



**HAL**  
open science

# Rôle du long ARN non codant H19 dans l'émergence et le développement des métastases du cancer du sein

Evodie Peperstraete

► **To cite this version:**

Evodie Peperstraete. Rôle du long ARN non codant H19 dans l'émergence et le développement des métastases du cancer du sein. Cancer. Université de Lille, 2022. Français. NNT : 2022ULILS106 . tel-04306448

**HAL Id: tel-04306448**

**<https://theses.hal.science/tel-04306448>**

Submitted on 25 Nov 2023

**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.

UNIVERSITE DE LILLE  
LABORATOIRE CANTHER UMR9020 CNRS – U1277 INSERM

## THESE DE DOCTORAT

Pour l'obtention du titre de

### DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LILLE

Ecole Doctorale Biologie-Santé de Lille (ED-446)

Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

## ROLE DU LONG ARN NON CODANT *H19* DANS L'EMERGENCE ET LE DEVELOPPEMENT DES METASTASES DU CANCER DU SEIN

Présentée et soutenue publiquement par

**Evodie PEPERSTRAETE**

Le 24 Novembre 2022

### Composition du Jury :

Présidente du Jury	Pr. Xuefen LE BOURHIS	UMR CANTHER, Lille
Rapporteurs	Dr. Christophe DENOYELLE	U1086 ANTICIPE, Caen
	DR. Evelyne SEGAL-BENDIRDJIAN	UMRS_1124 T3S, Paris
Examineurs	Pr. Fabrice ALLAIN	UMR 8576 UGSF, Lille
	Dr. Constance VENNIN	LIR/Institute for Physiological Chemistry, Mayence
Directeur de thèse	Pr. Eric ADRIAENSSENS	UMR CANTHER, Lille

UNIVERSITE DE LILLE  
LABORATOIRE CANTHER UMR9020 CNRS – U1277 INSERM

## THESE DE DOCTORAT

Pour l'obtention du titre de

### DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LILLE

Ecole Doctorale Biologie-Santé de Lille (ED-446)

Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

## ROLE DU LONG ARN NON CODANT *H19* DANS L'EMERGENCE ET LE DEVELOPPEMENT DES METASTASES DU CANCER DU SEIN

Présentée et soutenue publiquement par

**Evodie PEPERSTRAETE**

Le 24 Novembre 2022

### Composition du Jury :

Présidente du Jury	Pr. Xuefen LE BOURHIS	UMR CANTHER, Lille
Rapporteurs	Dr. Christophe DENOYELLE	U1086 ANTICIPE, Caen
	DR. Evelyne SEGAL-BENDIRDJIAN	UMRS_1124 T3S, Paris
Examineurs	Pr. Fabrice ALLAIN	UMR 8576 UGSF, Lille
	Dr. Constance VENNIN	LIR/Institute for Physiological Chemistry, Mayence
Directeur de thèse	Pr. Eric ADRIAENSSENS	UMR CANTHER, Lille



## REMERCIEMENTS

Je souhaite remercier les membres de mon jury le **Docteur Evelyne SEGAL-BENDIRDJIAN**, le **Docteur Constance VENNIN**, le **Docteur Christophe DENOYELLE**, le **Professeur Fabrice ALLAIN** qui ont accepté de lire ce manuscrit et d'évaluer mes travaux de thèse. Je vous remercie d'avoir consacré de votre temps pour assister à ma soutenance de thèse. Votre présence m'honore énormément. Un grand merci à **Evelyne SEGAL-BENDIRDJIAN** et à **Fabrice ALLAIN** pour vos précieux conseils lors de mes comités de suivi de thèse.

Je remercie le **Professeur Xuefen LE BOURHIS**, directrice de l'équipe Plasticité Cellulaire et Cancer, pour m'avoir accueillie pour mes stages de master puis pour ma thèse. Merci de m'avoir fait confiance au cours de ces 4 années. Votre soutien ainsi que vos conseils éclairés sur mes travaux ont permis l'avancée de ce projet.

J'aimerais également remercier mon directeur de thèse, le **Professeur Eric ADRIAENSSENS** de m'avoir encadrée pendant ces 3 années de thèse et durant mes stages de master. Je vous remercie de m'avoir fait confiance et d'avoir cru en moi. Vous m'avez transmis votre rigueur et votre sens du détail qui m'ont toujours poussée dans mes retranchements. Je n'oublierai pas les fois où vous prononciez les mots « J'ai pensé à ça » qui résonnaient dans un bureau assourdi, et qui parfois me faisaient sursauter. Je retiendrai aussi vos anecdotes sur la vie du labo et votre humour qui instaurent une bonne ambiance dans notre bureau avant de reparler de sciences.

Mes remerciements s'étendent également vers les membres de l'équipe : **Robert-Alain**, merci pour vos remarques constructives lors des réunions. **Pierre-Olivier** et **Pamela**, merci pour vos conseils et votre aide lors des manips et de l'analyse sur les poissons. **Chann**, merci pour ton expertise sur les cellules souches. **Roland**, merci de m'avoir fait confiance pour présenter mes travaux lors des Séminaires Thématiques des M2-Biologie Santé. **Valérie**, merci pour ta disponibilité et ton aide lors des commandes. Nos conversations méridiennes sur la danse et ta bonne humeur me manqueront. Merci **Isabelle** pour ton aide quotidienne nécessaire pour faire tourner le labo. On peut compter sur toi à tous moments. Je remercie aussi les membres de l'IRCL : **Samuel, Nicole, Christine** et **Mélanie**, j'ai toujours été bien reçue quand je venais de votre côté. Merci **Alessandro** pour vos commentaires pertinents lors des réunions hebdomadaires.

Durant ces 5 années au laboratoire, j'ai rencontré beaucoup d'étudiants sur qui j'ai pu compter quand j'en avais besoin. Je vais commencer par les plus anciens qui m'ont rapidement intégrée à leur « crew » et qui m'ont fait me sentir à l'aise au sein du laboratoire. **Nadège**, nous avons eu besoin de temps pour nous connaître et puis au fur et à mesure j'ai gagné ta confiance. Je te remercie du temps que tu m'as accordé, tu as toujours répondu présente pour mes entraînements de soutenance de M2 et puis pour le concours de thèse. Ta persévérance et ton organisation imposent le respect. Tu as également perpétué la tradition avec les fameuses vidéos de fin de thèse que tu gérais à la perfection sans oublier les soirées « jeux », qui nous permettaient de garder une cohésion de groupe et une bonne ambiance entre nous. Je te souhaite le meilleur pour ton nouveau poste.

Douce **Ihsan**, ta gentillesse et ton sourire ont marqué le laboratoire. Je me souviens quand nous parlions de nos manips qui fonctionnaient ou non. Nous avons toujours un mot d'encouragement l'une pour l'autre, cela m'a manqué durant ces deux dernières années. Je me rappelle aussi quand tu passais devant mon bureau et que tu étais en retard pour les cours quand j'entendais tes petits talons qui claquaient à chacun de tes pas dans le couloir. Je sais à présent que tu as trouvé ta voie et je te souhaite que cela continue.

**Jérémy**, merci pour tes conseils et ton humour en salle de Biochimie. Je me rappelle quand tu essayais par tous les moyens de faire des « cœurs » en sélectionnant minutieusement les cônes, cela me faisait rire. Je repense souvent à cela, quand je prends un cône, j'essaie à mon tour d'être une artiste-scientifique pour les prochains utilisateurs.

La team *H19* à présent, **Jordan**, tu as contribué à ma formation quand je suis arrivée en stage de M1, qui s'est poursuivie en M2 et puis au début de ma thèse. Merci, pour tous tes « trucs et astuces » au laboratoire, qui me font gagner un temps fou. Bonne continuation à toi ! **Clément**, tu as également participé à ma formation scientifique. Je te remercie pour ton soutien et ton aide précieuse sur le projet « métastases ». Nous avons planifié ensemble chacune de nos manips même pendant les fêtes de fin d'année. Au moment où j'écris ces lignes, je ne regrette absolument pas d'être venue au laboratoire lors de cette période, nous n'avions aucune vision sur l'avenir et la COVID-19 nous a tous mis à l'arrêt. Notre organisation sans faille a permis la publication de cet article et nous pouvons en être fiers. Tu as toujours instauré une bonne ambiance dans notre bureau et dans les salles de manips. Je t'entends même encore siffloter quand tu passais dans les couloirs, et que nous n'étions pas d'accord sur le choix de la radio. Un grand merci pour tout cela ! Je te souhaite le meilleur pour la suite mais je ne m'en fais pas pour toi !

**Quentin**, merci pour ton accueil quand je venais à l'IRCL et ton humour. Je me méfiais en permanence de vous 2, avec Clément, vous étiez toujours en préparation d'un sabotage de bureau si nous n'étions pas d'accord avec vous. Nadège en a d'ailleurs connu les frais. Je me ralliais à la cause qui m'arrangeait et c'était assez drôle de coller des gommettes la Reine des Neiges absolument partout ! Bonne continuation chez Roquette !

Place aux plus jeunes maintenant avec **Marie W**, merci pour ton calme et ta discrétion à tous moments. Tu es une personne apaisante pour quelqu'un comme moi de « speed ». Ta patience et tes conseils m'ont été d'une grande aide pour l'analyse des poissons. Encore félicitations pour ta thèse et ton post-doc aux USA ! **Sarah**, bon courage pour la dernière ligne droite. **Marie D**, merci pour ta joie de vivre, ton soutien et ton amitié qui m'ont permis de m'épanouir pleinement au sein du laboratoire comme en dehors. Malheureusement, la science ne t'a pas épargné mais tu t'es toujours relevée car tu es courageuse et une battante. Je suis certaine que tu feras profiter de ton expérience et de tes qualités dans un autre domaine (la bio-informatique peut-être). **Ludivine**, merci pour ton leadership et ton caractère qui t'est propre. Tu as repris d'une main de maître le flambeau des anciens en organisant des soirées jeux ou en nous réunissant pour la Fête de la Science. Bon courage pour la dernière ligne droite ! **Mathilde**, ma copine de promo, tu m'as toujours poussé vers le haut. Ton soutien infailible et tes conseils m'ont toujours aidé à aller plus loin. Bien-sûr, nous passions tout notre temps à la BU avec **Caroline** mais nous parlions aussi de tout et de rien. Je nous revois, quelques années en arrière, sur les bancs de la fac et nous voilà, aujourd'hui, toutes les 3 bientôt Docteurs en Biologie. Nous pouvons être fières du chemin parcouru ! **Mathilde**, bon courage pour cette année supplémentaire, qui je l'espère t'aidera à publier tes travaux. **Caroline**, bon courage pour la dernière ligne droite. **Julien, Amina, Andria**, bon courage pour la dernière année ! **Célia**, une amitié comme celle que nous partageons est indispensable. Tu peux compter sur moi dans les bons comme dans les mauvais moments et je sais également que tu seras toujours présente. Merci pour tous ces fous rires à Deauville et pour qui tu es tout simplement. Surtout reste toi-même et je te souhaite le meilleur pour la suite ! **Alexandre, Mayar, Lisa, Geoffrey**, bon courage pour la thèse ! **Martine**, je suis convaincue que tu as toutes les compétences nécessaires pour faire un post-doc alors j'espère que tu trouveras ta place dans la recherche. Je remercie également les personnes de passage au laboratoire : **Aurélie, Pauline, Julia, Aurélien, Thomas, Maria, Tony, Edouard, Estelle, Adrien, Emma, Amandine** et **Romy**.

Je crois qu'à présent je ne peux plus trop me considérer comme dans les plus jeunes, j'ai basculé dans les anciens. Il est donc venu le temps pour moi, de céder ma place et de souhaiter

une belle réussite aux futurs doctorants : **Anaïs, Flavie, Joséphine, Eloïse, Paul** et **Mariette**. Et enfin, la relève est assurée avec **Kekely**. Je peux partir sereine en te laissant les clés de la baraque !

Outre mes rencontres au laboratoire, j'ai également des amies en or. Je vais commencer par **Manon**, notre amitié a commencé au lycée, au bord du bassin. Même si tu es partie vivre à 700 km de Lille, nous avons toujours gardé contact. Merci pour ces appels en visio de plus de 4h où nous refaisons le monde, et pour ton amitié sincère depuis des années.

**Gwendoline**, ta joie de vivre, ton sourire et nos franches soirées de rigolades m'ont terriblement manqué depuis que tu es partie mais je sais que tu es maintenant épanouie dans ce que tu fais. Nous nous reverrons sans doute, par hasard, en vacances comme cette fameuse année. Je te souhaite une belle réussite professionnelle autant que personnelle.

**Pauline**, tu as toujours été là pour moi et on peut le dire, tu m'as souvent relevé quand j'étais au plus bas. Bien-sûr, nous avons également eu de bons moments où nous parlions de tout et de rien (un coucou à **Aurélien**). Merci pour ton soutien au cours de ces dernières années, qui m'a permis d'en arriver là aujourd'hui. Nous avons pris un chemin différent mais je sais que tu as trouvé ta voie dans l'enseignement.

**Lucie**, ma copine de cheveux bouclés, toutes les deux on se connaît depuis un bout de temps maintenant. Merci d'être la fille que tu es, rayonnante et toujours de bonne humeur. Je crois que nous nous sommes bien trouvées, notamment pour notre passion commune pour les « pinous » mais pas seulement. Je te souhaite le meilleur ma belle et j'espère qu'on se reverra vite.

Durant ces 9 années de vie étudiante, j'ai eu besoin de garder un équilibre entre les bouquins et le sport. J'ai fait la rencontre d'une super Prof, qui est devenue mon amie et qui combinait zumba et hip-hop, tout ce dont je voulais pour me défouler. **Peggy**, je te remercie d'avoir toujours été là pour moi. Ton dynamisme et ton énergie sont un moteur pour moi. Nous avons toutes les deux tellement évoluées, je suis si fière des femmes que nous sommes devenues. Ça y est, j'arrête la vie d'étudiante, je ne pourrai plus être ton assistante. Je suis si triste que cela se termine mais je dois voler de mes propres ailes à présent.

Merci aux filles de la danse, **Eli, Léa, Agnès, Andréa, Penda, Perrine, Pauline** et **les autres** pour votre énergie et votre bonne humeur. Ce groupe m'a permis de m'épanouir pleinement et de rester un minimum zen dans mon travail. Je souhaite une longue vie au groupe de Pom-Pom et pleins de représentations à venir. Je vous passe le flambeau les filles et les garçons, gardez toujours cette bonne ambiance entre vous. C'est moi qui viendrai vous applaudir à présent !



Jolie **Pauline**, un message particulier pour toi, nous nous sommes rencontrées à la danse et cette année nous a fortement rapproché. Tu seras la première de nous 2 à être diplômée Docteure. Je serai là, le jour J pour te féliciter de vive voix mais je te le redis ici Félicitations pour ta thèse de Chir-Dent ! Nous pouvons le dire, cela n'a pas été de tout repos mais nous avons réussi. Garde toujours ta positivité et ta créativité ! Je te souhaite le meilleur pour la suite !

**Mathilde**, merci pour ton écoute et ton soutien. Tu m'as apporté une vision différente sur mon travail et sur la vie en général. Merci pour ta confiance (coucou à **Arthur**) et tes encouragements.

Place à ma famille, j'aimerais d'abord remercier ma belle-famille, **Marie-Louise, Philippe, Romain**, de m'avoir accueillie à bras ouverts dans votre famille. Un grand merci pour votre soutien pendant ces 3 années. Merci à ma grand-mère **Noëlla**, de toujours m'écouter expliquer ma passion et mon travail au quotidien même si tu es souvent perdue. Merci à mon oncle, **Henry**, pour ton soutien et ton écoute, je sais que je peux compter sur toi à tous moments.

Un grand merci à ma petite sœur **Aurane**, qui est d'ailleurs plus grande que moi mais seulement en taille. Merci pour ton soutien, ton écoute et ta disponibilité au quotidien. Tu as toujours cru en moi et tu m'as toujours encouragé dans mes choix. Il m'est impossible de finir ces remerciements sans un mot pour mes **parents** qui ont fait de moi ce que je suis aujourd'hui. **PAPA, MAMAN**, merci pour votre confiance, votre soutien à chaque épreuve de ma vie. **Maman**, merci d'être la personne que tu es, aimante, encourageante et d'un soutien sans faille. Sans toi, je n'aurais pas pu en arriver là. Tu es ma coach *number 2*, celle que j'appelle à toute heure de la journée pour lui partager mes joies, mes tristesses et mes déceptions.

Enfin, je ne peux pas terminer sans un mot pour mon coach *number 1*, celui qui partage ma vie et qui m'accompagne au quotidien. **Valentin**, tu me fais rire même quand j'ai le moral dans les chaussettes. Tu subis mes joies, mes colères, mes coups de blues mais tu es toujours là. Merci de croire en moi et de m'encourager à devenir meilleure. Je n'en serais pas là aujourd'hui si tu n'avais pas été à mes côtés.

Ces quelques lignes ne suffiront jamais à vous exprimer toute ma reconnaissance et je ne vous le dirais jamais assez mais MERCI !

**« Il faut toujours viser la lune, car même en cas d'échec, on atterrit dans les étoiles. »**

**Oscar Wilde**



## RESUME

Le long ARN non codant *H19* (lncRNA) est surexprimé dans 70% des cancers du sein et favorise les propriétés tumorigènes des cellules cancéreuses mammaires. De plus, *H19* est le précurseur du miR-675, impliqué dans la tumorigenèse mammaire. L'objectif de ce projet de thèse est de décrypter, dans les cellules cancéreuses mammaires, le rôle et les mécanismes d'action du lncRNA *H19* ainsi que les parts relatives de l'ARNm et du miR-675 sur les phénotypes observés lors de l'émergence des métastases.

Afin de déterminer l'implication et la contribution relative de *H19* et du miR-675 dans l'augmentation du potentiel métastatique du cancer du sein, nous avons discriminé les phénotypes du processus métastatique associés à l'expression du miR-675 et ceux dus à l'ARNm lui-même. Mes travaux de thèse montrent que le lncRNA *H19* et le miR-675 augmentent tous deux la migration cellulaire ainsi que l'invasion des cellules cancéreuses mammaires *in vitro* et *in vivo*. Nous démontrons, pour la première fois que le miR-675 comme *H19*, augmentent les propriétés souches des cellules cancéreuses du sein. D'autre part, *H19* et le miR-675 ont des actions séquentielles. En effet, *in vitro*, *H19* semble induire l'EMT alors que le miR-675 semble induire la MET.

