l'isoforme courte d'UCA1, capable de séquestrer par liaison directe le miR-27a-5-p. Ce dernier est alors libre d'agir sur le mRNA d'UBE2N, protéine notamment impliquée dans les mécanismes de réparation de l'ADN à différents niveaux. L'inhibition d'UBE2N à l'aide de siRNAs spécifiques permet l'augmentation de BIM, démontrant son rôle direct dans la sensibilisation observée.

De manière particulièrement intéressante, l'utilisation d'un inhibiteur d'UBE2N permet également de sensibiliser à l'action d'un sel de platine des lignées d'organoïdes cultivées dans une matrice tri-dimensionnelle, établie à partir d'échantillons tumoraux.

Nous avons ainsi pu mettre en évidence le mécanisme par lequel l'inhibition d'UCA1 sensibilise des cellules tumorales ovariennes à l'action de la chimiothérapie conventionnelle, identifiant UBE2N comme la cible potentielle de stratégies thérapeutiques innovantes.

### III. Résultats complémentaires :

#### A. La chimiosensibilisation induite par l'inhibition d'UCA1 dans les cellules OAW42-R

*L'inhibition d'UCA1 augmente l'expression de PUMA et possiblement de Bik.*

Suite à l'analyse par microarray des gènes différentiellement exprimés en réponse à l'inhibition d'UCA1 dans la lignée OAW42-R, comme exposé précédemment des processus en lien avec la mort cellulaire sont perturbés. Outre l'augmentation de l'expression de BIM déjà exposée, nous avons également identifié une augmentation de l'expression de deux autres protéines pro-apoptotiques BH3-only appartenant à la famille Bcl-2. Il s'agit de BIK dont l'expression est augmentée d'un facteur de 1,97 ( $p=0.008$ ) et PUMA augmenté d'un facteur de 1.81 ( $p=0.010$ ) (**Figure 1A**). Nous avons cherché à valider cette surexpression par RT-qPCR et par western blot. BIK s'est avéré être faiblement exprimé que ce soit en termes de transcrit ou de protéine (**données non présentées**). Nous avons par contre montré, par RT-qPCR une augmentation de l'expression de PUMA dans ces cellules après inhibition d'UCA1, de façon similaire à celle de BIM (**Figure 1B**), ainsi qu'une augmentation de son expression protéique (**Figure 1C**).

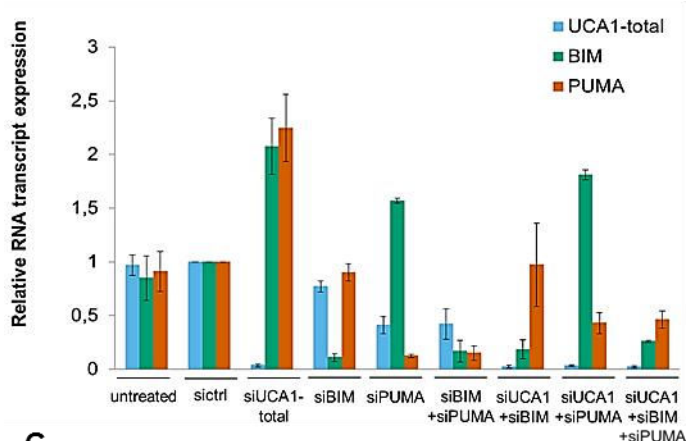
*L'augmentation de l'expression de PUMA est impliquée de manière marginale dans la sensibilisation au Cisplatine des cellules OAW42-R par inhibition d'UCA1.*

Nous avons cherché à déterminer si l'augmentation de l'expression de PUMA jouait un rôle dans la sensibilisation des cellules OAW42-R au Cisplatine, au même titre que BIM. Nous avons étudié la réponse des cellules OAW42-R au Cisplatine après inhibition d'UCA1 seul, ou en inhibant de manière concomitante BIM, PUMA, ou les deux, à l'aide de siRNAs spécifiques, éteignant efficacement leurs cibles (**Figure 1B et 1C**). On note toutefois une induction transcriptionnelle et protéique des niveaux de BIM après transfection de siPUMA (**Figure 1B et 1C**). Suite au traitement au Cisplatine, on observe dans l'ensemble des conditions contrôles une diminution du nombre de cellules, un gonflement des cellules avec un blocage de S/G2-M du cycle cellulaire et une légère augmentation de la proportion de cellules en phase subG1 ne dépassant pas les 13% en moyenne. Dans la condition siUCA1-total, on observe une forte diminution du nombre de cellules, un détachement des cellules du tapis caractéristique de la mort cellulaire, l'augmentation de la proportion d'évènements en phase subG1, 26% en moyenne, ainsi qu'une perte partielle du blocage des cellules en phase G2-M.

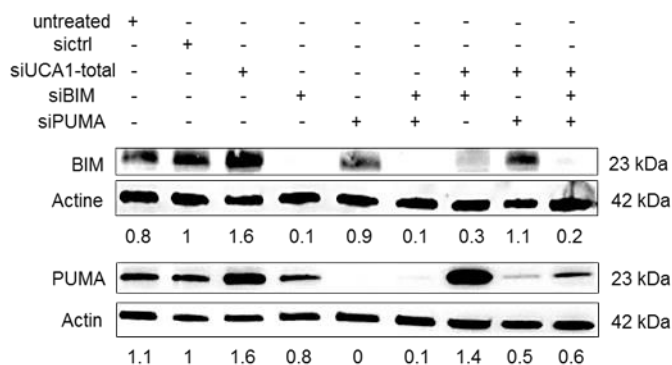
**A**

Term upregulated	P-Value	Gene symbol	Fold change	P-Value
GO:0012502~induction of programmed cell death	0.011	BCL2L11 (BIM)	1.9	0.003
GO:0008219~Cell death	0.015	BIK	1.97	0.008
GO:0016265~ death	0.016	BBC3 (PUMA)	1.81	0.010

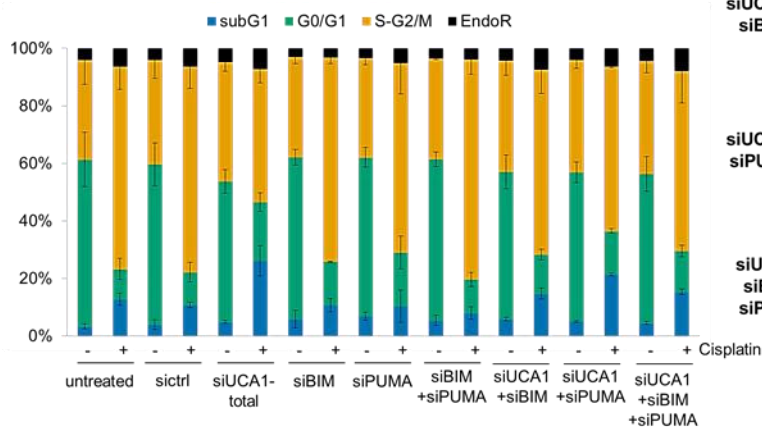
**B**



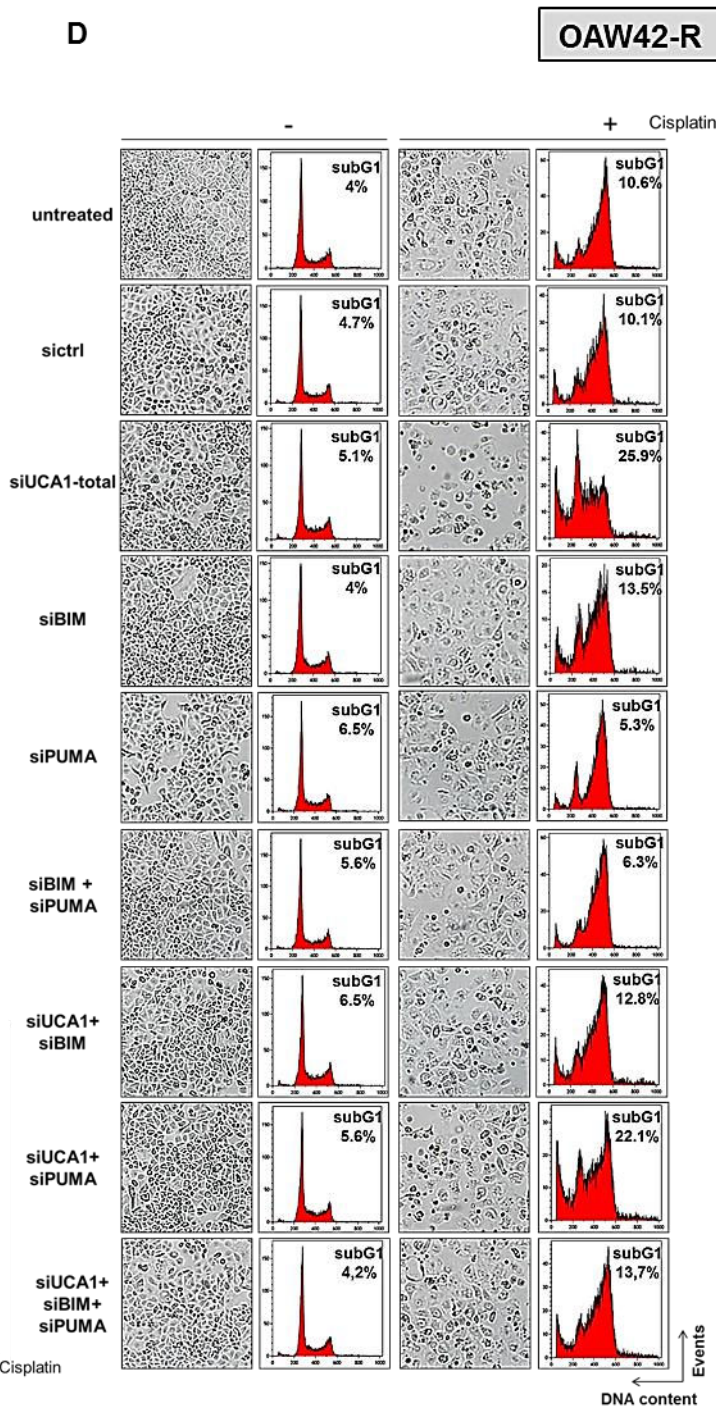
**C**



**E**



**D**





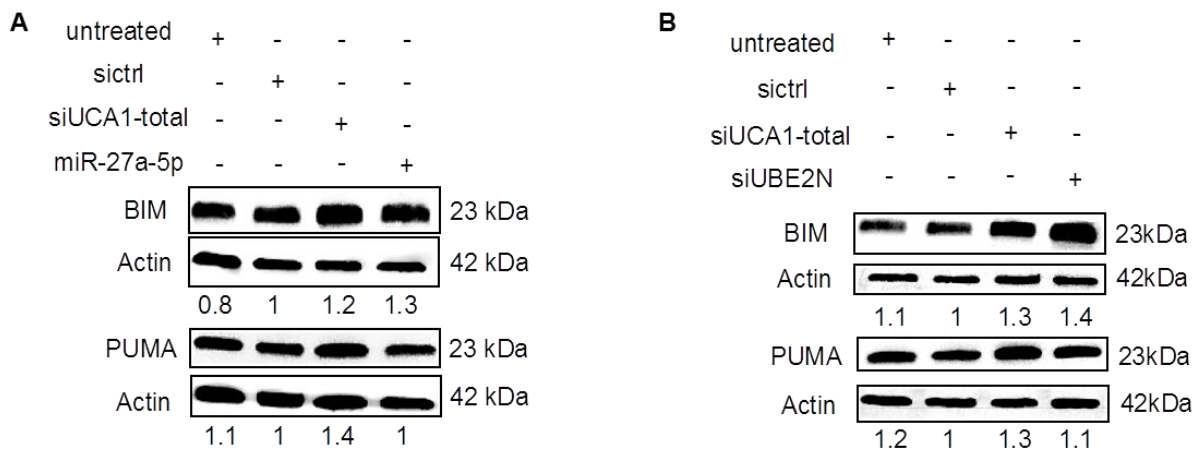
L'observation des tapis cellulaires et de la proportion d'évènements Sub-G1 pour la condition siBIM + siUCA1 confirme le rôle majeur de BIM exposé précédemment. L'inhibition de PUMA semble également protéger de la sensibilisation au Cisplatine induite par l'inhibition d'UCA1, tel que suggéré par l'observation du tapis cellulaire, et le maintien d'un blocage important en phase G2/M du cycle cellulaire. Toutefois, la proportion d'évènements Sub-G1 après siUCA1 + siPUMA, bien que moins importante que pour siUCA1, 21% en moyenne, reste supérieure à siUCA1 + siBIM ou sictrl, montrant le rôle limité de PUMA dans la sensibilisation au cisplatine induite par siUCA1 (**Figure 1D et 1E**).

**Figure 1: PUMA est impliqué de façon marginale dans la sensibilisation des cellules OAW42-R au Cisplatine par inhibition d'UCA1.**

(A) Processus biologiques en lien avec la mort cellulaire identifiés par le logiciel DAVID sur la base de données GO (Gene Ontology) comme associés aux DEGS après inhibition d'UCA1, et membres de la famille BCL-2 associés (B) Histogramme représentant l'expression par RT-qPCR des transcrits d'UCA1-total, de BIM et de PUMA, normalisée par SDHA, relative au sictrl. 72 heures après transfection avec les siRNA indiqués dans les cellules OAW42-R. Moyennes +/- SEM issues de trois expériences indépendantes. (C) Niveaux d'expression protéique de BIM et PUMA par western blot, l'actine est utilisée comme un contrôle de charge. 72 heures après transfection avec les siRNA indiqués dans les cellules OAW42-R. Images représentatives de 3 expériences. Les valeurs de densitométrie annotées sous les puits correspondants, sont relatives à l'actine et ont été calculées par le logiciel ImageJ, représentant la moyenne de trois expériences pour BIM et deux pour PUMA. (D et E) Les cellules OAW42-R sont réensemencées 48 heures après transfection et traitées au Cisplatine le lendemain (72h après transfection). Les photographies du tapis cellulaire et l'analyse par cytométrie en flux sont réalisées 72 h après le traitement au Cisplatine (soit 6 jours après la transfection). Les résultats sont représentatifs de 3 expériences (D). Histogramme de la répartition dans le cycle cellulaire par cytométrie en flux. Moyennes +/- SEM issues de trois expériences indépendantes (E).

*PUMA n'est pas impliqué dans la sensibilisation au Cisplatine induite par miR-27a-5p et l'inhibition d'UBE2N.*

L'inhibition d'UCA1 permet la libération du miR-27a-5p, qui à son tour va se lier à UBE2N, sa cible directe, et favoriser ainsi l'augmentation de l'expression de BIM et sensibiliser les cellules OAW42-R au Cisplatine. Nous avons donc cherché à déterminer si l'expression de PUMA était également induite par ce biais. Nous avons transfecté les cellules avec siUCA1, ou miR-27a-5p ou avec siUBE2N et avons constaté une augmentation de l'expression de la protéine PUMA suite à l'inhibition d'UCA1, par western-blot, mais n'avons constaté aucune augmentation de son expression en présence du miR-27a-5p et une très faible suite à l'inhibition d'UBE2N (**Figure 2A et 2B**). Ces résultats indiquent que (i) la sensibilisation des cellules OAW42-R au Cisplatine par l'inhibition d'UBE2N est indépendante de PUMA, et que (ii) l'inhibition d'UCA1 induit un stress cellulaire indépendant de son rôle de ceRNA vis-à-vis de miR-27a-5p et de l'inhibition d'UBE2N.



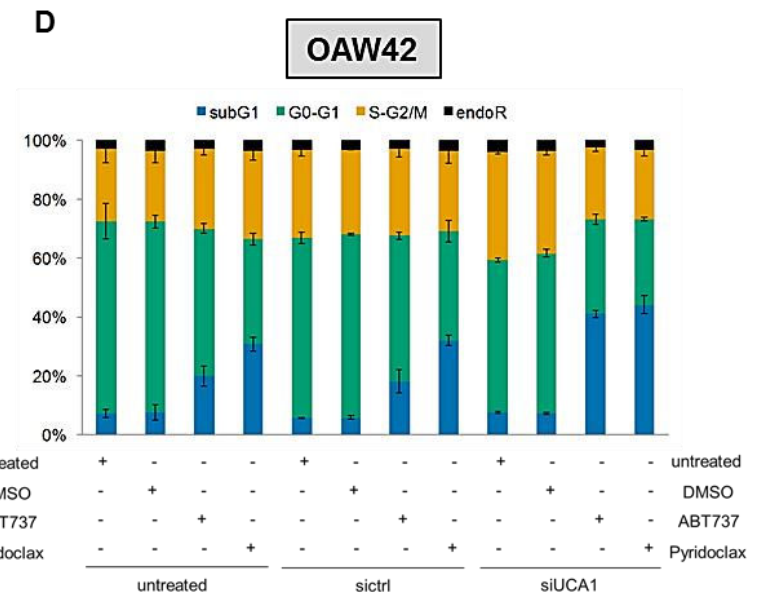
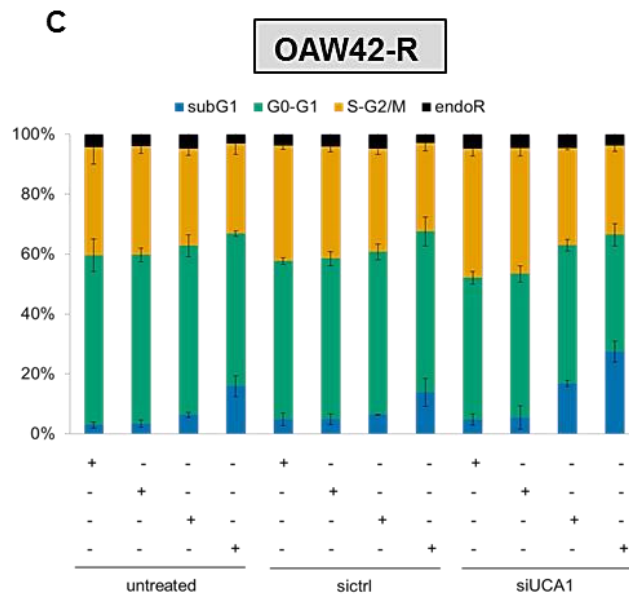
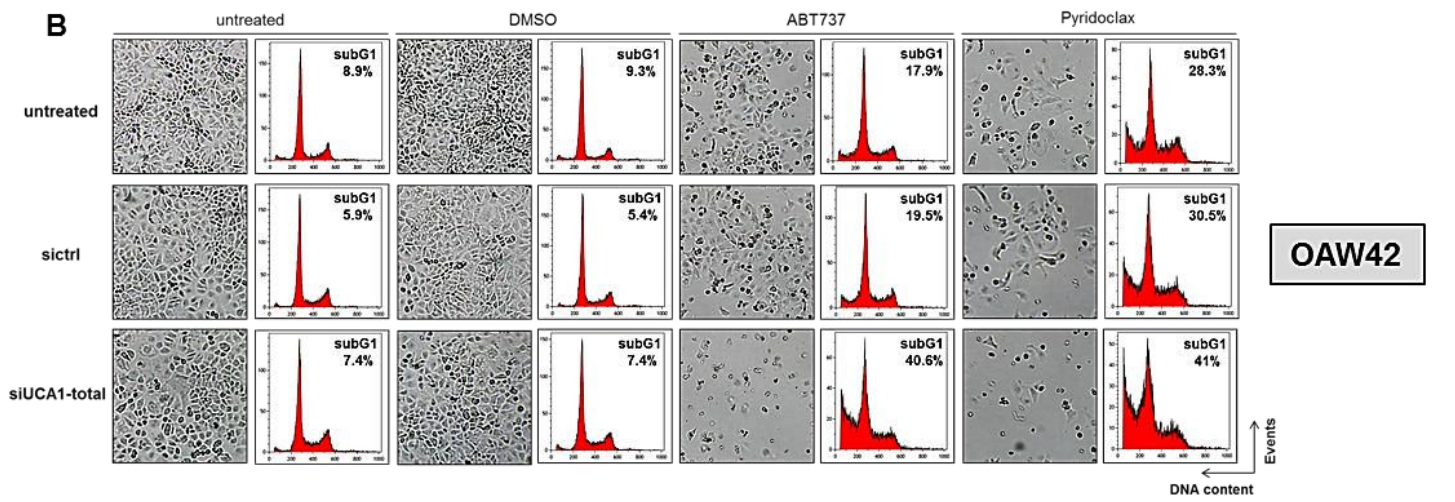
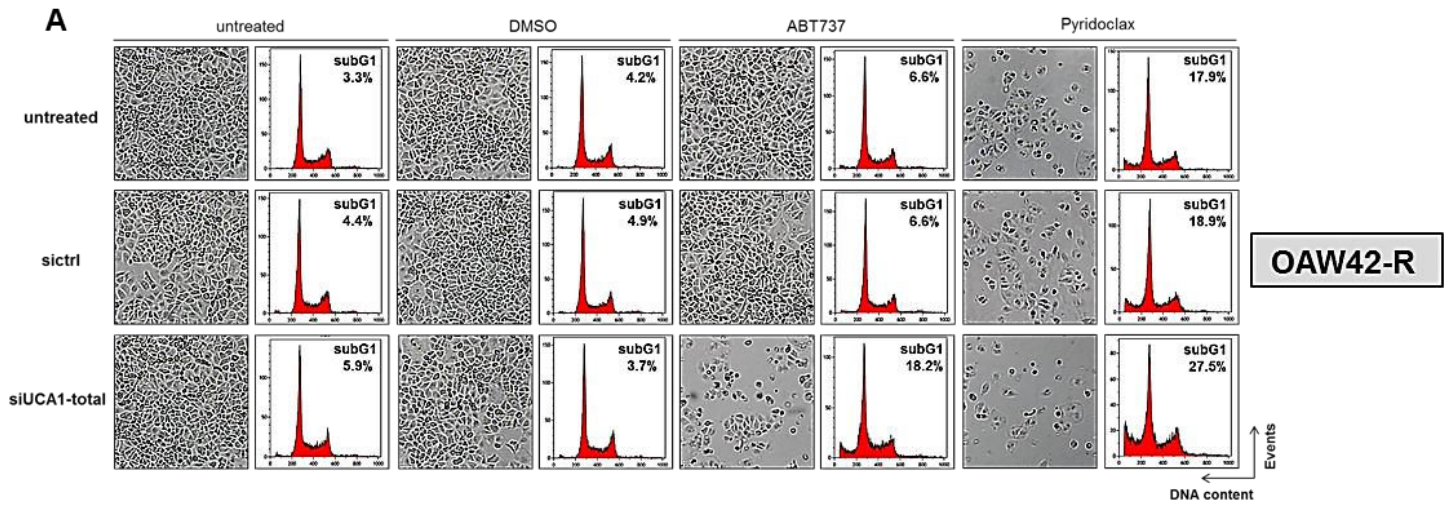
**Figure 2 : la sensibilisation des cellules OAW42-R au Cisplatine après transfection du miR-27a-5p ou l'inhibition d'UBE2N n'est pas associée à l'augmentation de PUMA.**

(A et B) Niveaux d'expression protéique de PUMA par western blot, l'actine est utilisée comme un contrôle de charge. 72 heures après transfection avec les siRNA indiqués dans les cellules OAW42-R. Les valeurs de densitométrie annotées sous les puits correspondants, sont relatives à l'actine et ont été calculées par le logiciel ImageJ, représentant la moyenne de trois expériences pour BIM et deux pour PUMA.

*L'inhibition d'UCA1 permet la sensibilisation des cellules OAW42 et OAW42-R aux BH3 mimétiques ABT-737 et Pyridoclox.*

L'équilibre dans les cellules tumorales ovariennes entre les membres pro- et anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 est un déterminant reconnu du devenir de ces cellules, survie ou mort cellulaire (Pétigny-Lechartier et al., 2017; Villedieu et al., 2007). De manière générale, les cellules tumorales ovariennes sont soumises à un fort stress oncogénique, induisant l'expression de pro-apoptotiques de la famille Bcl-2. La surexpression des membres anti-apoptotiques, notamment de Bcl-xL et Mcl-1 dans les cancers de l'ovaire, protège ces cellules tumorales contre la mort en séquestrant les pro-apoptotiques par des interactions directes au niveau de leur domaine BH3 (Brotin et al., 2010). C'est en prenant appui sur ce concept que le laboratoire a développé des stratégies visant à induire la mort des cellules tumorales ovariennes en modulant l'activité et/ou l'expression des membres de la famille Bcl-2 afin de faire pencher la balance pro/anti apoptotiques vers la mort cellulaire. Parmi ces stratégies, les molécules BH3-mimétiques visent à inhiber l'activité de membres anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 en se liant au niveau de leur domaine BH3, libérant ainsi les pro-apoptotiques ou empêchant leur fixation. Parmi ces BH3 mimétiques, l'ABT-737 est un inhibiteur sélectif des anti-apoptotiques Bcl-2 et Bcl-xL auxquels il se lie afin d'inhiber leur activité (Oltersdorf et al., 2005). Un autre BH3 mimétique, développé au laboratoire est le Pyridoclox, un inhibiteur sélectif de l'anti-apoptotique Mcl-1 (Hedir et al., 2018). Etant donné que la sensibilisation des cellules OAW42-R au Cisplatine par l'inhibition d'UCA1 dépend de l'augmentation de l'expression de BIM et plus marginalement de PUMA, il nous a semblé pertinent d'explorer la possible sensibilisation à l'ABT-737 et au Pyridoclox par inhibition d'UCA1.