Dans le but d'identifier des déterminants moléculaires régulés par *H19* lors de l'émergence métastatique, nous avons réalisé une étude transcriptomique. D'après ces résultats, le gène *BST2* est surexprimé dans les cellules surexprimant stablement *H19*. Nous mettons en évidence par des expériences de perte et de gain de fonction qu'il existe une régulation post-transcriptionnelle entre *H19* et *BST2*. De plus, j'ai montré que le miR-675 régule négativement *BST2*. Enfin, comme *H19*, *BST2* augmente la prolifération, la migration et l'invasion cellulaire dans nos cellules cancéreuses mammaires.

Enfin, mes travaux de thèse mettent en évidence que *H19* séquestre p53 dans le cytoplasme des cellules cancéreuses mammaires, ce qui entraîne une dégradation de p53 ne pouvant plus être transloqué dans le noyau cellulaire. De plus, nous montrons que *H19* interagit avec p53 et avec MDM2 pour former un complexe tripartite. De par cette interaction, *H19* réprime l'activité transcriptionnelle de p53 et empêche l'arrêt du cycle cellulaire, l'induction de l'apoptose et la sénescence des cellules après dommages à l'ADN.

Pour conclure, mes travaux de thèse mettent en évidence de nouveaux mécanismes impliquant *H19* et son miR-675 dans la progression tumorale mammaire.

**Mots-clés : lncRNA, *H19*, miR-675, cancer du sein, métastases, *BST2*, cellule souche cancéreuse**



## ABSTRACT

The long non-coding RNA *H19* (lncRNA) is overexpressed in 70% of breast cancer and promotes the tumorigenic properties of breast cancer cells. Furthermore, *H19* is the precursor of miR-675, which is involved in breast tumorigenesis. The aim of this thesis project is to decipher, in breast cancer cells, the role and mechanisms of action of *H19* as well as the relative contribution of mRNA and miR-675 on the phenotypes observed during the emergence of metastasis.

To determine the involvement and relative contribution of *H19* and miR-675 in increasing the metastatic potential of breast cancer, we discriminated between phenotypes of the metastatic process associated with miR-675 expression and those due to mRNA itself. My work shows that both lncRNA *H19* and miR-675 increase cell migration and invasion of breast cancer cells *in vitro* and *in vivo*. We demonstrate, for the first time, that miR-675, like *H19*, increase the stemness of breast cancer cells. Moreover, *H19* and miR-675 have sequential actions. Indeed, *in vitro*, *H19* seems to induce EMT while miR-675 seems to induce MET.

In order to identify molecular determinants regulated by *H19* during metastatic emergence, we performed a transcriptomic analysis. According to these results, the *BST2* gene is overexpressed in cells stably overexpressing *H19*. We demonstrate by loss- and gain-of-function experiments that there is a post-transcriptional regulation between *H19* and *BST2*. Furthermore, I have shown that miR-675 regulates negatively *BST2*. Finally, like *H19*, *BST2* increases cell proliferation, migration and invasion in our breast cancer cells.

Finally, my thesis work shows that *H19* sequesters p53 in the cytoplasm of breast cancer cells, which leads to a degradation of p53 that can't be translocated into the cell nucleus. Moreover, we show that *H19* interacts with p53 and with MDM2 to form a tripartite complex. Through this interaction, *H19* represses the transcriptional activity of p53 and prevents cell cycle arrest, induction of apoptosis and senescence of cells after DNA damages.

In conclusion, my work highlights new mechanisms involving *H19* and its miR-675 in breast tumor progression.

**Keywords : lncRNA, *H19*, miR-675, breast cancer, metastasis, *BST2*, cancer stem cell**



# TABLE DES MATIERES

REMERCIEMENTS .....	I
RESUME .....	VII
ABSTRACT .....	IX
LISTE DES FIGURES.....	XV
LISTE DES TABLES.....	XVII
LISTE DES ABREVIATIONS .....	XIX
<i>INTRODUCTION</i> .....	2
La glande mammaire.....	4
I.    Physiologie de la glande mammaire.....	4
1) Anatomie .....	4
2) Evolution de la glande mammaire.....	4
II.   Le cancer du sein .....	7
1) Epidémiologie.....	7
2) Facteurs de risque .....	7
3) Développement du cancer .....	10
4) Transformation maligne .....	12
a.   Altérations génétiques et cancer du sein.....	13
❖ Inhibition de gènes suppresseurs de tumeur.....	13
❖ Activation des oncogènes.....	14
b.   Altérations épigénétiques et cancer du sein.....	15
❖ Méthylation de l'ADN .....	15
❖ Contrôle de la compaction de la chromatine.....	16
c.   Influence du microenvironnement tumoral.....	17
5) Origine du cancer du sein.....	20
a.   Modèles théoriques du développement tumoral .....	20
❖ Modèle stochastique.....	20
❖ Modèle hiérarchique .....	20
❖ Modèle de plasticité cellulaire .....	21
b.   Généralités sur les cellules souches cancéreuses .....	21
c.   Identification des cellules souches cancéreuses .....	22
❖ Marqueurs de surface .....	22
❖ Activité enzymatique de l'ALDH .....	23
❖ Exclusion de colorants vitaux – Side population .....	23
❖ Activité faible du protéasome .....	23
❖ Capacité de formation de sphères .....	23

❖ Tumorigénicité <i>in vivo</i> .....	24
6) Classification des cancers du sein .....	24
a. Classification histologique .....	24
b. Classification TNM .....	25
c. Classification moléculaire .....	26
7) Traitements du cancer du sein .....	28
a. La chirurgie .....	28
b. La radiothérapie .....	29
c. La chimiothérapie .....	29
d. L'hormonothérapie .....	30
e. Les thérapies ciblées .....	30
❖ Thérapies ciblées contre les tumeurs HER2+ .....	30
❖ Thérapies ciblées contre les tumeurs triple négatives.....	31
❖ Thérapies ciblées contre les tumeurs hormono-dépendantes métastatiques .....	32
❖ Thérapies ciblées contre les tumeurs liées à une mutation génétique héréditaire .....	32
Les ARN non codants.....	34
I. Les longs ARN non codants .....	34
1) Découverte des longs ARN non codants .....	34
2) Classification des longs ARN non codants.....	36
a. LncRNA intergéniques (lincRNA) .....	36
b. LncRNA antisens .....	36
c. LncRNA issus de pseudogènes.....	36
d. LncRNA introniques .....	36
e. ARN enhancers (eRNAs) .....	37
3) Modes d'action des longs ARN non codants.....	37
II. Les petits ARN non codants.....	38
1) Découverte des microRNA .....	38
2) Nomenclature des microRNA.....	38
3) Voies de synthèse des microRNA.....	40
a. Voie canonique.....	40
b. Voies dites non-canoniques .....	42
❖ Voie Drosha-indépendante ou Voie indépendante du microprocesseur .....	42
❖ Voie Dicer-indépendante .....	44
4) Modes d'actions des microRNA .....	44
a. Régulation négative par les microRNA.....	44
b. Régulation positive par les microRNA.....	45



c.	Autres modes de régulation .....	45
5)	MicroRNA et cancer .....	46
a.	Suppresseur de tumeur .....	46
b.	Oncogène .....	46
c.	Oncogène ou suppresseur de tumeur ? .....	47
Le locus <i>H19/IGF2</i> .....		50
I.	L’empreinte génomique parentale .....	50
1)	Découverte de l’empreinte .....	50
2)	Mise en place et maintien de l’empreinte .....	51
a.	Méthylation des cytosines.....	52
b.	Modifications post-traductionnelles des histones .....	54
II.	L’empreinte génomique du locus <i>H19/IGF2</i> .....	56
1)	Généralités de l’empreinte génomique du locus <i>H19/IGF2</i> .....	56
2)	Pathologies associées au locus <i>H19/IGF2</i> .....	58
3)	Autres transcrits au locus <i>H19/IGF2</i> .....	60
III.	Gène <i>H19</i> .....	62
1)	Historique .....	62
2)	Gène <i>H19</i> dans l’empreinte génomique .....	63
3)	Régulation de l’expression du gène <i>H19</i> .....	63
4)	<i>H19</i> dans les cancers .....	66
5)	Modes d’action du lncRNA <i>H19</i> .....	67
a.	Précurseur du miR-675.....	67
b.	Eponge à microRNA.....	70
c.	Interactant protéique .....	70
<b>OBJECTIFS DE LA THESE</b> .....		74
<b>MATERIELS &amp; METHODES</b> .....		78
I.	Culture cellulaire .....	80
II.	Traitements .....	81
III.	Génération des plasmides .....	81
a.	Obtention du plasmide pH19-mCherry.....	81
b.	Obtention du plasmide pcDNA3.1-BST2 .....	82
IV.	Transfection de plasmide .....	82
V.	Transfection de siRNA.....	83
VI.	Transfection de mimics/anti-miR .....	83
VII.	Extraction d’ARN, rétro-transcription (RT) et RT-PCR en temps réel (qPCR) .....	83
VIII.	Extraction de protéines et Western blot.....	85

IX.	Immunoprécipitation des protéines .....	86
X.	Immunofluorescence .....	87
XI.	Test de migration et d'invasion cellulaire .....	87
XII.	Test de résistance à l'anoïkis .....	88
XIII.	Test de clonogénicité .....	88
XIV.	Test de formation de sphères .....	88
XV.	Test de prolifération .....	88
XVI.	Analyse du cycle cellulaire .....	89
XVII.	Xénogreffe de poissons zèbres transgéniques (fli1 : GFP) .....	89
XVIII.	Tests statistiques .....	89
<b>RESULTATS</b> .....		<b>92</b>
I.	Contribution et parts relatives de <i>H19</i> et du miR-675 lors de l'émergence des métastases du cancer du sein .....	94
II.	Implication de <i>BST2</i> dans les phénotypes associés au lncRNA <i>H19</i> lors de l'émergence des métastases du cancer du sein .....	130
III.	Rôle du lncRNA <i>H19</i> dans la régulation de la protéine p53 contribuant à la progression tumorale mammaire .....	154
<b>DISCUSSION</b> .....		<b>184</b>
I.	Contribution et parts relatives de <i>H19</i> et du miR-675 lors de l'émergence des métastases du cancer du sein .....	186
II.	Implication de <i>BST2</i> dans les phénotypes associés au lncRNA <i>H19</i> lors de l'émergence des métastases du cancer du sein .....	194
III.	Rôle du lncRNA <i>H19</i> dans la régulation de la protéine p53 contribuant à la progression tumorale mammaire .....	200
<b>CONCLUSION</b> .....		<b>206</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE</b> .....		<b>210</b>
<b>ANNEXES</b> .....		<b>244</b>
Annexe 1 .....		246

## LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Représentation schématique d'une dissection antéro-latérale et d'une dissection sagittale de la glande mammaire chez la femme.	6
Figure 2 : Evolution de la glande mammaire au cours de la vie d'une souris.	7
Figure 3 : Développement cancéreux de la glande mammaire.	10
Figure 4 : Modifications physiologiques cellulaires nécessaires à la transformation maligne.	12
Figure 5 : Représentation des modèles stochastique, hiérarchique et de plasticité du développement tumoral.	20
Figure 6 : Courbes de survie associées aux différents sous-types moléculaires de cancer du sein.	29
Figure 7 : Classification des longs ARN non codants.	36
Figure 8 : Modes d'action des longs ARN non codants.	38
Figure 9 : Voie de biosynthèse canonique des microRNA.	40
Figure 10 : Voies de biosynthèse non-canonique des microRNA.	42
Figure 11 : Modes d'action des microRNA.	44
Figure 12 : Expériences de co-injection des génomes maternel et paternel.	50
Figure 13 : Modifications post-traductionnelles des histones.	54
Figure 14 : Locus <i>H19/IGF2</i> .	56
Figure 15 : Nouveaux transcrits identifiés au locus <i>H19/IGF2</i> .	60
Figure 16 : Découvertes majeures du gène <i>H19</i> et son implication dans le cancer du sein.	62
Figure 17 : Structure secondaire du lncRNA <i>H19</i> .	62
Figure 18 : Modes d'action du lncRNA <i>H19</i> .	72
Figure 19 : Localisation de la $\beta$ -caténine déterminée par immunofluorescence dans les lignées MCF-7 et MDA-MB-231 contrôles (mock) ou surexprimant stablement <i>H19</i> ( <i>H19</i> ).	127
Figure 20 : Résistance à l'anoïkis de lignées cellulaires cancéreuses mammaires surexprimant stablement ou non <i>H19</i> ou le miR-675.	129
Figure 21 : Expression relative des gènes identifiés par RNA-sequencing régulés positivement ou négativement par <i>H19</i> .	132
Figure 22 : Structure fonctionnelle de BST2.	133

Figure 23 : Régulation positive entre <i>H19</i> et <i>BST2</i> .	136
Figure 24 : Effets du knockdown de <i>H19</i> .	138
Figure 25 : Effets du knockdown de <i>BST2</i> .	140
Figure 26 : Effets dose de <i>BST2</i> sur les MCF-7 WT.	143
Figure 27 : Effets dose de <i>BST2</i> sur les MDA-MB-231 WT.	145
Figure 28 : Expériences de co-transfection de <i>BST2</i> et de <i>H19</i> sur les cellules cancéreuses mammaires.	147
Figure 29 : Effets de la surexpression de <i>BST2</i> sur les cellules cancéreuses mammaires.	148
Figure 30 : Effets de <i>BST2</i> sur les phénotypes associés au lncRNA <i>H19</i> sur les cellules de cancer du sein.	150
Figure 31 : Régulation négative du miR-675 sur <i>BST2</i> .	152
Figure 32 : Génération de lignées cellulaires cancéreuses mammaires contenant des allèles <i>H19</i> déficients en miR-675.	192
Figure 33 : Représentation schématique de l'hypothèse de régulation post-transcriptionnelle entre <i>H19</i> et <i>BST2</i> .	194
Figure 34 : Représentation schématique de l'hypothèse de régulation post-transcriptionnelle entre <i>H19</i> et <i>BST2</i> faisant intervenir le miR-675.	198
Figure 35 : Spectre de mutations des gènes fréquemment mutés dans les cancers humains.	204

## LISTE DES TABLES

Tableau 1 : Marqueurs de surface des CSC selon le type de cancer	23
Tableau 2 : Stades cliniques du cancer du sein déterminés par la classification TNM.	27
Tableau 3 : Caractéristiques moléculaires des différents sous-types de cancer du sein.	28
Tableau 4 : Principales thérapies utilisées selon les sous-types moléculaires de cancer du sein.	34
Tableau 5 : Cibles connues du miR-675 dans les cancers.	70
Tableau 6 : Séquences des amorces utilisées lors du clonage moléculaire.	83
Tableau 7 : Séquences des siRNA utilisés.	84
Tableau 8 : Références des mimics et anti-miR utilisés.	84
Tableau 9 : Séquences des amorces utilisées en qPCR.	86
Tableau 10 : Séquences des anticorps utilisés en western blot.	87
Tableau 11 : Liste des gènes cibles modulés par l'expression de <i>H19</i> dans les cellules MDA-MB-231.	130
Tableau 12 : Liste des gènes cibles modulés par l'expression de <i>H19</i> dans les cellules MCF-7.	131



## LISTE DES ABREVIATIONS

### A

---

**ABC** : ATP binding cassette  
**ADN** : acide désoxyribonucléique  
**AGO** : argonaute  
**AKT** : Ak strain thymoma  
**ALDH** : aldéhyde déshydrogénase  
**ARN** : acide ribonucléique  
**ARNm** : ARN messager  
**ARNt** : ARN de transfert  
**ATCC** : American Type Culture Collection

### B

---

**BAX** : BCL2-associated X protein  
**BCA** : Bicinchonnic acid  
**BCL2** : B-cell lymphoma 2  
**BDNF** : Brain-derived neurotrophic factor  
**BIK** : BCL2-interacting killer  
**BRAF** : v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1  
**BRCA** : Breast Cancer  
**BRMS1L** : Breast cancer metastasis suppressor 1 like  
**BSA** : Bovine serum albumin  
**BST2** : Bone marrow stromal cell antigen 2

### C

---

**CAF** : Cancer-associated fibroblast  
**CANTHER** : Cancer Heterogeneity, Plasticity, and resistance to Therapies  
**Cbl-b** : Casitas b-lineage lymphoma proto-oncogene b  
**CCIS** : carcinome canalaire *in situ*  
**CCND1** : cyclin D1

**CDH1** : Cadherin 1  
**CDK** : Cyclin-dependent kinase  
**CDKN1A** : Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A  
**C/EBP $\alpha$**  : CCAAT enhancer binding protein  $\alpha$   
**CLDN** : Claudin  
**CLIS** : Carcinome lobulaire *in situ*  
**c-MET** : Tyrosine-protein kinase MET / HGFR : Hepatocyte growth factor receptor  
**CpG** : cytosine-phosphate-guanine  
**CRD-BP** : cMyc mRNA coding region instability determinant binding protein  
**CSC** : Cellule souche cancéreuse  
**CST7** : Cystatin 7  
**Ct** : Cycle threshold  
**CTCF** : CCCTC-binding factor  
**CXCR4** : C-X-C motif chemokine receptor 4

### D

---

**DAP** : 2,6-Diaminopurine  
**DGCR8** : DiGeorge syndrome chromosomal (or critical) region 8  
**DGT** : Dihydrotestosterone  
**DMEM** : Dulbecco's Modified Eagle Medium  
**DMR** : Differentially methylated region  
**DMSO** : Dimethyl sulfoxide  
**DNMT** : DNA methyltransferase  
**dNTP** : Desoxyribonucleotide triphosphate

### E

---

**E2F1** : E2F transcription factor 1  
**EDTA** : Ethylene diamine tetra-acetic acid  
**EGF** : Epidermal growth factor

**EGFR** : Epidermal growth factor receptor  
**EGR1** : Early growth response 1  
**eIF4E** : Eukaryotic translation initiation factor 4<sup>E</sup>  
**EMT** : Epithelial-to-mesenchymal transition  
**ENCODE** : Encyclopedia of DNA elements  
**EpCAM** : Epithelial cell adhesion molecule  
**ER** : Estrogen receptor  
**ERBB2** : Erythroblastosis oncogene B2  
**ERK** : Extracellular signal-regulated kinases  
**ESA** : Epithelial surface antigen  
**EZH2** : Enhancer of zeste homolog 2

## F

---

**FGF** : Fibroblast growth factor  
**FLCN** : Folliculin  
**FLT3** : Fms related tyrosine kinase 3  
**FMR1** : Fragile X mental retardation 1  
**FXR1** : FMR1 autosomal homolog 1

## G

---

**GPI** : Ancre glycosylphosphatidylinositol

## H

---

**HAT** : Histone acetyltransferase  
**HDAC** : Histone désacétylase  
**HDMT** : Histone déméthylase  
**HEPES** : Acide 4-(2-hydroxyéthyl) -1-piperazine éthane sulfonique  
**HER2** : Human epidermal growth factor receptor 2  
**HGF/SF** : Hepatocyte growth factor / scatter factor  
**HIF-1 $\alpha$**  : Hypoxia-inducible factor 1  $\alpha$

**HMOF** : Histone acetylase ortholog of Drosophila males absent on the first  
**HMT** : Histone méthyltransférase  
**HOTAIR** : HOX transcript antisense RNA  
**HOTS** : *H19* opposite tumor suppressor  
**HRP** : Horseradish peroxidase

## I

---

**IC** : Imprinting control  
**IGF** : Insulin growth factor  
**IGF2** : Insulin-like growth factor 2  
**IGF2R** : Insulin-like growth factor 2 receptor  
**IGFBP-3** : insulin-like growth factor binding protein 3  
**IgG** : Immunoglobuline G  
**IL** : Interleukin  
**IMP1** : IGF2 mRNA binding protein 1  
**INCa** : Institut National contre le Cancer  
**INF $\gamma$**  : Interféron  $\gamma$   
**INSERM** : Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale  
**IR** : Imprinting region  
**IRES** : Internal ribosome entry site

## K

---

**Kb** : Kilobase  
**KDa** : Kilo Dalton  
**KISS1** : Kiss1 metastasis suppressor  
**KLF4** : Krüppel-like factor 4  
**Kpb** : Kilopaire de bases

## L

---

**lincRNA** : Large-intergenic non-coding RNA  
**LLC** : Leucémie lymphoïde chronique



**LNA** : Locked nucleic acid

**lncRNA** : Long non-coding RNA

## M

---

**MALAT1** : Metastasis-associated lung adenocarcinoma transcript 1

**MAPK** : Mitogen-activated protein kinase

**MBD** : Methyl-binding domain

**MCF-7** : Michigan Cancer Foundation-7

**MDA-MB-231** : Monroe Dunawat Anderson-Metastasis Breast cancer cell line-231

**MDGF-1** : Mammary derived growth factor 1

**MDGI** : Mammary-derived growth inhibitor

**MDM2** : Mouse double minute 2 homolog/E3 ubiquitin-protein ligase

**MEK** : MAPK kinase

**MET** : Mesenchymal-to-epithelial transition

**miRNA** : micro-RNA

**mTOR** : Mechanistic target of rapamycin kinase

**MYC** : Myelocytomatosis oncogene

## N

---

**NANOG** : Nanog homeobox

**ncRNA** : non-coding RNA

**NF-κB** : Nuclear factor κB

**NGF** : Nerve growth factor

**NR4A3** : Nuclear receptor subfamily 4 group A member 3

**Nt** : Nucleotide

**NT4/5** : Neurotrophin 4/5

## O

---

**OCT4** : Octamer-binding transcription factor 4

**OMS** : Organisation Mondiale de la Santé

**ORF** : Open reading frame

## P

---

**PALB2** : Partner and localizer of BRCA2

**PARP** : Poly-ADP ribose polymerase

**Pb** : Paires de bases

**PBS** : Phosphate-buffered saline

**PCR** : Polymerase chain reaction

**PI3K** : Phosphatidylinositol-4,5-biphosphate 3-kinase

**PIHit** : Paternally expressed *IGF2/H19* intergenic transcript

**PIK3CA** : Phosphatidylinositol-4,5-biphosphate 3-kinase catalytic subunit α

**PNGase F** : Peptide:N-glycosidase F

**Pol II** : ARN polymérase II

**PR** : Progesterone receptor

**PRC2** : Polycomb repressive complex 2

**PRLR** : Prolactin receptor

**PSM** : Poste de sécurité microbiologique

**PTEN** : Phosphatase and tensin homolog

**PVDF** : Polyfluorure de vinylidene

**PXDN** : Peroxidase homolog

## Q

---

**qPCR** : quantitative PCR

## R

---

**Rad51** : Rad51 recombinase

**RB** : Retinoblastoma

**RIPA** : Radioimmunoprécipitation assay buffer

**RISC** : RNA-induced silencing complex

**RNA-seq** : RNA sequencing

**ROBO1** : Roundabout guidance receptor 1

**RoR** : Regulator of reprogramming

**RPLP0** : Ribosomal protein lateral stalk subunit P0

**RPMI** : Roswell Park Memorial Institute medium

**RT** : Retro-transcription

## S

---

**SAM** : S-adénosylméthionine

**SDS** : Sodium dodecyl sulfate

**SFC** : Sphere-forming capacity

**siRNA** : Small interfering RNA

**SOX2** : SRY-related HMG-box 2

**SVF** : Sérum de veau fœtal

## T

---

**TALEN** : Transcription activator-like effector nucleases

**TAM** : Tumor-associated macrophage

**TBST** : Tris-buffered saline tween

**TEB** : Terminal End Buds

**TERC** : Telomerase RNA component

**TERT** : Telomerase reverse transcriptase

**TGF- $\alpha$**  : Transforming growth factor  $\alpha$

**TGF- $\beta$ 1** : Transforming growth factor  $\beta$ 1

**TNBC** : Triple negative breast cancer

**TNF- $\alpha$**  : Tumor necrosis factor  $\alpha$

**TNM** : Tumor, Node, Metastasis

**TP53** : Tumor protein 53

**TXN1P** : Thioredoxin interacting protein

## U

---

**UTDL** : Unité terminale ducto-lobulaire

**UTR** : Untranslated transcribed region

## V

---

**VEGF** : Vascular endothelial growth factor

## W

---

**WB** : Western blot

**WNT** : Wingless-type MMTV integration site

**WT** : Wild type

## Y

---

**YAP** : Yes associated protein

## Z

---

**ZEB1/2** : Zinc finger E-box binding homeobox 1/2

**ZO-1** : Zonula occludens 1





## *INTRODUCTION*



# La glande mammaire

## I. Physiologie de la glande mammaire

### 1) Anatomie

Le sein est une glande exocrine, constitué d'une glande mammaire de type tubulo-alvéolaire, de fibres de soutien (ligaments de Cooper) et de tissu adipeux. Le sein possède une riche vascularisation et un réseau lymphatique dense et complexe. La glande mammaire possède 15 à 25 lobes irréguliers. Chaque lobe est drainé par un canal galactophore qui se termine à la surface du mamelon. Ces canaux galactophores permettent la sécrétion du lait au moment de la lactation. Le canal galactophore est issu des canaux lobulaires provenant des lobules mammaires. Les lobules renferment les alvéoles ou acini reliés au canal lobulaire par un canalicule. L'alvéole est une cavité qui constitue la partie sécrétrice de la glande. Chaque canal lobulaire et son lobule constitue l'unité terminale ducto-lobulaire (UTDL). Cette unité assure la production de lait lors de la grossesse et de la lactation. L'aréole est la peau autour du mamelon fine et pigmentée. Elle contient des glandes sébacées, appelées glandes de Morgani, qui s'hypertrophient à la grossesse et deviennent des tubercules de Montgomery (Figure 1).

### 2) Evolution de la glande mammaire

La structure de la glande mammaire évolue au cours de la vie génitale de la femme, en fonction des cycles menstruels et des grossesses. En effet, le développement de la glande mammaire débute au stade fœtal et se poursuit jusqu'à la ménopause, mais l'essentiel de la croissance s'effectue après la puberté et se termine une fois la première grossesse menée à terme (Figure 2). La différenciation terminale a lieu à la lactation. A partir de la puberté, la glande mammaire est sous l'influence permanente d'hormones sexuelles (œstrogènes et progestérone) et de facteurs de croissance permettant sa croissance par une expansion rapide du réseau canalaire et du stroma périphérique. Le réseau canalaire est formé de deux types cellulaires. La couche interne est composée de cellules épithéliales sécrétrices du lait et la couche externe est composée de cellules myoépithéliales fusiformes contractiles. Ces cellules myoépithéliales se contractent en réponse au stimulus de succion lors de la lactation pour permettre l'éjection du lait à travers les canaux galactophores. Ces couches cellulaires sont entourées de tissu conjonctif lâche richement vascularisé appelé le stroma. Le stroma est nécessaire au développement de la glande mammaire car il contient une matrice extracellulaire riche en fibres de collagènes, en fibroblastes, en adipocytes et en vaisseaux sanguins et lymphatiques.

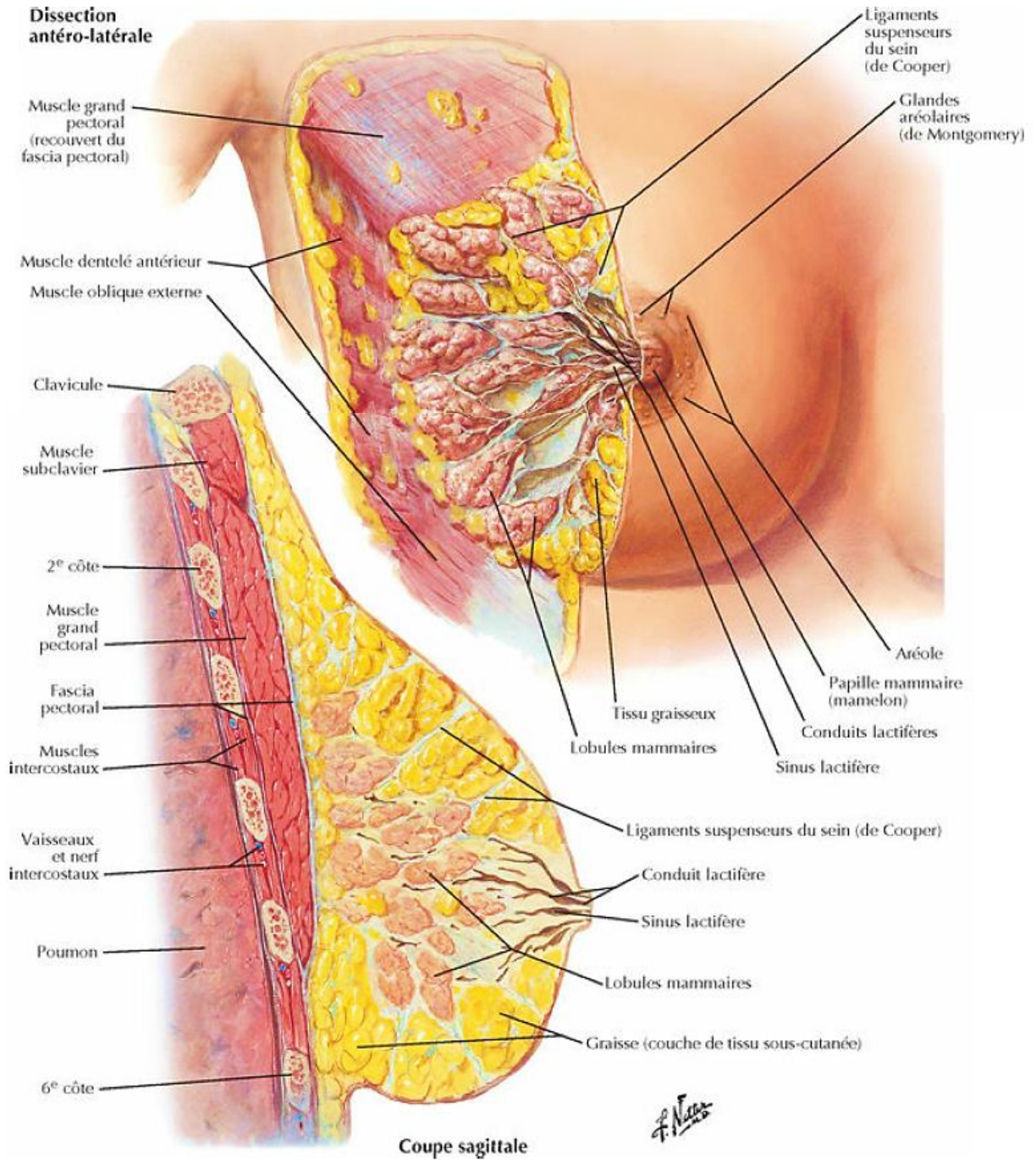


Figure 1 : Représentation schématique d'une dissection antéro-latérale et d'une dissection sagittale de la glande mammaire chez la femme. D'après Franck Netter, Atlas d'anatomie humaine, 6<sup>e</sup> édition, 2014.

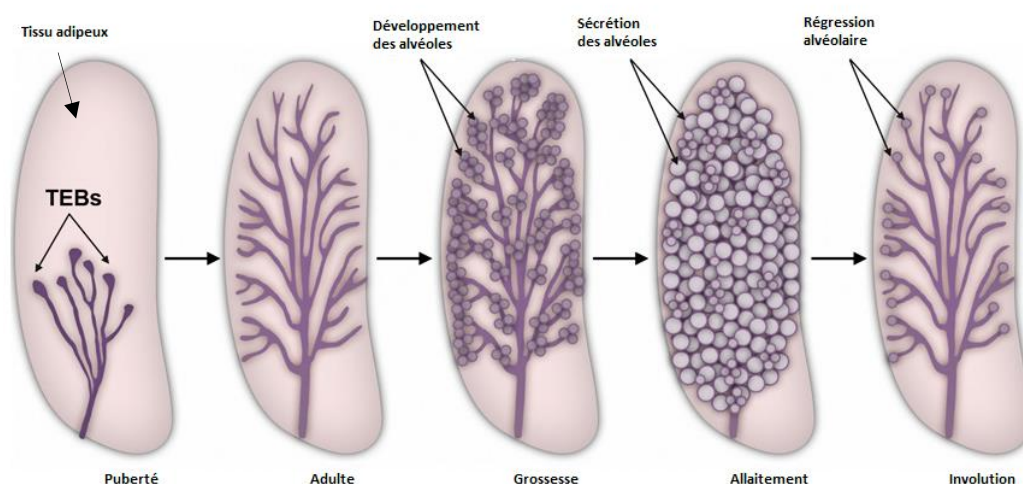


Au cours de la gestation, les alvéoles se développent et prennent la place du tissu adipeux. Les concentrations en œstrogènes, progestérone et hormones lactogènes placentaires sont augmentées et induisent la sécrétion de facteurs de croissance comme le TGF $\alpha$  (*Transforming Growth factor*), le MDGF-1 (*Mammary Derived Growth factor-1*), l'IGF (*Insulin Growth factor*) et l'EGF (*Epidermal Growth factor*) par les cellules épithéliales. Ces facteurs de croissance régulent de façon paracrine la prolifération et la différenciation de l'épithélium mammaire. Pendant la grossesse, la sécrétion de lait est inhibée par la progestérone d'origine placentaire qui inhibe la prolactine.

A la fin de la grossesse, la glande mammaire est totalement différenciée, les alvéoles occupent l'espace du coussin adipeux et deviennent fonctionnelles. Après l'accouchement, le placenta est éliminé, la production de lait est donc induite grâce à la modification de l'équilibre progestérone/prolactine. Lors de l'allaitement, la succion du mamelon va stimuler l'adénohypophyse qui permet la sécrétion de prolactine et d'ocytocine, une hormone responsable de la contraction des cellules myoépithéliales nécessaire à l'éjection du lait.

A la fin de l'allaitement, sans stimulus de succion, la glande mammaire retourne à un état post-pubertaire quiescent jusqu'à une nouvelle grossesse, elle involue. Les cellules épithéliales et myoépithéliales entrent en apoptose et la production de lait s'arrête.

A la ménopause, la concentration en œstrogènes et progestérone diminuent fortement. Les acini disparaissent et les cellules épithéliales et myoépithéliales s'atrophient tandis que la membrane basale s'épaissit. Le sein est alors constitué de tissu fibro-adipeux.



**Figure 2 : Evolution de la glande mammaire au cours de la vie d'une souris.** A la puberté, le réseau canalaire et le stroma périphérique se développent et se ramifient sous l'influence permanente d'hormones sexuelles et de facteurs de croissance. Lors de la grossesse, les alvéoles (TEBs) se développent et prennent la place du tissu adipeux. Lors de l'allaitement, les acini produisent et sécrètent le lait dans le canal galactophore grâce à la

sécrétion de prolactine. A la fin de l'allaitement, la glande mammaire retourne à un état post-pubertaire quiescent jusqu'à une nouvelle grossesse, c'est l'involution. (Adapté de Shore & Rosen, 2014).

## II. Le cancer du sein

### 1) Epidémiologie

Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), le cancer du sein est la première cause de mortalité chez les femmes par cancer en France et dans le monde (OMS, 2018). En France, une femme sur 8 développera un cancer du sein. D'après les chiffres de l'INCa (2018), l'incidence est de 59 000 nouveaux cas par an et 12 000 décès en France. Le taux de mortalité reste stable depuis 15 ans malgré les progrès en termes de dépistage (palpation, mammographie) et de traitement (chirurgie, radiothérapie, chimiothérapie, hormonothérapie, thérapies ciblées). La mortalité est principalement causée par la formation de métastases, le plus souvent osseuses, pulmonaires, hépatiques et cérébrales. Selon les données de l'INCa, 5 ans après le diagnostic, la survie est de 87% quel que soit l'âge de la patiente ou le type de cancer du sein et de 76% 10 ans après le diagnostic (INCa 2018). Le cancer du sein peut également survenir chez l'homme et représente moins de 1% des cancers du sein et 0,5% des cancers masculins.