Les cellules OAW42 et OAW42-R ont été transfectées avec siUCA1 ou sictrl, 72H après la transfection elles ont été traitées avec soit l'ABT-737, soit le Pyridoclox. Suite au traitement avec l'ABT-737, aucun effet n'est observé dans la lignée OAW42-R, tandis que dans les cellules OAW42 on observe un effet en agent seul avec une augmentation de la proportion d'évènements subG1 (18% en moyenne) comparé aux conditions contrôles (6% en moyenne) et une diminution du tapis cellulaire. L'inhibition d'UCA1 a engendré une sensibilisation de ces deux lignées cellulaires à l'action de l'ABT-737, forte pour la lignée OAW42-R et très forte pour la lignée OAW42, avec une diminution de la confluence, du nombre de cellules, une augmentation du nombre de cellule détachée du tapis ainsi que du pourcentage d'évènements subG1 comparé aux conditions contrôles (en moyenne, 17% vs 6% et 41% vs 18% dans OAW42-R et OAW42 respectivement) (**Figure 3A, 3B, 3C et 3D**). Suite au traitement de ces deux lignées cellulaire par le Pyridoclox, un effet plus important a été constaté en agent seul comparé à celui de l'ABT-737.



**Figure 3 : L'inhibition d'UCA1 sensibilise les cellules OAW42 et OAW42-R aux BH3-mimétiques ABT-737 et Pyridoclox.**

(**A et C**) Les cellules OAW42-R sont réensemencées 48 heures après transfection et traitées avec l'ABT-737 ou le Pyridoclox le lendemain (72h après transfection). Des photographies du tapis cellulaire et l'analyse par cytométrie en flux sont réalisées 72 h après le traitement avec l'ABT-737 ou le Pyridoclox (soit 6 jours après la transfection). Les résultats sont représentatifs de 3 expériences (**A**). Histogramme de la répartition dans le cycle cellulaire par cytométrie en flux. Moyennes +/- SEM issues de trois expériences indépendantes (**C**). (**B et D**) Les cellules OAW42 sont réensemencées 48 heures après transfection et traitées avec l'ABT-737 ou le Pyridoclox le lendemain (72h après transfection). Des photographies du tapis cellulaire et l'analyse par cytométrie en flux sont réalisées 72 h après le traitement avec l'ABT-737 ou le Pyridoclox (soit 6 jours après la transfection). Les résultats sont représentatifs de 3 expériences (**B**). Histogramme de la répartition dans le cycle cellulaire par cytométrie en flux. Moyennes +/- SEM issues de trois expériences indépendantes (**D**).

On observe une diminution de la confluence cellulaire, ainsi que l'augmentation de la proportion d'évènements subG1, comparés aux conditions contrôles (en moyenne, 14% vs 5% et 32% vs 6% dans OAW42-R et OAW42 respectivement). L'inhibition d'UCA1 dans ces deux lignées a permis leur sensibilisation à l'action du Pyridoclox avec une diminution importante de la confluence par comparaison avec les conditions contrôles ainsi que l'augmentation de la proportion d'évènements subG1 par comparaison avec les conditions contrôles (27.5% vs 14% et 44% vs 32% dans OAW42-R et OAW42 respectivement (**Figure 3A, 3B, 3C et 3D**)).



## **B. L'inhibition d'UCA1 perturbe les mécanismes de réparation de l'ADN.**

*L'inhibition d'UCA1 module l'expression d'un panel de gènes impliqués dans les voies de réparation de l'ADN.*

Suite à l'analyse des DEGs après inhibition d'UCA1 dans les OAW42-R, nous avons identifié UBE2N, connu notamment pour son implication dans la détection des dégâts à l'ADN comme un acteur de la sensibilisation au cisplatine. Suite à une analyse des DEGs sur le logiciel String, permettant de réaliser des réseaux d'interactions protéines-protéines, il nous a été possible d'identifier un réseau d'interaction comprenant de nombreux gènes appartenant aux voies de réparation de l'ADN. Plus d'une dizaine de gènes sont significativement différentiellement exprimés, tel que RPA1 inhibé d'un facteur 2.57 ( $p=0.005$ ), RAD51B inhibé d'un facteur 1,82 ( $p=0.03$ ) ou encore H2AFX inhibé d'un facteur 1,59 ( $p=0.022$ ) (**Figure 4A et 4B**).

*L'inhibition d'UCA1 induit des altérations de la dynamique de réparation de l'ADN.*

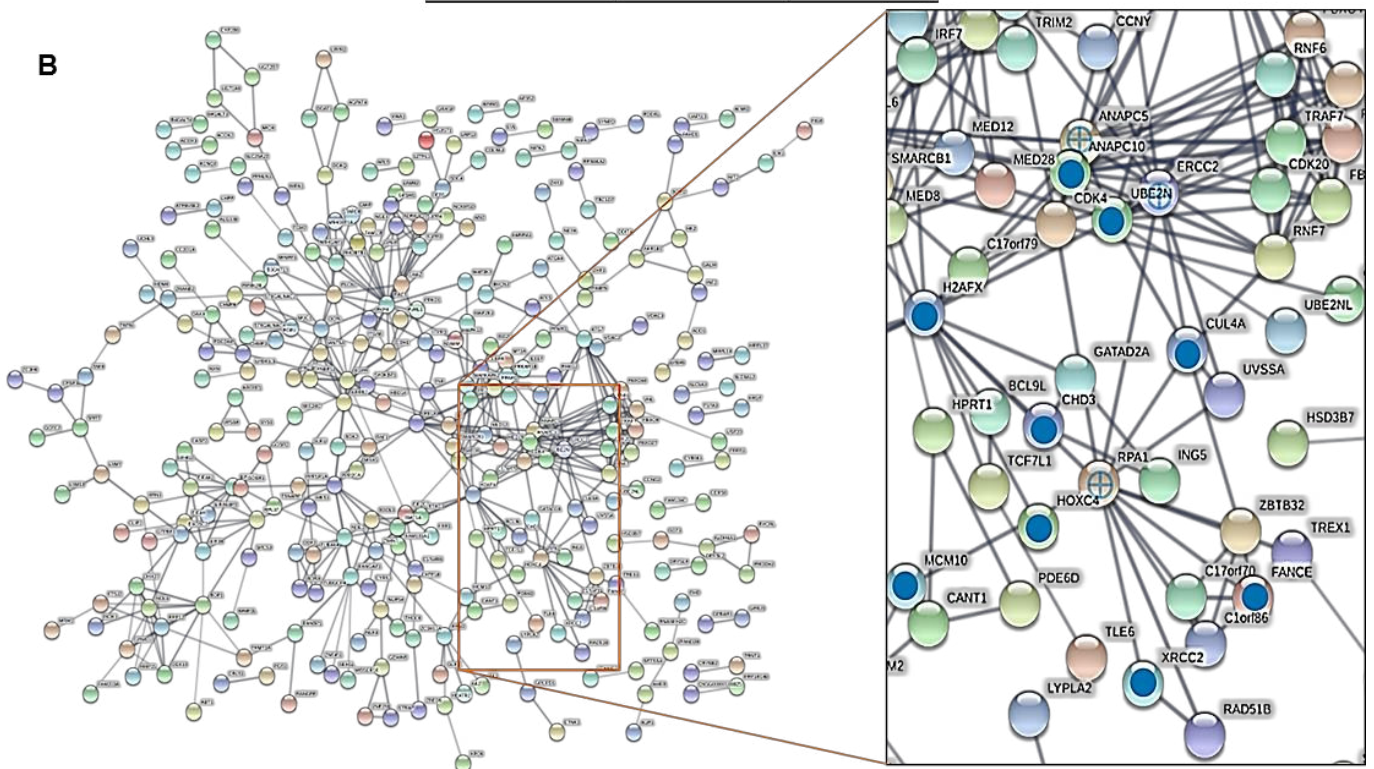
Nous avons ainsi exploré de possibles perturbations de la dynamique de réparation de l'ADN après inhibition d'UCA1. Tout d'abord, nous avons étudié la distribution subcellulaire de RAD51, connu pour son implication dans la réparation de l'ADN par recombinaison homologue (HR) suite à des cassures doubles brins (DSBs). RAD51 est alors observable au sein de foci nucléaires siège de la réparation. Nous avons réalisé une transfection des cellules avec siUCA1 analysé le marquage RAD51 par immunofluorescence 72h après. Nous avons compté le nombre de noyaux cellulaire positifs pour la présence de foci, montrant une diminution, de 34% en moyenne mais d'amplitude variable de la proportion de noyaux marqués en réponse à l'inhibition d'UCA1 (**Figure 5A et 5B**). De manière intéressante nous avons également constaté une augmentation, parfois importante, du marquage cytoplasmique des cellules pour RAD51 après inhibition d'UCA1 (**Figure 5A**), qui n'est pourtant pas en lien avec une variation des quantités de protéines RAD51, analysées par western blot (**Figure 5C**), suggérant sa relocalisation cytoplasmique. Nous avons également étudié la présence de foci nucléaires de  $\gamma$ -H2AX, connu pour son rôle dans la détection des dégâts à l'ADN suite à des DSB, en amont de RAD51. Nous avons montré une diminution, de 33% en moyenne de la proportion de noyaux marqués suite à l'inhibition d'UCA1 (**Figure 5D et 5E**).

OAW42-R

A

Gene symbol	Fold change	P-Value
<b>UBE2N</b>	<b>6,15</b>	<b>0.007</b>
HOXC4	5,15	0,03
RPA1	2,57	0.005
MCM10	1,97	0.004
ANAPC10	1,85	0.025
RAD51B	1,82	0.030
RELA	1,73	0.010
CUL4A	1,68	0.013
FANCE	1,65	0.046
H2AFX	1,59	0.022
CHD3	1,57	0.015
XRCC2	1,48	0.028
TONSL	1,47	0.043
SMARCB1	1,42	0.050
ANAPC5	1,36	0.020
ERCC2	1,28	0.040

B



**Figure 4 : L'inhibition d'UCA1 inhibe l'expression de nombreux gènes des voies de réparation de l'ADN.**

(A) Tableau représentant les gènes significativement réprimés (DEGs) après inhibition d'UCA1 et impliqués dans les mécanismes de la réparation de l'ADN. P-value corrigée par la méthode Benjamini-Hochberg. (B) Représentation du réseau d'interactions protéines-protéines réalisée sur le logiciel String à partir de l'ensemble des gènes réprimés après inhibition d'UCA1. La partie agrandie met en évidence le cluster comprenant les gènes impliqués dans les mécanismes de réparation.



Le niveau d'expression de la protéine H2AX a également été déterminé par western blot au cours du temps, mettant en évidence une augmentation de l'expression protéique à 48h et une légère diminution à 72h par rapport aux conditions contrôles, ce dernier point correspondant aux données d'expression issues du microarray (**Figure 5F**). Nous avons ensuite cherché à mettre en évidence un effet au niveau de la phosphorylation de la protéine ATM, agissant en amont de  $\gamma$ -H2AX dans la reconnaissance des cassures doubles brins. Nous avons cette fois observé une légère augmentation, d'environ 31% en moyenne, du nombre de noyaux marqués positivement avec des foci P-ATM dans les cellules OAW42-R suite à l'inhibition d'UCA1 (**Figure 5G et 5H**).

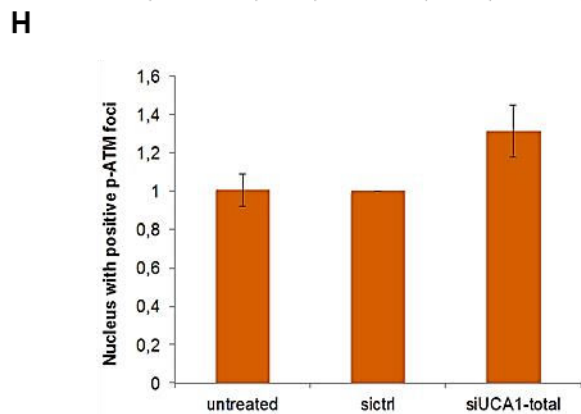
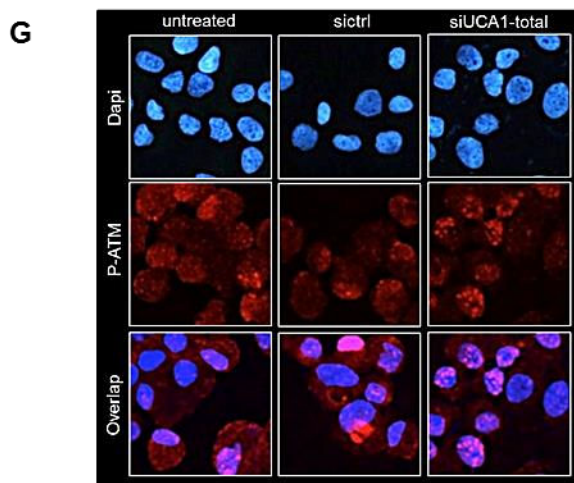
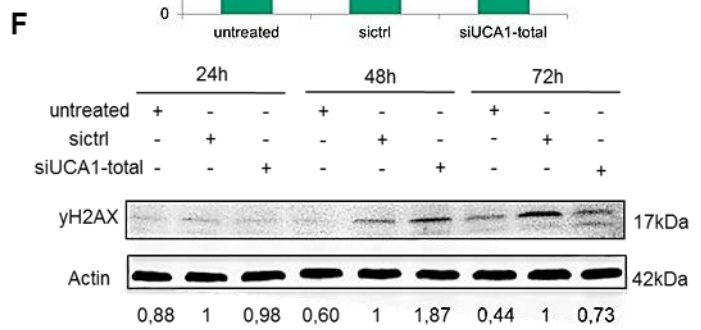
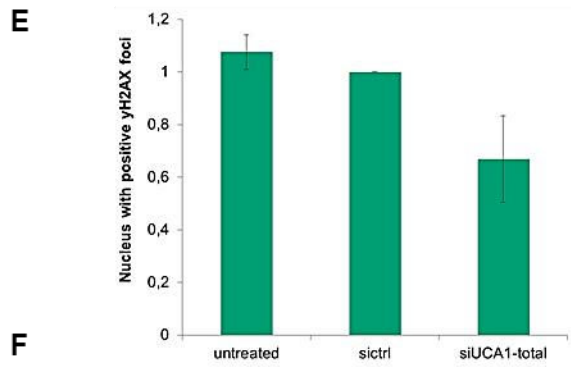
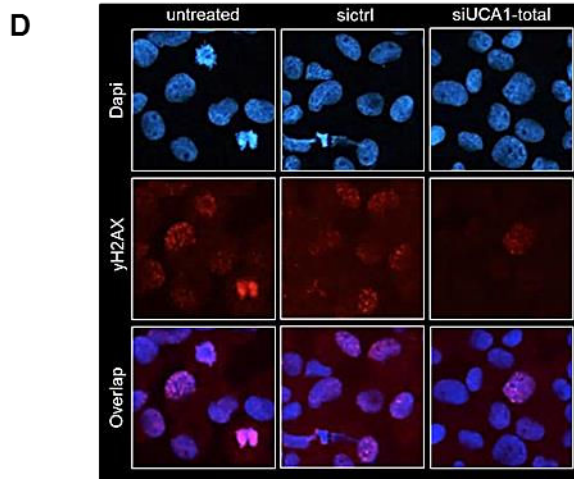
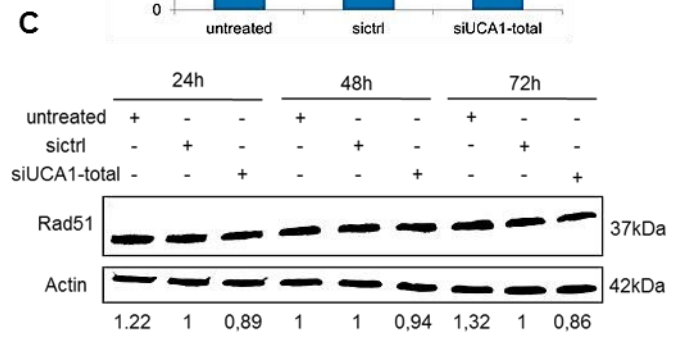
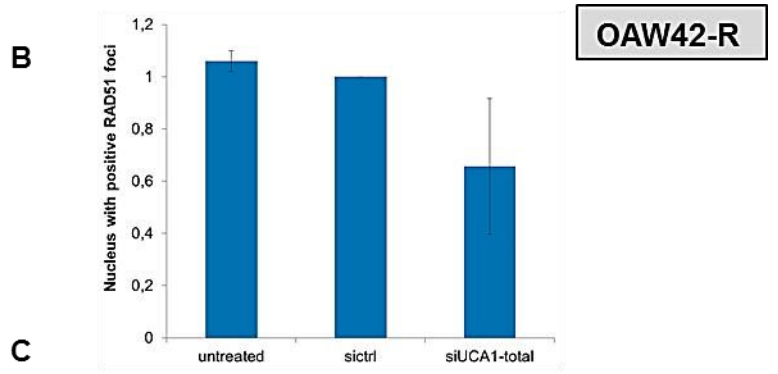
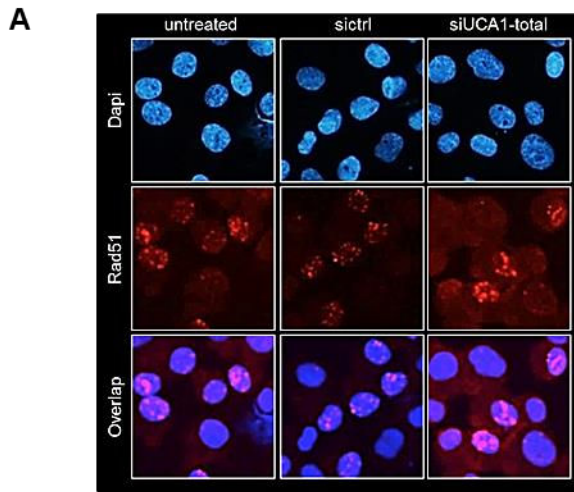
Dans l'ensemble, nous avons pu mettre en évidence une altération de la voie de réparation de l'ADN par l'inhibition d'UCA1. Cependant l'identification du mécanisme exact de son action à ce niveau, et du rôle joué par UBE2N dans ce contexte, nécessitera des expérimentations complémentaires.

***Figure 5 : L'inhibition d'UCA1 perturbe la formation de foci nucléaires de RAD51,  $\gamma$ H2AX et P-ATM.***

72 heures après transfection des cellules OAW42-R avec siUCA1, immunofluorescence avec les anticorps indiqués. (**A, D et G**) Marquage par un anticorps anti-RAD51, anti- $\gamma$ H2AX, ou anti-P-ATM, anticorps secondaire, la rhodamine, fluorescent dans le rouge, noyaux colorés au Dapi, fluorescent dans le bleu. L'analyse des images a été réalisée sur le logiciel ImageJ. Images représentatives de trois expériences indépendantes. (**B, E et H**) Histogramme représentant la proportion de noyaux marqués positivement avec des foci, RAD51,  $\gamma$ H2AX, P-ATM. Données relatives au siCtrl. Moyennes +/- SEM issues de trois expériences indépendantes pour RAD51 et  $\gamma$ H2AX et deux expériences indépendantes pour P-ATM. (**C et F**) Les cellules OAW42-R ont été transfectées, les niveaux d'expression protéique de RAD51 et  $\gamma$ H2AX ont été déterminés par western-blot 24, 48 et 72 heures après la transfection. Les valeurs de densitométrie annotées sous les puits correspondants sont relatives à l'actine et sont représentatives de cette seule expérience, elles ont été calculées par le logiciel ImageJ.

*L'inhibition d'UCA1, la transfection de miR-27-5p et l'inhibition d'UBE2N, permettent la sensibilisation des cellules OAW42-R à l'olaparib, un inhibiteur de PARP.*

Les inhibiteurs de PARP (PARPi) suscitent actuellement un grand intérêt pour le traitement des cancers de l'ovaire, comme expliqué dans l'introduction bibliographique de ce manuscrit. Le rôle important joué par UBE2N dans l'action chimiosensibilisatrice de l'inhibition d'UCA1, et les fonctions de cette protéine dans les mécanismes de réparation de l'ADN, ainsi que la perturbation de ces mécanismes induite par l'inhibition d'UCA1, dont le lien avec UBE2N reste à préciser, il semblait particulièrement pertinent d'étudier une possible sensibilisation à l'action des PARPi par l'inhibition d'UCA1.



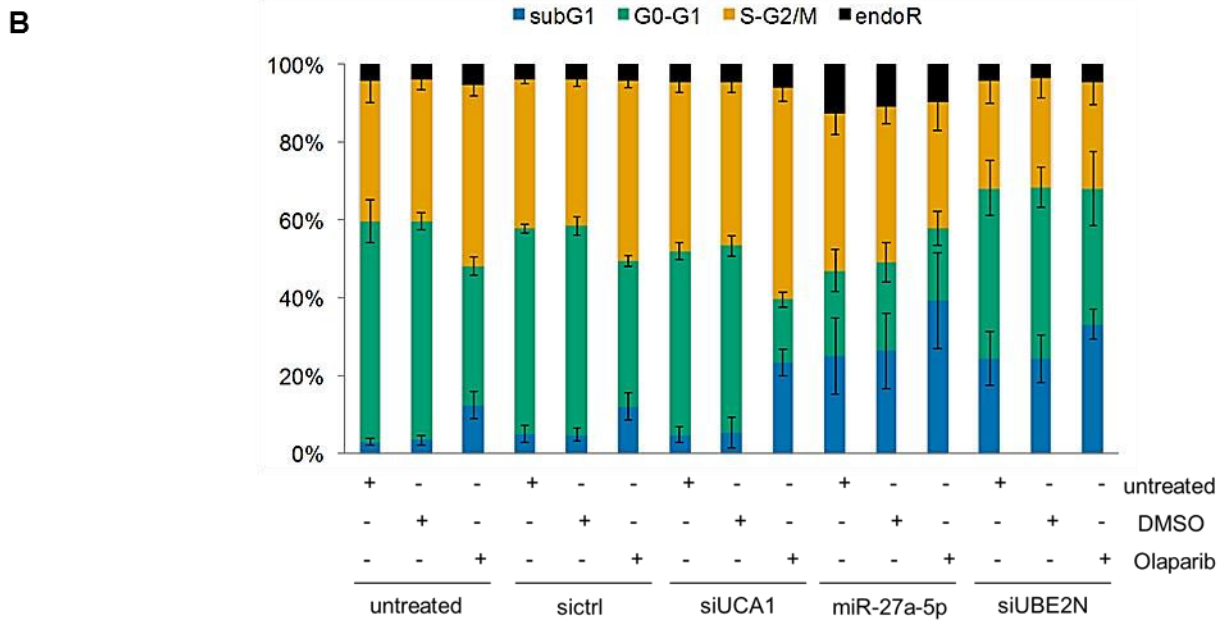
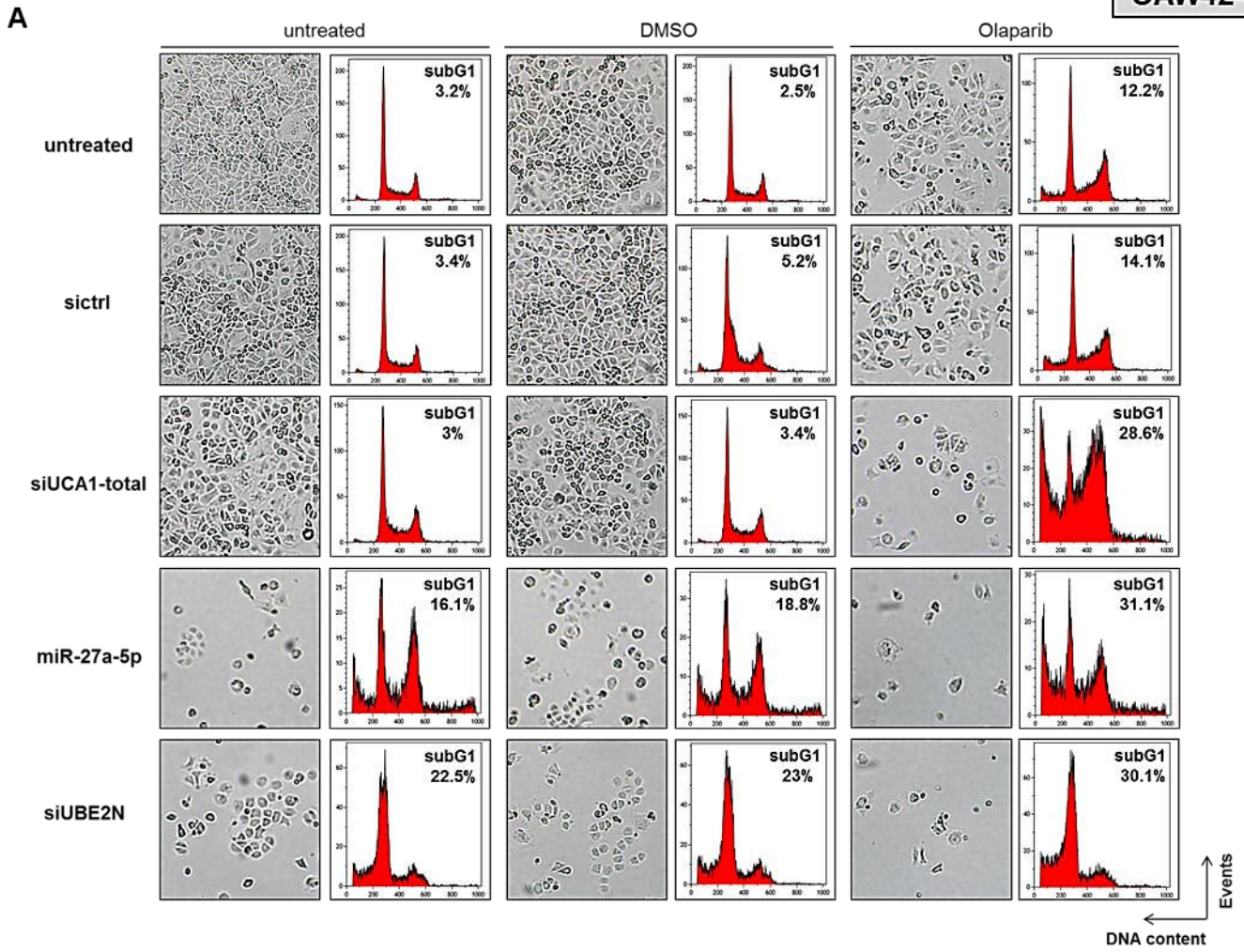
Le traitement par Olaparib, un PARPi ayant récemment reçu l'AMM pour le traitement des cancers ovariens en récurrence sensibles au platine, de la lignée cellulaire OAW42-R, 72h après sa transfection avec sictrl et cela pendant 72h, induit une diminution modérée de la confluence du tapis cellulaire, un léger blocage dans la phase S-G2/M du cycle cellulaire et une proportion d'évènements Sub-G1, en moyenne, de 12% vs 3% (**Figure 6A et 6B**). Lorsque le traitement à l'olaparib fait suite à une inhibition d'UCA1, on observe une forte sensibilisation avec une diminution importante de la confluence du tapis cellulaire, un blocage des cellules dans la phase S-G2/M du cycle cellulaire et une proportion d'évènements Sub-G1 en moyenne de 23% vs 12% pour la condition sictrl (**Figure 6A et 6B**). Lorsque le traitement à l'olaparib fait suite à la transfection du miR-27a-5p ou du siUBE2N, une sensibilisation est également observée, avec notamment la quasi-disparition du tapis cellulaire, qui est toutefois déjà fortement diminué après la transfection avec miR-27a-5p et siUBE2N par comparaison avec sictrl. Les modifications de la distribution des cellules dans le cycle cellulaire concernent principalement une augmentation modeste du nombre d'évènements Sub-G1, en moyenne : 12%, 26% et 24% pour l'olaparib, miR-27a-5p et siUBE2N seuls respectivement, et 39% et 33% pour l'olaparib combiné au miR-27a-5p et à siUBE2N respectivement (**Figure 6A et 6B**).