### 2) Facteurs de risque

A l'heure actuelle, les facteurs de risques susceptibles de favoriser le développement du cancer du sein sont bien identifiés. En effet, le cancer du sein est une maladie multifactorielle. Nous pouvons en citer quelques-uns.

#### - Les facteurs de risque lié à l'âge :

Le risque de développer un cancer du sein augmente avec l'âge. L'âge médian au diagnostic d'un cancer du sein en France est de 63 ans en 2019. De plus, plus de 80% des cancers du sein surviennent après 50 ans. En France, 5% des femmes atteintes d'un cancer du sein ont moins de 40 ans.

#### - Les facteurs de risque liés à l'hygiène de vie :

Le **type d'alimentation** peut influencer sur le développement du cancer du sein. En effet, une consommation riche en végétaux (fruits, légumes et céréales) pourrait diminuer ce risque. Cependant, la **sédentarité et le surpoids** peuvent favoriser l'apparition d'un cancer du sein. La prise de poids à l'âge adulte augmente le risque de cancer du sein après la ménopause. En revanche, une activité physique régulière diminue le risque.

Selon le Centre international de recherche sur le cancer, la **consommation d'alcool et le tabagisme** (actif ou passif) est le facteur de risque comportemental le plus important. Enfin, selon

certaines études, le **travail de nuit** dérégule l'horloge biologique et augmente le risque de développer un cancer du sein (Cordina-Duverger et al., 2018).

- Les facteurs de risque liés à **des antécédents médicaux personnels** :

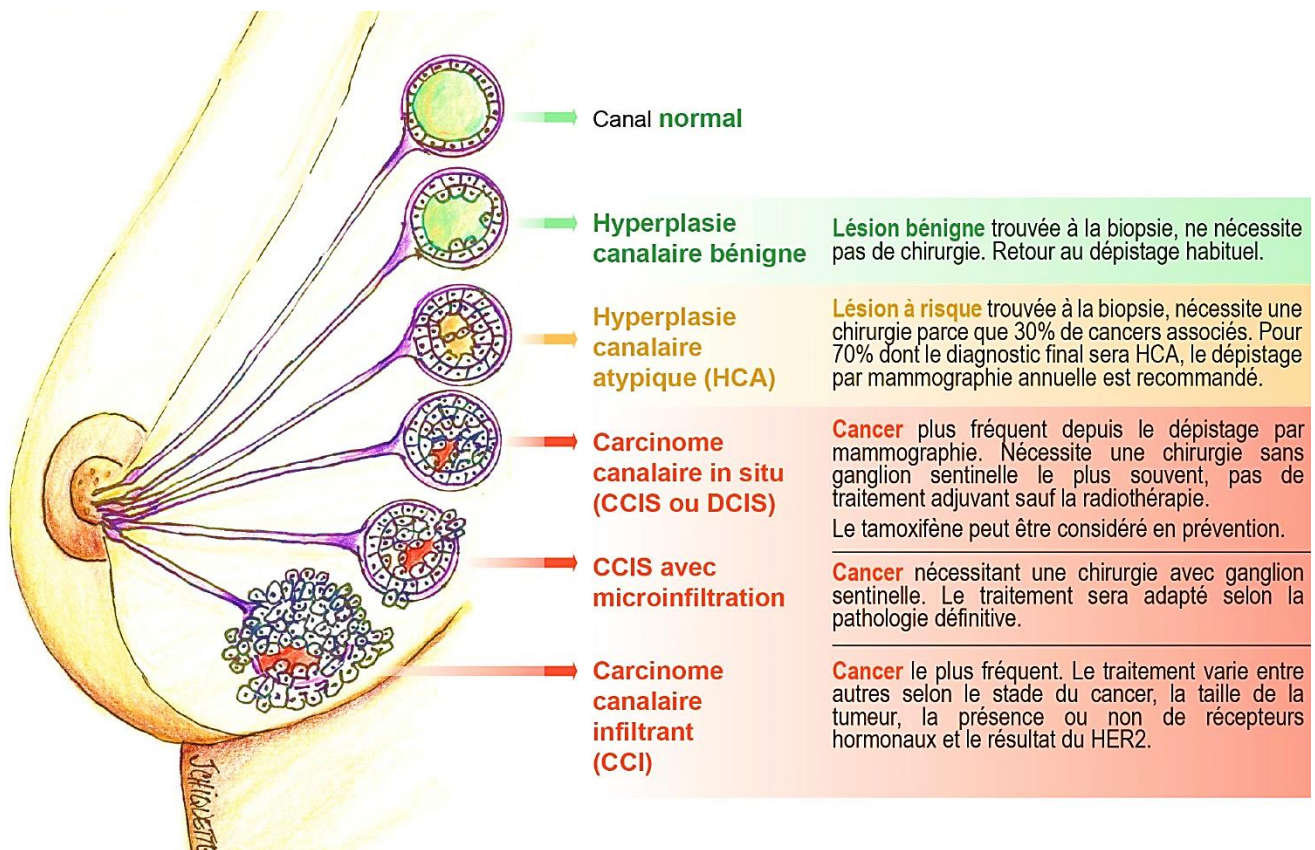
Le risque de cancer du sein est augmenté après un premier cancer du sein et/ou de l'endomètre et/ou de l'ovaire. Après un cancer du sein, une femme présente 4 à 5 fois plus de risque de développer une tumeur de l'autre sein par rapport aux femmes sans antécédent. Cela représente 15% des femmes traitées pour un cancer du sein.

- Les facteurs de risque liés à **des antécédents médicaux familiaux** :

L'existence de **prédispositions génétiques** au cancer du sein est connue depuis longtemps. En effet, les cancers du sein héréditaires représentent 5% des cancers du sein. De nombreuses études ont mis en évidence des gènes de prédisposition au cancer du sein et/ou de l'ovaire, dont les formes mutées sont transmises de façon héréditaire à la descendance. Les mutations les plus fréquentes sont celles des gènes BRCA1 et BRCA2 (*Breast Cancer 1/2*) avec une incidence de 80% des formes héréditaires de cancer du sein et de l'ovaire et de 65% des formes héréditaires de cancer du sein isolés. Ces gènes participent à la réparation de l'ADN à la suite de lésions subies au niveau de l'ADN. D'autres gènes pourraient également être mutés et impliqués dans l'origine du cancer du sein tels que les gènes *TP53*, *CHEK2*, *ATM*, *PALB2*, *PTEN*. La majorité de ces gènes régulent les voies de réparation de l'ADN (Shiovitz & Korde, 2015).

- Les facteurs de risque liés à **l'imprégnation hormonale** :

Le risque de cancer du sein est augmenté lorsque la femme a été soumise, au cours de sa vie, à des taux d'œstrogènes et de progestérone à long terme. En effet, une puberté précoce (avant 12 ans) ou une ménopause tardive (après 55 ans) peuvent favoriser la survenue d'un cancer du sein dû à une augmentation du nombre de cycles menstruels total. Le risque serait également légèrement augmenté avec la prise de contraceptifs hormonaux (contraceptifs œstroprogestatifs, traitements hormonaux de la ménopause) associant progestatif de synthèse et œstrogène. De plus, les femmes n'ayant pas eu d'enfant ou ayant eu leur première grossesse après 30 ans ont un risque de cancer du sein supérieur par rapport aux autres femmes. Enfin, il est suggéré que l'allaitement diminuerait le risque de cancer du sein.



**Figure 3 : Développement cancéreux de la glande mammaire.** Les cellules épithéliales des alvéoles ou des canaux prolifèrent, c'est l'hyperplasie. Les cellules normales se transforment peu à peu en cellules cancéreuses, c'est l'hyperplasie atypique. Les cellules transformées accumulent des altérations génétiques ou épigénétiques jusqu'à ce que l'amas formé obstrue le canal, c'est le carcinome *in situ*. Les cellules tumorales franchissent la membrane basale, c'est le carcinome infiltrant. Enfin, les cellules cancéreuses colonisent d'autres organes et forment des métastases, c'est le carcinome invasif. D'après le site [www.depistagesein.ca](http://www.depistagesein.ca).

### 3) Développement du cancer

Le remodelage constant de la glande mammaire à chaque cycle menstruel, ainsi que l'absence de différenciation terminale en absence de lactation, rendent la glande mammaire sensible à la transformation. Les cellules cancéreuses deviennent insensibles aux signaux régulant la croissance cellulaire, échappent au système de mort programmée et envahissent les tissus avoisinants par le réseau lymphatique et vasculaire. Dans ce paragraphe, nous étudierons les étapes de différenciation des cellules cancéreuses mammaires (Figure 3).

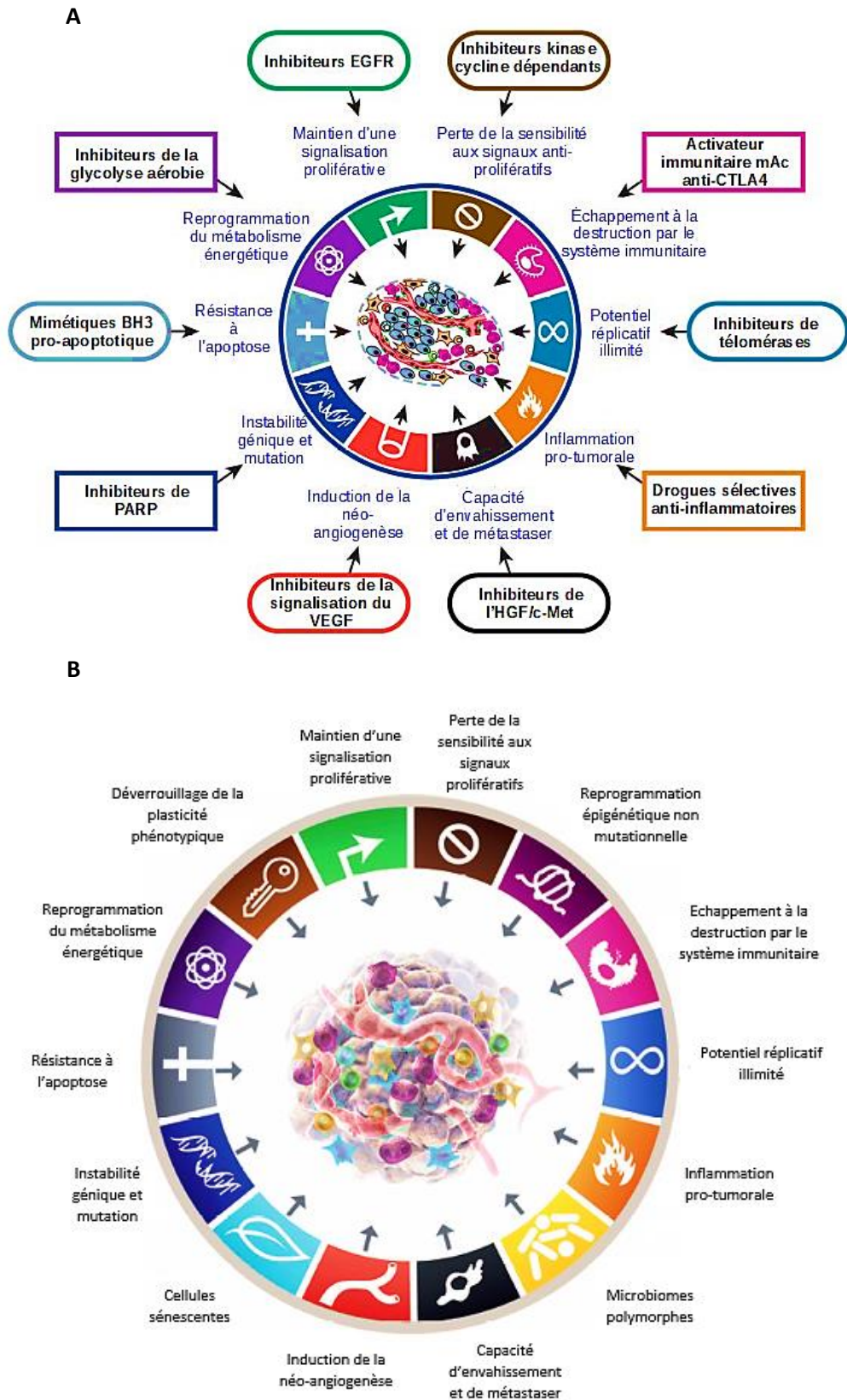
Différents stades tumoraux sont observés dans le cancer du sein. En effet, « l'hyperplasie » (hyperplasie simple) est le premier stade, il correspond à une augmentation de la prolifération des cellules. Le nombre de cellules tapissant les canaux ou les lobules du sein augmente. En fonction du type de cellules qui prolifèrent, nous distinguons deux types d'hyperplasies : l'hyperplasie canalaire, la plus fréquente et l'hyperplasie lobulaire. Ce stade n'accroît pas le risque de développer un cancer du sein.

Le stade « hyperplasie dit atypique » est bien distinct de l'hyperplasie simple. Elle est caractérisée par une augmentation du nombre de cellules anormales. De la même manière que l'hyperplasie simple, deux hyperplasies atypiques existent en fonction du type de cellules qui prolifèrent : l'hyperplasie canalaire atypique et l'hyperplasie lobulaire atypique. Cette hyperplasie augmente le risque de cancer du sein.

Les cellules accumulent ensuite des altérations génétiques au cours du temps. Elles acquièrent de nouvelles propriétés de cellules cancéreuses et ainsi forment un « carcinome *in situ* ». Les cellules se développent localement et ne se propagent pas aux autres organes.

Au fur et à mesure, les cellules cancéreuses continuent d'acquérir des modifications génétiques qui changent leurs devenir. Elles sont alors capables d'être mobiles et de se détacher de la tumeur pour franchir la membrane basale, c'est le « carcinome infiltrant ». Les cellules peuvent alors envahir le stroma par perte d'adhérence, sécréter des protéases et mettre en place l'angiogenèse. Le dernier stade est atteint lorsque les cellules forment des métastases dans l'organisme entier, on parle de « carcinome invasif ». Ce stade est le plus agressif, les cellules circulent dans les réseaux lymphatiques et/ou sanguins pour coloniser différents organes et former une tumeur secondaire. Ce sont les métastases.





**Figure 4 : Modifications physiologiques cellulaires nécessaires à la transformation maligne. A.** Représentation des dix principes d'Hanahan et Weinberg ainsi que les pistes thérapeutiques envisagées. (Adapté de Hanahan & Weinberg, 2011). **B.** Représentation des quatorze nouveaux principes du cancer. (Adapté de Hanahan, 2022).

#### 4) Transformation maligne

La transformation d'une cellule normale en cellule cancéreuse peut être causée par l'accumulation d'altérations de gènes responsables de la prolifération cellulaire, de la mort cellulaire et du maintien de l'intégrité génétique ou encore par des agents environnementaux tels que des cancérogènes chimiques, des rayonnements ou des virus. Selon les principes de Hanahan et Weinberg (Hanahan & Weinberg, 2000, 2011), une cellule transformée pourra se diviser si elle présente les modifications physiologiques cellulaires distinctes et complémentaires suivantes (Figure 4A):

- Maintien d'une signalisation proliférative
- Perte de la sensibilité aux signaux antiprolifératifs
- Résistance à l'apoptose
- Potentiel répliatif illimité
- Induction de la néo-angiogenèse
- Capacité d'invasion des tissus et de métastaser
- Reprogrammation du métabolisme énergétique
- Echappement à la destruction par le système immunitaire
- Production d'inflammation tumorale
- Instabilité génique conduisant à l'accumulation de mutations

En 2022, Hanahan propose quatre nouvelles caractéristiques pouvant induire la transformation maligne des cellules (Figure 4B): le déverrouillage de la plasticité phénotypique qui permet diverses perturbations lors de la différenciation cellulaire (dédifférenciation de l'état mature à l'état progéniteur, différenciation terminale à partir de cellules progénitrices, transdifférenciation en différents lignages cellulaires), la reprogrammation épigénétique non mutationnelle, les microbiomes polymorphes qui peuvent influencer, de manière diverse, la modulation des phénotypes tumoraux (microbiome intestinal, microbiome de la peau, microbiome de la tumeur, etc...) et les cellules sénescents (Hanahan, 2022).

La mise en évidence de ces nouvelles caractéristiques démontre l'influence du micro-environnement tumoral lors de la transformation maligne. L'ensemble de ces modifications physiologiques pro-tumorales sont dues aux altérations génétiques et/ou épigénétiques sporadiques ou plus rarement héréditaires (5 à 10% des cancers du sein) (Mavaddat et al., 2010; Apostolou & Fostira, 2013; Shiovitz & Korde, 2015; Wendt & Margolin, 2019).

a. Altérations génétiques et cancer du sein

❖ **Inhibition de gènes suppresseurs de tumeur**

Un gène suppresseur de tumeur est un gène dont l'inhibition favorise le développement tumoral. Certains gènes suppresseurs de tumeur régulent la prolifération cellulaire, ce sont les « gatekeepers ». Parmi eux, la protéine RB (*retinoblastoma*) (premier suppresseur de tumeur découvert) régule négativement la progression du cycle cellulaire, *PTEN*, un inhibiteur de la voie PI3K, ou encore *TP53*. D'autres gènes suppresseurs de tumeur sont impliqués dans la stabilité génétique, ce sont les « caretakers ». Nous pouvons citer les gènes *TP53* (*tumor protein 53*) ou *BRCA* impliqués dans la réparation des dommages à l'ADN. L'étude de Knudson démontre que la perte de fonction d'un gène suppresseur de tumeur est active si les deux allèles sont altérés dans les cellules somatiques (Knudson, 1993). Dans les cancers du sein héréditaires, l'inactivation du gène de prédisposition *BRCA* a lieu lorsque l'un des deux allèles est muté sur la lignée germinale et l'autre allèle est muté de façon sporadique dans l'ADN tumoral (Knudson, 2001). Dans le cancer du sein, les gènes suppresseurs de tumeur les plus fréquents sont les gènes *BRCA1/2*, *TP53* et *Rb*.