La sensibilisation des cellules OAW42-R semble ainsi suivre une voie identique entre siUCA1, miR-27a-5p et siUBE2N, malgré un effet plus important de miR27a-5p et siUBE2N en agents seuls, qui peut s'expliquer par une inhibition d'UBE2N bien plus forte qu'avec siUCA1 (**Cf résultats précédents, manuscrit de l'article**)

**Figure 6 :** *L'inhibition d'UCA1, la transfection de miR27a-5p et l'inhibition d'UBE2N sensibilisent les cellules OAW42-R à un inhibiteur de PARP, l'olaparib.*

(**A et B**) Les cellules OAW42-R sont ré-ensemencées 48 heures après transfection et traitées avec l'olaparib le lendemain (72h après transfection). Des photographies du tapis cellulaire et l'analyse par cytométrie en flux sont réalisées 72 h après le traitement à l'olaparib (soit 6 jours après la transfection). Les résultats sont représentatifs de 3 expériences (**A**). Histogramme de la répartition dans le cycle cellulaire par cytométrie en flux. Moyennes +/- SEM issues de trois expériences indépendantes (**B**).

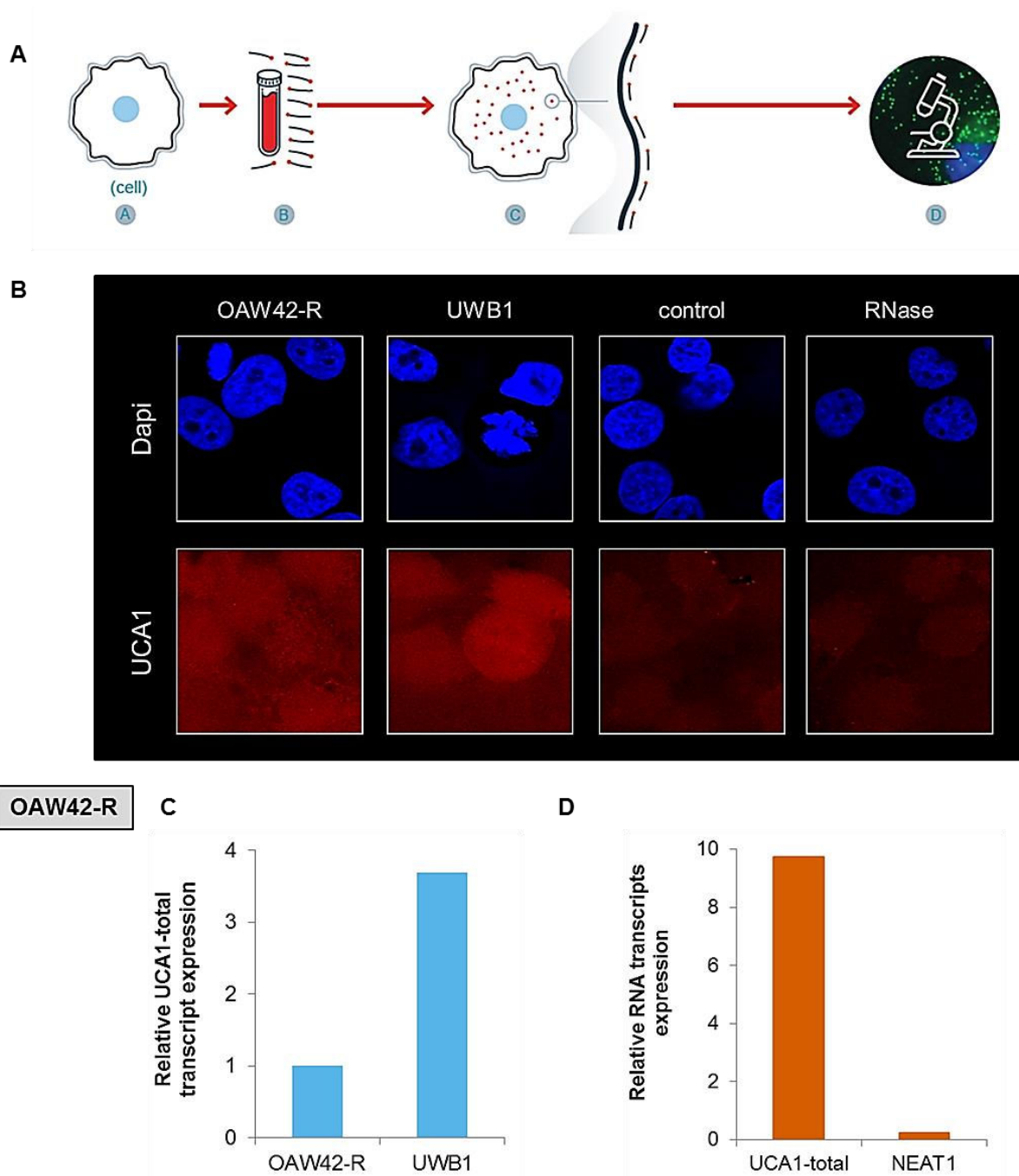
OAW42-R



## C. Les lncRNAs tumoraux comme potentiels marqueurs pronostiques.

*Le lncRNA NEAT1, et non UCA1, est mis en évidence par RNA-FISH dans des échantillons tumoraux de l'ovaire inclus en paraffine.*

Etant donné le rôle de divers lncRNAs dans la chimiorésistance dans de nombreux modèles, et plus particulièrement d'UCA1 dans la chimiorésistance des cellules cancéreuses ovariennes OAW42-R, nous avons exploré la possibilité de l'utiliser dans un rôle de biomarqueurs pronostique dans les tumeurs de patientes atteintes d'un cancer ovarien, par la mise en place d'un protocole de RNA-FISH. Cette technique permet d'identifier la localisation des ARNs dans les cellules tumorales : cellule cancéreuse, stromale, immunitaire... Ainsi, il est possible de s'affranchir des éventuelles variations d'expressions observées sur un échantillon tumoral complet par RT-qPCR dues à une proportion hétérogène de cellules tumorales. La méthodologie choisie utilise plusieurs dizaines de sondes fluorescentes de petite taille (20 nt environ) afin de marquer un ARN spécifique sur toute sa longueur, la multiplicité des sondes permettant d'assurer la spécificité du signal détecté (**Figure 7A**). Nous avons effectué un marquage d'UCA1 par RNA-FISH (**Figure 7B**), sur cellules adhérentes OAW42-R et UWB1, deux lignées exprimant fortement UCA1-total, avec pour les UWB1 une expression environ 4 fois supérieure à celle des OAW42-R (**Figure 7C**). Nous avons constaté un marquage fluorescent diffus, autant au niveau du compartiment nucléaire, que cytoplasmique et surtout très similaire aux conditions sans sonde ou avec un traitement préliminaire des échantillons à la RNase (**Figure 7B**), concluant à l'absence de marquage spécifique pour UCA1 avec les sondes et le protocole utilisés. Toutefois, le marquage par RNA-FISH du lncRNA NEAT1, utilisé en premier lieu comme contrôle positif, pourtant 10 fois moins exprimé qu'UCA1 (**Figure 7D**), a mis en évidence un marquage caractéristique de NEAT1 laissant apparaître des foci nucléaires (**Figure 8A**).

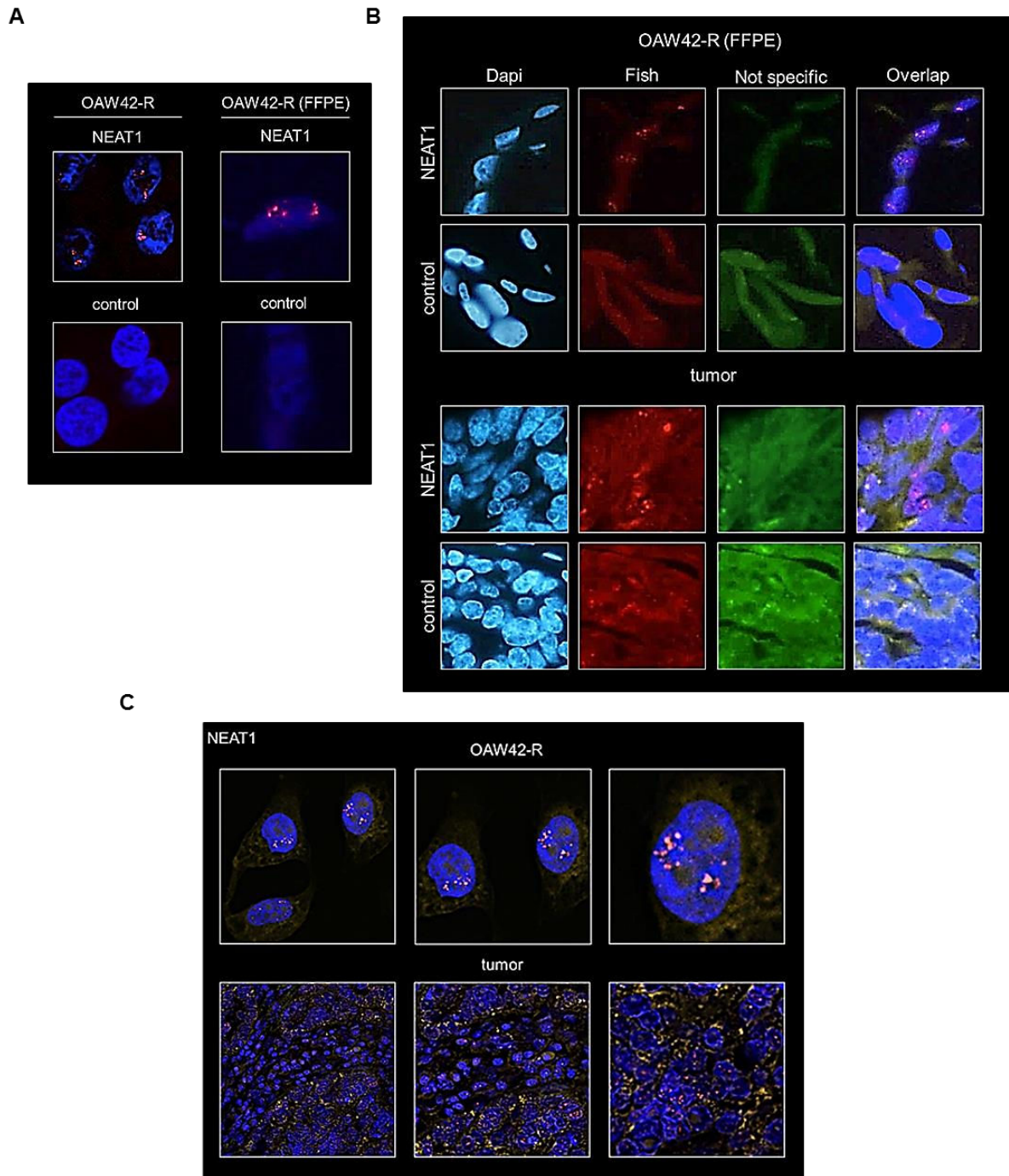


**Figure 7 : L'approche de RNA-FISH choisie ne permet pas la détection d'UCA1**

(A) Représentation schématique du protocole expérimental de RNA-FISH par Stellaris, démontrant en A une cellule, en B la préparation des sondes spécifiques marquée au Quasar-570 et hybridées aux lncRNAs d'intérêt, en C, la détection de la fluorescence correspondante à la fixation de multiples sondes sur le lncRNA et en (D) la prise de photos par microscope, scanner. (B) Images au microscope à fluorescence de RNA-FISH sur des cellules OAW42-R cultivées sur lamelles, avec des sondes contre UCA1. Absence de mise en évidence d'un signal spécifique, noyaux colorés au Dapi, fluorescent dans le bleu (C) Histogramme représentant l'expression d'UCA1, normalisée par rapport à SDHA, relative aux niveaux d'UCA1 dans les cellules OAW42-R, dans les cellules OAW42-R et UWB1. (D) Histogramme représentant l'expression d'UCA1 et de NEAT1 dans les cellules OAW42-R, normalisée par rapport à SDHA, relative aux niveaux de NEAT1.

NEAT1 étant également connu pour ses propriétés oncogéniques dans divers cancers, dont les cancers de l'ovaire (Ding et al., 2017), nous avons décidé de mettre en place les conditions de l'étude de ses niveaux d'expression dans des échantillons tumoraux de cancers de l'ovaire. Le marquage de NEAT1 dans des cellules OAW42-R fraîchement fixées, ou incluses en paraffine (FFPE) est caractéristique (nucléaire sous forme de foci), et spécifique (**Figure 8A**).

Nous avons ensuite cherché à réaliser une RNA-FISH pour NEAT1 sur des coupes de tumeurs de patientes atteintes d'un cancer ovarien, en parallèle avec des cellules OAW42-R incluses en paraffine. Nous avons mis en évidence un marquage de NEAT1 dans les cellules et dans plusieurs échantillons de tissus tumoraux. Toutefois, une fraction importante du signal s'est avérée non spécifique, comme illustré par les images prises sur un canal de fluorescence pour lequel aucun fluorochrome n'est présent sur les lames, rendant impossible dans ces conditions une quantification de l'expression de NEAT1 par RNA-FISH (**Figure 8B** et **données non présentées**). La mise à disposition pour démonstration d'un dispositif de scanner de lames de microscope à fluorescence (équipement en cours d'acquisition au laboratoire), équipé d'un logiciel de traitement d'image performant, nous a permis d'effectuer divers essais de traitement du signal afin de discriminer le signal spécifique et de l'isoler du bruit de fond. Ces essais ont donné des résultats particulièrement encourageants (**Figure 8C**) et nous permettent d'envisager à terme la possibilité de quantifier les niveaux d'expression de NEAT1, ou d'autres lncRNAs, dans les cellules tumorales ovariennes.



**Figure 8 :** Mise en évidence d'un signal spécifique à NEAT1 par RNA-FISH dans des échantillons de cancers ovariens.

(A) Images au microscope à fluorescence de RNA-FISH sur des cellules OAW42-R cultivées sur lamelles, avec des sondes contre NEAT1 ou sans sondes (ctrl), noyaux colorés au Dapi, fluorescent dans le bleu (gauche), même protocole sur des cellules préalablement incluses en paraffine (droite). (B) Images au microscope à fluorescence RNA-FISH sur des cellules OAW42-R incluses en paraffine, avec des sondes contre NEAT1 ou sans sondes (ctrl), noyaux colorés au Dapi, fluorescent dans le bleu. Le canal vert, pour lequel aucun fluorochrome n'est présent, montre la présence d'un signal fluorescent non-spécifique (haut). Même protocole pour un échantillon tumoral, représentatif de 3 échantillons traités (bas). (C) Même protocole que (B), images prises au scanner à fluorescence haute résolution et retraitées avec le logiciel associé.





Les méthodes utilisées dans le cadre de la partie I des résultats (I. Article: The long non-coding RNA 'UCA1' modulates the response to chemotherapy of ovarian cancer through direct binding to miR-27a-5p and control of UBE2N levels.), sont détaillées dans la section « Material and Methods » du manuscrit associé. Les méthodes supplémentaires mises en œuvre pour les parties II, III, et IV, sont décrites ci-après.

## Matériel et Méthodes

---

### **Lignée cancéreuse ovarienne :**

La lignée cancéreuse ovarienne *BRCA* muté et sensible au Cisplatine UWB1.289 (ATCC® CRL-2945™), a été établie à partir d'un carcinome ovarien séreux et elle a été obtenue chez ATCC (LGS Standards, Molsheim, France). Cette lignée cellulaire a été cultivée dans un milieu contenant 50% de milieu RPMI-1640, 50% de MEGM (Mammary Epithelial Growth Medium de Clonetics/Lonza (MEGM Bullet Kit; CC-3150)) et du sérum de veau fœtal à une concentration finale de 3% et a été maintenue à 37°C dans une atmosphère humide à 5% de CO<sub>2</sub>.

### **Transfection :**

La transfection des cellules OAW42 et OAW42-R avec un siRNA ciblant PUMA, annoté siPUMA et obtenu chez Eurogentec (Liège, Belgique), suit le même protocole que celui décrit dans le 'matériels et méthodes' du manuscrit de l'article « The long non-coding RNA 'UCA1' modulates the response to chemotherapy of ovarian cancer through direct binding to miR-27a-5p and control of UBE2N levels ».

<b>Gene</b>	<b>siRNA</b>	<b>Séquence cible (5'-3')</b>
PUMA	siPUMA	5'- gccuguaagauacuguaua -3'

### **Traitements :**

Le traitement des cellules OAW42-R au Cisplatine, suit le même protocole que celui décrit dans le 'matériels et méthodes' du manuscrit de l'article.

Les cellules OAW42 et OAW42-R ont été réensemencées à 250000 cellules par flasque de 25cm<sup>2</sup>, 48h après transfection. Le lendemain, soit 72h après transfection, elles ont été traitées soit avec l'ABT737 (un inhibiteur de Bcl-xL), fourni par Selleckem (Houston, TX, USA), à une concentration de 5µM, soit avec le Pyridoclax (un inhibiteur de Mcl-1), mis au point au laboratoire (Hedir et al., 2018), à une concentration de 25µM. Les cellules OAW42-R ont également été traitées avec un inhibiteur de PARP, l'olaparib (S1060; AZD2281) acheté chez Selleckem (Souffelweyersheim, France), à une concentration de 150µM. Ces traitements ont été appliqués en continu pendant 72h dans du milieu DMEM supplémenté en sérum de veau fœtal. Les inhibiteurs, obtenus sous forme de poudre sont solubilisés dans du DMSO stérile et sont stockés à -20°C. Les conditions contrôles sont-elles réalisées dans du milieu DMEM contenant du DMSO dans les mêmes proportions que pour les inhibiteurs concernés.

### **Western-blot :**

L'analyse de l'expression des protéines par western-blot des cellules OAW42-R, avec les anticorps primaire anti-Puma (12450, Cell Signaling Technology), anti-RAD51 (ab133534; abcam) et anti- $\gamma$ H2AX (ab11174; abcam), suit le même protocole que celui décrit dans le 'matériels et méthodes' du manuscrit de l'article « The long non-coding RNA 'UCA1' modulates the response to chemotherapy of ovarian cancer through direct binding to miR-27a-5p and control of UBE2N levels ».

### **RT-qPCR :**

L'analyse de l'expression des ARNs par RT-qPCR des cellules OAW42-R et UWB1, suit le même protocole que celui décrit dans le 'matériels et méthodes' du manuscrit de l'article « The long non-coding RNA 'UCA1' modulates the response to chemotherapy of ovarian cancer through direct binding to miR-27a-5p and control of UBE2N levels ».

Les séquences de primers pour PUMA sont indiquées dans le tableau suivant :

<b>Genes</b>	<b>Primers</b>	<b>Sequence (5'-3')</b>
PUMA	Forward	5'ccaaacgtgaccactagcct3'
	Reverse	5'gatgaaggtgaggcaggcat3'

### **Immunofluorescence :**

Les cellules OAW42-R détachées par la trypsine sont ensuite déposées sur une lame de verre (polylysine-coated glass slide), grâce à un cytopspin (Shandon, USA) par cyto-centrifugation pendant 5 minutes à 800rpm. Les cellules ont ensuite été fixées grâce à une solution de formaldéhyde à 3,7%, composée de, formaldéhyde à 37% (F8775-25mL; Sigma Life Science), PBS 10X (14200-067; Gibco or P4417-50TAB; Sigma Life Science), de l'eau nucléase-free (DEPC: D5758-25ML; Sigma Life Science), pendant 10 minutes à température ambiante. Elles ont ensuite été rincées 3 fois au PBS 1X, perméabilisées avec du TritonX-100 (T9284-500ML; Sigma Life Science) à 0.5%, pendant 5 minutes à température ambiante. Elles sont rincées au PBS 1X et incubées dans du diluant d'anticorps primaire (10-0001; Ventana) pendant 30 minutes, puis placées dans un automate (Ventana), où chaque lame est recouverte de 100 $\mu$ l d'anticorps primaire pendant 1 heure à 37°C avec soit, RAD51 (ab133534, abcam),  $\gamma$ H2AX (ab11174; abcam) tous deux au 1/100000<sup>ème</sup>, soit P-ATM (14-9046-80; Invitrogen/thermoFisher) au 1/1000<sup>ème</sup>. L'automate réalise ensuite des cycles de coloration automatique, préprogrammé, incluant l'anticorps secondaire adapté issu de lapin (Omnimap Rabbit : 760-4311, Ventana), ou de souris (Omnimap Mouse : 760-4310, Ventana), puis avec la rhodamine H2O2 (253-4884; Ventana) et le Dapi (760-4196;

Ventana). A la fin du cycle, les lames sont lavées à l'eau tiède et au savon, puis montées avec du Fuoromount-G® (0100-01; southern Biotech). Les images des noyaux et des marqueurs fluorescents sont prises avec le microscope (Olympus BX51) et sont analysées sur le logiciel ImageJ. Le comptage de noyaux « positifs » ou « négatifs » pour la présence de foci est effectué en une seule fois par expérience afin d'assurer l'homogénéité de l'évaluation.

### **RNA-FISH sur cellules adhérentes :**

Les sondes RNA-FISH d'UCA1 (Stellaris® FISH probes, human UCA1 with Quasar® 570 Dye : SMF-2651 ; 5nmol) et de NEAT1 (Stellaris® FISH Probes, Human NEAT1 5' Segment with Quasar® 570 Dye : SMF-2036 ; 1nmol) sont resuspendues dans respectivement 400µl et 80µl de tampon TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8,0), formant chacune une solution stock de 12,5µM et sont conservées à -20°C. Les cellules OAW42-R et UWB1 sont cultivées en plaque 12 puits, sur lamelles, jusqu'à 80% de confluence. Les cellules ont ensuite été fixées grâce à une solution de formaldéhyde à 3,7%, comme décrit précédemment, pendant 10 minutes à température ambiante (RT). Elles sont ensuite placées dans une solution de glycine 1X pendant 5 minutes à RT afin de stopper l'action du formaldéhyde et de limiter l'auto-fluorescence. Elles sont rincées au PBS 1X et perméabilisées à l'éthanol 70% pendant 1 heure à 4°C. Les cellules sont ensuite rincées avec du Wash buffer A (WBA) (10% formamide dans 1X de WBA stellaris : SMF-WA1-60) pendant 5 minutes à RT, puis les cellules sont mises en contact avec 100µl de solution contenant la sonde (1µl) et un tampon d'hybridation (100µl) (10% formamide et tampon d'hybridation stellaris : SMF-HB1-10), pendant 2 à 16h, à 37°C dans une atmosphère humide, dans le noir. Les cellules sont à nouveau rincées avec le WBA à RT pendant 30 minutes, puis colorées au Dapi pendant 30 minutes à RT dans le noir. Les cellules sont incubées avec le Wash buffer B (WBB) (stellaris : SMF-WB1-20) pendant environ 5 minutes et montées sur lame avec du mowiol ou du Fuoromount-G® (0100-01; southern Biotech). Les images présentées ont été prises soit avec un microscope confocal (Nicolas Elie, plateforme CCMABio<sup>3</sup> : Centre de Microscopie Appliquée à la Biologie, Plateau technique d'Histo-Imagerie Quantitative, Structure Fédérative 4206 ICORE), soit avec un scanner de fluorescence Olympus en démonstration au laboratoire.