Les gènes ***BRCA1/2*** sont des gènes de prédisposition aux cancers du sein, de l'ovaire, du pancréas et de la prostate. Ils sont localisés respectivement sur les chromosomes 17q22 et 13q12-13. Les protéines BRCA interagissent avec les protéines Rad51, P53 et l'ADN polymérase et sont impliquées dans les mécanismes de réparation de l'ADN, dans la régulation du cycle cellulaire et dans la régulation de la transcription (Venkitaraman, 2002; Foulkes & Shuen, 2013). Les mutations *BRCA* sont le plus souvent des délétions ou des duplications de grand domaine (entre 14 et 17 kb) (Thompson et al., 2001). Ces mutations sont retrouvées associées à des tumeurs de haut grade et de mauvais pronostic.

Le gène ***TP53*** est localisé sur le chromosome 17 en position p13.1. Il code la protéine p53 qui régule de nombreuses voies cellulaires comme l'apoptose, la sénescence, la régulation du cycle cellulaire ou la réparation des dommages à l'ADN. Lors de dommages à l'ADN, p53 active la transcription du gène *CDKN1A* (qui produit la protéine p21) pour induire un arrêt temporaire de la progression dans le cycle cellulaire pour permettre la réparation de l'ADN. Si les dommages sont trop élevés, p53 active la transcription du gène *BAX*, pour orienter la cellule vers la voie de l'apoptose et ainsi éliminer les cellules potentiellement cancéreuses pour l'organisme (Lacroix et al., 2006). P53 est donc surnommé « le gardien du génome » assurant l'intégrité de l'ADN. Dans 25% des cancers du sein, p53 est muté et est associé à un mauvais pronostic (P. Yang et al., 2013).

Le gène ***RB*** est localisé sur le chromosome 13 en position q14.1. Il code la protéine Rb impliquée dans la régulation du cycle cellulaire et plus particulièrement lors du blocage de la transition G1/S du cycle. Rb est phosphorylé, et régule alors négativement le facteur de



transcription E2F1 et les protéines CDK (Di Fiore et al., 2013). L'inactivation de la protéine, c'est-à-dire la perte de phosphorylation, entraîne une perte des checkpoints du cycle cellulaire et donc une prolifération anarchique des cellules et contribue à l'agressivité des tumeurs. Dans 25 à 30% des tumeurs mammaires, le gène *RB* perd son hétérozygotie (Bosco & Knudsen, 2007).

#### ❖ Activation des oncogènes

La définition d'un oncogène est la suivante : tous les gènes dont l'activation participe au processus tumoral est un oncogène. Dans le cancer du sein, l'activation d'oncogène peut être due à différentes altérations génétiques telles qu'une amplification génique, des mutations ponctuelles ou des translocations chromosomiques (Osborne et al., 2004). La majorité des oncogènes est impliquée dans la régulation du pouvoir métastatique ou dans le processus d'angiogenèse (*VEGF*). Ils peuvent également participer à la transduction des signaux de prolifération cellulaire (facteurs de croissance), à la régulation du cycle cellulaire (cyclines) ou à l'inhibition de l'apoptose. Dans le cas du cancer du sein, nous pouvons citer trois oncogènes fréquemment activés : *CCND1* (*cyclin D1*), *c-MYC* (*myelocytomatosis oncogene*) et *ERBB2* (*erythroblastosis oncogene B2*).

Le gène ***CCND1*** est localisé sur le chromosome 11 en position p13 et code la cycline D1. Cette protéine régule le cycle cellulaire et intervient lors des transitions G1/S et G2/M du cycle. De plus, elle possède des activités de facteur de transcription. Dans la moitié des carcinomes mammaires, la cycline D1 est surexprimée. Son amplification génique est retrouvée dans 15% des cas (Arnold & Papanikolaou, 2005). Cette différence peut s'expliquer par le fait que l'expression de la cycline D1 peut être activée par d'autres facteurs, comme les hormones oestrogéniques ou la protéine p53 *via* son effet sur la protéine p21 (Roy & Thompson, 2006). En 2004, une étude montre que la surexpression de la cycline D1 est associée à la résistance au tamoxifène dans les traitements hormono-dépendants (Stendahl et al., 2004).

Le gène ***c-MYC*** est localisé sur le chromosome 8 en position q24 et code la protéine nucléaire Myc. Myc est un facteur de transcription qui régule l'expression de nombreux gènes humains impliqués dans divers processus cellulaires (la prolifération, la croissance, la différenciation et l'apoptose) (Y. Chen & Olopade, 2008). Dans 40% des tumeurs mammaires, Myc est surexprimé mais son amplification génique n'est retrouvée que dans 15% des cas, comme pour la cycline D1. Cette différence peut s'expliquer par une augmentation de la transcription de l'ARNm et/ou une stabilisation de l'ARNm et de la protéine dans la cellule. En outre, plusieurs études mettent en évidence une corrélation entre l'expression de Myc et les tumeurs de type « basal-like » de mauvais pronostic (J. Xu et al., 2010).

Le gène **ERBB2** est localisé sur le chromosome 17 en position q21-22 et code la protéine HER2 (*human epidermal growth factor receptor 2*). HER2 est un récepteur à activité tyrosine kinase impliqué dans divers processus cellulaires comme la prolifération, l'angiogenèse, l'interaction cellulaire, l'induction de métastase et la résistance à l'apoptose. Dans 25% des cancers du sein, ERBB2 est surexprimé. Cette surexpression entraîne son homo-dimérisation et/ou son hétéro-dimérisation avec d'autres membres de la famille des récepteurs HER regroupant 4 membres : HER1 ou EGFR1, HER2, HER3 et HER4. Le récepteur HER2 s'hétéro-dimérise avec les récepteurs HER3 ou HER4 pour induire sa signalisation (Moasser, 2007). Aujourd'hui, les tumeurs HER2+ sont considérées comme un des sous-types moléculaires du cancer du sein ([Chapitre 1, Partie II, Paragraphe 6](#)). Elles sont associées à un phénotype invasif et sont de mauvais pronostic car elles résistent à l'hormonothérapie et à certaines chimiothérapies. Pour pallier les résistances de ces tumeurs, des thérapies ciblées sont développées pour les tumeurs HER2+ ([Chapitre 1, Partie II, Paragraphe 7](#)).

*b. Altérations épigénétiques et cancer du sein*

Les altérations épigénétiques sont des modifications de l'expression génique sans altération de la séquence d'ADN. Pendant longtemps, les altérations génétiques étaient au cœur de nombreuses études portant sur l'origine du cancer du sein. A l'heure actuelle, les altérations épigénétiques sont considérées comme des facteurs importants lors de la progression tumorale (Dworkin et al., 2009; Pasculli et al., 2018). Ces altérations épigénétiques peuvent se faire de 3 façons : la méthylation de l'ADN, le contrôle de la compaction de la chromatine et l'intervention des ARN non codants.

❖ **Méthylation de l'ADN**

L'expression génique peut être contrôlée par l'ajout d'un groupement méthyle ( $\text{CH}_3$ ) à partir d'une S-adenosylméthionine (SAM) sur une cytosine, c'est la méthylation de l'ADN. Cette modification épigénétique est possible grâce aux ADN méthyltransférases (DNMT). Cette famille d'enzymes regroupe 5 types d'enzymes DNMT telles que DNMT1, DNMT3A et DNMT3B. DNMT1 préserve l'ADN hémi-méthylé généré lors de la réplication de l'ADN et est nécessaire pour copier la méthylation de l'ADN de la matrice au brin d'ADN fille. Au contraire, les enzymes DNMT3A et DNMT3B sont des méthyltransférases *de novo*, elles ciblent l'ADN non méthylé (Lyko, 2018). Le groupement méthyle s'ajoute majoritairement au sein des îlots CpG, des régions spécifiques de l'ADN riches en dinucléotides cytosine-phosphate-guanine (CpG). Les îlots CpG sont principalement retrouvés au niveau des régions promotrices des gènes. En effet, environ 70% des promoteurs sont associés à des îlots CpG dont le statut de méthylation est généralement corrélé à l'activité transcriptionnelle (Pasculli et al., 2018). Dans les cellules cancéreuses, les îlots CpG à

proximité des régions régulatrices de gènes suppresseurs de tumeur sont souvent hyperméthylés pour réprimer leur expression potentielle. Au contraire, d'autres régions seront hypométhylées pour permettre la transcription d'oncogènes (Novak et al., 2008; Jovanovic et al., 2010; Vietri et al., 2021). De nombreuses études démontrent une corrélation entre le phénotype de cancer du sein et le profil de méthylation constaté. En effet, une hypométhylation de l'ADN correspondrait à un phénotype basal et agressif alors qu'une hyperméthylation de l'ADN serait corrélée au sous-type luminal B (Stefansson et al., 2015; Győrffy et al., 2016; Vietri et al., 2021). Par exemple, le promoteur du gène *BRCA1* est hyperméthylé dans 13 à 40% des cancers du sein sporadiques (Stefansson et al., 2011).

#### ❖ Contrôle de la compaction de la chromatine

L'ADN est empaqueté et compacté au sein de la chromatine. La chromatine est constituée d'une association d'ADN et d'histones qui sont des protéines nucléaires. Il existe cinq types d'histones : H1 ou H5, H2A, H2B, H3 et H4. L'histone H1 ou son homologue H5 sont impliquées dans l'organisation de la chromatine tandis que les 4 autres histones s'associent à l'ADN pour former des nucléosomes (Pasculli et al., 2018). Deux formes de la chromatine sont distinguées selon l'état de compaction : l'**euchromatine** est peu condensée, les gènes sont plus accessibles aux facteurs de transcription et donc plus facilement exprimés ; l'**hétérochromatine** est très dense, l'ADN est moins accessible aux facteurs de transcription. La transition entre l'euchromatine et l'hétérochromatine est possible grâce à des modifications post-traductionnelles au niveau des queues N-terminales des histones. Les modifications les plus retrouvées sont des acétylations, des méthylation, des phosphorylations, des sumoylations et des ubiquitylations (Pasculli et al., 2018). Dans le cancer du sein, l'acétylation et la méthylation sont les deux modifications post-traductionnelles des histones les plus retrouvées.

L'acétylation est le transfert d'un groupement acétyl ( $\text{COCH}_3$ ) à partir de l'acétyl-CoA sur un groupement amine de résidu lysine. L'acétylation neutralise les charges positives des histones et modifie la structure de la chromatine ce qui favorise la formation d'euchromatine (Tropberger & Schneider, 2013). L'ajout du groupement acétyl est catalysé par une histone acétyltransférase (HAT), et le processus inverse par une histone désacétylase (HDAC).

La méthylation est l'ajout d'un ou de plusieurs groupements méthyl (mono-, di- ou triméthylation) sur les résidus arginine ou lysine des histones. La méthylation des histones favorise la formation d'euchromatine ou d'hétérochromatine selon le résidu d'histone concerné. Par exemple, la mono- ou la triméthylation de la lysine 4 de l'histone H3 (H3K4me1 et H3K4me3) et la triméthylation de la lysine 36 de l'histone H3 (H3K36me3) sont associées à la formation d'euchromatine (Heintzman et al., 2007, 2009). A l'inverse, la triméthylation des lysines 9 et 27 de

l'histone H3 (H3K9me3 et H3K27me3) est associée à la formation d'hétérochromatine (Kouzarides, 2007). L'ajout du groupement méthyl est catalysé par une histone méthyltransférase (HMT) et le processus inverse par une histone déméthylase (HDMT).

De nombreuses études montrent l'implication des modifications post-traductionnelles des histones dans les cancers du sein. En effet, plus les niveaux de ces modifications sont faibles, plus le cancer est de phénotype basal et de mauvais pronostic (Q.-Y. Zhao et al., 2016). La marque H3K4me3, par exemple, est associée au processus de dissémination métastatique (Messier et al., 2016). De plus, la régulation des enzymes impliquées dans la mise en place des marques épigénétiques est importante par rapport à la progression du cancer et au sous-type tumoral. Dans le cancer du sein, l'histone acétyltransférase HMOF est sous-exprimée (Arun et al., 2016), alors que l'histone déméthylase LSD1 et les histones désacétylases 2 et 3 sont surexprimées et corrélées à un sous-type de cancer plus agressif (Lim et al., 2010; Müller et al., 2013).

#### *c. Influence du microenvironnement tumoral*

Bien que l'apparition d'une tumeur résulte d'une succession d'altérations génétiques et épigénétiques conduisant à la transformation maligne, les mutations des cellules épithéliales ne conduisent pas à elles seules à l'apparition de la tumeur. En effet, la mise en évidence de nouvelles caractéristiques par Hanahan (Hanahan, 2022) démontre l'implication du microenvironnement tumoral dans la progression tumorale. Il semblerait que le microenvironnement subisse, lui aussi, des altérations qui sont nécessaires au développement tumoral. De plus, des altérations cellulaires essentielles à la transformation maligne sont influencées par le microenvironnement tumoral (Hanahan & Coussens, 2012).

Le microenvironnement des cellules épithéliales mammaires est complexe et riche. Il comprend une matrice extracellulaire ainsi que de nombreuses cellules non épithéliales comme des adipocytes, des macrophages, des fibroblastes, des lymphocytes et des cellules endothéliales. Ces cellules, ensemble, maintiennent l'homéostasie tissulaire de la glande mammaire. Les cellules communiquent entre elles de façon dynamique grâce à la sécrétion de chimiokines, de cytokines, d'hormones et de facteurs de croissance. Cette communication permet également le maintien de l'homéostasie. Le microenvironnement sain permet la régulation d'une prolifération anarchique à l'origine de l'initiation tumorale (Bissell & Hines, 2011).

Les cellules tumorales mammaires modifient ce microenvironnement et perturbent sa régulation, ce qui facilite ainsi leur prolifération, leur survie, leurs capacités invasives, l'angiogenèse, le remodelage de la chromatine et leur échappement au système immunitaire. Lors de la tumorigenèse, le stroma est remodelé grâce à des modifications de la matrice extracellulaire

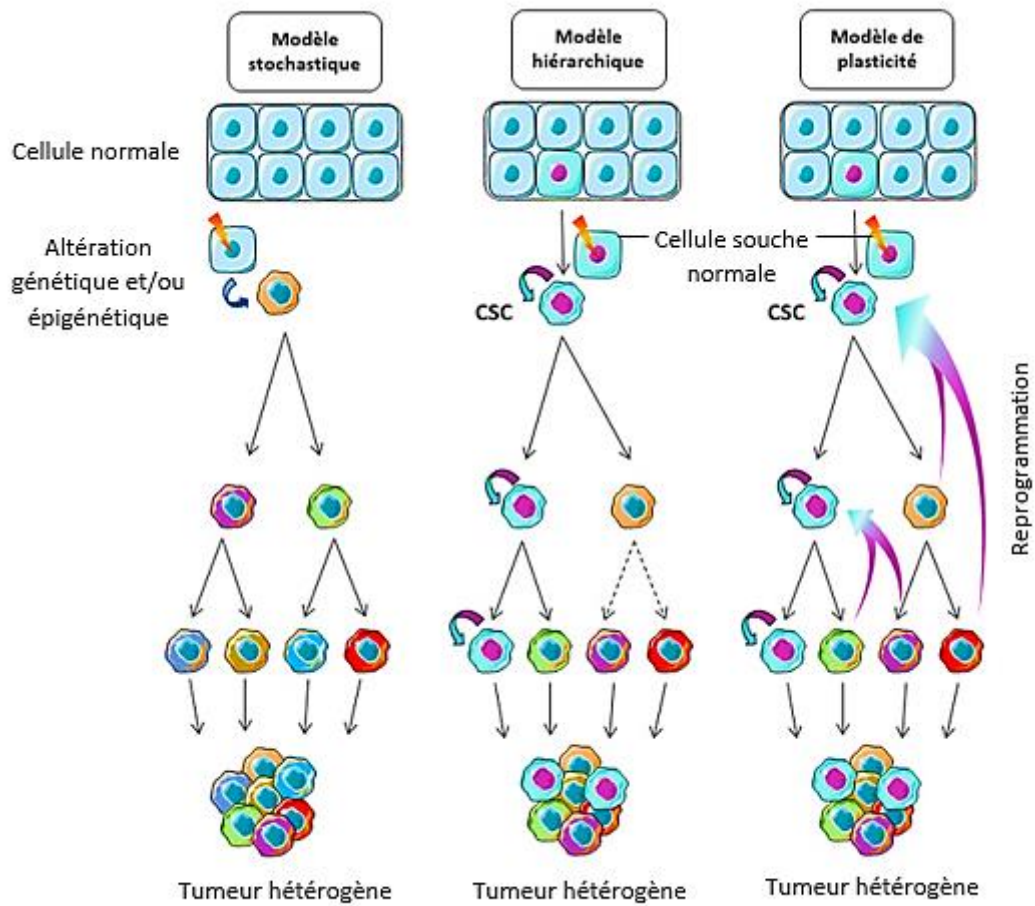
et de la membrane basale. De plus, les cellules tumorales sont capables de recruter les fibroblastes du microenvironnement pour les convertir en fibroblastes associés au cancer ou CAF (*cancer associated fibroblasts*). Une fois activés, les CAF sécrètent un grand nombre de molécules, notamment des composants de la matrice extracellulaire (fibronectine, collagène, ...), des cytokines, des protéases et des facteurs de croissance (IGF, VEGF, HGF/SF) pour favoriser le développement tumoral (Elenbaas & Weinberg, 2001; Kalluri & Zeisberg, 2006).

Les cellules cancéreuses mammaires vont également recruter des macrophages associés aux tumeurs ou TAM (*tumor-associated macrophages*) pour permettre l'angiogenèse en sécrétant des facteurs inhibant la prolifération et l'activité des lymphocytes T (Carmeliet, 2003). Ils vont jouer un rôle d'immunosuppresseur important pour empêcher la réponse anti-tumorale normale (Lewis & Pollard, 2006). Les TAM sécrètent des facteurs de croissance notamment l'EGF qui sera capable de stimuler les cellules cancéreuses et de favoriser leur prolifération, leurs capacités migratoires et invasives (Wyckoff et al., 2004; Goswami et al., 2005).

Présents en majorité dans la glande mammaire, les adipocytes favorisent également la croissance, la migration et l'invasion des cellules tumorales en sécrétant des facteurs de croissance (comme le HGF/SF), des adipokines (comme la leptine) et des protéines de la matrice extracellulaire (comme le collagène) (Iyengar et al., 2005; Vona-Davis & Rose, 2007; Walter et al., 2009; Dirat et al., 2011).