### **RNA-FISH sur FFPE (formalin-fixed paraffin-embedded) (cellules ou tissus) :**

Des culots de cellules OAW42-R et des échantillons de tumeurs de patientes atteintes de cancer ovarien, inclus en paraffine ont été utilisés. Les blocs paraffine sont coupés à 4 µm par un microtome et les tranches sont montées sur lames avec la présence d'eau ultra pure et déposée sur une plaque chauffante à 50°C, l'eau est ensuite retirée et la lame placée à

37°C pendant 1 nuit. Les lames sont ensuite réhydratées par incubation consécutive dans du Xylène 100% 1 fois 10 minutes, puis une fois 5 minutes, suivi de bain d'éthanol 100% pendant 10 minutes, puis à nouveau pendant 10 minutes et dans de l'éthanol 95% pendant 10 minutes. Les échantillons sont perméabilisés pendant 1 heure à RT dans de l'éthanol 70%, ils sont rincés dans du PBS-1X pendant environ 5 minutes et incubés ou non dans une solution préchauffée à 37°C de protéinase K (10µg/mL dans du PBS 1X) 20 minutes à 37°C. Les lames sont ensuite rincées deux fois au PBS 1X pendant 5 minutes. Les cellules ou tissus sont ensuite rincés avec du WBA pendant 5 minutes à RT, puis sont mis en contacts avec 200µl de solution contenant la sonde (2µl – les sondes utilisées sont présentées dans le paragraphe précédent) et un tampon d'hybridation (200µl), pendant 2 à 16h, à 37°C dans une atmosphère humide, dans le noir. Ils sont à nouveau rincés avec le WBA à RT pendant 30 minutes, puis colorés au Dapi pendant 30 minutes à RT dans le noir. Les lames sont incubées avec le WBB environ 5 minutes et montées avec du mowiol ou du Fluoromount-G® (0100-01; southern Biotech), avec lamelles. Les images des noyaux et des marqueurs fluorescents sont prises soit avec un microscope (Olympus BX51) soit avec un scanner de fluorescence Olympus en démonstration au laboratoire.

## **Discussion, conclusion et Perspectives**

---



La chimiorésistance des cancers de l’ovaire constitue un obstacle majeur pour l’amélioration de la prise en charge des patientes. La mise en place de nouvelles alternatives thérapeutiques permettant de contrer cette chimiorésistance, ainsi que la définition de biomarqueurs capables de prédire la réponse aux traitements, représentent un enjeu capital. A cet effet, la mise en évidence récente de la grande diversité des lncRNAs, de leurs modes d’action, et de leur influence dans la régulation de l’ensemble des grandes fonctions biologiques pourrait apporter un corpus de connaissance particulièrement pertinent.

### **Les lncRNAs en tant que marqueurs prédictifs de la réponse aux traitements**

La prédiction de la réponse des cancers de l’ovaire aux traitements disponibles revêt deux aspects principaux. En premier lieu, prédire la réponse à la chimiothérapie conventionnelle, un sel de platine associé à un taxane, pourrait permettre d’adresser les patientes vers des thérapies alternatives, possiblement innovantes, tout en évitant les lourds effets secondaires de la chimiothérapie en absence de perspective d’effets bénéfiques. En second lieu, et bien que le développement des thérapies ciblées soit moins avancé pour les cancers de l’ovaire que dans d’autres pathologies, ces thérapies nécessitent la mise en place de tests compagnons afin d’identifier les patientes pouvant en bénéficier.

La définition de biomarqueurs est possible à partir d’approches globales, sans a priori sur les aspects fonctionnels des gènes dont l’expression est liée à la réponse au traitement. L’avènement des approches transcriptomiques, notamment par séquençage à haut-débit a permis la proposition de nombreux lncRNAs comme possible marqueurs prédictifs de la réponse au cisplatine (Liu et al., 2015; Wang et al., 2015b, 2015d; Zheng et al., 2016). L’identification de biomarqueurs peut aussi résulter de l’identification d’un lien mécanistique entre un lncRNA et la réponse à une molécule précise, ce qui est notamment à l’origine de la proposition d’UCA1 comme un possible marqueur prédictif de la réponse au cisplatine (Fang et al., 2017; Wang et al., 2015b, 2017a), mais aussi de H19 ou HOTAIR (Liu et al., 2013; Wang et al., 2017b, 2015d; Yan et al., 2016; Zheng et al., 2016).

Toutefois, aucun lncRNAs n’est à ce jour utilisable en clinique comme marqueur prédictif de la réponse aux sels de platine ou aux inhibiteurs de PARP. L’utilisation de ces derniers en clinique est encore trop récente pour que des cohortes d’échantillons tumoraux traités par ces molécules soient disponibles pour la recherche de marqueurs prédictifs de la réponse. En ce qui concerne la réponse aux sels de platine, les études concernant les lncRNAs concernent en général des cohortes comportant des échantillons tumoraux provenant de sous-types histologiques, stades et grades hétérogènes. Etant donné les différences

importantes entre ces différents sous-types, il n'est pas surprenant que les potentiels biomarqueurs identifiés varient en fonction de la composition des cohortes (Mandilaras et al., 2017). D'autre part, la multiplicité des approches (PCR, microarray, séquençage haut-débit) et des méthodologies de normalisation ne joue pas en faveur de la reproductibilité qui permettrait de valider des marqueurs sur de multiples cohortes (Mandilaras et al., 2017).

En outre, l'analyse des niveaux d'expression d'un transcrit dans un échantillon tumoral se heurte à la proportion de cellules tumorales, stromales et immunitaires de l'échantillon considéré, qui peut ainsi s'avérer un facteur confondant important. Une approche intéressante pour contourner ce problème, applicable aux données de séquençage haut-débit, réside dans l'utilisation d'outils bioinformatique de déconvolution des données d'expression, permettant d'attribuer un profil d'expression transcriptomique à chaque élément de la tumeur (cellules cancéreuses, du stroma, immunitaires) (Newman et al., 2015; Yoshihara et al., 2013). Ces méthodologies, bien qu'encore peu employées, pourraient permettre d'exploiter au mieux les informations présentes dans les bases de données librement accessibles. Une autre approche plus directe pour s'affranchir de l'hétérogénéité des sous types cellulaires présents dans une tumeur consiste à utiliser des approches de marquage in situ.

C'est la raison pour laquelle nous avons mis en place au laboratoire la méthode de RNA-FISH. Bien que nos efforts n'aient pas permis la détection d'UCA1, nous avons pu mettre en place les conditions de l'étude de l'expression de NEAT1 en regard de la réponse à la chimiothérapie. Toutefois, NEAT1 est principalement connu pour être impliqué dans la réponse au paclitaxel dans les cancers de l'ovaire (An et al., 2017), alors que les sels de platine sont les principaux effecteurs de la chimiothérapie de première ligne. La détection de lncRNAs tels que H19 (Zheng et al., 2016) ou HOTAIR (Wang et al., 2015d) par RNA-FISH afin d'étudier leur potentielle utilisation comme marqueurs prédictifs de la réponse au traitement de première ligne constituerait certainement un choix plus éclairé, d'autant que contrairement à UCA1 des sondes de RNA-FISH pour ces lncRNAs sont d'ores et déjà disponibles.

L'acquisition récente par le Centre de Microscopie Appliquée à la BIOlogie de l'Université de Caen Basse-Normandie du système d'imagerie et d'analyse nous ayant permis de discriminer le signal spécifique à NEAT1 dans des échantillons tumoraux de l'ovaire fixés en FFPE constitue une première étape prometteuse. La mesure, et surtout la quantification, de l'intensité des signaux restent une étape délicate, pour laquelle le laboratoire possède déjà

une expertise de par son activité en histo-imagerie quantitative qui pourra nous être d'une grande aide.

Une autre possibilité intéressante pour l'utilisation de lncRNAs comme marqueurs prédictifs de la réponse au traitement est l'étude de leur présence dans la circulation. Un certain nombre d'études ont rapporté la détection de lncRNAs dans des échantillons sériques ou plasmatiques (Qi et al., 2016). Par exemple dans le cancer de la prostate les lncRNAs PCAT3 (Hu et al., 2014; Xue et al., 2014) et MALAT1 (Ren et al., 2013; Wang et al., 2014a), tous deux ayant une expression augmentée, dans le cancer gastrique, les lncRNAs H19 dont l'expression est augmenté (Schmitt and Chang, 2016) et FER1L4 qui lui est sous-exprimé (Liu et al., 2014), ou encore dans le cancer de la vessie où le lncRNA UCA1 a été identifié dans la circulation, avec une expression augmentée (Liu et al., 2016; Srivastava et al., 2014). Dans cette perspective, une attention particulière devra être apportée à la normalisation des niveaux d'expression des lncRNAs, qui a été relevée comme un facteur critique pour l'étude des miRNAs circulants. A cet effet, l'utilisation de normalisateurs exogènes dont la pertinence a été montrée au laboratoire (Mandilaras et al., 2017) devra très probablement être envisagée.

### **UCA1 agit comme un oncogène dans de nombreux cancers *via* des mécanismes variés**

Comme présenté dans l'introduction bibliographique, UCA1 présente des fonctions oncogéniques dans un nombre important de pathologies cancéreuses, et présente une grande variété de mécanismes d'action. Prises dans leur ensemble, les données relatives à UCA1 soulignent l'intérêt d'études plus approfondies afin de préciser ses modes d'actions et les partenaires impliqués. En outre, la multiplicité des modèles dans lesquels UCA1 a été étudié jusqu'à présent ne permet pas de déterminer la portée de chacune de ses fonctions prises indépendamment, et il apparaît probable qu'une fraction importante des effets d'UCA1 soit dépendante du contexte cellulaire.

Une majorité des publications ayant étudié les modalités de l'action d'UCA1 se sont intéressées à ses fonctions de ceRNA permettant la séquestration de miRNAs. Il a été rapporté qu'UCA1 se lierait à au moins 18 miRNAs (Barbagallo et al., 2018; Fang et al., 2017; He et al., 2017; Li et al., 2017a; Tian et al., 2018; Wang et al., 2015a, 2018c; Yang and Chen, 2019; Zhou et al., 2018a) (Geng et al., 2018; Gong et al., 2018; Li et al., 2019a; Nie et al., 2016; Sun et al., 2018; Wei et al., 2016; Wu et al., 2018; Xin et al., 2019; Yang et al., 2016; Zhou et al., 2018b). Ce mode d'action devrait reposer principalement sur l'isoforme courte d'UCA1, cytoplasmique, étant donnée la voie canonique d'action des miRNAs. On ne

peut toutefois pas exclure que l'isoforme longue puisse également avoir des fonctions de ceRNA, puisqu'il a été montré que des miRNAs sont également présents dans le compartiment nucléaire (Sarshad et al., 2018). En outre, il est envisageable que l'isoforme longue d'UCA1 puisse être présente dans le compartiment cytoplasmique dans certains contextes.

Cette fonction de ceRNA sera nécessairement dépendante du contexte considéré : présence ou absence des miRNAs pouvant se lier à UCA1, de leurs cibles, et effets contextuels dépendants des miRNAs eux-mêmes (Mandilaras et al., 2017). De fait, les effets d'UCA1 dans un type tumoral particulier seront particulièrement difficiles à anticiper et seule l'expérimentation permettra d'obtenir des données robustes.

Dans notre modèle, nous avons montré que le miR-27a-5p est en interaction directe avec UCA1. La prédiction bioinformatique identifie 2 sites possibles d'interaction entre UCA1 et miR-27a-5p. Un de ces sites est dans une région unique de l'isoforme longue. Bien que nous ne puissions éliminer la possibilité d'une interaction sur ce site, l'absence de phénotype après inhibition de l'isoforme longue, ainsi que son caractère nucléaire laissent supposer que ce site n'est pas responsable d'une séquestration efficace de miR-27a-5p. L'autre site prédit d'interaction se situe dans une région commune aux isoformes courte et longue, et est ainsi présent dans le compartiment cytoplasmique, ce qui est en phase avec le mode de fonctionnement canonique des miRNAs, dans le compartiment cytoplasmique.

L'analyse de nos données d'expression différentielle après inhibition d'UCA1 révèle que plusieurs autres miRNAs potentiellement séquestrés par UCA1 pourraient être responsables de la dérégulation de nombreux gènes. En effet, miR-16, miR-26a, miR-27b, miR-96 et miR-195 sont prédits comme pouvant interagir avec UCA1 (miR-96 n'est pas exprimé dans les cellules OAW42-R, données non présentées), et on observe un enrichissement de mRNA portant la région seed de ces miRNAs dans les gènes différentiellement exprimés après inhibition d'UCA1, suggérant qu'à l'instar de miR-27a-5p ils pourraient être libérés puis agir sur un ensemble de cibles spécifiques.

Toutefois, nous avons montré que la transfection de miR-27a-5p induit l'expression de BIM à des niveaux comparables avec l'inhibition d'UCA1, et que cette induction est nécessaire à la sensibilisation des cellules au cisplatine. Il a été montré que miR-27a-5p agit comme un suppresseur de tumeurs dans l'adénocarcinome pulmonaire (Yu et al., 2019) et le cancer des poumons à petites cellules (Mizuno et al., 2017). En outre, il cible l'EGFR dans des modèles de cancers de la tête et du cou (Chari et al., 2019; Wu et al., 2013b), EGFR étant lui-même modérément inhibé (facteur 1.42) en réponse à l'inhibition d'UCA1 dans les

cellules OAW42-R. De manière intéressante, des travaux précédents au laboratoire ont montré que l'inhibition d'EGFR induit l'augmentation de BIM dans les cellules tumorales ovariennes chimiorésistantes IGROV1-R10. Cependant, nos résultats ont montré que l'inhibition d'UBE2N, cible directe de miR-27a-5p dans des cellules endothéliales de l'aorte (Romy et al., 2015), induit l'expression de BIM. Etant donné que l'inhibition d'UCA1 ne suffit pas à inhiber complètement UBE2N, il est probable que l'augmentation de BIM en réponse à l'inhibition d'UCA1 repose à la fois sur l'inhibition d'UBE2N et sur celle de l'EGFR.

Outre ses fonction de ceRNA, il a été montré qu'UCA1 peut se lier à EZH2 dans le carcinome hépatocellulaire (Hu et al., 2016), les cancers gastriques (Wang et al., 2017c), du sein (Li et al., 2019b) et de la vésicule biliaire (Cai et al., 2017) ou se lier à BRG1 dans le cancer de la vessie (Wang et al., 2014b).

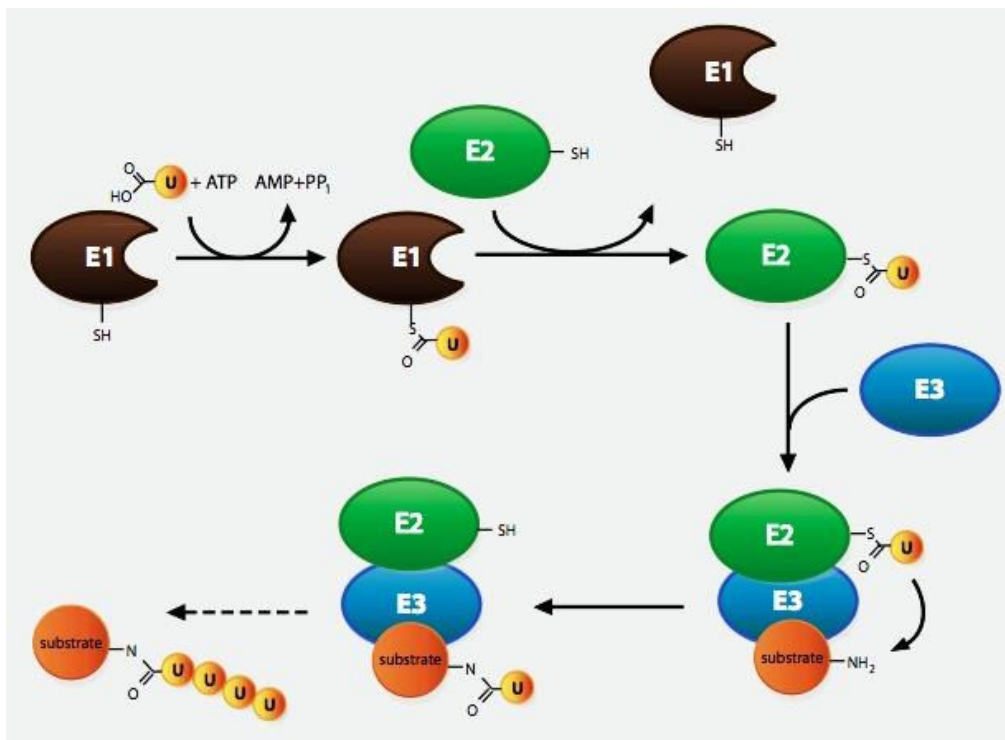
EZH2 est un membre du complexe PRC2, qui a une fonction épigénétique d'inhibiteur transcriptionnel par la triméthylation de la lysine 27 de l'histone 3 (H3K27me3). Ces fonctions, nucléaires par essence, devraient plutôt impliquer l'isoforme longue d'UCA1, dont l'inhibition n'est pas impliquée dans la sensibilisation au cisplatine des cellules cancéreuses de l'ovaire que nous avons étudiées, et n'a pas fait apparaître de phénotype précis. C'est donc un aspect que nous avons laissé de côté et dont l'étude ne nous semble pas prioritaire dans le contexte des cancers de l'ovaire.

La liaison d'UCA1 avec BRG1 (aussi annoté en tant que SMARCA4) a été rapportée dans une unique publication dans un modèle de cancer de la vessie (Wang et al., 2014b). Dans ce contexte, la libération de BRG1 par inhibition d'UCA1 permet à ce membre du complexe SWI/SNF de remodelage de la chromatine d'aller se fixer dans la région promotrice de p21, et ainsi de promouvoir son expression ce qui a pour effet de ralentir l'entrée des cellules dans le cycle cellulaire. Bien que nous n'observions pas un tel effet dans les cellules OAW42-R après inhibition d'UCA1, nous notons toutefois une augmentation de l'expression de p21 (facteur 2.4).

BRG1 est le plus souvent présenté comme un suppresseur de tumeurs (Kwon et al., 2015; Qi et al., 2015), et est impliqué dans la réparation des dommages à l'ADN. Ainsi, une éventuelle libération de BRG1 après inhibition d'UCA1 devrait favoriser les mécanismes de réparation des cassures double brin de l'ADN par recombinaison homologue (HR) (Brownlee et al., 2015; Kwon et al., 2015; Qi et al., 2015). Or, en sus de la surexpression de p21 après inhibition d'UCA1, nous observons également une augmentation de l'expression de TP53INP1 et de PUMA, qui avec p21 sont tous les trois sous le contrôle transcriptionnel du gène *TP53*. Ces résultats laissent supposer une activation de la voie tp53 dans nos cellules après inhibition d'UCA1 (TP53 n'est pas mutée dans les cellules OAW42 dont sont issues

les OAW42-R), ce qui pourrait exclure un rôle de BRG1 dans l'augmentation de p21. En outre, nous observons des perturbations des mécanismes de réparation par HR après inhibition d'UCA1 (Cf ci-dessous), ce qui est en phase avec une augmentation de BIM (Delbridge et al., 2016; Garrison et al., 2012; Happo et al., 2010), excluant aussi a priori une augmentation de l'activité réparatrice de BRG1 après inhibition d'UCA1. En outre, l'activité de BRG1 dans la réparation de l'ADN semble indépendante de son activité de remodelage de la chromatine (Kwon et al., 2015). De fait, la démonstration que la libération de BRG1 après inhibition UCA1 lui permet de remodeler la chromatine, notamment dans le promoteur de p21, n'implique pas nécessairement un effet sur son activité dans la réparation de l'ADN par HR. Ainsi, une éventuelle fonction de BRG1 dans la réponse à l'inhibition d'UCA1 dans les cellules cancéreuses de l'ovaire reste à démontrer.

### UBE2N : une ubiquitine ligase aux rôles ubiquitaires



**Figure Discussion: Rôles des différents types de protéines ubiquitine ligases (E1, E2 et E3) dans le processus d'ubiquitination des protéines. (D'Arcy et al., 2015)**

UBE2N est une ubiquitine ligase de type E2, permettant la formation d'une chaîne d'ubiquitines liées par la lysine en position 63 (Lys63) sur des substrats spécifiques (**Figure Discussion**). La littérature suggère deux voies possibles par lesquelles l'inhibition d'UBE2N pourrait permettre une augmentation de l'expression de BIM.

En premier lieu, UBE2N est lié à son cofacteur Uev1A dans le cytoplasme, permettant l'ubiquitinylation des protéines IRAK1, TRAF6 et TRAF2, menant à la phosphorylation de IKK et à l'activation de NF- $\kappa$ B (2016; Hofmann and Pickart, 1999; Lamothe et al., 2007; Ordureau et al., 2008; Wooff et al., 2004). Ainsi, l'inhibition d'UBE2N, en empêchant l'activation de NF- $\kappa$ B, pourrait entraîner l'augmentation de l'expression de BIM, ainsi qu'il a été démontré par (Godbersen et al., 2014).

En second lieu, UBE2N est lié à son cofacteur mms2 dans le noyau, où l'ubiquitinylation notamment des histones H2A et H1 permet le recrutement de RAP80 et de BRCA1 pour la réparation des dommages à l'ADN par HR (Kolas et al., 2007; Thorslund et al., 2015; Wang and Elledge, 2007). En outre, le couple UBE2N/mms2 joue également un rôle important dans la protection des cellules contre le stress réplicatif. En effet, la présence de dommages à l'ADN lors du passage la fourche de réplication entraîne l'activation de la voie TLS (Translesion DNA Synthesis) ou de la voie TS (Template Switching) afin de permettre la continuité de la réplication. L'utilisation de la voie TLS induit une instabilité génomique, ce qui n'est pas le cas pour la voie TS, cette dernière nécessitant l'intervention du couple UBE2N/mms2 (Hodge et al., 2016). De fait, l'inhibition d'UBE2N favorise l'instabilité génomique et la persistance des dommages à l'ADN, ce qui entraîne une augmentation de l'expression de BIM (Delbridge et al., 2016; Garrison et al., 2012; Happonen et al., 2010).

Nos résultats ont montré une perturbation de la dynamique de réparation de l'ADN après inhibition d'UCA1. L'augmentation de la présence de foci de p-ATM et la diminution de celle de foci RAD51 peuvent s'expliquer par l'inhibition d'UBE2N. En effet, en empêchant la réparation par HR, son inhibition pourrait entraîner une augmentation de la quantité de dommages détectés, et donc de la présence de p-ATM, tout en empêchant le recrutement de RAD51 et la réparation effective de ces dommages.

Cependant, la diminution de la présence de foci  $\gamma$ -H2AX ne semble pas en accord avec cette hypothèse. Nous avons noté une inhibition de l'expression de H2AX en réponse à l'inhibition d'UCA1 (facteur 1.6), ce qui pourrait limiter son accumulation au niveau des dommages à l'ADN.

De manière intéressante, l'inhibition d'UCA1 induit également l'expression de Puma, ce qui n'est pas observé après transfection de miR-27a-5p ou inhibition d'UBE2N, suggérant que l'induction de dommages à l'ADN en réponse à l'inhibition d'UCA1 ne repose pas uniquement sur l'inhibition d'UBE2N. De plus, l'inhibition d'UCA1 induit une diminution de l'expression de nombreux gènes impliqués dans les voies de réparation de l'ADN, sans que nous puissions émettre d'hypothèse quant à la possible implication d'UBE2N dans ces effets.

Ainsi, nous pouvons faire l'hypothèse que l'inhibition d'UCA1 pourrait agir sur les mécanismes de réparation à la fois *via* l'inhibition d'UBE2N et également pas d'autres mécanismes entraînant la diminution de l'expression de nombreux gènes de la réparation et une augmentation de l'expression de Puma dont le mode de fonctionnement reste à déterminer. Ainsi, nous ne pouvons conclure quant à la voie (Nf-kB, réparation de l'ADN ou les deux) permettant l'induction de BIM après inhibition d'UBE2N.

Une hypothèse intéressante pourrait résider dans les fonctions de BRG1. Comme indiqué plus haut, sa libération d'UCA1 lui permet d'avoir une activité de remodelage de la chromatine, or, cette activité semble indépendante de ses fonctions dans la réparation de l'ADN. Il serait intéressant de connaître les conséquences de sa liaison ou non à UCA1 sur ses fonctions dans la réparation de l'ADN.

Des expériences complémentaires, en premier lieu visant à étudier les conséquences de l'inhibition spécifique d'UBE2N sur la dynamique de la réparation de l'ADN, seront particulièrement pertinentes pour apporter des éléments de réponse quant aux rôles respectifs d'UCA1 et de UBE2N.

### **UBE2N est une potentielle cible thérapeutique d'intérêt pour le traitement des cancers de l'ovaire**

L'inhibition d'UBE2N dans les cellules OAW42-R mène à une augmentation de l'expression de BIM et à la sensibilisation de ces cellules à l'action du cisplatine, mais aussi à celle des BH3 mimétiques ABT-737 et Pyridoclax et à l'olaparib.

BIM est un membre pro-apoptotique de la famille Bcl-2. Cette famille de protéines se compose de pro- et anti-apoptotiques, dont l'équilibre détermine le devenir des cellules : mort ou survie. L'augmentation de l'expression de BIM fait pencher cette balance en faveur de la mort cellulaire, ce qui a été démontré dans de nombreuses études (Lheureux et al., 2015; Pétigny-Lechartier et al., 2017). Ainsi, nous avons démontré que l'augmentation de l'expression de BIM est nécessaire pour la sensibilisation au cisplatine dans les cellules OAW42-R, et nous pouvons raisonnablement supposer que c'est aussi le cas pour la sensibilisation à l'ABT-737 et au Pyridoclax, ces deux molécules inhibant l'activité de Bcl-xL (et Bcl-2) et de Mcl-1 respectivement (Hedir et al., 2018; Oltersdorf et al., 2005). Ainsi, l'utilisation d'inhibiteurs d'UBE2N constitue une stratégie prometteuse de sensibilisation au cisplatine ou à des molécules BH3 mimétiques.



D'autre part, les fonctions d'UBE2N dans la régulation de la voie NF-kB pourraient revêtir un intérêt vis-à-vis des stratégies visant à induire une réponse immunitaire chez les patientes contre les cellules tumorales. A cet effet, des stratégies ciblant le couple PD1/PDL1 ont été développées et sont actuellement à l'étude pour le traitement des cancers de l'ovaire (Mandai et al., 2016; Mittica et al., 2016; Pujade-Lauraine et al., 2018). De manière intéressante, l'expression de PDL1 est sous le contrôle de la voie NF-kB (Lucas et al., 2018; Pogge von Strandmann et al., 2017), ainsi l'inhibition d'UBE2N pourrait revêtir un intérêt de ce point de vue.