Outre les effets pro-tumoraux, le microenvironnement peut sécréter des facteurs anti-tumoraux. En effet, notre équipe a mis en évidence que les cellules épithéliales mammaires saines sécrètent de l'IGFBP-3 (*insulin-like growth factor binding protein 3*) et de la maspine, de façon à induire l'apoptose des cellules cancéreuses au sein du tissu (Toillon et al., 2007). Ces cellules sécrètent aussi des facteurs inhibiteurs de croissance tels que le TGF- $\beta$ 1, le TNF- $\alpha$ , le MDGI ou encore des interleukines et certains protéoglycanes (Bourhis et al., 2000).

De plus, notre équipe a démontré que les cellules cancéreuses mammaires sont capables de sécréter de façon autocrine des facteurs de croissance particuliers appelés neurotrophines. Parmi eux, le NGF (*nerve growth factor*), le BDNF (*brain-derived neurotrophic factor*) et la NT4/5 (*neurotrophin 4/5*) sont identifiés. La sécrétion de ces neurotrophines augmente la prolifération, la survie, la migration et l'invasion des cellules cancéreuses mammaires (Descamps et al., 2001; Dollé et al., 2003; Vanhecke et al., 2011; Demont et al., 2012). De plus, nous avons mis en évidence que ces neurotrophines peuvent être des cibles thérapeutiques. En effet, des inhibiteurs de NGF, BDNF ou de NT4/5 réduisent la formation de tumeur mammaire dans des modèles de xénogreffe (Adriaenssens et al., 2008; Vanhecke et al., 2011; Aubert et al., 2015).



**Figure 5 : Représentation des modèles stochastique, hiérarchique et de plasticité du développement tumoral.** Selon le modèle stochastique, l'accumulation de mutations sporadiques dans n'importe quelle cellule du tissu peut lui donner un pouvoir tumorigène. Selon le modèle hiérarchique, la progression tumorale est uniquement conduite par une sous-population de cellules souches cancéreuses. Selon le modèle de plasticité cellulaire, les cellules cancéreuses peuvent se « dé-différencier » en cellules souches cancéreuses, c'est la reprogrammation. (Adapté de Lemaire et al., 2020).

## 5) Origine du cancer du sein

### a. *Modèles théoriques du développement tumoral*

Les tumeurs, dont les tumeurs mammaires, sont très hétérogènes de par leur différenciation cellulaire, leur transformation, leurs altérations génétiques et épigénétiques et l'influence du microenvironnement. L'origine de cette hétérogénéité peut s'expliquer selon deux modèles de progression tumorale : le modèle stochastique et le modèle hiérarchique.

#### ❖ **Modèle stochastique**

Dans le modèle stochastique ou encore appelé le modèle d'évolution clonale, n'importe quelle cellule normale du tissu, quel que soit son degré de différenciation, peut acquérir une série de mutations sporadiques pour donner une cellule cancéreuse (Figure 5). De plus, n'importe quel clone cellulaire ayant un avantage sélectif peut promouvoir la progression tumorale (Polyak, 2007). Une prolifération accrue de ce clone permettra alors la formation d'une masse tumorale et l'accumulation d'altérations entrainera l'émergence de sous-populations distinctes (Lengauer et al., 1998). Cette théorie semble controversée puisqu'elle suggère qu'il n'y aurait peu ou pas de hiérarchie cellulaire au sein de la tumeur. Il serait alors impossible de déterminer quelle cellule est à l'origine de la tumeur car toutes les cellules du tissu sont potentiellement aptes à initier la transformation maligne. De plus, il est difficile d'expliquer comment une cellule différenciée, qui se divise très peu, peut acquérir une série de mutations sporadiques. Enfin, dans le cancer du sein, plusieurs études montrent l'existence d'une diversité clonale pour une même patiente (Torres et al., 2007; Nakada et al., 2017).

#### ❖ **Modèle hiérarchique**

Dans le modèle hiérarchique ou encore appelé modèle des cellules souches cancéreuses (CSC), la croissance et la progression tumorale sont conduites uniquement par une petite sous-population tumorale de cellules souches cancéreuses (Figure 5). Cette théorie repose sur l'idée que l'hétérogénéité tumorale serait due aux capacités de différenciation des CSC (Dick, 2008). En 2003, l'équipe de Al-Hajj isole les CSC du cancer du sein et les transplante dans des souris immunodéficientes. Six mois après l'injection, ces cellules régénèrent une masse tumorale présentant la même hétérogénéité phénotypique que la tumeur d'origine (Al-Hajj et al., 2003). La dissémination métastatique et la résistance aux thérapies seraient dues à cette population de CSC (Campbell & Polyak, 2007). Ce modèle pourrait expliquer l'hétérogénéité retrouvée entre les différents sous-types tumoraux du cancer du sein car le degré de différenciation de la cellule ayant subi à l'origine les premières mutations déterminerait le sous-type de cancer du sein (Visvader, 2009; Morel et al., 2017).



#### ❖ **Modèle de plasticité cellulaire**

Le modèle stochastique et le modèle hiérarchique exposent le même principe : au sein du tissu, une cellule subit des altérations génétiques et acquiert des capacités de prolifération qui lui donne un avantage sélectif par rapport aux cellules voisines. Ce clone est à l'origine de la formation de la tumeur hétérogène. Pourtant, ces théories possèdent des limites puisque le modèle stochastique ne permet pas d'expliquer l'hétérogénéité cellulaire observée au sein des tumeurs. Quant au modèle hiérarchique, il sous-entend que les cellules souches perdent leur potentiel d'auto-renouvellement puisqu'elles se différencient pour initier la tumorigenèse.

Un nouveau modèle est alors proposé pour répondre à ces problématiques. Celui-ci prend en compte les deux théories déjà existantes et émet la notion de plasticité cellulaire (Rich, 2016). En effet, les cellules cancéreuses non-souches (non-CSC) sont capables de se « dédifférencier » en CSC, c'est le principe de reprogrammation (Figure 5) (Chaffer et al., 2011; Iliopoulos et al., 2011; Marjanovic et al., 2013; Eun et al., 2017). Lors de la reprogrammation, de nombreux stimuli sont impliqués comme la sécrétion d'IL-6 (Iliopoulos et al., 2011) ou l'expression de marqueurs mésenchymateux pour le processus d'EMT (*epithelial-to-mesenchymal transition*) (Mani et al., 2008; Morel et al., 2008).

#### *b. Généralités sur les cellules souches cancéreuses*

En 1997, l'équipe de Dick démontre pour la première fois l'existence des CSC dans la leucémie myéloïde aigüe (Bonnet & Dick, 1997). Six ans plus tard, les CSC sont isolées dans les tumeurs solides (Al-Hajj et al., 2003). Les CSC sont caractérisées par un potentiel d'auto-renouvellement illimité et sont multipotentes (Kreso & Dick, 2014). Elles sont capables de donner naissance à des cellules progénitrices précoces puis tardives. Les cellules progénitrices sont issues d'une division asymétrique et vont produire l'ensemble des types cellulaires (Rich, 2016). Dans le tissu considéré, un pool constant de CSC est conservé.

Le processus d'auto-renouvellement est minutieusement régulé afin de conserver un équilibre entre l'auto-renouvellement des cellules souches pour la régénération tissulaire et l'auto-renouvellement en excès des cellules souches induisant le développement tumoral. Les cellules souches sont alors en quiescence (Fuchs & Chen, 2013).

Les cellules souches sont plus exposées au risque d'accumuler des mutations conduisant à la transformation cellulaire et à la formation de tumeur que les cellules différenciées puisque leur potentiel de division est illimité (Sugihara & Saya, 2013). Malgré les controverses, ces arguments renforcent l'hypothèse que les CSC sont dérivées des cellules souches normales (Magee et al., 2012). De plus, les CSC contribuent à la résistance aux thérapies et aux métastases entraînant une récurrence et le décès des patientes (Bai et al., 2018).



Plusieurs facteurs de transcription sont mis en évidence pour réguler la pluripotence des CSC comme SOX2, OCT4 et NANOG (Boyer et al., 2005). Puis, d'autres facteurs se sont ajoutés à la liste des facteurs de transcription ayant un rôle dans la biologie des cellules souches tels que c-Myc et KLF4 (Varlakhanova et al., 2010; M. O. Kim et al., 2012). Ces facteurs sont indispensables pour induire la dé-différenciation de fibroblastes murin et leur reprogrammation vers un état pluripotent (K. Takahashi & Yamanaka, 2006).

*c. Identification des cellules souches cancéreuses*

De nombreuses méthodes d'identification et d'analyse des CSC sont décrites. Cependant, un marqueur n'est pas retrouvé dans toutes les lignées cellulaires ni dans tous les sous-types tumoraux. La combinaison de plusieurs marqueurs permet d'isoler plusieurs populations distinctes de CSC.

❖ **Marqueurs de surface**

L'expression de protéines membranaires et plus particulièrement l'expression de marqueurs de surface des CSC a permis de mettre en lumière les premières populations de CSC (Bonnet & Dick, 1997). L'expression de ces marqueurs est propre à chaque tissu ([Tableau 1](#)).

Cancer	Marqueurs de surface	Références
Leucémie aigüe myéloïde	CD34+/CD38-	(Bonnet & Dick, 1997)
Sein	ESA+/CD44+/ CD24 <sup>-/low</sup>	(Al-Hajj et al., 2003)
Gliome	CD133+	(Singh et al., 2003)
Colon	CD133+	(C. A. O'Brien et al., 2007)
Mélanome	CD20+ CD271+	(Fang et al., 2005) (Boiko et al., 2010)
Pancréas	CD133+ CXCR4+	(Hermann et al., 2007)
Prostate	CD44+/α <sub>2</sub> β <sub>1</sub> + /CD133+	(Collins et al., 2005)
Ovaire	CD44+/CD117+	(S. Zhang et al., 2008)
Foie	EpCAM CD133+	(Yamashita et al., 2010) (Suetsugu et al., 2006)
Poumon	CD133+	(Eramo et al., 2008)
Estomac	CD44+	(Takaishi et al., 2009)

**Tableau 1 : Marqueurs de surface des CSC selon le type de cancer.** (Adapté de R.-U. Takahashi et al., 2011).

Dans le cancer du sein, l'identification et l'isolation des CSC s'effectuent grâce au phénotype CD44+/ CD24<sup>-/low</sup>. Cependant, la proportion de cellules CD44+/ CD24<sup>-/low</sup> diffère selon les cellules cancéreuses mammaires utilisées et est très variable (dans les cellules luminales MCF-7 : proche de 0% jusqu'à 100% dans les cellules triple négatives MDA-MB-231 ou SUM159PT). La population cellulaire souche varie en fonction du sous-type tumoral mammaire (Fillmore & Kuperwasser, 2008).

❖ **Activité enzymatique de l'ALDH**

L'enzyme ALDH (aldéhyde déshydrogénase) est responsable de l'oxydation des aldéhydes en acides carboxyliques. Elle est impliquée dans le métabolisme oxydatif du rétinol en acide rétinoïque. Cette activité enzymatique est utilisée pour l'identification des cellules souches mammaires normales et les CSC (Ginestier et al., 2007). L'activité de l'ALDH est détectée grâce à l'utilisation d'un substrat qui devient fluorescent lorsqu'il est clivé par l'ALDH. Dans le cancer du sein, l'activité des isoformes ALDH1A1 et ALDH1A3 sont identifiées comme spécifique des CSC (Marcato, Dean, Giacomantonio, et al., 2011; Marcato, Dean, Pan, et al., 2011).

❖ **Exclusion de colorants vitaux – Side population**

Les CSC sont également caractérisées par l'activité accrue de pompes d'efflux de la famille ABC (*ATP binding cassette*) exprimées à leur membrane. L'identification de la population de CSC peut se faire en cytométrie en flux par un test d'exclusion de colorants vitaux fluorescents comme le Hoechst 33342.

❖ **Activité faible du protéasome**

Le protéasome a pour fonction de dégrader les protéines. Il est associé à des mécanismes cellulaires comme le contrôle du cycle cellulaire et la réparation de l'ADN. Dans plusieurs modèles cellulaires, comme le cancer du sein, de la prostate, du poumon, du colon et dans les gliomes, les CSC ont une faible activité du protéasome (Della Donna et al., 2012; Lenos & Vermeulen, 2016; Munakata et al., 2016; Pan et al., 2010; Vlashi et al., 2009). L'isolation des CSC est permise grâce à l'utilisation d'un rapporteur de l'activité du protéasome.

❖ **Capacité de formation de sphères**

Des tests fonctionnels permettent de définir le phénotype souche d'une population cellulaire et ainsi compléter l'analyse de l'expression des marqueurs de surface. Le premier test repose sur la capacité des cellules souches à croître en l'absence d'ancrage. Pour cela, les cellules sont ensemencées à faible densité dans un milieu dépourvu de sérum et riche en facteurs de croissance et en conditions non adhérentes. La capacité des cellules à former des mammosphères est évaluée en comptant le nombre de sphères et en rapportant ce chiffre au nombre de cellules

ensemencées afin d'obtenir un pourcentage de formation de sphères (SFC, *sphere-forming capacity*) (Lombardo et al., 2015).

#### ❖ *Tumorigénicité in vivo*

Le deuxième test fonctionnel est le test de tumorigénicité *in vivo*. Ce test se base sur l'auto-renouvellement et la différenciation des CSC. Les CSC sont injectées en nombre limité chez la souris (environ 100 cellules contre plus d'un million en condition classique de xénogreffe). Le caractère souche de la population testée est défini par la présence ou l'absence de développement tumoral. Un autre paramètre est pris en compte : la capacité des cellules à générer des tumeurs en série après transplantation, et à reproduire l'hétérogénéité de la tumeur initiale (Visvader & Lindeman, 2008).

## 6) Classification des cancers du sein

A l'heure actuelle, plusieurs types de cancers du sein existent. Pour permettre une meilleure prise en charge thérapeutique et pronostique des patients, les tumeurs mammaires sont regroupées et classées selon différents critères. En effet, nous étudierons 3 classifications différentes des tumeurs mammaires basées dans un premier temps sur les caractéristiques macroscopiques, histologiques et pronostiques de la tumeur, il s'agit de la classification dite « histologique ». La seconde classification repose sur la taille de la tumeur (T), l'invasion ganglionnaire (N) et l'invasion métastatique (M), elle est nommée classification « TNM ». Enfin, la dernière classification repose sur les aspects moléculaires observés de la tumeur appelée classification moléculaire.

### a. Classification histologique

Selon le diagnostic et leur évolution, les tumeurs mammaires peuvent être bénignes ou malignes. Ces deux types de tumeurs sont différenciées selon les caractéristiques macroscopiques, histologiques et pronostiques de la tumeur. Toutes les masses du sein ne sont pas forcément des tumeurs cancéreuses.

Les tumeurs bénignes sont définies par des contours bien délimités et restent localisées dans le tissu où elles sont apparues, elles ne provoquent pas de métastase. Les cellules sont bien différenciées, avec une croissance lente et ressemblent à des cellules normales.

Au contraire, les tumeurs malignes ont des contours irréguliers. Les cellules ont des formes et des tailles différentes et sont indifférenciées, elles perdent leurs caractéristiques d'origine. Elles sont capables de franchir la membrane basale et d'envahir les organes voisins du tissu où elles sont apparues. Elles ont une croissance rapide et peuvent provoquer des métastases. Les adénocarcinomes représentent la majorité des tumeurs malignes avec 95% des cas. Ces cancers

se forment à partir des cellules épithéliales de la glande mammaire. En fonction de la localisation des cellules cancéreuses, il existe deux types de carcinome : les **carcinomes canaux** ; les cellules cancéreuses prennent naissance au niveau des canaux galactophores et les **carcinomes lobulaires** ; la tumeur se développe dans les glandes où est fabriqué le lait maternel, les lobules. Les adénocarcinomes peuvent être soit *in situ* (non-infiltrants), soit invasifs (infiltrants) en fonction de l'état d'envahissement des cellules dans le tissu environnant.

Les **adénocarcinomes *in situ*** sont des tumeurs qui ne franchissent pas la membrane basale, ils n'envahissent pas les tissus avoisinants et sont de bon pronostic. Il existe deux types de carcinomes *in situ* : les carcinomes canaux *in situ* (CCIS) qui sont des tumeurs provenant de la lumière du canal galactophore, ils représentent 85% des cancers *in situ* et les carcinomes lobulaires *in situ* (CLIS) qui sont des tumeurs provenant de la prolifération des acini des lobules.

Les **adénocarcinomes invasifs (infiltrants)** sont des tumeurs qui envahissent les tissus voisins et peuvent se propager vers les ganglions lymphatiques et par conséquent vers d'autres organes en altérant la membrane basale. Comme pour le carcinome *in situ*, il existe deux types de carcinomes infiltrants : les carcinomes canaux infiltrants qui représentent 90% des cancers infiltrants et les carcinomes lobulaires infiltrants qui représentent 10% des tumeurs malignes du sein infiltrants.

#### *b. Classification TNM*

Cette classification repose sur des observations anatomiques lors d'un examen de diagnostic. En effet, trois critères sont pris en compte pour évaluer le stade pré-clinique de la tumeur : la taille et l'infiltration de la tumeur (T) ; l'atteinte ou non des ganglions lymphatiques, leur nombre et leur emplacement (N) ; la présence ou non de métastases (M).

Dans un premier temps, le volume tumoral est observé. Selon la taille de la tumeur, un score T est attribué entre 0 et 4. La valeur T0 correspond à une tumeur non palpable inférieure à 1 cm et la valeur T4 correspond à une tumeur de taille importante avec une extension directe soit à la paroi thoracique, soit à la peau.

Ensuite, l'atteinte ganglionnaire lymphatique est étudiée. L'envahissement ganglionnaire est évalué et noté N entre 0 et 3. La valeur N0 correspond à l'absence d'envahissement ganglionnaire tandis que la valeur N3 correspond à l'envahissement d'au moins 10 ganglions axillaires ou sous-claviculaires.

Enfin, la présence ou non de métastases est analysée et notée M. La valeur M0 correspond à l'absence de métastase et la valeur M1 correspond à la présence de métastases.