Enfin, les fonctions d'UBE2N dans le mécanisme de réparation de l'ADN par HR en fait un candidat particulièrement intéressant dans l'optique d'une sensibilisation des cellules à l'action des très prometteurs PARPi, ayant reçu depuis leur AMM pour le traitement de maintenance des cancers de l'ovaire chimiosensibles (Madariaga et al., 2019; Morgan et al., 2018). Ces traitements sont indiqués pour les patientes dont la tumeur présente des altérations dans la voie HR (Pilié et al., 2019), limitant de fait la proportion de patientes pouvant en bénéficier. Ainsi, l'inhibition d'UBE2N pourrait constituer une stratégie permettant d'induire une altération de la voie HR, et donc permettre à un grand nombre de patientes de bénéficier des PARPi.

De manière intéressante, nous avons pu bénéficier au laboratoire de la présence de cultures d'organoïdes dérivés d'échantillons tumoraux issus patientes. Ces modèles constituent un progrès notable pour l'étude de la réponse aux traitements par rapport aux lignées cellulaires classiquement utilisées, et pourraient rendre compte fidèlement de la réponse au traitement des patientes dont ils sont issus (Jabs et al., 2017; Kondo and Inoue, 2019). Nos résultats montrant la sensibilisation aux sels de platine de 3 de ces lignées par l'utilisation d'un inhibiteur pharmacologique d'UBE2N constituent un premier pas particulièrement encourageant pour la définition de nouvelles stratégies thérapeutiques potentielles dans les cancers de l'ovaire.



## Références

---

## Références :

- Acunzo, M., Romano, G., Wernicke, D., and Croce, C.M. (2015). MicroRNA and cancer--a brief overview. *Adv. Biol. Regul.* 57, 1–9.
- Adams, J.M., and Cory, S. (2007). The Bcl-2 apoptotic switch in cancer development and therapy. *Oncogene* 26, 1324–1337.
- Alarcón, A., Figueroa, U., Espinoza, B., Sandoval, A., Carrasco-Aviño, G., Aguayo, F.R., and Corvalan, A.H. (2017). Epstein-Barr Virus–Associated Gastric Carcinoma: The Americas' Perspective. In *Gastric Cancer*, G. Mózsik, and O. Karádi, eds. (InTech), p.
- Altucci, L. (2017). A key HDAC6 dependency of ARID1A-mutated ovarian cancer. *Nat. Cell Biol.* 19, 889–890.
- Alvarez, R.D., Karlan, B.Y., and Strauss, J.F. (2016). “Ovarian cancers: Evolving paradigms in research and care”: Report from the Institute of Medicine. *Gynecol. Oncol.* 141, 413–415.
- An, J., Lv, W., and Zhang, Y. (2017). LncRNA NEAT1 contributes to paclitaxel resistance of ovarian cancer cells by regulating ZEB1 expression via miR-194. *OncoTargets Ther. Volume 10*, 5377–5390.
- Autuoro, J.M., Pirnie, S.P., and Carmichael, G.G. (2014). Long noncoding RNAs in imprinting and X chromosome inactivation. *Biomolecules* 4, 76–100.
- Aziz, A.U.R., Farid, S., Qin, K., Wang, H., and Liu, B. (2018). PIM Kinases and Their Relevance to the PI3K/AKT/mTOR Pathway in the Regulation of Ovarian Cancer. *Biomolecules* 8.
- Baeriswyl, V., and Christofori, G. (2009). The angiogenic switch in carcinogenesis. *Semin. Cancer Biol.* 19, 329–337.
- Balas, M.M., and Johnson, A.M. (2018). Exploring the mechanisms behind long noncoding RNAs and cancer. *Non-Coding RNA Res.* 3, 108–117.
- Barbagallo, C., Brex, D., Caponnetto, A., Cirnigliaro, M., Scalia, M., Magnano, A., Caltabiano, R., Barbagallo, D., Biondi, A., Cappellani, A., et al. (2018). LncRNA UCA1, Upregulated in CRC Biopsies and Downregulated in Serum Exosomes, Controls mRNA Expression by RNA-RNA Interactions. *Mol. Ther. - Nucleic Acids* 12, 229–241.
- Bartel, D.P. (2009). MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell* 136, 215–233.
- Bartel, D.P. (2018). Metazoan MicroRNAs. *Cell* 173, 20–51.
- Battistelli, C., Cicchini, C., Santangelo, L., Tramontano, A., Grassi, L., Gonzalez, F.J., de

Nonno, V., Grassi, G., Amicone, L., and Tripodi, M. (2017). The Snail repressor recruits EZH2 to specific genomic sites through the enrollment of the lncRNA HOTAIR in epithelial-to-mesenchymal transition. *Oncogene* *36*, 942–955.

Bernstein, E., Caudy, A.A., Hammond, S.M., and Hannon, G.J. (2001). Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* *409*, 363–366.

Berretta, J., and Morillon, A. (2009). Pervasive transcription constitutes a new level of eukaryotic genome regulation. *EMBO Rep.* *10*, 973–982.

Bian, Z., Jin, L., Zhang, J., Yin, Y., Quan, C., Hu, Y., Feng, Y., Liu, H., Fei, B., Mao, Y., et al. (2016). LncRNA-UCA1 enhances cell proliferation and 5-fluorouracil resistance in colorectal cancer by inhibiting miR-204-5p. *Sci. Rep.* *6*, 23892.

Blasco, M.A. (2005). Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond. *Nat. Rev. Genet.* *6*, 611–622.

du Bois, A., Reuss, A., Pujade-Lauraine, E., Harter, P., Ray-Coquard, I., and Pfisterer, J. (2009). Role of surgical outcome as prognostic factor in advanced epithelial ovarian cancer: A combined exploratory analysis of 3 prospectively randomized phase 3 multicenter trials: By the Arbeitsgemeinschaft Gynaekologische Onkologie Studiengruppe Ovarialkarzinom (AGO-OVAR) and the Groupe d'Investigateurs Nationaux Pour les Etudes des Cancers de l'Ovaire (GINECO). *Cancer* *115*, 1234–1244.

Boland, A., Huntzinger, E., Schmidt, S., Izaurralde, E., and Weichenrieder, O. (2011). Crystal structure of the MID-PIWI lobe of a eukaryotic Argonaute protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108*, 10466–10471.

Bracken, C.P., Scott, H.S., and Goodall, G.J. (2016). A network-biology perspective of microRNA function and dysfunction in cancer. *Nat. Rev. Genet.* *17*, 719–732.

Brannan, C.I., Dees, E.C., Ingram, R.S., and Tilghman, S.M. (1990). The product of the H19 gene may function as an RNA. *Mol. Cell. Biol.* *10*, 28–36.

Brennecke, J., Stark, A., Russell, R.B., and Cohen, S.M. (2005). Principles of microRNA-target recognition. *PLoS Biol.* *3*, e85.

Brett M., R., Jennifer B., P., Thomas A., S., Brett M., R., Jennifer B., P., and Thomas A., S. (2017). Epidemiology of ovarian cancer: a review. *Cancer Biol. Med.* *14*, 9–32.

Brockdorff, N., Ashworth, A., Kay, G.F., McCabe, V.M., Norris, D.P., Cooper, P.J., Swift, S., and Rastan, S. (1992). The product of the mouse Xist gene is a 15 kb inactive X-specific transcript containing no conserved ORF and located in the nucleus. *Cell* *71*, 515–526.

Brotin, E., Meryet-Figuière, M., Simonin, K., Duval, R.E., Villedieu, M., Leroy-Dudal, J.,

- Saison-Behmoaras, E., Gauduchon, P., Denoyelle, C., and Poulain, L. (2010). Bcl-XL and MCL-1 constitute pertinent targets in ovarian carcinoma and their concomitant inhibition is sufficient to induce apoptosis. *Int. J. Cancer* *126*, 885–895.
- Brown, C.J., Hendrich, B.D., Rupert, J.L., Lafrenière, R.G., Xing, Y., Lawrence, J., and Willard, H.F. (1992). The human XIST gene: analysis of a 17 kb inactive X-specific RNA that contains conserved repeats and is highly localized within the nucleus. *Cell* *71*, 527–542.
- Browning, L., Patel, M.R., Horvath, E.B., Tawara, K., and Jorcyk, C.L. (2018). IL-6 and ovarian cancer: inflammatory cytokines in promotion of metastasis. *Cancer Manag. Res.* *10*, 6685–6693.
- Brownlee, P.M., Meisenberg, C., and Downs, J.A. (2015). The SWI/SNF chromatin remodelling complex: Its role in maintaining genome stability and preventing tumourigenesis. *DNA Repair* *32*, 127–133.
- Burns, K.H. (2017). Transposable elements in cancer. *Nat. Rev. Cancer* *17*, 415–424.
- Cabili, M.N., Trapnell, C., Goff, L., Koziol, M., Tazon-Vega, B., Regev, A., and Rinn, J.L. (2011). Integrative annotation of human large intergenic noncoding RNAs reveals global properties and specific subclasses. *Genes Dev.* *25*, 1915–1927.
- Cai, Q., Jin, L., Wang, S., Zhou, D., Wang, J., Tang, Z., and Quan, Z. (2017). Long non-coding RNA UCA1 promotes gallbladder cancer progression by epigenetically repressing p21 and E-cadherin expression. *Oncotarget* *8*, 47957.
- Calin, G.A., Sevignani, C., Dumitru, C.D., Hyslop, T., Noch, E., Yendamuri, S., Shimizu, M., Rattan, S., Bullrich, F., Negrini, M., et al. (2004). Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 2999–3004.
- Carmeliet, P. (2005). VEGF as a key mediator of angiogenesis in cancer. *Oncology* *69 Suppl 3*, 4–10.
- Chari, N.S., Ivan, C., Le, X., Li, J., Mijiti, A., Patel, A.A., Osman, A.A., Peterson, C.B., Williams, M.D., Pickering, C.R., et al. (2019). Disruption of TP63-miR-27a\* feedback loop by mutant TP53 in head and neck cancer. *J. Natl. Cancer Inst.*
- Chen, D.S., and Mellman, I. (2017). Elements of cancer immunity and the cancer-immune set point. *Nature* *541*, 321–330.
- Chen, Y., Bi, F., An, Y., and Yang, Q. (2019). Identification of pathological grade and prognosis-associated lncRNA for ovarian cancer. *J. Cell. Biochem.* jcb.28704.
- Cheng, N., Chytil, A., Shyr, Y., Joly, A., and Moses, H.L. (2008). Transforming growth factor-

beta signaling-deficient fibroblasts enhance hepatocyte growth factor signaling in mammary carcinoma cells to promote scattering and invasion. *Mol. Cancer Res. MCR* 6, 1521–1533.

Cheng, N., Cai, W., Ren, S., Li, X., Wang, Q., Pan, H., Zhao, M., Li, J., Zhang, Y., Zhao, C., et al. (2015). Long non-coding RNA UCA1 induces non-T790M acquired resistance to EGFR-TKIs by activating the AKT/mTOR pathway in EGFR-mutant non-small cell lung cancer. *Oncotarget* 6, 23582–23593.

Clark, M.B., and Mattick, J.S. (2011). Long noncoding RNAs in cell biology. In *Seminars in Cell & Developmental Biology*, (Elsevier), pp. 366–376.

Clark, M.B., Amaral, P.P., Schlesinger, F.J., Dinger, M.E., Taft, R.J., Rinn, J.L., Ponting, C.P., Stadler, P.F., Morris, K.V., Morillon, A., et al. (2011). The reality of pervasive transcription. *PLoS Biol.* 9, e1000625; discussion e1001102.

Coleman, R.L. (2016). Ovarian cancer in 2015: Insights into strategies for optimizing ovarian cancer care. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 13, 71–72.

Coleman, R.L., Monk, B.J., Sood, A.K., and Herzog, T.J. (2013). Latest research and treatment of advanced-stage epithelial ovarian cancer. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 10, 211–224.

Colombo, P.-E., Fabbro, M., Theillet, C., Bibeau, F., Rouanet, P., and Ray-Coquard, I. (2014). Sensitivity and resistance to treatment in the primary management of epithelial ovarian cancer. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 89, 207–216.

Cornelison, R., Llana, D.C., and Landen, C.N. (2017). Emerging Therapeutics to Overcome Chemoresistance in Epithelial Ovarian Cancer: A Mini-Review. *Int. J. Mol. Sci.* 18.

Cortez, A.J., Tudrej, P., Kujawa, K.A., and Lisowska, K.M. (2018). Advances in ovarian cancer therapy. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 81, 17–38.

Cortez, M.A., Bueso-Ramos, C., Ferdin, J., Lopez-Berestein, G., Sood, A.K., and Calin, G.A. (2011). MicroRNAs in body fluids--the mix of hormones and biomarkers. *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 8, 467–477.

Costa, F.F. (2008). Non-coding RNAs, epigenetics and complexity. *Gene* 410, 9–17.

Cusanelli, E., Romero, C.A.P., and Chartrand, P. (2013). Telomeric noncoding RNA TERRA is induced by telomere shortening to nucleate telomerase molecules at short telomeres. *Mol. Cell* 51, 780–791.

D’Arcy, P., Wang, X., and Linder, S. (2015). Deubiquitinase inhibition as a cancer therapeutic strategy. *Pharmacol. Ther.* 147, 32–54.

Delbridge, A.R.D., Pang, S.H.M., Vandenberg, C.J., Grabow, S., Aubrey, B.J., Tai, L., Herold, M.J., and Strasser, A. (2016). RAG-induced DNA lesions activate proapoptotic BIM

to suppress lymphomagenesis in p53-deficient mice. *J. Exp. Med.* *213*, 2039–2048.

Derrien, T., Johnson, R., Bussotti, G., Tanzer, A., Djebali, S., Tilgner, H., Guernec, G., Martin, D., Merkel, A., Knowles, D.G., et al. (2012). The GENCODE v7 catalog of human long noncoding RNAs: analysis of their gene structure, evolution, and expression. *Genome Res.* *22*, 1775–1789.

Devouassoux-Shisheboran, M., Genestie, C., and Ray-Coquard, I. (2016). [Dualistic classification of epithelial ovarian cancer: Is it clinically relevant?]. *Bull. Cancer (Paris)* *103*, 252–258.

Di Gesualdo, F., Capaccioli, S., and Lulli, M. (2014). A pathophysiological view of the long non-coding RNA world. *Oncotarget* *5*, 10976.

Di Leva, G., Garofalo, M., and Croce, C.M. (2014). MicroRNAs in cancer. *Annu. Rev. Pathol.* *9*, 287–314.

Ding, M., Liu, Y., Liao, X., Zhan, H., Liu, Y., and Huang, W. (2018). Enhancer RNAs (eRNAs): New Insights into Gene Transcription and Disease Treatment. *J. Cancer* *9*, 2334–2340.

Ding, N., Wu, H., Tao, T., and Peng, E. (2017). NEAT1 regulates cell proliferation and apoptosis of ovarian cancer by miR-34a-5p/BCL2. *OncoTargets Ther. Volume 10*, 4905–4915.

Dongre, A., and Weinberg, R.A. (2018). New insights into the mechanisms of epithelial–mesenchymal transition and implications for cancer. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *1*.

Dykes, I.M., and Emanuelli, C. (2017). Transcriptional and Post-transcriptional Gene Regulation by Long Non-coding RNA. *Genomics Proteomics Bioinformatics* *15*, 177–186.

Ebbesen, K.K., Kjems, J., and Hansen, T.B. (2016). Circular RNAs: Identification, biogenesis and function. *Biochim. Biophys. Acta* *1859*, 163–168.

Eddy, S.R. (2001). Non-coding RNA genes and the modern RNA world. *Nat. Rev. Genet.* *2*, 919–929.

Eidem, T.M., Kugel, J.F., and Goodrich, J.A. (2016). Noncoding RNAs: Regulators of the Mammalian Transcription Machinery. *J. Mol. Biol.* *428*, 2652–2659.

Engelhardt, J., and Stadler, P.F. (2015). Evolution of the unspliced transcriptome. *BMC Evol. Biol.* *15*, 166.

Fabbri, M., Calore, F., Paone, A., Galli, R., and Calin, G.A. (2013). Epigenetic regulation of miRNAs in cancer. *Adv. Exp. Med. Biol.* *754*, 137–148.



- Falaleeva, M., Pages, A., Matuszek, Z., Hidmi, S., Agranat-Tamir, L., Korotkov, K., Nevo, Y., Eyraş, E., Sperling, R., and Stamm, S. (2016). Dual function of C/D box small nucleolar RNAs in rRNA modification and alternative pre-mRNA splicing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *113*, E1625-1634.
- Falaleeva, M., Welden, J.R., Duncan, M.J., and Stamm, S. (2017). C/D-box snoRNAs form methylating and non-methylating ribonucleoprotein complexes: Old dogs show new tricks. *BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.* *39*.
- Fan, Y., Shen, B., Tan, M., Mu, X., Qin, Y., Zhang, F., and Liu, Y. (2014a). Long non-coding RNA UCA1 increases chemoresistance of bladder cancer cells by regulating Wnt signaling. *FEBS J.* *281*, 1750–1758.
- Fan, Y., Shen, B., Tan, M., Mu, X., Qin, Y., Zhang, F., and Liu, Y. (2014b). TGF- $\beta$ -induced upregulation of malat1 promotes bladder cancer metastasis by associating with suz12. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *20*, 1531–1541.
- Fang, Y., and Fullwood, M.J. (2016). Roles, Functions, and Mechanisms of Long Non-coding RNAs in Cancer. *Genomics Proteomics Bioinformatics* *14*, 42–54.
- Fang, J., Sun, C.-C., and Gong, C. (2016). Long noncoding RNA XIST acts as an oncogene in non-small cell lung cancer by epigenetically repressing KLF2 expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *478*, 811–817.
- Fang, Z., Zhao, J., Xie, W., Sun, Q., Wang, H., and Qiao, B. (2017). LncRNA UCA1 promotes proliferation and cisplatin resistance of oral squamous cell carcinoma by suppressing miR-184 expression. *Cancer Med.* *6*, 2897–2908.
- Farazi, T.A., Juranek, S.A., and Tuschl, T. (2008). The growing catalog of small RNAs and their association with distinct Argonaute/Piwi family members. *Dev. Camb. Engl.* *135*, 1201–1214.
- Faust, T., Frankel, A., and D'Orso, I. (2012). Transcription control by long non-coding RNAs. *Transcription* *3*, 78–86.
- Fernandes, J.C.R., Acuña, S.M., Aoki, J.I., Floeter-Winter, L.M., and Muxel, S.M. (2019). Long Non-Coding RNAs in the Regulation of Gene Expression: Physiology and Disease. *Non-Coding RNA* *5*.
- Filipowicz, W., Bhattacharyya, S.N., and Sonenberg, N. (2008). Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat. Rev. Genet.* *9*, 102–114.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M.K., Kostas, S.A., Driver, S.E., and Mello, C.C. (1998). Potent

and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* *391*, 806–811.

Flynn, R.A., and Chang, H.Y. (2014). Long Noncoding RNAs in Cell-Fate Programming and Reprogramming. *Cell Stem Cell* *14*, 752–761.

Friedman, R.C., Farh, K.K.-H., Burge, C.B., and Bartel, D.P. (2009). Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res.* *19*, 92–105.

Garitano-Trojaola, A., Agirre, X., Prósper, F., and Fortes, P. (2013). Long non-coding RNAs in haematological malignancies. *Int. J. Mol. Sci.* *14*, 15386–15422.

Garrison, S.P., Phillips, D.C., Jeffers, J.R., Chipuk, J.E., Parsons, M.J., Rehg, J.E., Opferman, J.T., Green, D.R., and Zambetti, G.P. (2012). Genetically defining the mechanism of Puma- and BIM-induced apoptosis. *Cell Death Differ.* *19*, 642–649.

Gebert, L.F.R., and MacRae, I.J. (2019). Regulation of microRNA function in animals. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *20*, 21–37.

Geisler, S., and Coller, J. (2013). RNA in unexpected places: long non-coding RNA functions in diverse cellular contexts. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *14*, 699–712.

Geng, J.-F., Liu, X., Zhao, H.-B., Fan, W.-F., Geng, J.-J., and Liu, X.-Z. (2018). LncRNA UCA1 inhibits epilepsy and seizure-induced brain injury by regulating miR-495/Nrf2-ARE signal pathway. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *99*, 133–139.

Ghildiyal, M., and Zamore, P.D. (2009). Small silencing RNAs: an expanding universe. *Nat. Rev. Genet.* *10*, 94–108.

Giroud, M., and Scheideler, M. (2017). Long Non-Coding RNAs in Metabolic Organs and Energy Homeostasis. *Int. J. Mol. Sci.* *18*.

Godbersen, J.C., Humphries, L.A., Danilova, O.V., Kebbekus, P.E., Brown, J.R., Eastman, A., and Danilov, A.V. (2014). The Nedd8-activating enzyme inhibitor MLN4924 thwarts microenvironment-driven NF- $\kappa$ B activation and induces apoptosis in chronic lymphocytic leukemia B cells. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *20*, 1576–1589.

Gong, P., Qiao, F., Wu, H., Cui, H., Li, Y., Zheng, Y., Zhou, M., and Fan, H. (2018). LncRNA UCA1 promotes tumor metastasis by inducing miR-203/ZEB2 axis in gastric cancer. *Cell Death Dis.* *9*, 1158.

Grammatikakis, I., Panda, A.C., Abdelmohsen, K., and Gorospe, M. (2014). Long noncoding RNAs(lncRNAs) and the molecular hallmarks of aging. *Aging* *6*, 992–1009.

Grimson, A., Farh, K.K.-H., Johnston, W.K., Garrett-Engele, P., Lim, L.P., and Bartel, D.P. (2007). MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing. *Mol.*

Cell 27, 91–105.

Grote, P., and Herrmann, B.G. (2015). Long noncoding RNAs in organogenesis: making the difference. *Trends Genet. TIG* 31, 329–335.

Grunewald, T., and Ledermann, J.A. (2017). Targeted therapies for ovarian cancer. *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* 41, 139–152.

Gu, Z., Jiang, J., Tan, W., Xia, Y., Cao, H., Meng, Y., Da, Z., Liu, H., and Cheng, C. (2013). p53/p21 Pathway involved in mediating cellular senescence of bone marrow-derived mesenchymal stem cells from systemic lupus erythematosus patients. *Clin. Dev. Immunol.* 2013, 134243.

Guil, S., and Esteller, M. (2012). Cis-acting noncoding RNAs: friends and foes. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 19, 1068–1075.

Guo, J.U., Agarwal, V., Guo, H., and Bartel, D.P. (2014). Expanded identification and characterization of mammalian circular RNAs. *Genome Biol.* 15, 409.

Gutschner, T., and Diederichs, S. (2012). The hallmarks of cancer: A long non-coding RNA point of view. *RNA Biol.* 9, 703–719.

Guttman, M., Amit, I., Garber, M., French, C., Lin, M.F., Feldser, D., Huarte, M., Zuk, O., Carey, B.W., Cassady, J.P., et al. (2009). Chromatin signature reveals over a thousand highly conserved large non-coding RNAs in mammals. *Nature* 458, 223–227.

Ha, M., and Kim, V.N. (2014). Regulation of microRNA biogenesis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 15, 509–524.

Hammond, S.M., Boettcher, S., Caudy, A.A., Kobayashi, R., and Hannon, G.J. (2001). Argonaute2, a link between genetic and biochemical analyses of RNAi. *Science* 293, 1146–1150.

Han, Y., Yang, Y., Yuan, H., Zhang, T., Sui, H., Wei, X., Liu, L., Huang, P., Zhang, W., and Bai, Y. (2014). UCA1, a long non-coding RNA up-regulated in colorectal cancer influences cell proliferation, apoptosis and cell cycle distribution. *Pathology (Phila.)* 46, 396–401.

Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell* 100, 57–70.

Hanahan, D., and Weinberg, R.A. (2011). Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 144, 646–674.

Hannon, G.J., Rivas, F.V., Murchison, E.P., and Steitz, J.A. (2006). The expanding universe of noncoding RNAs. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 71, 551–564.

Happo, L., Cragg, M.S., Phipson, B., Haga, J.M., Jansen, E.S., Herold, M.J., Dewson, G.,

Michalak, E.M., Vandenberg, C.J., Smyth, G.K., et al. (2010). Maximal killing of lymphoma cells by DNA damage-inducing therapy requires not only the p53 targets Puma and Noxa, but also BIM. *Blood* 116, 5256–5267.

Hay, N. (2016). Reprogramming glucose metabolism in cancer: can it be exploited for cancer therapy? *Nat. Rev. Cancer* 16, 635–649.

He, Z., Wang, Y., Huang, G., Wang, Q., Zhao, D., and Chen, L. (2017). The lncRNA UCA1 interacts with miR-182 to modulate glioma proliferation and migration by targeting iASPP. *Arch. Biochem. Biophys.*

Hedir, S., De Giorgi, M., Fogha, J., De Pascale, M., Weiswald, L.-B., Brotin, E., Marekha, B., Denoyelle, C., Denis, C., Suzanne, P., et al. (2018). Structure-guided design of pyridoclast derivatives based on Noxa / Mcl-1 interaction mode. *Eur. J. Med. Chem.* 159, 357–380.

Höck, J., and Meister, G. (2008). The Argonaute protein family. *Genome Biol.* 9, 210.

Hodge, C.D., Spyropoulos, L., and Glover, J.M. (2016). Ubc13: the Lys63 ubiquitin chain building machine. *Oncotarget* 7, 64471.

Hofmann, R.M., and Pickart, C.M. (1999). Noncanonical MMS2-encoded ubiquitin-conjugating enzyme functions in assembly of novel polyubiquitin chains for DNA repair. *Cell* 96, 645–653.

Hong, H.H., Hou, L.K., Pan, X., Wu, C.Y., Huang, H., Li, B., and Nie, W. (2016). Long non-coding RNA UCA1 is a predictive biomarker of cancer. *Oncotarget* 7, 44442.