Grâce au diagnostic TNM, le stade tumoral mammaire peut être attribué (Tableau 2). Les stades sont notés en chiffres romains de 0 à IV où 0 correspond à un cancer *in situ* de petite taille, sans atteinte ganglionnaire et sans métastase (Tis N0 M0) et IV correspond à une tumeur de taille importante avec atteinte des ganglions et présence de métastases (Tous T Tous N M1).

Stade	Tumeur	Ganglion	Métastases	Description
0	T0 ou Tis	N0	M0	Cancer <i>in situ</i>
I	T1	N0	M0	Tumeur inférieure à 2 cm sans atteinte ganglionnaire, sans métastase
IIA	T0 T1 T2	N1 N1 N0	M0	Tumeur inférieure à 2 cm avec atteinte mineure des ganglions ou tumeur de 2 à 5 cm sans atteinte ganglionnaire, sans métastase
IIB	T2 T3	N1 N0	M0	Tumeur de 2 à 5 cm avec atteinte mineure des ganglions ou tumeur supérieure à 5 cm sans atteinte ganglionnaire, sans métastase
IIIA	T0/1/2/3	N1/2	M0	Tumeur de taille variable avec atteinte mineure ou modérée des ganglions, sans métastase
IIIB	T4	N0/1/2	M0	Tumeur de taille variable avec extension directe à la paroi thoracique ou la peau, atteinte ganglionnaire mineure à modérée, sans métastase
IIIC	Tous T	N3	M0	Tumeur de taille variable avec atteinte ganglionnaire importante, sans métastase
IV	Tous T	Tous N	M1	Cancer métastatique

**Tableau 2 : Stades cliniques du cancer du sein déterminés par la classification TNM.**

c. Classification moléculaire

A l'heure actuelle, les classifications histologiques et cliniques ne permettent plus de prédire totalement l'évolution des tumeurs mammaires. En effet, la présence ou l'absence des récepteurs aux hormones œstrogènes (ER), à la progestérone (PR) et au facteur de croissance HER2 sont pris en compte pour le choix thérapeutique. Des analyses génomiques permettent d'analyser simultanément l'expression de gènes grâce aux puces à ADN (microarray) et ainsi regrouper les tumeurs en fonction de leur profil d'expression génique. L'identification de ces caractéristiques permet de classer les cancers du sein selon leurs sous-types moléculaires. En 2000, l'équipe de Perou est la première à proposer une classification des cancers du sein selon leur profil d'expression génique de 65 tumeurs mammaires obtenus à partir de 42 individus (Perou et al., 2000; Sorlie et al., 2003). Après analyse, seulement 496 gènes sont retenus sur les 8102 présents sur la puce. Les auteurs ont pu identifier deux groupes distincts : un groupe avec des tumeurs ER- et un groupe avec des tumeurs ER+. Les tumeurs ER+ expriment les récepteurs aux œstrogènes et à la progestérone, les cytokératines spécifiques des cellules luminales et d'autres marqueurs de ce type cellulaire. Elles sont appelées **tumeurs luminales ou hormono-dépendantes**. De plus, la détection des récepteurs aux œstrogènes, à la progestérone, d'HER2 et du marqueur de prolifération Ki-67 par immunohistochimie a permis de mettre en évidence deux sous-groupes de

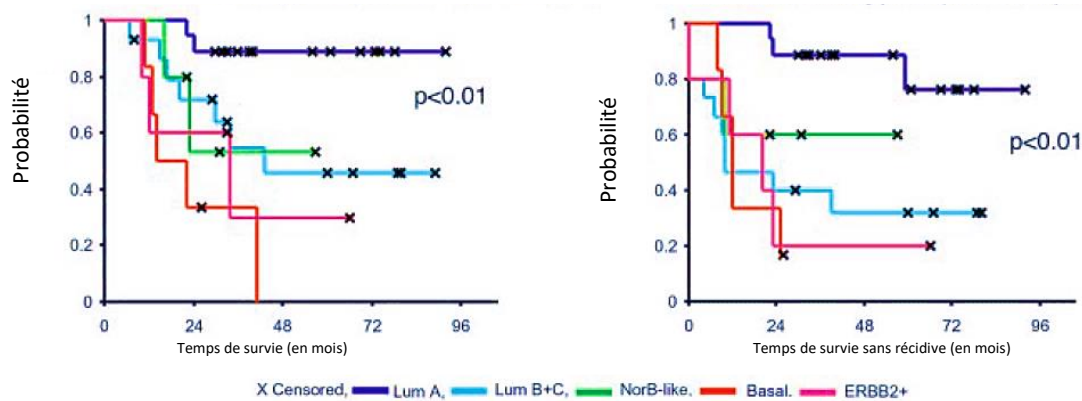
tumeurs luminales : **luminal-A et luminal-B**. Dans le groupe des tumeurs ER-, 3 sous-groupes sont identifiés en fonction des modifications d'expression du récepteur HER2 et de l'expression des cytokératines spécifiques des différents types cellulaires : le sous-groupe **HER2+**, le sous-groupe **basal-like** et le sous-groupe **normal-like**.

D'autres types de tumeurs mammaires ont été mis en évidence, il s'agit des tumeurs dites « **molecular apocrine** » qui possèdent une activation du récepteur aux androgènes et les tumeurs dites « **claudin-low** » qui se caractérisent par une faible expression des marqueurs de jonction cellulaire (CDH1, Cadherin-1, CLDN, claudin). Les caractéristiques de ces sous-types sont détaillées dans le [tableau 3](#).

Sous-type	ER/PR/HER	Fréquence	Autres marqueurs	Cluster de prolifération	Grade histologique	Pronostic
<b>Normal-like</b>	ER+/-, PR ? HER2-	5 à 10%	CKR5- EGFR-	Faible	I	Intermédiaire
<b>Luminal-A</b>	ER+ PR+ HER2-	50 à 60%	CK8/18+ ER1+ Ki67-	Faible	I ou II	Bon
<b>Luminal-B</b>	ER+/- PR+/- HER2+/-	10 à 20%	Ki67+	Elevé	I ou II	Intermédiaire
<b>HER2+</b>	ER- PR- HER2+	15 à 20%	Ki67+ P53 mutée	Elevé	III	Défavorable
<b>Basal-like</b>	ER- PR- HER2-	10 à 20%	CK5/14/17+ Laminine+ P53 mutée Ki67+	Elevé	III	Très défavorable
<b>Molecular apocrine</b>	ER- PR- HER2+/-		CK5+	Elevé	II ou III	Intermédiaire
<b>Claudin-low</b>	ER- PR- HER2-	12 à 14%	CK5 CDH1 bas/- CLDN1 bas/-	Elevé	III	Défavorable

**Tableau 3 : Caractéristiques moléculaires des différents sous-types de cancer du sein.** (Adapté de Eroles et al., 2012; Weigelt et al., 2010).

Les tumeurs basal-like, molecular apocrine et claudin-low sont regroupées sous le nom de tumeurs triple négatives (TNBC, *triple negative breast cancer*). Les cancers du sein triple négatif concernent 25 à 40% des femmes âgées de moins de 40 ans. Ces tumeurs sont les plus agressives et possèdent un mauvais pronostic de survie ([Figure 6](#)).



**Figure 6 : Courbes de survie associées aux différents sous-types moléculaires de cancer du sein. A.** Analyse de la survie selon le sous-type moléculaire. **B.** Analyse de la survie sans récurrence selon le sous-type moléculaire. Lum A : luminal-A ; LumB+C : luminal-B ; NorB-like : normal-like ; Basal : basal-like ; ERBB2+ : HER2+. (Adapté de Sørli et al., 2001).

## 7) Traitements du cancer du sein

Le cancer du sein présente une hétérogénéité intra et inter-tumorale complexe. Différents traitements sont donc utilisés pour traiter les patientes atteintes d'un cancer du sein. L'oncologue décide alors du schéma thérapeutique en fonction des caractéristiques cliniques, biologiques et génétiques de chaque tumeur mammaire pouvant associer la chirurgie, la radiothérapie, la chimiothérapie, l'hormonothérapie ou la mise en place d'une thérapie ciblée.

### a. La chirurgie

La chirurgie est le traitement de référence de la plupart des cancers du sein. Elle a pour but de supprimer les tissus touchés par les cellules cancéreuses. Elle est le plus souvent réalisée en première intention, avant les autres traitements, mais peut aussi être réalisée après un traitement néo-adjuvant (une chimiothérapie ou une hormonothérapie) pour réduire la taille de la tumeur avant l'opération et éviter la mastectomie totale.

Lorsque la tumeur est de petite taille, une **tumorectomie** est réalisée. Cette technique préserve le sein et consiste à enlever la tumeur et les cellules qui l'entourent. La tumorectomie est toujours suivie d'une radiothérapie. En revanche, une ablation totale du sein est requise lorsque le volume tumoral est trop important, c'est la **mastectomie**.

De plus, le risque d'envahissement ganglionnaire est évalué lors de la chirurgie, soit par biopsie du ganglion sentinelle, soit par curage axillaire. En effet, en absence de ganglion palpable, les médecins utilisent un marqueur de scintigraphie qui permet d'identifier **les ganglions sentinelles**. Ils les prélèvent et les examinent au microscope pour y rechercher la présence ou non de cellules

cancéreuses. Cette technique repose sur l'hypothèse que si les premiers ganglions lymphatiques de la chaîne ganglionnaire qui assure le drainage du cancer du sein ne sont pas envahis par les cellules tumorales alors les autres ganglions ne le seront pas non plus. Au contraire, s'ils contiennent des cellules cancéreuses alors elles peuvent avoir migré et circuler dans l'organisme. Un **curage axillaire** est alors réalisé et permet de retirer la chaîne de ganglions lymphatiques qui drainent la zone du sein pour éviter la propagation des cellules cancéreuses.

Après la chirurgie et selon le type de cancer, un traitement par radiothérapie ou par chimiothérapie peut être prescrit.

*b. La radiothérapie*

La radiothérapie est une thérapie locale qui permet d'arrêter la prolifération cellulaire et d'induire la mort des cellules de la zone ciblée. La radiothérapie peut être prescrite après la mastectomie partielle ou totale pour détruire les cellules cancéreuses qui auraient pu échapper au geste chirurgical. Ce traitement repose sur l'utilisation d'émission de rayons X ou de faisceaux d'électrons pour endommager l'ADN des cellules ciblées, de façon à éliminer uniquement les cellules cancéreuses.

La radiothérapie peut être administrée de deux façons différentes. La première est permise à partir d'une source **externe** de rayonnements. Une dose définie de radiations cible la zone de la tumeur. Le traitement est délivré sur plusieurs semaines à raison d'une séance par jour et de quatre à cinq jours sur sept sans hospitalisation. La deuxième nécessite une hospitalisation de courte durée pour implanter directement au contact de la tumeur de fins tubes contenant la source des rayons, c'est de la **curiethérapie**.

*c. La chimiothérapie*

La chimiothérapie est le traitement conventionnel administré aux patientes présentant une atteinte ganglionnaire, une tumeur de plus d'un centimètre ou un cancer invasif comme les tumeurs triple négatives pour lesquelles aucune thérapie ciblée n'est efficace. La chimiothérapie utilise plusieurs molécules anti-tumorales administrées par voie intraveineuse ou par voie orale pour détruire les cellules cancéreuses de façon systématique. Elle est, le plus souvent, prescrite en situation adjuvante (après l'opération) pour limiter le risque de récurrence (Shah & Gradishar, 2018). Les principales molécules utilisées en chimiothérapie sont des anthracyclines, potentialisées par des cyclophosphamides et des taxanes (Conte et al., 2000).

Les anthracyclines modifient la structure de l'ADN, ce qui empêche sa réplication et par conséquent entraîne la mort cellulaire par apoptose. Les principales anthracyclines utilisées dans le cancer du sein sont la doxorubicine et son dérivé, l'épirubicine (Khasraw et al., 2012). Quant



aux taxanes, ils inhibent la formation de microtubules bloquant la division cellulaire et entraînant l'apoptose de la cellule en division. Le taxane le plus prescrit aux patientes atteintes d'un cancer du sein est le paclitaxel (Nabholtz & Gligorov, 2005; Abu Samaan et al., 2019).

Les chimiothérapies détruisent les cellules à croissance rapide et ne sont pas spécifiques des cellules cancéreuses. En effet, les cellules sanguines, des cheveux ou celles qui tapissent le tube digestif sont aussi ciblées. Les traitements de chimiothérapie sont donc à l'origine de nombreux effets secondaires chez les patientes.

#### *d. L'hormonothérapie*

L'hormonothérapie est destinée aux tumeurs hormono-dépendantes c'est-à-dire aux tumeurs qui surexpriment les récepteurs aux œstrogènes et à la progestérone. Ce traitement utilise des inhibiteurs de l'activation de ces récepteurs pour empêcher les cellules tumorales d'être stimulées par ces hormones. L'hormonothérapie est souvent proposée après la chirurgie de manière adjuvante (Bergerat, 2007). Les hormonothérapies les plus prescrites chez les femmes non ménopausées sont les anti-œstrogènes comme le tamoxifène. Chez les femmes ménopausées, les inhibiteurs d'aromatase entrent en compétition avec l'aromatase, une enzyme qui catalyse la transformation de la testostérone en œstradiol, ensuite converti en œstrogène par d'autres enzymes (Bertelli & Paridaens, 2006). Les inhibiteurs d'aromatase bloquent la synthèse d'œstrogène par l'organisme. Les cellules œstrogènes-dépendantes arrêtent leur prolifération.

#### *e. Les thérapies ciblées*

Les thérapies ciblées agissent spécifiquement sur les cellules cancéreuses mammaires en ciblant une de leurs caractéristiques telles que les tumeurs HER2+, les tumeurs triple négatives, les tumeurs hormono-dépendantes ou encore les tumeurs liées à une mutation génétique héréditaire. Ce traitement permet d'observer une meilleure efficacité tout en diminuant le risque d'effets secondaires.

#### ❖ **Thérapies ciblées contre les tumeurs HER2+**

Les tumeurs HER2+ sont caractérisées par une surexpression du récepteur HER2. Cette thérapie repose sur l'utilisation d'anticorps monoclonaux ciblant spécifiquement le récepteur HER2 comme le trastuzumab aussi connu sous le nom d'herceptine (Maximiano et al., 2016). L'anticorps se fixe au niveau du domaine juxtamembranaire de HER2 ce qui empêche son activation ainsi que les voies de signalisations en aval (Derakhshani et al., 2020). Des résistances à ce traitement sont observées chez les patientes traitées par trastuzumab. En effet, les tumeurs peuvent présenter une forme tronquée de HER2. Pour réduire ce phénomène de résistance, d'autres molécules anti-HER2 sont développées. Notamment, le trastuzumab emtansine (T-DM1) qui est une molécule composée du trastuzumab couplé à un dérivé de la maytansine. La

maytansine inhibe la formation de microtubules de la cellule en division. Cette molécule T-DM1 se fixe sur le récepteur HER2 qui est internalisé dans la cellule. Lors de sa dégradation par le protéasome, la maytansine est libérée et va inhiber la formation des microtubules entraînant la mort cellulaire. Cette molécule semble être un traitement prometteur dans les cancers du sein HER2+ précoces et avancés. En effet, chez les patientes atteintes d'un cancer du sein HER2+ précoce, le risque de récurrence de cancer du sein invasif ou de décès est diminué de moitié avec le traitement T-DM1 par rapport au trastuzumab seul (von Minckwitz et al., 2019). De plus, pour les tumeurs HER2+ tardives, le T-DM1 augmente la survie de la patiente et présente moins de toxicité que d'autres composés anti-HER2 (Verma et al., 2012).

#### ❖ Thérapies ciblées contre les tumeurs triple négatives

Les cancers du sein triple négatifs sont les plus agressifs et disséminent facilement dans l'organisme. Ils donnent des métastases relativement tôt (avant 5 ans) alors que les cancers hormonosensibles donnent des métastases plus tardivement (entre 5 à 10 ans). Le taux de survie à 5 ans est de 11,3% avec une survie médiane globale de 14 mois et demi. Il est difficile de cibler ces tumeurs spécifiquement à cause de l'absence de récepteurs hormonaux. Le traitement actuel repose sur l'utilisation d'anthracyclines et de taxanes qui est parfois peu efficace. L'apparition de métastases requiert des mécanismes permettant la prolifération, la migration et l'invasion des cellules tumorales dans les réseaux vasculaires avant la dissémination des cellules cancéreuses dans les organes cibles. Les cellules ont besoin de former de nouveaux vaisseaux sanguins, c'est la néo-angiogenèse. Un inhibiteur spécifique du récepteur VEGF est utilisé pour traiter les tumeurs mammaires triples négatives métastatiques : le bevacizumab. Une étude a comparé les effets d'un traitement de chimiothérapie seul ou en combinaison avec le bevacizumab. Une meilleure réponse thérapeutique est observée chez les patientes atteintes d'un cancer du sein HER2- avancé ayant reçu la combinaison par rapport à la chimiothérapie seule (Sini et al., 2016).

L'étude ASCENT de phase III randomisée (IMMU-132-05) met en évidence une nouvelle molécule prometteuse qui augmente la survie des patientes atteintes d'un cancer du sein triple négatif métastatique (Bardia, Hurvitz, Rugo, et al., 2021). En effet, le sacituzumab govitecan (Trodelvy) est un anticorps conjugué à une chimiothérapie (Syed, 2020) qui est utilisée pour traiter les patientes atteintes d'un cancer triple négatif métastatiques ayant reçu au moins deux lignes de traitements en situation avancée ou métastatique. L'étude est menée sur 468 patientes sans métastase cérébrale, 235 d'entre elles reçoivent le sacituzumab govitecan et 233 la chimiothérapie seule. La médiane de survie sans progression est de 5,6 mois pour les patientes traitées avec le trodelvy contre 1,7 mois pour celles traitées avec la chimiothérapie seule. L'étude montre une amélioration de la survie globale des patientes avec 12,1 mois contre 6,7 mois avec

la chimiothérapie (Bardia, Hurvitz, Tolaney, et al., 2021). Cette thérapie est proposée aux femmes en échec thérapeutique en France depuis le 1<sup>er</sup> novembre 2021.