Hsu, P.P., and Sabatini, D.M. (2008). Cancer cell metabolism: Warburg and beyond. *Cell* 134, 703–707.

Hu, B., Yang, H., and Yang, H. (2014). Diagnostic value of urine prostate cancer antigen 3 test using a cutoff value of 35 µg/L in patients with prostate cancer. *Tumour Biol. J. Int. Soc. Oncodevelopmental Biol. Med.* 35, 8573–8580.

Hu, J.-J., Song, W., Zhang, S.-D., Shen, X.-H., Qiu, X.-M., Wu, H.-Z., Gong, P.-H., Lu, S., Zhao, Z.-J., He, M.-L., et al. (2016). HBx-upregulated lncRNA UCA1 promotes cell growth and tumorigenesis by recruiting EZH2 and repressing p27Kip1/CDK2 signaling. *Sci. Rep.* 6, 23521.

Huang, D., Chen, J., Yang, L., Ouyang, Q., Li, J., Lao, L., Zhao, J., Liu, J., Lu, Y., Xing, Y., et al. (2018). NKILA lncRNA promotes tumor immune evasion by sensitizing T cells to activation-induced cell death. *Nat. Immunol.* 19, 1112–1125.

Huang, J., Zhou, N., Watabe, K., Lu, Z., Wu, F., Xu, M., and Mo, Y.-Y. (2014). Long non-coding RNA UCA1 promotes breast tumor growth by suppression of p27 (Kip1). *Cell Death*

Dis. 5, e1008.

Huang, X.A., Yin, H., Sweeney, S., Raha, D., Snyder, M., and Lin, H. (2013). A major epigenetic programming mechanism guided by piRNAs. *Dev. Cell* 24, 502–516.

Hung, T., Wang, Y., Lin, M.F., Koegel, A.K., Kotake, Y., Grant, G.D., Horlings, H.M., Shah, N., Umbricht, C., Wang, P., et al. (2011). Extensive and coordinated transcription of noncoding RNAs within cell-cycle promoters. *Nat. Genet.* 43, 621–629.

Hutvagner, G. (2005). Small RNA asymmetry in RNAi: function in RISC assembly and gene regulation. *FEBS Lett.* 579, 5850–5857.

Hutvagner, G., and Simard, M.J. (2008). Argonaute proteins: key players in RNA silencing. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 22–32.

Jabs, J., Zickgraf, F.M., Park, J., Wagner, S., Jiang, X., Jechow, K., Kleinheinz, K., Toprak, U.H., Schneider, M.A., Meister, M., et al. (2017). Screening drug effects in patient-derived cancer cells links organoid responses to genome alterations. *Mol. Syst. Biol.* 13, 955.

Jackson, S.P., and Bartek, J. (2009). The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature* 461, 1071–1078.

Jadaliha, M., Gholamalamdari, O., Tang, W., Zhang, Y., Petracovici, A., Hao, Q., Tariq, A., Kim, T.G., Holton, S.E., Singh, D.K., et al. (2018). A natural antisense lncRNA controls breast cancer progression by promoting tumor suppressor gene mRNA stability. *PLoS Genet.* 14, e1007802.

Jinek, M., and Doudna, J.A. (2009). A three-dimensional view of the molecular machinery of RNA interference. *Nature* 457, 405–412.

Johnsson, P., Ackley, A., Vidarsdottir, L., Lui, W.-O., Corcoran, M., Grandér, D., and Morris, K.V. (2013). A pseudogene long-noncoding-RNA network regulates PTEN transcription and translation in human cells. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 20, 440–446.

Junttila, M.R., and Evan, G.I. (2009). p53--a Jack of all trades but master of none. *Nat. Rev. Cancer* 9, 821–829.

Kapusta, A., Kronenberg, Z., Lynch, V.J., Zhuo, X., Ramsay, L., Bourque, G., Yandell, M., and Feschotte, C. (2013). Transposable elements are major contributors to the origin, diversification, and regulation of vertebrate long noncoding RNAs. *PLoS Genet.* 9, e1003470.

Kehr, S., Bartschat, S., Tafer, H., Stadler, P.F., and Hertel, J. (2013). Matching of Soulmates: coevolution of snoRNAs and their targets. *Mol. Biol. Evol.* 31, 455–467.

Khalil, A.M., Guttman, M., Huarte, M., Garber, M., Raj, A., Morales, D.R., Thomas, K., Presser, A., Bernstein, B.E., and Van Oudenaarden, A. (2009). Many human large intergenic

noncoding RNAs associate with chromatin-modifying complexes and affect gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *106*, 11667–11672.

Kim, T., and Reitmair, A. (2013). Non-Coding RNAs: Functional Aspects and Diagnostic Utility in Oncology. *Int. J. Mol. Sci.* *14*, 4934–4968.

Kim, V.N., Han, J., and Siomi, M.C. (2009). Biogenesis of small RNAs in animals. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *10*, 126–139.

Kiss-László, Z., Henry, Y., Bachellerie, J.P., Caizergues-Ferrer, M., and Kiss, T. (1996). Site-specific ribose methylation of preribosomal RNA: a novel function for small nucleolar RNAs. *Cell* *85*, 1077–1088.

Klymkowsky, M.W., and Savagner, P. (2009). Epithelial-mesenchymal transition: a cancer researcher's conceptual friend and foe. *Am. J. Pathol.* *174*, 1588–1593.

Kohn, A.D., Summers, S.A., Birnbaum, M.J., and Roth, R.A. (1996). Expression of a constitutively active Akt Ser/Thr kinase in 3T3-L1 adipocytes stimulates glucose uptake and glucose transporter 4 translocation. *J. Biol. Chem.* *271*, 31372–31378.

Kolas, N.K., Chapman, J.R., Nakada, S., Ylanko, J., Chahwan, R., Sweeney, F.D., Panier, S., Mendez, M., Wildenhain, J., Thomson, T.M., et al. (2007). Orchestration of the DNA-damage response by the RNF8 ubiquitin ligase. *Science* *318*, 1637–1640.

Kondo, J., and Inoue, M. (2019). Application of Cancer Organoid Model for Drug Screening and Personalized Therapy. *Cells* *8*.

Kotake, Y., Nakagawa, T., Kitagawa, K., Suzuki, S., Liu, N., Kitagawa, M., and Xiong, Y. (2011). Long non-coding RNA ANRIL is required for the PRC2 recruitment to and silencing of p15(INK4B) tumor suppressor gene. *Oncogene* *30*, 1956–1962.

Kozomara, A., Birgaoanu, M., and Griffiths-Jones, S. (2019). miRBase: from microRNA sequences to function. *Nucleic Acids Res.* *47*, D155–D162.

Kumar, M.S., Lu, J., Mercer, K.L., Golub, T.R., and Jacks, T. (2007). Impaired microRNA processing enhances cellular transformation and tumorigenesis. *Nat. Genet.* *39*, 673–677.

Kung, J.T.Y., Colognori, D., and Lee, J.T. (2013). Long Noncoding RNAs: Past, Present, and Future. *Genetics* *193*, 651–669.

Kurman, R.J., and Shih, I.-M. (2011). Molecular pathogenesis and extraovarian origin of epithelial ovarian cancer—Shifting the paradigm. *Hum. Pathol.* *42*, 918–931.

Kurman, R.J., and Shih, I.-M. (2016). The dualistic model of ovarian carcinogenesis: revisited, revised, and expanded. *Am. J. Pathol.* *186*, 733–747.

- Kwok, Z.H., and Tay, Y. (2017). Long noncoding RNAs: links between human health and disease. *Biochem. Soc. Trans.* *45*, 805–812.
- Kwon, S.J., Park, J.H., Park, E.J., Lee, S.A., Lee, H.S., Kang, S.W., and Kwon, J. (2015). ATM-mediated phosphorylation of the chromatin remodeling enzyme BRG1 modulates DNA double-strand break repair. *Oncogene* *34*, 303.
- Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Lendeckel, W., and Tuschl, T. (2001). Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science* *294*, 853–858.
- Lamothe, B., Besse, A., Campos, A.D., Webster, W.K., Wu, H., and Darnay, B.G. (2007). Site-specific Lys-63-linked tumor necrosis factor receptor-associated factor 6 auto-ubiquitination is a critical determinant of I kappa B kinase activation. *J. Biol. Chem.* *282*, 4102–4112.
- Latos, P.A., and Barlow, D.P. (2009). Regulation of imprinted expression by macro non-coding RNAs. *RNA Biol.* *6*, 100–106.
- Lau, N.C., Lim, L.P., Weinstein, E.G., and Bartel, D.P. (2001). An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science* *294*, 858–862.
- Lebrun, L., Milowich, D., Le Mercier, M., Allard, J., Van Eycke, Y., Roumeguere, T., Decaestecker, C., Salmon, I., and Rorive, S. (2018). UCA1 overexpression is associated with less aggressive subtypes of bladder cancer. *Oncol. Rep.*
- Lee, R.C., and Ambros, V. (2001). An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science* *294*, 862–864.
- Lee, E.J., Baek, M., Gusev, Y., Brackett, D.J., Nuovo, G.J., and Schmittgen, T.D. (2008). Systematic evaluation of microRNA processing patterns in tissues, cell lines, and tumors. *RNA N. Y. N* *14*, 35–42.
- Lee, S., Kopp, F., Chang, T.-C., Sataluri, A., Chen, B., Sivakumar, S., Yu, H., Xie, Y., and Mendell, J.T. (2016). Noncoding RNA NORAD Regulates Genomic Stability by Sequestering PUMILIO Proteins. *Cell* *164*, 69–80.
- Lee, Y., Jeon, K., Lee, J.-T., Kim, S., and Kim, V.N. (2002). MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *EMBO J.* *21*, 4663–4670.
- Leeb, M., Steffen, P.A., and Wutz, A. (2009). X chromosome inactivation sparked by non-coding RNAs. *RNA Biol.* *6*, 94–99.
- Lewis, B.P., Burge, C.B., and Bartel, D.P. (2005). Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* *120*, 15–20.

- Lheureux, S., N'Diaye, M., Blanc-Fournier, C., Dugué, A.E., Clarisse, B., Dutoit, S., Giffard, F., Abeilard, E., Briand, M., Labiche, A., et al. (2015). Identification of predictive factors of response to the BH3-mimetic molecule ABT-737: an ex vivo experiment in human serous ovarian carcinoma. *Int. J. Cancer* 136, E340-350.
- Lheureux, S., Braunstein, M., and Oza, A.M. (2019). Epithelial ovarian cancer: Evolution of management in the era of precision medicine. *CA. Cancer J. Clin.* 69, 280–304.
- Li, X. (2012). Long non-coding RNA UCA1a(CUADR) promotes proliferation and tumorigenesis of bladder cancer. *Int. J. Oncol.*
- Li, D., Feng, J., Wu, T., Wang, Y., Sun, Y., Ren, J., and Liu, M. (2013). Long intergenic noncoding RNA HOTAIR is overexpressed and regulates PTEN methylation in laryngeal squamous cell carcinoma. *Am. J. Pathol.* 182, 64–70.
- Li, H.-J., Sun, X.-M., Li, Z.-K., Yin, Q.-W., Pang, H., Pan, J.-J., Li, X., and Chen, W. (2017a). LncRNA UCA1 Promotes Mitochondrial Function of Bladder Cancer via the MiR-195/ARL2 Signaling Pathway. *Cell. Physiol. Biochem. Int. J. Exp. Cell. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 43, 2548–2561.
- Li, O., Yi, W., Yang, P., Guo, C., and Peng, C. (2019a). Long non-coding RNA UCA1 promotes proliferation and invasion of intrahepatic cholangiocarcinoma cells through targeting microRNA-122. *Exp. Ther. Med.* 18, 25–32.
- Li, T., Chen, Y., Zhang, J., and Liu, S. (2018a). LncRNA TUG1 promotes cells proliferation and inhibits cells apoptosis through regulating AURKA in epithelial ovarian cancer cells: *Medicine (Baltimore)* 97, e12131.
- Li, X., Zhang, R., Liu, Z., Li, S., and Xu, H. (2017b). The genetic variants in the PTEN/PI3K/AKT pathway predict susceptibility and CE(A)F chemotherapy response to breast cancer and clinical outcomes. *Oncotarget* 8, 20252–20265.
- Li, Y., Li, Y., Huang, S., He, K., Zhao, M., Lin, H., Li, D., Qian, J., Zhou, C., Chen, Y., et al. (2017c). Long non-coding RNA growth arrest specific transcript 5 acts as a tumour suppressor in colorectal cancer by inhibiting interleukin-10 and vascular endothelial growth factor expression. *Oncotarget* 8, 13690–13702.
- Li, Z., Liu, H., Zhong, Q., Wu, J., and Tang, Z. (2018b). LncRNA UCA1 is necessary for TGF- $\beta$ -induced epithelial-mesenchymal transition and stemness via acting as a ceRNA for Slug in glioma cells. *FEBS Open Bio* 8, 1855–1865.
- Li, Z., Yu, D., Li, H., Lv, Y., and Li, S. (2019b). Long non-coding RNA UCA1 confers tamoxifen resistance in breast cancer endocrinotherapy through regulation of the EZH2/p21



axis and the PI3K/AKT signaling pathway. *Int. J. Oncol.* *54*, 1033–1042.

Li, Z., Niu, H., Qin, Q., Yang, S., Wang, Q., Yu, C., Wei, Z., Jin, Z., Wang, X., Yang, A., et al. (2019c). lncRNA UCA1 Mediates Resistance to Cisplatin by Regulating the miR-143/FOSL2-Signaling Pathway in Ovarian Cancer. *Mol. Ther. Nucleic Acids* *17*, 92–101.

Lin, H. (2007). piRNAs in the germ line. *Science* *316*, 397.

Lin, X., Spindler, T.J., de Souza Fonseca, M.A., Corona, R.I., Seo, J.-H., Dezem, F.S., Li, L., Lee, J.M., Long, H.W., and Sellers, T.A. (2019). Super-Enhancer-Associated lncRNA UCA1 Interacts Directly with AMOT to Activate YAP Target Genes in Epithelial Ovarian Cancer. *iScience*.

Lingel, A., Simon, B., Izaurralde, E., and Sattler, M. (2004). Nucleic acid 3'-end recognition by the Argonaute2 PAZ domain. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *11*, 576–577.

Liu, E., Liu, Z., Zhou, Y., Mi, R., and Wang, D. (2015). Overexpression of long non-coding RNA PVT1 in ovarian cancer cells promotes cisplatin resistance by regulating apoptotic pathways. *Int. J. Clin. Exp. Med.* *8*, 20565–20572.

Liu, F.-T., Dong, Q., Gao, H., and Zhu, Z.-M. (2017). The prognostic significance of UCA1 for predicting clinical outcome in patients with digestive system malignancies. *Oncotarget* *8*, 40620–40632.

Liu, H., Wang, G., Yang, L., Qu, J., Yang, Z., and Zhou, X. (2016). Knockdown of Long Non-Coding RNA UCA1 Increases the Tamoxifen Sensitivity of Breast Cancer Cells through Inhibition of Wnt/ $\beta$ -Catenin Pathway. *PLOS ONE* *11*, e0168406.

Liu, H.-Y., Zhang, Y.-Y., Zhu, B.-L., Feng, F.-Z., Yan, H., Zhang, H.-Y., and Zhou, B. (2019). miR-21 regulates the proliferation and apoptosis of ovarian cancer cells through PTEN/PI3K/AKT. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* *23*, 4149–4155.

Liu, Y., Ding, M., Gao, Q., He, A., Liu, Y., and Mei, H. (2018). Current Advances on the Important Roles of Enhancer RNAs in Gene Regulation and Cancer. *BioMed Res. Int.* *2018*, 2405351.

Liu, Z., Sun, M., Lu, K., Liu, J., Zhang, M., Wu, W., De, W., Wang, Z., and Wang, R. (2013). The Long Noncoding RNA HOTAIR Contributes to Cisplatin Resistance of Human Lung Adenocarcinoma Cells via downregulation of p21WAF1/CIP1 Expression. *PLoS ONE* *8*, e77293.

Liu, Z., Shao, Y., Tan, L., Shi, H., Chen, S., and Guo, J. (2014). Clinical significance of the low expression of FER1L4 in gastric cancer patients. *Tumor Biol.* *35*, 9613–9617.

Louro, R., Smirnova, A.S., and Verjovski-Almeida, S. (2009). Long intronic noncoding RNA

transcription: expression noise or expression choice? *Genomics* 93, 291–298.

Lu, K., Li, W., Liu, X., Sun, M., Zhang, M., Wu, W., Xie, W., and Hou, Y. (2013). Long non-coding RNA MEG3 inhibits NSCLC cells proliferation and induces apoptosis by affecting p53 expression. *BMC Cancer* 13, 461.

Lucas, J., Hsieh, T.-C., Halicka, H.D., Darzynkiewicz, Z., and Wu, J.M. (2018). Upregulation of PD-L1 expression by resveratrol and piceatannol in breast and colorectal cancer cells occurs via HDAC3/p300-mediated NF- $\kappa$ B signaling. *Int. J. Oncol.* 53, 1469–1480.

Lukas, J., and Altmeyer, M. (2015). A lncRNA to repair DNA. *EMBO Rep.* 16, 1413–1414.

Lund, E., Güttinger, S., Calado, A., Dahlberg, J.E., and Kutay, U. (2004). Nuclear export of microRNA precursors. *Science* 303, 95–98.

Luo, H., Xu, X., Ye, M., Sheng, B., and Zhu, X. (2018). The prognostic value of HER2 in ovarian cancer: A meta-analysis of observational studies. *PloS One* 13, e0191972.

Lynch, H.T., Casey, M.J., Snyder, C.L., Bewtra, C., Lynch, J.F., Butts, M., and Godwin, A.K. (2009). Hereditary ovarian carcinoma: heterogeneity, molecular genetics, pathology, and management. *Mol. Oncol.* 3, 97–137.

Ma, L., Bajic, V.B., and Zhang, Z. (2013). On the classification of long non-coding RNAs. *RNA Biol.* 10, 925–933.

Ma, X., Li, Z., Li, T., Zhu, L., Li, Z., and Tian, N. (2017). Long non-coding RNA HOTAIR enhances angiogenesis by induction of VEGFA expression in glioma cells and transmission to endothelial cells via glioma cell derived-extracellular vesicles. *Am. J. Transl. Res.* 9, 5012–5021.

Madariaga, A., Lheureux, S., and Oza, A.M. (2019). Tailoring Ovarian Cancer Treatment: Implications of BRCA1/2 Mutations. *Cancers* 11.

Malek, E., Jagannathan, S., and Driscoll, J.J. (2014). Correlation of long non-coding RNA expression with metastasis, drug resistance and clinical outcome in cancer. *Oncotarget* 5.

Mandai, M., Hamanishi, J., Abiko, K., Matsumura, N., Baba, T., and Konishi, I. (2016). Anti-PD-L1/PD-1 immune therapies in ovarian cancer: basic mechanism and future clinical application. *Int. J. Clin. Oncol.* 21, 456–461.

Mandilaras, V., Vernon, M., Meryet-Figuière, M., Karakasis, K., Lambert, B., Poulain, L., Oza, A., Denoyelle, C., and Lheureux, S. (2017). Updates and current challenges in microRNA research for personalized medicine in ovarian cancer. *Expert Opin. Biol. Ther.* 17, 927–943.

Matsuo, K., Lin, Y.G., Roman, L.D., and Sood, A.K. (2010). Overcoming platinum resistance

in ovarian carcinoma. *Expert Opin. Investig. Drugs* 19, 1339–1354.

Mattick, J.S. (2004). RNA regulation: a new genetics? *Nat. Rev. Genet.* 5, 316–323.

Mattick, J.S. (2009). The Genetic Signatures of Noncoding RNAs. *PLoS Genet.* 5, e1000459.

Mattick, J.S. (2011). The central role of RNA in human development and cognition. *FEBS Lett.* 585, 1600–1616.

Matulonis, U.A., Sood, A.K., Fallowfield, L., Howitt, B.E., Sehouli, J., and Karlan, B.Y. (2016). Ovarian cancer. *Nat. Rev. Dis. Primer* 2, 16061.

McMullen, J.R., and Ooi, J.Y.Y. (2017). The Interplay of Protein Coding and Non-Coding RNAs (circRNAs, lncRNAs) During Cardiac Differentiation. *EBioMedicine* 25, 9–10.

Meister, G., and Tuschl, T. (2004). Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature* 431, 343–349.

Melissari, M.-T., and Grote, P. (2016). Roles for long non-coding RNAs in physiology and disease. *Pflugers Arch.* 468, 945–958.

Memczak, S., Jens, M., Elefsinioti, A., Torti, F., Krueger, J., Rybak, A., Maier, L., Mackowiak, S.D., Gregersen, L.H., Munschauer, M., et al. (2013). Circular RNAs are a large class of animal RNAs with regulatory potency. *Nature* 495, 333–338.

Mercer, T.R., and Mattick, J.S. (2013). Structure and function of long noncoding RNAs in epigenetic regulation. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 20, 300–307.

Mercer, T.R., Dinger, M.E., and Mattick, J.S. (2009). Long non-coding RNAs: insights into functions. *Nat. Rev. Genet.* 10, 155–159.

Merritt, W.M., Lin, Y.G., Han, L.Y., Kamat, A.A., Spannuth, W.A., Schmandt, R., Urbauer, D., Pennacchio, L.A., Cheng, J.-F., Nick, A.M., et al. (2008). Dicer, Drosha, and outcomes in patients with ovarian cancer. *N. Engl. J. Med.* 359, 2641–2650.

Meryet-Figuière, M., Lambert, B., Gauduchon, P., Vigneron, N., Brotin, E., Poulain, L., and Denoyelle, C. (2016). An overview of long non-coding RNAs in ovarian cancers. *Oncotarget* 7, 44719.

Meseure, D. (2016). Evaluation du rôle des longs ARN non codants dans les carcinomes mammaires infiltrants. PhD Thesis.

Mittal, M., Siddiqui, M.R., Tran, K., Reddy, S.P., and Malik, A.B. (2014). Reactive oxygen species in inflammation and tissue injury. *Antioxid. Redox Signal.* 20, 1126–1167.

Mittica, G., Genta, S., Aglietta, M., and Valabrega, G. (2016). Immune Checkpoint Inhibitors: A New Opportunity in the Treatment of Ovarian Cancer? *Int. J. Mol. Sci.* 17.

- Mizuno, K., Mataka, H., Arai, T., Okato, A., Kamikawaji, K., Kumamoto, T., Hiraki, T., Hatanaka, K., Inoue, H., and Seki, N. (2017). The microRNA expression signature of small cell lung cancer: tumor suppressors of miR-27a-5p and miR-34b-3p and their targeted oncogenes. *J. Hum. Genet.* *62*, 671–678.
- Momenimovahed, Z., Tiznobaik, A., Taheri, S., and Salehiniya, H. (2019). Ovarian cancer in the world: epidemiology and risk factors. *Int. J. Womens Health* *11*, 287–299.
- Mondal, T., Subhash, S., Vaid, R., Enroth, S., Uday, S., Reinius, B., Mitra, S., Mohammed, A., James, A.R., Hoberg, E., et al. (2015). MEG3 long noncoding RNA regulates the TGF- $\beta$  pathway genes through formation of RNA–DNA triplex structures. *Nat. Commun.* *6*, 7743.
- Morgan, R.D., Clamp, A.R., Evans, D.G.R., Edmondson, R.J., and Jayson, G.C. (2018). PARP inhibitors in platinum-sensitive high-grade serous ovarian cancer. *Cancer Chemother. Pharmacol.* *81*, 647–658.
- Moumen, A., Masterson, P., O'Connor, M.J., and Jackson, S.P. (2005). hnRNP K: an HDM2 target and transcriptional coactivator of p53 in response to DNA damage. *Cell* *123*, 1065–1078.
- Mowel, W.K., Kotzin, J.J., McCright, S.J., Neal, V.D., and Henao-Mejia, J. (2018). Control of Immune Cell Homeostasis and Function by lncRNAs. *Trends Immunol.* *39*, 55–69.
- Muinao, T., Pal, M., and Deka Boruah, H.P. (2018). Origins based clinical and molecular complexities of epithelial ovarian cancer. *Int. J. Biol. Macromol.* *118*, 1326–1345.
- Mullen, M.M., Kuroki, L.M., and Thaker, P.H. (2018). Novel treatment options in platinum-sensitive recurrent ovarian cancer: a review. *Gynecol. Oncol.*
- Mutch, D.G., and Prat, J. (2014). 2014 FIGO staging for ovarian, fallopian tube and peritoneal cancer. *Gynecol. Oncol.* *133*, 401–404.
- Negrini, S., Gorgoulis, V.G., and Halazonetis, T.D. (2010). Genomic instability--an evolving hallmark of cancer. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *11*, 220–228.
- Newman, A.M., Liu, C.L., Green, M.R., Gentles, A.J., Feng, W., Xu, Y., Hoang, C.D., Diehn, M., and Alizadeh, A.A. (2015). Robust enumeration of cell subsets from tissue expression profiles. *Nat. Methods* *12*, 453.
- Ng, S.-Y., Johnson, R., and Stanton, L.W. (2012). Human long non-coding RNAs promote pluripotency and neuronal differentiation by association with chromatin modifiers and transcription factors. *EMBO J.* *31*, 522–533.
- Ni, B., Yu, X., Guo, X., Fan, X., Yang, Z., Wu, P., Yuan, Z., Deng, Y., Wang, J., Chen, D., et al. (2015). Increased urothelial cancer associated 1 is associated with tumor proliferation and

metastasis and predicts poor prognosis in colorectal cancer. *Int. J. Oncol.* *47*, 1329–1338.

Niazi, F., and Valadkhan, S. (2012). Computational analysis of functional long noncoding RNAs reveals lack of peptide-coding capacity and parallels with 3' UTRs. *RNA N. Y. N* *18*, 825–843.

Nie, F., Sun, M., Yang, J., Xie, M., Xu, T., Xia, R., Liu, Y., Liu, X., Zhang, E., Lu, K., et al. (2015). Long noncoding RNA ANRIL promotes non-small cell lung cancer cell proliferation and inhibits apoptosis by silencing KLF2 and P21 expression. *Mol. Cancer Ther.* *14*, 268–277.

Nie, W., Ge, H., Yang, X., Sun, X., Huang, H., Tao, X., Chen, W., and Li, B. (2016). LncRNA-UCA1 exerts oncogenic functions in non-small cell lung cancer by targeting miR-193a-3p. *Cancer Lett.* *371*, 99–106.

Nikpayam, E., Tasharofi, B., Sarrafzadeh, S., and Ghafouri-Fard, S. (2017). The role of long non-coding RNAs in ovarian cancer. *Iran. Biomed. J.* *21*, 3.

Olena, A.F., and Patton, J.G. (2010). Genomic organization of microRNAs. *J. Cell. Physiol.* *222*, 540–545.

Oliveira, J.C., Oliveira, L.C., Mathias, C., Pedroso, G.A., Lemos, D.S., Salviano-Silva, A., Jucoski, T.S., Lobo-Alves, S.C., Zambalde, E.P., Cipolla, G.A., et al. (2018). LncRNAs in Cancer: another layer of complexity. *J. Gene Med.* e3065.

Oltersdorf, T., Elmore, S.W., Shoemaker, A.R., Armstrong, R.C., Augeri, D.J., Belli, B.A., Bruncko, M., Deckwerth, T.L., Dinges, J., Hajduk, P.J., et al. (2005). An inhibitor of Bcl-2 family proteins induces regression of solid tumours. *Nature* *435*, 677–681.

Ordureau, A., Smith, H., Windheim, M., Peggie, M., Carrick, E., Morrice, N., and Cohen, P. (2008). The IRAK-catalysed activation of the E3 ligase function of Pellino isoforms induces the Lys63-linked polyubiquitination of IRAK1. *Biochem. J.* *409*, 43–52.

Pal, T., Permuth-Wey, J., Betts, J.A., Krischer, J.P., Fiorica, J., Arango, H., LaPolla, J., Hoffman, M., Martino, M.A., Wakeley, K., et al. (2005). BRCA1 and BRCA2 mutations account for a large proportion of ovarian carcinoma cases. *Cancer* *104*, 2807–2816.

Pan, J., Li, X., Wu, W., Xue, M., Hou, H., Zhai, W., and Chen, W. (2016). Long non-coding RNA UCA1 promotes cisplatin/gemcitabine resistance through CREB modulating miR-196a-5p in bladder cancer cells. *Cancer Lett.* *382*, 64–76.

Park, C., Yu, N., Choi, I., Kim, W., and Lee, S. (2014). lncRNAtor: a comprehensive resource for functional investigation of long non-coding RNAs. *Bioinforma. Oxf. Engl.* *30*, 2480–2485.

Pasquinelli, A.E. (2012). MicroRNAs and their targets: recognition, regulation and an

emerging reciprocal relationship. *Nat. Rev. Genet.* *13*, 271–282.

Pasquinelli, A.E., Reinhart, B.J., Slack, F., Martindale, M.Q., Kuroda, M.I., Maller, B., Hayward, D.C., Ball, E.E., Degnan, B., Müller, P., et al. (2000). Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA. *Nature* *408*, 86–89.

Peinado, H., Marin, F., Cubillo, E., Stark, H.-J., Fusenig, N., Nieto, M.A., and Cano, A. (2004). Snail and E47 repressors of E-cadherin induce distinct invasive and angiogenic properties in vivo. *J. Cell Sci.* *117*, 2827–2839.

Peschansky, V.J., and Wahlestedt, C. (2014). Non-coding RNAs as direct and indirect modulators of epigenetic regulation. *Epigenetics* *9*, 3–12.

Pétigny-Lechartier, C., Duboc, C., Jebahi, A., Louis, M.-H., Abeilard, E., Denoyelle, C., Gauduchon, P., Poulain, L., and Villedieu, M. (2017). The mTORC1/2 Inhibitor AZD8055 Strengthens the Efficiency of the MEK Inhibitor Trametinib to Reduce the Mcl-1/[BIM and Puma] ratio and to Sensitize Ovarian Carcinoma Cells to ABT-737. *Mol. Cancer Ther.* *16*, 102–115.

Pfaff, M.J., Mukhopadhyay, S., Hoofnagle, M., Chabasse, C., and Sarkar, R. (2018). Tumor suppressor protein p53 negatively regulates ischemia-induced angiogenesis and arteriogenesis. *J. Vasc. Surg.* *68*, 222S–233S.e1.

Pickard, M.R., and Williams, G.T. (2015). Molecular and Cellular Mechanisms of Action of Tumour Suppressor GAS5 LncRNA. *Genes* *6*, 484–499.

Pilié, P.G., Gay, C.M., Byers, L.A., O'Connor, M.J., and Yap, T.A. (2019). PARP Inhibitors: Extending Benefit Beyond BRCA-Mutant Cancers. *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* *25*, 3759–3771.

Pogge von Strandmann, E., Reinartz, S., Wager, U., and Müller, R. (2017). Tumor-Host Cell Interactions in Ovarian Cancer: Pathways to Therapy Failure. *Trends Cancer* *3*, 137–148.

Poliseno, L., Salmena, L., Zhang, J., Carver, B., Haveman, W.J., and Pandolfi, P.P. (2010). A coding-independent function of gene and pseudogene mRNAs regulates tumour biology. *Nature* *465*, 1033–1038.

Ponting, C.P., Oliver, P.L., and Reik, W. (2009). Evolution and Functions of Long Noncoding RNAs. *Cell* *136*, 629–641.

Prat, J. (2015). FIGO's staging classification for cancer of the ovary, fallopian tube, and peritoneum: abridged republication. *J. Gynecol. Oncol.* *26*, 87.

Pujade-Lauraine, E., Fujiwara, K., Dychter, S.S., Devgan, G., and Monk, B.J. (2018).

Avelumab (anti-PD-L1) in platinum-resistant/refractory ovarian cancer: JAVELIN Ovarian 200 Phase III study design. *Future Oncol. Lond. Engl.* *14*, 2103–2113.

Qi, P., Zhou, X.-Y., and Du, X. (2016). Circulating long non-coding RNAs in cancer: current status and future perspectives. *Mol. Cancer* *15*, 39.

Qi, W., Wang, R., Chen, H., Wang, X., Xiao, T., Boldogh, I., Ba, X., Han, L., and Zeng, X. (2015). BRG1 promotes the repair of DNA double-strand breaks by facilitating the replacement of RPA with RAD51. *J. Cell Sci.* *128*, 317–330.

Qiu, J., Lin, Y., Ye, L., Ding, J., Feng, W., Jin, H., Zhang, Y., Li, Q., and Hua, K. (2014). Overexpression of long non-coding RNA HOTAIR predicts poor patient prognosis and promotes tumor metastasis in epithelial ovarian cancer. *Gynecol. Oncol.* *134*, 121–128.

Qureshi, I.A., and Mehler, M.F. (2012). Emerging roles of non-coding RNAs in brain evolution, development, plasticity and disease. *Nat. Rev. Neurosci.* *13*, 528–541.

Ren, C., Liu, F., Ouyang, Z., An, G., Zhao, C., Shuai, J., Cai, S., Bo, X., and Shu, W. (2017). Functional annotation of structural ncRNAs within enhancer RNAs in the human genome: implications for human disease. *Sci. Rep.* *7*, 15518.

Ren, S., Wang, F., Shen, J., Sun, Y., Xu, W., Lu, J., Wei, M., Xu, C., Wu, C., Zhang, Z., et al. (2013). Long non-coding RNA metastasis associated in lung adenocarcinoma transcript 1 derived miniRNA as a novel plasma-based biomarker for diagnosing prostate cancer. *Eur. J. Cancer Oxf. Engl.* *1990* *49*, 2949–2959.

Reyes-González, J.M., Armaiz-Peña, G.N., Mangala, L.S., Valiyeva, F., Ivan, C., Pradeep, S., Echevarría-Vargas, I.M., Rivera-Reyes, A., Sood, A.K., and Vivas-Mejía, P.E. (2015). Targeting c-MYC in Platinum-Resistant Ovarian Cancer. *Mol. Cancer Ther.* *14*, 2260–2269.

Rodriguez, A., Griffiths-Jones, S., Ashurst, J.L., and Bradley, A. (2004). Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome Res.* *14*, 1902–1910.

Romay, M.C., Che, N., Becker, S.N., Pouldar, D., Hagopian, R., Xiao, X., Lusic, A.J., Berliner, J.A., and Civelek, M. (2015). Regulation of NF- $\kappa$ B signaling by oxidized glycerophospholipid and IL-1 $\beta$  induced miRs-21-3p and -27a-5p in human aortic endothelial cells. *J. Lipid Res.* *56*, 38–50.

Rosa, A., and Brivanlou, A.H. (2013). Regulatory non-coding RNAs in pluripotent stem cells. *Int. J. Mol. Sci.* *14*, 14346–14373.

Sabin, L.R., Delás, M.J., and Hannon, G.J. (2013). Dogma derailed: the many influences of RNA on the genome. *Mol. Cell* *49*, 783–794.

Saetrom, P., Heale, B.S.E., Snøve, O., Aagaard, L., Alluin, J., and Rossi, J.J. (2007).

Distance constraints between microRNA target sites dictate efficacy and cooperativity. *Nucleic Acids Res.* *35*, 2333–2342.

Salk, J.J., Fox, E.J., and Loeb, L.A. (2010). Mutational heterogeneity in human cancers: origin and consequences. *Annu. Rev. Pathol.* *5*, 51–75.

Sarshad, A.A., Juan, A.H., Muler, A.I.C., Anastasakis, D.G., Wang, X., Genzor, P., Feng, X., Tsai, P.-F., Sun, H.-W., Haase, A.D., et al. (2018). Argonaute-miRNA Complexes Silence Target mRNAs in the Nucleus of Mammalian Stem Cells. *Mol. Cell* *71*, 1040–1050.e8.

Schirle, N.T., Sheu-Gruttadauria, J., and MacRae, I.J. (2014). Structural basis for microRNA targeting. *Science* *346*, 608–613.

Schmiedel, J.M., Klemm, S.L., Zheng, Y., Sahay, A., Blüthgen, N., Marks, D.S., and van Oudenaarden, A. (2015). Gene expression. MicroRNA control of protein expression noise. *Science* *348*, 128–132.

Schmitt, A.M., and Chang, H.Y. (2016). Long Noncoding RNAs in Cancer Pathways. *Cancer Cell* *29*, 452–463.

Selbach, M., Schwanhäusser, B., Thierfelder, N., Fang, Z., Khanin, R., and Rajewsky, N. (2008). Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs. *Nature* *455*, 58–63.

Semenza, G.L. (2010). HIF-1: upstream and downstream of cancer metabolism. *Curr. Opin. Genet. Dev.* *20*, 51–56.

Shao, Y., Li, H., Du, R., Meng, J., and Yang, G. (2018). Involvement of non-coding RNAs in chemotherapy resistance of ovarian cancer. *J. Cancer* *9*, 1966–1972.

Sharma, V., Khurana, S., Kubben, N., Abdelmohsen, K., Oberdoerffer, P., Gorospe, M., and Misteli, T. (2015). A BRCA1-interacting lncRNA regulates homologous recombination. *EMBO Rep.* *16*, 1520–1534.

Shen, W., Yuan, Y., Zhao, M., Li, J., Xu, J., Lou, G., Zheng, J., Bu, S., Guo, J., and Xi, Y. (2016). Novel long non-coding RNA GACAT3 promotes gastric cancer cell proliferation through the IL-6/STAT3 signaling pathway. *Tumour Biol. J. Int. Soc. Oncodevelopmental Biol. Med.* *37*, 14895–14902.

Sheng, S.-R., Wu, J.-S., Tang, Y.-L., and Liang, X.-H. (2017). Long noncoding RNAs: emerging regulators of tumor angiogenesis. *Future Oncol.* *13*, 1551–1562.

Sherr, C.J., and McCormick, F. (2002). The RB and p53 pathways in cancer. *Cancer Cell* *2*, 103–112.

Sinha, S., Shukla, S., Khan, S., Farhan, M., Kamal, M.A., and Meeran, S.M. (2015).



Telomeric Repeat Containing RNA (TERRA): Aging and Cancer. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets* 14, 936–946.

Slaby, O., Laga, R., and Sedlacek, O. (2017). Therapeutic targeting of non-coding RNAs in cancer. *Biochem. J.* 474, 4219–4251.

Song, J.-J., Smith, S.K., Hannon, G.J., and Joshua-Tor, L. (2004). Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity. *Science* 305, 1434–1437.

Soong, T.R., Howitt, B.E., Horowitz, N., Nucci, M.R., and Crum, C.P. (2019). The fallopian tube, “precursor escape” and narrowing the knowledge gap to the origins of high-grade serous carcinoma. *Gynecol. Oncol.* 152, 426–433.

Srivastava, A.K., Singh, P.K., Rath, S.K., Dalela, D., Goel, M.M., and Bhatt, M.L.B. (2014). Appraisal of diagnostic ability of UCA1 as a biomarker of carcinoma of the urinary bladder. *Tumour Biol. J. Int. Soc. Oncodevelopmental Biol. Med.* 35, 11435–11442.

St Laurent, G., Shtokalo, D., Tackett, M.R., Yang, Z., Eremina, T., Wahlestedt, C., Urcuqui-Inchima, S., Seilheimer, B., McCaffrey, T.A., and Kapranov, P. (2012). Intronic RNAs constitute the major fraction of the non-coding RNA in mammalian cells. *BMC Genomics* 13, 504.

St Laurent, G., Shtokalo, D., Dong, B., Tackett, M.R., Fan, X., Lazorthes, S., Nicolas, E., Sang, N., Triche, T.J., McCaffrey, T.A., et al. (2013). VlincRNAs controlled by retroviral elements are a hallmark of pluripotency and cancer. *Genome Biol.* 14, R73.

St Laurent, G., Vyatkin, Y., and Kapranov, P. (2014). Dark matter RNA illuminates the puzzle of genome-wide association studies. *BMC Med.* 12, 97.

St Laurent, G., Wahlestedt, C., and Kapranov, P. (2015). The Landscape of long noncoding RNA classification. *Trends Genet. TIG* 31, 239–251.

Sun, L., Liu, L., Yang, J., Li, H., and Zhang, C. (2018). SATB1 3'-UTR and lncRNA-UCA1 competitively bind to miR-495-3p and together regulate the proliferation and invasion of gastric cancer: SUN ET AL. *J. Cell. Biochem.*

Sun, W., Yang, Y., Xu, C., and Guo, J. (2017). Regulatory mechanisms of long noncoding RNAs on gene expression in cancers. *Cancer Genet.* 216–217, 105–110.

Svobodova, E., Kubikova, J., and Svoboda, P. (2016). Production of small RNAs by mammalian Dicer. *Pflugers Arch.* 468, 1089–1102.

Taft, R.J., Pheasant, M., and Mattick, J.S. (2007). The relationship between non-protein-coding DNA and eukaryotic complexity. *BioEssays News Rev. Mol. Cell. Dev. Biol.* 29, 288–299.

- Taft, R.J., Kaplan, C.D., Simons, C., and Mattick, J.S. (2009). Evolution, biogenesis and function of promoter-associated RNAs. *Cell Cycle Georget. Tex* 8, 2332–2338.
- Taheri, M., and Ghafouri-Fard, S. (2018). Antisense Non-Coding RNA in the INK4 Locus (ANRIL) in Human Cancers. *Int. J. Cancer Manag. In Press*.
- Tang, Y., Wang, J., Lian, Y., Fan, C., Zhang, P., Wu, Y., Li, X., Xiong, F., Li, X., Li, G., et al. (2017). Linking long non-coding RNAs and SWI/SNF complexes to chromatin remodeling in cancer. *Mol. Cancer* 16, 42.
- Thorslund, T., Ripplinger, A., Hoffmann, S., Wild, T., Uckelmann, M., Villumsen, B., Narita, T., Sixma, T.K., Choudhary, C., and Bekker-Jensen, S. (2015). Histone H1 couples initiation and amplification of ubiquitin signalling after DNA damage. *Nature* 527, 389.
- Tian, S., Yuan, Y., Li, Z., Gao, M., Lu, Y., and Gao, H. (2018). LncRNA UCA1 sponges miR-26a to regulate the migration and proliferation of vascular smooth muscle cells. *Gene* 673, 159–166.
- Tripathi, V., Ellis, J.D., Shen, Z., Song, D.Y., Pan, Q., Watt, A.T., Freier, S.M., Bennett, C.F., Sharma, A., Bubulya, P.A., et al. (2010). The nuclear-retained noncoding RNA MALAT1 regulates alternative splicing by modulating SR splicing factor phosphorylation. *Mol. Cell* 39, 925–938.
- Tripathi, V., Shen, Z., Chakraborty, A., Giri, S., Freier, S.M., Wu, X., Zhang, Y., Gorospe, M., Prasanth, S.G., Lal, A., et al. (2013). Long noncoding RNA MALAT1 controls cell cycle progression by regulating the expression of oncogenic transcription factor B-MYB. *PLoS Genet.* 9, e1003368.
- Tsai, M.-C., Manor, O., Wan, Y., Mosammamaparast, N., Wang, J.K., Lan, F., Shi, Y., Segal, E., and Chang, H.Y. (2010). Long noncoding RNA as modular scaffold of histone modification complexes. *Science* 329, 689–693.
- Tsang, W.P., Ng, E.K.O., Ng, S.S.M., Jin, H., Yu, J., Sung, J.J.Y., and Kwok, T.T. (2010). Oncofetal H19-derived miR-675 regulates tumor suppressor RB in human colorectal cancer. *Carcinogenesis* 31, 350–358.
- Turtle, C.J., Hanafi, L.-A., Berger, C., Gooley, T.A., Cherian, S., Hudecek, M., Sommermeyer, D., Melville, K., Pender, B., Budiarto, T.M., et al. (2016). CD19 CAR-T cells of defined CD4+:CD8+ composition in adult B cell ALL patients. *J. Clin. Invest.* 126, 2123–2138.
- Ulitsky, I., and Bartel, D.P. (2013). lincRNAs: genomics, evolution, and mechanisms. *Cell* 154, 26–46.

Vander Heiden, M.G., Cantley, L.C., and Thompson, C.B. (2009). Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. *Science* 324, 1029–1033.

Villedieu, M., Louis, M., Dutoit, S., Brotin, E., Lincet, H., Duigou, F., Staedel, C., Gauduchon, P., and Poulain, L. (2007). Absence of Bcl-xL down-regulation in response to cisplatin is associated with chemoresistance in ovarian carcinoma cells☆. *Gynecol. Oncol.* 105, 31–44.

Volders, P.-J., Anckaert, J., Verheggen, K., Nuytens, J., Martens, L., Mestdagh, P., and Vandesompele, J. (2019). LNCipedia 5: towards a reference set of human long non-coding RNAs. *Nucleic Acids Res.* 47, D135–D139.

Wan, L.-B., and Bartolomei, M.S. (2008). Regulation of imprinting in clusters: noncoding RNAs versus insulators. *Adv. Genet.* 61, 207–223.

Wang, X.-S. (2006). Rapid Identification of UCA1 as a Very Sensitive and Specific Unique Marker for Human Bladder Carcinoma. *Clin. Cancer Res.* 12, 4851–4858.

Wang, B., and Elledge, S.J. (2007). Ubc13/Rnf8 ubiquitin ligases control foci formation of the Rap80/Abraxas/Brca1/Brcc36 complex in response to DNA damage. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104, 20759–20763.

Wang, K.C., and Chang, H.Y. (2011). Molecular Mechanisms of Long Noncoding RNAs. *Mol. Cell* 43, 904–914.

Wang, C., Qi, S., Xie, C., Li, C., Wang, P., and Liu, D. (2018a). Upregulation of long non-coding RNA XIST has anticancer effects on epithelial ovarian cancer cells through inverse downregulation of hsa-miR-214-3p. *J. Gynecol. Oncol.* 29, e99.

Wang, F., Li, X., Xie, X., Zhao, L., and Chen, W. (2008). *UCA1*, a non-protein-coding RNA up-regulated in bladder carcinoma and embryo, influencing cell growth and promoting invasion. *FEBS Lett.* 582, 1919–1927.

Wang, F., Zou, Y., Liu, F.-Y., Yu, X.-H., Huang, H., Zhang, N., Qi, Y.-Y., Liu, R.-F., Liu, X.-Y., Chen, J., et al. (2013). Infrequent mutations of the PPP2R1A and PPP2R1B genes in patients with ovarian cancer. *Mol. Med. Rep.* 7, 1826–1830.

Wang, F., Ren, S., Chen, R., Lu, J., Shi, X., Zhu, Y., Zhang, W., Jing, T., Zhang, C., Shen, J., et al. (2014a). Development and prospective multicenter evaluation of the long noncoding RNA MALAT-1 as a diagnostic urinary biomarker for prostate cancer. *Oncotarget* 5, 11091–11102.

Wang, F., Ying, H.-Q., He, B.-S., Pan, Y.-Q., Deng, Q.-W., Sun, H.-L., Chen, J., Liu, X., and Wang, S.-K. (2015a). Upregulated lncRNA-UCA1 contributes to progression of hepatocellular carcinoma through inhibition of miR-216b and activation of FGFR1/ERK signaling pathway.

Oncotarget 6, 7899.

Wang, F., Zhou, J., Xie, X., Hu, J., Chen, L., Hu, Q., Guo, H., and Yu, C. (2015b). Involvement of SRPK1 in cisplatin resistance related to long non-coding RNA UCA1 in human ovarian cancer cells. *Neoplasma* 62, 432–438.

Wang, H., Guan, Z., He, K., Qian, J., Cao, J., and Teng, L. (2017a). LncRNA UCA1 in anti-cancer drug resistance. *Oncotarget* 8.

Wang, H., Liu, Y., Zhong, J., Wu, C., Zhong, Y., Yang, G., Zhang, J., and Tang, A. (2018b). Long noncoding RNA ANRIL as a novel biomarker of lymph node metastasis and prognosis in human cancer: a meta-analysis. *Oncotarget* 9, 14608–14618.

Wang, H.-M., Lu, J.-H., Chen, W.-Y., and Gu, A.-Q. (2015c). Upregulated lncRNA-UCA1 contributes to progression of lung cancer and is closely related to clinical diagnosis as a predictive biomarker in plasma. *Int. J. Clin. Exp. Med.* 8, 11824–11830.

Wang, J., Ye, C., Liu, J., and Hu, Y. (2018c). UCA1 confers paclitaxel resistance to ovarian cancer through miR-129/ABCB1 axis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 501, 1034–1040.

Wang, Q., Cheng, N., Li, X., Pan, H., Li, C., Ren, S., Su, C., Cai, W., Zhao, C., Zhang, L., et al. (2017b). Correlation of long non-coding RNA *H19* expression with cisplatin-resistance and clinical outcome in lung adenocarcinoma. *Oncotarget* 8.

Wang, X., Gong, Y., Jin, B., Wu, C., Yang, J., Wang, L., Zhang, Z., and Mao, Z. (2014b). Long non-coding RNA urothelial carcinoma associated 1 induces cell replication by inhibiting BRG1 in 5637 cells. *Oncol. Rep.*

Wang, Y., Wang, H., Song, T., Zou, Y., Jiang, J., Fang, L., and Li, P. (2015d). HOTAIR is a potential target for the treatment of cisplatin-resistant ovarian cancer. *Mol. Med. Rep.*

Wang, Z.-Q., Cai, Q., Hu, L., He, C.-Y., Li, J.-F., Quan, Z.-W., Liu, B.-Y., Li, C., and Zhu, Z.-G. (2017c). Long noncoding RNA UCA1 induced by SP1 promotes cell proliferation via recruiting EZH2 and activating AKT pathway in gastric cancer. *Cell Death Dis.* 8, e2839.

Wapinski, O., and Chang, H.Y. (2011). Long noncoding RNAs and human disease. *Trends Cell Biol.* 21, 354–361.

Webb, P.M., and Jordan, S.J. (2017). Epidemiology of epithelial ovarian cancer. *Best Pract. Res. Clin. Obstet. Gynaecol.* 41, 3–14.

Wehner, S., Dörrich, A.K., Ciba, P., Wilde, A., and Marz, M. (2014). pRNA: NoRC-associated RNA of rRNA operons. *RNA Biol.* 11, 3–9.

Wei, G.-H., and Wang, X. (2017). lncRNA MEG3 inhibit proliferation and metastasis of

gastric cancer via p53 signaling pathway. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 21, 3850–3856.

Wei, J.-W., Huang, K., Yang, C., and Kang, C.-S. (2017). Non-coding RNAs as regulators in epigenetics (Review). *Oncol. Rep.* 37, 3–9.

Wei, Y., Sun, Q., Zhao, L., Wu, J., Chen, X., Wang, Y., Zang, W., and Zhao, G. (2016). LncRNA UCA1-miR-507-FOXO1 axis is involved in cell proliferation, invasion and G0/G1 cell cycle arrest in melanoma. *Med. Oncol. Northwood Lond. Engl.* 33, 88.

Weinberg, M.S., and Morris, K.V. (2016). Transcriptional gene silencing in humans. *Nucleic Acids Res.* 44, 6505–6517.

Whitehead, J., Pandey, G.K., and Kanduri, C. (2009). Regulation of the mammalian epigenome by long noncoding RNAs. *Biochim. Biophys. Acta* 1790, 936–947.

Wood, A.J., and Oakey, R.J. (2006). Genomic imprinting in mammals: emerging themes and established theories. *PLoS Genet.* 2, e147.

Wooff, J., Pastushok, L., Hanna, M., Fu, Y., and Xiao, W. (2004). The TRAF6 RING finger domain mediates physical interaction with Ubc13. *FEBS Lett.* 566, 229–233.

Worku, T., Bhattarai, D., Ayers, D., Wang, K., Wang, C., Rehman, Z. ur, Talpur, H. sajjad, and Yang, L. (2017). Long Non-Coding RNAs: the New Horizon of Gene Regulation in Ovarian Cancer. *Cell. Physiol. Biochem.* 948–966.

Wu, C., and Luo, J. (2016). Long Non-Coding RNA (lncRNA) Urothelial Carcinoma-Associated 1 (UCA1) Enhances Tamoxifen Resistance in Breast Cancer Cells via Inhibiting mTOR Signaling Pathway. *Med. Sci. Monit. Int. Med. J. Exp. Clin. Res.* 22, 3860–3867.

Wu, J., Du, M., Zhang, Q., Zhang, W., Fan, Y., Yin, L., Fei, Q., Jiang, X., Chen, W., Zhu, H., et al. (2018). Long noncoding RNA UCA1 promotes the proliferation, invasion, and migration of nasopharyngeal carcinoma cells via modulation of miR-145. *OncoTargets Ther.* 11, 7483–7492.

Wu, W., Zhang, S., Li, X., Xue, M., Cao, S., and Chen, W. (2013a). Ets-2 Regulates Cell Apoptosis via the Akt Pathway, through the Regulation of Urothelial Cancer Associated 1, a Long Non-Coding RNA, in Bladder Cancer Cells. *PLoS ONE* 8, e73920.

Wu, X., Bhayani, M.K., Dodge, C.T., Nicoloso, M.S., Chen, Y., Yan, X., Adachi, M., Thomas, L., Galer, C.E., Jiffar, T., et al. (2013b). Coordinated targeting of the EGFR signaling axis by microRNA-27a\*. *Oncotarget* 4, 1388–1398.

Xiao, C., Wu, C.-H., and Hu, H.-Z. (2016). LncRNA UCA1 promotes epithelial-mesenchymal transition (EMT) of breast cancer cells via enhancing Wnt/beta-catenin signaling pathway. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 20, 2819–2824.

- Xin, H., Liu, N., Xu, X., Zhang, J., Li, Y., Ma, Y., Li, G., and Liang, J. (2019). Knockdown of lncRNA-UCA1 inhibits cell viability and migration of human glioma cells by miR-193a-mediated downregulation of CDK6. *J. Cell. Biochem.* *120*, 15157–15169.
- Xue, M., Chen, W., and Li, X. (2016). Urothelial cancer associated 1: a long noncoding RNA with a crucial role in cancer. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* *142*, 1407–1419.
- Xue, W.-J., Ying, X.-L., Jiang, J.-H., and Xu, Y.-H. (2014). Prostate cancer antigen 3 as a biomarker in the urine for prostate cancer diagnosis: a meta-analysis. *J. Cancer Res. Ther.* *10 Suppl*, C218-221.
- Yan, B., Yao, J., Liu, J.-Y., Li, X.-M., Wang, X.-Q., Li, Y.-J., Tao, Z.-F., Song, Y.-C., Chen, Q., and Jiang, Q. (2015). lncRNA-MIAT regulates microvascular dysfunction by functioning as a competing endogenous RNA. *Circ. Res.* *116*, 1143–1156.
- Yan, J., Dang, Y., Liu, S., Zhang, Y., and Zhang, G. (2016). lncRNA HOTAIR promotes cisplatin resistance in gastric cancer by targeting miR-126 to activate the PI3K/AKT/MRP1 genes. *Tumor Biol.* *37*, 16345–16355.
- Yan, Q., Tian, Y., and Hao, F. (2018). Downregulation of lncRNA UCA1 inhibits proliferation and invasion of cervical cancer cells through miR-206 expression. *Oncol. Res.*
- Yang, Y., and Chen, L. (2019). Downregulation of lncRNA UCA1 facilitates apoptosis and reduces proliferation in multiple myeloma via regulation of the miR-1271-5p/HGF axis. *J. Chin. Med. Assoc. JCMA.*
- Yang, K., Hou, Y., Li, A., Li, Z., Wang, W., Xie, H., Rong, Z., Lou, G., and Li, K. (2017). Identification of a six-lncRNA signature associated with recurrence of ovarian cancer. *Sci. Rep.* *7*.
- Yang, Y., Jiang, Y., Wan, Y., Zhang, L., Qiu, J., Zhou, S., and Cheng, W. (2016). UCA1 functions as a competing endogenous RNA to suppress epithelial ovarian cancer metastasis. *Tumor Biol.* *37*, 10633–10641.
- Yap, K.L., Li, S., Muñoz-Cabello, A.M., Raguz, S., Zeng, L., Mujtaba, S., Gil, J., Walsh, M.J., and Zhou, M.-M. (2010). Molecular interplay of the noncoding RNA ANRIL and methylated histone H3 lysine 27 by polycomb CBX7 in transcriptional silencing of INK4a. *Mol. Cell* *38*, 662–674.
- Yen, K., Vinayachandran, V., Batta, K., Koerber, R.T., and Pugh, B.F. (2012). Genome-wide nucleosome specificity and directionality of chromatin remodelers. *Cell* *149*, 1461–1473.
- Ying, L., Chen, Q., Wang, Y., Zhou, Z., Huang, Y., and Qiu, F. (2012). Upregulated MALAT-1 contributes to bladder cancer cell migration by inducing epithelial-to-mesenchymal transition.

Mol. Biosyst. 8, 2289–2294.

Yoshihara, K., Shahmoradgoli, M., Martínez, E., Vegesna, R., Kim, H., Torres-Garcia, W., Treviño, V., Shen, H., Laird, P.W., Levine, D.A., et al. (2013). Inferring tumour purity and stromal and immune cell admixture from expression data. *Nat. Commun.* 4, 2612.

Yu, B., and Shan, G. (2016). Functions of long noncoding RNAs in the nucleus. *Nucl. Austin Tex* 7, 155–166.

Yu, N., Yong, S., Kim, H.K., Choi, Y.-L., Jung, Y., Kim, D., Seo, J., Lee, Y.E., Baek, D., Lee, J., et al. (2019). Identification of tumor suppressor miRNAs by integrative miRNA and mRNA sequencing of matched tumor-normal samples in lung adenocarcinoma. *Mol. Oncol.* 13, 1356–1368.

Yu, T.-Y., Kao, Y., and Lin, J.-J. (2014). Telomeric transcripts stimulate telomere recombination to suppress senescence in cells lacking telomerase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111, 3377–3382.

Yuan, S.-X., Yang, F., Yang, Y., Tao, Q.-F., Zhang, J., Huang, G., Yang, Y., Wang, R.-Y., Yang, S., Huo, X.-S., et al. (2012). Long noncoding RNA associated with microvascular invasion in hepatocellular carcinoma promotes angiogenesis and serves as a predictor for hepatocellular carcinoma patients' poor recurrence-free survival after hepatectomy. *Hepatol. Baltim. Md* 56, 2231–2241.

Zeng, Y., and Cullen, B.R. (2004). Structural requirements for pre-microRNA binding and nuclear export by Exportin 5. *Nucleic Acids Res.* 32, 4776–4785.

Zhan, L., Li, J., and Wei, B. (2018). Long non-coding RNAs in ovarian cancer. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 37.

Zhang, Y., and Reinberg, D. (2001). Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails. *Genes Dev.* 15, 2343–2360.

Zhang, H., Kolb, F.A., Jaskiewicz, L., Westhof, E., and Filipowicz, W. (2004). Single processing center models for human Dicer and bacterial RNase III. *Cell* 118, 57–68.

Zhang, J., Liu, L., Li, J., and Le, T.D. (2018a). LncmiRSRN: identification and analysis of long non-coding RNA related miRNA sponge regulatory network in human cancer. *Bioinforma. Oxf. Engl.* 34, 4232–4240.

Zhang, L., Huang, J., Yang, N., Greshock, J., Megraw, M.S., Giannakakis, A., Liang, S., Naylor, T.L., Barchetti, A., Ward, M.R., et al. (2006). microRNAs exhibit high frequency genomic alterations in human cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103, 9136–9141.

Zhang, L., Volinia, S., Bonome, T., Calin, G.A., Greshock, J., Yang, N., Liu, C.-G., Giannakakis, A., Alexiou, P., Hasegawa, K., et al. (2008). Genomic and epigenetic alterations deregulate microRNA expression in human epithelial ovarian cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *105*, 7004–7009.

Zhang, L., Cao, X., Zhang, L., Zhang, X., Sheng, H., and Tao, K. (2016). UCA1 overexpression predicts clinical outcome of patients with ovarian cancer receiving adjuvant chemotherapy. *Cancer Chemother. Pharmacol.* *77*, 629–634.

Zhang, M., Wu, W.-B., Wang, Z.-W., and Wang, X.-H. (2017a). lncRNA NEAT1 is closely related with progression of breast cancer via promoting proliferation and EMT. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* *21*, 1020–1026.

Zhang, M., Zhao, Y., Zhang, Y., Wang, D., Gu, S., Feng, W., Peng, W., Gong, A., and Xu, M. (2018b). lncRNA UCA1 promotes migration and invasion in pancreatic cancer cells via the Hippo pathway. *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.* *1864*, 1770–1782.

Zhang, X., Rice, K., Wang, Y., Chen, W., Zhong, Y., Nakayama, Y., Zhou, Y., and Klibanski, A. (2010). Maternally expressed gene 3 (MEG3) noncoding ribonucleic acid: isoform structure, expression, and functions. *Endocrinology* *151*, 939–947.

Zhang, X., Gao, F., Zhou, L., Wang, H., Shi, G., and Tan, X. (2017b). UCA1 Regulates the Growth and Metastasis of Pancreatic Cancer by Sponging miR-135a. *Oncol. Res.* *25*, 1529–1541.

Zhang, Y., Zhang, X.-O., Chen, T., Xiang, J.-F., Yin, Q.-F., Xing, Y.-H., Zhu, S., Yang, L., and Chen, L.-L. (2013). Circular intronic long noncoding RNAs. *Mol. Cell* *51*, 792–806.

Zhao, W., Sun, C., and Cui, Z. (2017). A long noncoding RNA UCA1 promotes proliferation and predicts poor prognosis in glioma. *Clin. Transl. Oncol.*

Zhao, Y., Sun, H., and Wang, H. (2016). Long noncoding RNAs in DNA methylation: new players stepping into the old game. *Cell Biosci.* *6*, 45.

Zheng, J., Dong, P., Mao, Y., Chen, S., Wu, X., Li, G., Lu, Z., and Yu, F. (2015). lincRNA-p21 inhibits hepatic stellate cell activation and liver fibrogenesis via p21. *FEBS J.* *282*, 4810–4821.

Zheng, Z.-G., Xu, H., Suo, S.-S., Xu, X.-L., Ni, M.-W., Gu, L.-H., Chen, W., Wang, L.-Y., Zhao, Y., and Tian, B. (2016). The essential role of H19 contributing to cisplatin resistance by regulating glutathione metabolism in high-grade serous ovarian cancer. *Sci. Rep.* *6*, 26093.

Zhong, Y., Gao, D., He, S., Shuai, C., and Peng, S. (2016). Dysregulated Expression of Long Noncoding RNAs in Ovarian Cancer: *Int. J. Gynecol. Cancer* *26*, 1564–1570.



Zhou, Y., Zhang, X., and Klibanski, A. (2012). MEG3 noncoding RNA: a tumor suppressor. *J. Mol. Endocrinol.* *48*, R45–R53.

Zhou, Y., Chen, Y., Ding, W., Hua, Z., Wang, L., Zhu, Y., Qian, H., and Dai, T. (2018a). LncRNA UCA1 impacts cell proliferation, invasion, and migration of pancreatic cancer through regulating miR-96/FOXO3. *IUBMB Life* *70*, 276–290.

Zhou, Y., Meng, X., Chen, S., Li, W., Li, D., Singer, R., and Gu, W. (2018b). IMP1 regulates UCA1-mediated cell invasion through facilitating UCA1 decay and decreasing the sponge effect of UCA1 for miR-122-5p. *Breast Cancer Res.* *20*.

Zhu, H., Li, X., Song, Y., Zhang, P., Xiao, Y., and Xing, Y. (2015). Long non-coding RNA ANRIL is up-regulated in bladder cancer and regulates bladder cancer cell proliferation and apoptosis through the intrinsic pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *467*, 223–228.

Zhu, Y., Rowley, M.J., Böhmendorfer, G., and Wierzbicki, A.T. (2013). A SWI/SNF chromatin-remodeling complex acts in noncoding RNA-mediated transcriptional silencing. *Mol. Cell* *49*, 298–309.



## **Annexes**

---

## Publication scientifique en révision :

### Publications internationales dans une revue à comité de lecture

**“A genome-wide miRNA screen identifies miR-3622b-5p as a tumor suppressor in ovarian carcinoma.”**

*Mégane Vernon, Bernard Lambert, Matthieu Meryet-Figuière, Nicolas Vigneron, Emilie Brotin, Anaïs Wambecke, Edwige Abeilard, Florence Giffard, Marie-Hélène Louis, Pascal Gauduchon, Laurent Poulain, Christophe Denoyelle*

#### **Abstract**

Ovarian carcinoma is the leading cause of death from gynaecological malignancies. No significant improvement in overall survival has been achieved in the past three decades, underlining the urgent need of new therapeutic opportunities. MicroRNAs (miRNAs) represent an interesting area to explore because they can target several hundred genes and regulate key pathways. We postulated that the identification of the targets and determinants of action of such miRNAs might reveal new vulnerabilities of ovarian cancer cells, which might constitute new potential combinatorial therapeutic options. Here, we screened a miRNA library with a real-time high-throughput method, to identify miRNAs with a cytotoxic activity in chemoresistant ovarian cancer cells. We showed that miR 3622b 5p induces apoptosis in several ovarian cancer cell lines by directly targeting BCL XL and by upregulating BIM through EGFR direct targeting. It also sensitises cells to cisplatin by the down regulation of BCL XL in cell line escaping BIM induction. MiR 3622b-5p also exerts anti-migratory capacities, through targeting both LIMK1 and NOTCH1. We eventually showed that the wide-range antitumor properties of miR 3622b-5p could be mimicked by associations of pharmacological inhibitors. Altogether, our work highlights the potential of phenotype-based miRNA screening approaches to decipher, in the absence of a preconceived idea, new relevant therapeutic targets harboring synthetic lethal interactions to finally propose new rationale drug combinations, which might lead to relevant clinically applicable strategies.

## Manuscrit en cours de finalisation:

**“Network-based integration of multi-omics data enables the identification of the most critical determinants of a miRNA effects: the example of miR-491-5p in ovarian cancer.”**

*Matthieu Meryet-Figuière\*, Mégane Vernon\*, Mamy Adrianteranagna, Bernard Lambert, Jean-Paul Issartel, Audrey Guttin, Pascal Gauduchon, Emilie Brotin, Florent Dingli, Damarys Loew, Nicolas Vigneron, Anaïs Wambecke, Emmanuel Barillot, Laurent Poulain, Loredana Martignetti, Christophe Denoyelle*

Soumission : automne 2019

### **Abstract**

The chemoresistance of ovarian cancers requires the development of new therapeutic approaches. The discovery of miRNAs, because of their ability to target numerous transcripts at once opens new potential therapeutic strategies. The use of miRNA per se as therapeutic agents has not yet reached clinical approval, therefore the identification of miRNAs' targets and associated regulatory networks involved in the chemoresistance might allow the definition of new strategies using drugs whose association might mimic a given miRNA's effects.

Based on this assumption, after identifying two direct targets, EGFR and BCL2L1 (Bcl-xL), involved in the apoptotic effect of miR-491-5p in ovarian cancer cells, our group has shown that the cytotoxicity of this miRNA could be recapitulated by a combining an EGFR inhibitor with a BH3-mimetic molecule, two drugs already used in clinical practice. However, the process of identification of miRNA's targets relies on imperfect prediction algorithms and is quite time-consuming. We therefore devised a multi-omics approach in an attempt to precisely characterize miRNAs' effects. We combined the analysis of miR-491-5p direct targets, and of miR-491-5p effects at the transcriptomic and proteomic levels. We chose to focus this approach firstly on miR-491-5p, as some of its direct targets and regulated pathways have already been identified by our group, and could constitute positive controls for the validation of integrated multi-omics results.

Integrated analysis confirmed the alteration of several already known pathways (such as MAPK), and of newly identified ones (such as RHO-GTPases) in response to miR-491-5p. More interestingly, our data enabled us to construct an interaction network which enlightened highly connected nodes, being either direct or indirect targets of miR-491-5p effects: the already known EGFR and BCL2L1, but also EP300, CTNNB1 (beta-catenin) and several RHO-GTPases. By using the different possible combinations of specific inhibitors of these

nodes (two at a time), we could greatly enhance their respective cytotoxicity and recapitulate miR-491-5p-induced phenotype.

Our methodology thus constitutes an interesting strategy to study at a large scale the effects of a given miRNA. Also, because we used pharmacological inhibitors already available for a clinical use, or in clinical trial phases, our results might pave the way for the definition of innovative therapeutic options for ovarian cancer patients.

## Communications par voie orale :

**“Implication des longs ARNs non-codants dans la chimiorésistance des cancers de l’ovaire.”**

***Anaïs Wambecke**, Mégane Vernon, Bernard Lambert, Emilie Brotin, Nicolas Vigneron, Laurent Poulain, Christophe Denoyelle et Matthieu Meryet-Figuère.*

3<sup>ème</sup> Journée Normande de Recherche Biomédicale (JRNB), Rouen – 20 Septembre 2018.

**“Mise en évidence des effets d’un miRNA à une échelle globale par l’utilisation combinée d’approches hauts débits et bio-informatiques: exemple du miR-491-5p.”**

***Matthieu Meryet-Figuere\***, Mégane Vernon\*, Mamy Andrianteranagna, Bernard Lambert, Jean-Paul Issartel, Audrey Guttin, Pascal Gauduchon, Emilie Brotin, Florent Dingli, Damarys Loew, Nicolas Vigneron, **Anaïs Wambecke**, Emmanuel Barillot, Laurent Poulain, Loredana Martignetti, Christophe Denoyelle*

10<sup>ème</sup> Journées Scientifiques du Cancéropôle Nord-Ouest, Deauville – 10 au 12 Mai 2017.

## Communications par voie d'affiche :

**“Implication du long ARN non-codant ‘UCA1’ dans la chimiorésistance des cancers de l’ovaire.”**

Anaïs Wambecke, *Mégane Vernon, Bernard Lambert, Emilie Brotin, Nicolas Vigneron, Martin Figeac, Laurent Poulain, Christophe Denoyelle et Matthieu Meryet-Figuière.*  
12<sup>ème</sup> Journées Scientifiques du Cancéropôle Nord-Ouest, Deauville – 15 au 17 Mai 2019.

**“Implication du long ARN non-codant ‘UCA1’ dans la chimiorésistance des cancers de l’ovaire.”**

Anaïs Wambecke, *Mégane Vernon, Bernard Lambert, Emilie Brotin, Nicolas Vigneron, Martin Figeac, Laurent Poulain, Christophe Denoyelle et Matthieu Meryet-Figuière.*  
11<sup>ème</sup> Journées Scientifiques du Cancéropôle Nord-Ouest, Deauville – 23 au 25 Mai 2018.

**“Implication des longs ARNs non-codants dans la chimiorésistance des cancers de l’ovaire.”**

Anaïs Wambecke, *Mégane Vernon, Bernard Lambert, Emilie Brotin, Nicolas Vigneron, Laurent Poulain, Christophe Denoyelle et Matthieu Meryet-Figuière.*  
2<sup>ème</sup> Journée Normande de Recherche Biomédicale (JRNB), Caen – 14 Novembre 2017.

**“Implication of long non-coding RNAs (lncRNAs) in the chemoresistance of ovarian carcinoma.”**

Anaïs Wambecke, *Mégane Vernon, Bernard Lambert, Emilie Brotin, Nicolas Vigneron, Laurent Poulain, Christophe Denoyelle et Matthieu Meryet-Figuière.*  
6th course on Non-Coding Genome; Institut pierre et Marie Curie Training Unit International Course, Paris – 24 février au 03 mars 2017.



## **Activité d'enseignement :**

Co-encadrement de séances de travaux pratiques de Biologie Moléculaire en DFGSP2 (UE Génome et Epigénome) avec le Dr. Emilie Brotin (ATER) à l'UFR des Sciences Pharmaceutiques de l'Université de Caen Normandie. (Avenant au contrat doctoral (2017-2018), 66h TP).

## **Encadrement d'étudiants :**

Co-encadrement d'un binôme de deux étudiants (collégien, 3ème et lycéen 1ère S) dans le cadre du dispositif «Apprentis chercheurs» de l'association «Arbre des Connaissances» (2016-2017) avec une doctorante.

## Formations :

### **Formations doctorales :**

- Formation « Initiation au logiciel de gestion des références bibliographique Zotero » (6h)
- Formation « mettre en place une veille documentaire grâce au fils RSS pour faire sa bibliographie » (2h)
- Formation « Fonctions avancées d'Excel » (6h)
- Formation « Structurer des documents longs avec Word » (6h)
- Formation anglais (Cours Magistraux et Travaux Dirigés) (72h, eq : 30h)
- Formation « Savoir créer des figures et illustrations pour publier des articles et rédiger sa thèse: initiation logiciel libre GIMP » (12h)
- Formation « Méthodes et outils Sciences et Santé » (4h)
- Formation « de la thèse à l'emploi: connaître le marché de l'emploi » (6h)
- Formation « de la thèse à l'emploi: CV et lettre de motivation » (6h)
- Formation « financement et le management des projets de recherche » (12h)
- Formation aux missions d'enseignement (dispensé par l'ESPE de Caen) (15h)

### **Autres formations :**

- DU expérimentation animale niveau 1 (72h, eq 35h)
- Atelier du chercheur : vulgarisation scientifique (dispensé par le Dôme Caen, Relais d'sciences) (16h)
- Les Apprentis Chercheurs, (dans le cadre de l'association Arbres des Connaissances) (30h)
- Sensibilisation à la valorisation scientifique (dispensé par le CNO), (1/2 journée)
- Les translationnelles en oncologie 2018 (dispensé par le CNO), (2 jours)

## Vulgarisation scientifique :

### **«Atelier du chercheur» dans le cadre de la Fête de la Science**

Fête de la Science, Collège Lavalley, SAINT LÔ– Octobre 2017

Fête de la Science, Collège André Collet, MOULINS LA MARCHE– Octobre 2017

### **«Apprentis chercheurs» dans la cadre de l'association Arbres des Connaissances**

Association Arbre des Connaissances, Caen – Décembre 2016 à Juin 2017.



## Résumé

Les cancers de l'ovaire présentent un taux de survie à 5 ans inférieur à 40% et constituent la principale cause de décès par cancer gynécologique dans le monde. Ce sombre pronostic s'explique par un diagnostic tardif (du à un développement asymptomatique dans les premiers stades) et une résistance aux traitements existants et souligne la nécessité de développer de nouvelles approches thérapeutiques. La découverte ces dernières années, d'un nombre important de lncRNAs a permis d'ouvrir de nouvelles perspectives pour la recherche en oncologie. Peu d'études ont à ce jour exploré leur implication dans la chimiorésistance, a fortiori dans les cancers de l'ovaire. Parmi ces lncRNAs, 'UCA1' exerce de multiples fonctions oncogéniques par des mécanismes encore peu décrits. Son expression constitue un facteur de mauvais pronostic dans diverses tumeurs malignes dont les cancers de l'ovaire. Nous avons pu démontrer un rôle de ceRNA pour le miR-27a-5p, qui une fois libéré suite à l'inhibition d'UCA1, régule négativement UBE2N, une cible directe. UBE2N est un acteur connu des voies de réparation de l'ADN et de la régulation de la voie NF- $\kappa$ B, et son inhibition dans nos modèles entraîne une augmentation de l'expression de BIM et perturbe les mécanismes de réparation de l'ADN, sensibilisant des cellules cancéreuses ovariennes à l'action des sels de platine et des PARPi. L'inhibition d'UBE2N sensibilise également aux sels de platine plusieurs cultures organoïdes tridimensionnelles dérivées de patientes, et pourrait ainsi constituer une stratégie thérapeutique innovante pour lutter contre la chimiorésistance dans le cancer de l'ovaire.

**Mots clés :** Cancers de l'ovaire, lncRNA, UCA1, chimiorésistance, stratégie thérapeutique.

## Abstract

Ovarian cancers present a 5-year survival rate of under 40% and are the leading cause of death from gynecological cancer worldwide. This poor prognosis is explained by a late diagnosis (due to asymptomatic development in the early stages) and resistance to existing treatments and highlights the need to develop new therapeutic approaches. The discovery in recent years of a significant number of lncRNAs has opened up new opportunities for oncology research. Few studies have so far explored their involvement in chemoresistance, let alone ovarian cancer. Among these lncRNAs, 'UCA1' performs multiple oncogenic functions through mechanisms not yet well described. Its expression is a factor of poor prognosis in various malignant tumours including ovarian cancers. We were able to demonstrate a role of ceRNA for miR-27a-5p, which when released following the inhibition of UCA1, negatively regulates UBE2N, a direct target. UBE2N is a known actor in DNA repair pathways and NF- $\kappa$ B pathway regulation, and its inhibition in our models leads to an increase in BIM expression and disrupts DNA repair mechanisms, sensitizing ovarian cancer cells to the action of platinum salts and PARPi. The inhibition of UBE2N also sensitizes to platinum salts, several three-dimensional organoid cultures derived from patients, thus may provide an innovative therapeutic strategy to combat chemoresistance in ovarian cancer.

**Keywords:** Ovarian cancers, lncRNA, UCA1, chemoresistance, therapeutics strategies.