❖ **Thérapies ciblées contre les tumeurs hormono-dépendantes métastatiques**

Comme dit précédemment, la mortalité des patientes atteintes de cancer du sein est principalement causée par la formation de métastases. Des inhibiteurs de voies de signalisation, comme la voie PI3K/Akt/mTOR, sont donc utilisés pour traiter les tumeurs hormono-dépendantes métastatiques et ainsi pallier les résistances des anticorps. Cette voie de signalisation mTOR (*mammalian Targets Of Rapamycin*) intervient dans la prolifération cellulaire, la survie, la migration et l'angiogenèse. La rapamycine est connue pour être un inhibiteur naturel de cette voie de signalisation (Ekizceli et al., 2020). Les thérapies contre les tumeurs hormono-dépendantes métastatiques utilisent des dérivés de la rapamycine qui ont une meilleure stabilité et sont plus facilement solubilisable (O'Shaughnessy et al., 2018). L'un de ces dérivés s'appelle l'everolimus, il restaure la sensibilité des cellules aux hormones et augmente l'efficacité de l'hormonothérapie (Du et al., 2018).

❖ **Thérapies ciblées contre les tumeurs liées à une mutation génétique héréditaire**

Certaines tumeurs peuvent être associées à une mutation héréditaire des gènes BRCA1 ou BRCA2 mutés. La stratégie thérapeutique proposée pour ces tumeurs est d'inhiber la protéine PARP (*poly-ADP ribose polymerase*) qui intervient dans le processus de réparation de l'ADN. En effet, les cellules présentant une mutation de BRCA1 et/ou BRCA2 sont incapables de réaliser la recombinaison homologue. L'inhibition de la protéine PARP entraîne alors une instabilité de l'ADN et la mort cellulaire. Les molécules inhibitrices de PARP telles que l'olaparib et l'iniparib sont actuellement en essai clinique de phase II et III respectivement (Tung et al., 2020; O'Shaughnessy et al., 2014).

L'ensemble des thérapies contre le cancer du sein est résumé selon le sous-type moléculaire dans le tableau ci-dessous ([Tableau 4](#)).

**Malgré les stratégies thérapeutiques existantes (chirurgie, radiothérapie, chimiothérapie, hormonothérapie, thérapies ciblées), le cancer du sein reste la première cause de mortalité par cancer chez la femme en France et dans le monde. Afin de diminuer cette mortalité, il est primordial d'identifier tous les acteurs moléculaires et les mécanismes impliqués dans la survenue des métastases du cancer du sein ainsi que dans la résistance aux traitements.**

Luminal-like	HER2+	Triple négative
<b><u>Chimiothérapies :</u></b>		
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Doxorubicine (anthracycline)</li> <li>- Gemcitabine (anthracycline)</li> <li>- Cisplatine (anthracycline) <ul style="list-style-type: none"> <li>- Paclitaxel (taxane)</li> <li>- Docetaxel (taxane)</li> </ul> </li> <li>- Capecitabine (taxane)</li> </ul>		
<b><u>Hormonothérapies :</u></b>  - Tamoxifène  - Inhibiteurs d'aromatase	<b><u>Anticorps anti-HER :</u></b>  - Trastuzumab (anti-HER2) - Lapatinib (anti-HER1 et HER2) - Pertuzumab (anti-HER2) - T-DM1 (anti-HER2) + taxane - MM-121 (anti-HER3) - MM-111 (antiHER2/HER3)	<b><u>Inhibiteurs PARP :</u></b>  - Olaparib  - Iniparib
	Dalotuzumab (anti-IGF1R)	<b><u>Inhibiteurs EGFR :</u></b>  - Cetuximab - Erlotinib - Lapatinib
<b><u>Inhibiteurs :</u></b>		
<ul style="list-style-type: none"> <li>- Everolimus (inhibiteur de mTOR)</li> <li>- Bevacizumab (inhibiteur de VEGF)</li> <li>- Sunitinib (inhibiteur multi-kinase)</li> <li>- Sorafenib (inhibiteur multi-kinase)</li> </ul>		

**Tableau 4 : Principales thérapies utilisées selon les sous-types moléculaires de cancer du sein.**

## Les ARN non codants

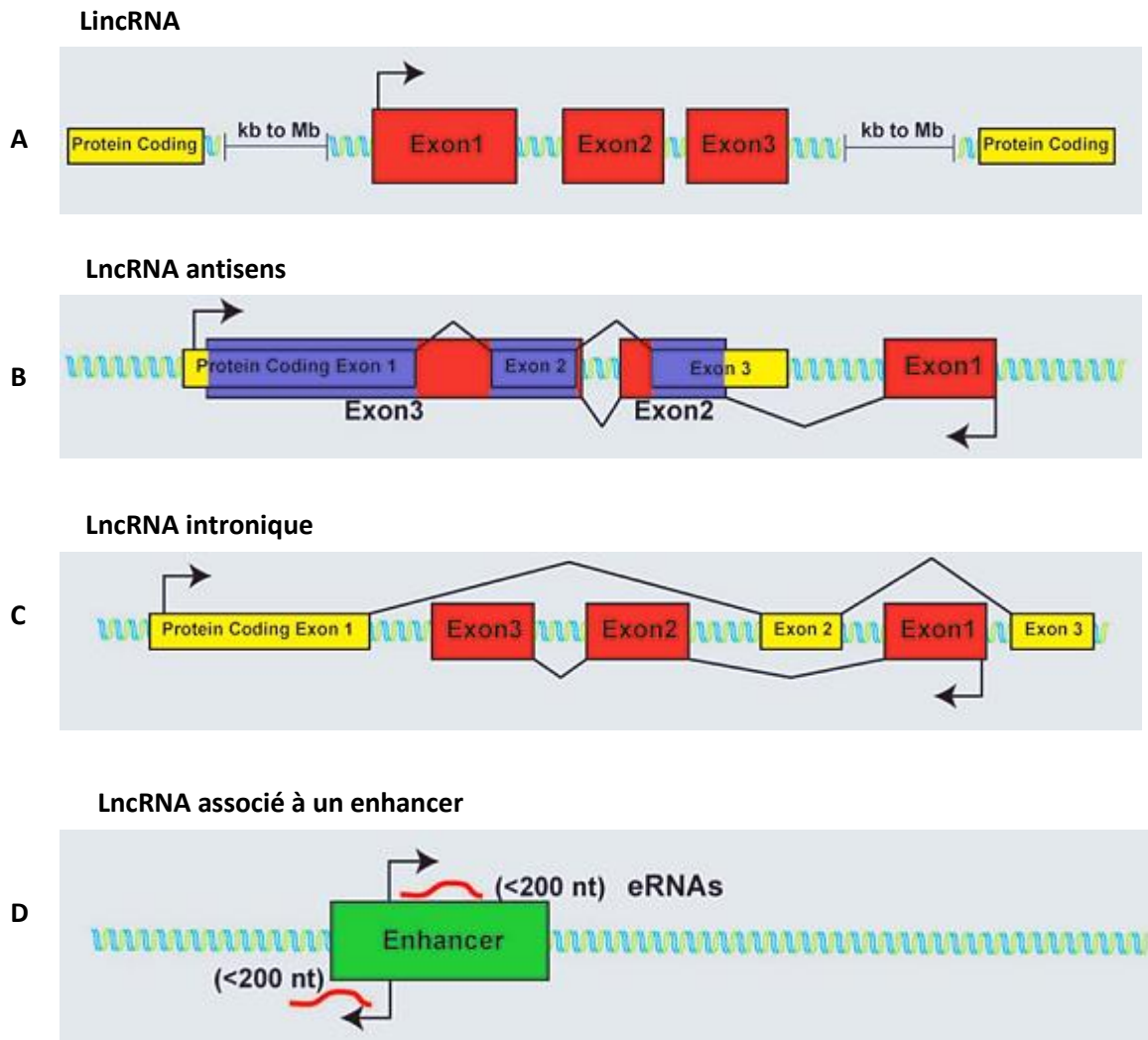
Selon le projet ENCODE (*Encyclopedia of DNA Elements*), près de 90% du génome humain est transcrit alors que seulement 3% est traduit (ENCODE Project Consortium et al., 2007; Qu & Fang, 2013). La majorité des ARN non traduits sont appelés « ARN non codants » (ncRNA) parmi lesquels se trouvent des ARN de plus de 200 nucléotides : les longs ARN non codants (lncRNA) et des ARN inférieurs à 200 nucléotides : les petits ARN non codants dont les microARN (miRNA). Grâce à leur mode d'action pléiotropique, les ARN non codants peuvent participer à l'acquisition d'un phénotype tumoral. En effet, nous verrons dans le chapitre suivant que le long ARN non codant *H19* est impliqué dans de nombreux processus cellulaires tels que la prolifération, la migration, l'apoptose et le maintien des cellules souches. Nous exposerons ainsi l'ensemble des mécanismes mis en place par les lncRNA dans l'induction de ces différents phénotypes. Les petits ARN non codants feront l'objet de la partie suivante ([Chapitre 2, Partie II](#)).

### I. Les longs ARN non codants

#### 1) Découverte des longs ARN non codants

Dans les années 1950, la communauté scientifique pensait que plus un organisme était développé, comme celui de l'Homme, plus son génome devait être important (Kung et al., 2013). Dans les années 1970, des expériences d'hybridation ADN-ARN ont montré que l'Homme ne possède que 20 000 à 30 000 gènes codants. A cette époque, le reste du génome est considéré comme de l'« ADN poubelle » ou « junk DNA » suite à la présence des transposons, des pseudogènes ou des séquences répétées (Ohno, 1972; Thomas, 1971; Palazzo & Koonin, 2020). Quelques années plus tard, ces séquences non codantes sont étudiées et démontrées régulant l'intégrité du génome, l'expression des gènes et la synthèse des ARNm matures.

Dès les années 2000, les études de séquençage du génome humain se multiplient notamment le Projet Génome Humain ou encore le consortium ENCODE (ENCODE Project Consortium et al., 2007; ENCODE Project Consortium, 2012). En 2005, par séquençage entier du génome humain, le Projet Génome Humain met en évidence que le taux de séquences non codantes dans l'organisme est le reflet de sa complexité. Ensuite, le consortium ENCODE a compilé près de 1640 banques de données sur 147 lignées cellulaires différentes et a mis en évidence 9640 loci permettant l'expression des longs ARN non codants chez l'Homme (Derrien et al., 2012). Aujourd'hui, grâce à la base de données LNCipedia 5.2, 127 802 lncRNA sont annotés sur la séquence du génome humain. La majorité d'entre eux n'ont pas de fonction dans la cellule décrite.



**Figure 7 : Classification des longs ARN non codants.** **A.** Les lincRNA sont classés en fonction de leur origine dans le génome. Les longs ARN intergénomiques sont issus de fragments distants d'au moins 1 kb d'un gène codant une protéine. **B.** Les lincRNA peuvent être transcrits en orientation antisens par rapport aux gènes codants. **C.** Les lincRNA introniques peuvent être formés à partir de certains introns éliminés au cours du phénomène d'épissage des ARNm. **D.** Ils peuvent être transcrits à partir d'enhancers (eRNAs). (Adapté de Clark and Blackshaw, 2014).

## 2) Classification des longs ARN non codants

De nombreuses méthodes de classification des longs ARN non codants existent selon des critères de discrimination comme la taille, la structure ou les fonctions biologiques. L'une des méthodes les plus utilisées repose sur l'origine de transcription des longs ARN non codants dans le génome (St Laurent et al., 2015). D'après cette classification, 5 groupes sont identifiés.

### a. LncRNA intergéniques (lincRNA)

Les lincRNA intergéniques possèdent leur propre promoteur et sont transcrits par l'ARN polymérase de type II, polyadénylés et épissés. Ils sont appelés les large-intergenic non coding RNA (lincRNA) (Figure 7A). Ils sont transcrits à partir d'une séquence comprise entre deux gènes codants et leur transcription ne se superposent pas à l'expression des gènes. Dans la majorité des cas, ils sont localisés à une distance de plus de 5 kb des séquences des gènes codants et ont une taille supérieure à 1000 nucléotides (Kung et al., 2013). Par exemple, les lincRNA les plus étudiés sont *Xist* (Brockdorff et al., 1992; Brown et al., 1992), *HOTAIR* (Rinn et al., 2007), *MALAT1* (Ji et al., 2003) et *H19* (Brannan et al., 1990).

### b. LncRNA antisens

Les lincRNA antisens sont transcrits en orientation antisens par rapport aux gènes codants (Figure 7B). Ils peuvent déborder partiellement ou entièrement sur ces gènes codants. Ils sont majoritairement retrouvés au niveau des régions chromosomiques soumises à l'empreinte génomique. Certains de ces lincRNA contrôlent l'établissement et le maintien de l'empreinte comme ceux transcrits à partir des loci *Tsix/Xist* (J. T. Lee et al., 1999), *Kcnq1/Kcnq1ot1* (Kanduri et al., 2006) et *Igf2R/Air* (Lyle et al., 2000). Une partie sera dédiée à la mise en place de l'empreinte génomique et à sa régulation (Chapitre 3, Partie I).

### c. LncRNA issus de pseudogènes

Suite à des mutations non-sens ou d'un décalage de la phase ouverte de lecture, les pseudogènes peuvent être transcrits en lincRNA. Ils peuvent acquérir de nouvelles fonctions dans la cellule et réguler de façon post-transcriptionnelle l'expression des gènes (Bekpen et al., 2009).

### d. LncRNA introniques

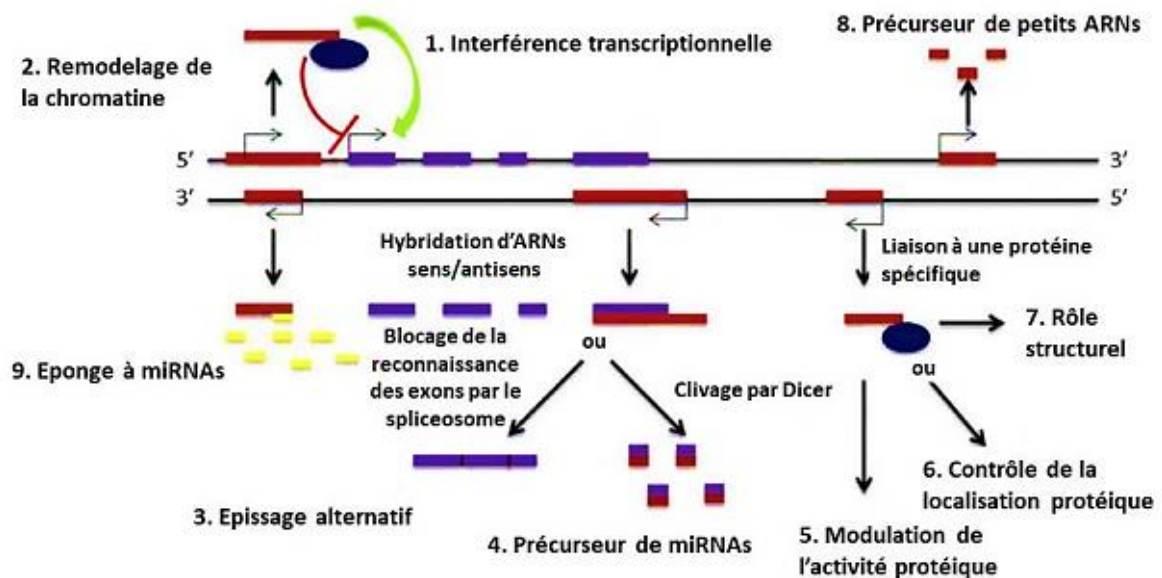
Les lincRNA introniques peuvent être formés à partir de certains introns éliminés au cours du phénomène d'épissage des ARNm (Figure 7C). Ils ont une fonction similaire à l'ARNm à partir duquel ils sont synthétisés. Par exemple, le lincRNA *COLDAIR*, transcrit à partir du locus FLC (flowering repressor locus), est impliqué dans le phénomène de vernalisation des plantes (Heo & Sung, 2011).

e. *ARN enhancers (eRNAs)*

Les ARN enhancers sont synthétisés à proximité des points d'initiation de la transcription des ARNm et des ARN antisens (Figure 7D). Leur fonction précise est inconnue. Ils sont de petite taille (de 20 à 2500 nt), coiffés et polyadénylés. Leur transcription est probablement impliquée dans les mécanismes de décondensation de la chromatine, de façon à favoriser l'expression des gènes auxquels ils sont associés (T.-K. Kim et al., 2010). Ils sont parfois considérés comme du bruit de fond transcriptionnel généré par l'interaction du complexe d'initiation de la transcription avec les séquences enhancers ou à proximité des promoteurs.

### 3) Modes d'action des longs ARN non codants

Les modes d'action des longs ARN non codants sont divers et varient en fonction de leur localisation cellulaire. Ils peuvent agir à la fois dans le noyau et dans le cytoplasme (X. Shi et al., 2013). Les longs ARN non codants peuvent exercer leur action au niveau transcriptionnel, au niveau post-transcriptionnel et au niveau post-translationnel (Figure 8). Nous y reviendrons plus en détail dans la partie consacrée aux modes d'action du long ARN non codant *H19* (Chapitre 3, Partie III, Paragraphe 5).



**Figure 8 : Modes d'action des longs ARN non codants.** Les longs ARN non codants peuvent réguler négativement (1) ou positivement (2) l'expression d'un gène codant par interférence transcriptionnelle ou en modulant le remodelage de la chromatine. De plus, l'hybridation de transcrits antisens avec leur ARN sens spécifique peut entraîner un épissage alternatif (3) ou la formation de microRNA (4). Les longs ARN non codants peuvent interagir avec des protéines régulant leur activité (5), leur localisation (6) ou former des complexes ou des structures particulières (7). Dans le cytoplasme, les longs ARN non codants peuvent être des précurseurs de petits ARN (siRNA, miRNA) (8) ou servir d'éponge à microRNA de façon à les séquestrer et inhiber leur action (9). (Adapté de X. Shi et al., 2013).



## II. Les petits ARN non codants

Les petits ARN non codants sont divisés en plusieurs groupes : les ARN de transfert (tRNA), les microRNA (miRNA), les *small interfering* ARN (siRNA), les ARN se fixant sur les protéines PIWI (piRNA) et les petits ARN nucléolaires (snoRNA) servant d'ARN guide. Cette partie sera consacrée principalement à la découverte, la synthèse et l'étude des mécanismes d'action des miRNA dans la cellule.

### 1) Découverte des microRNA

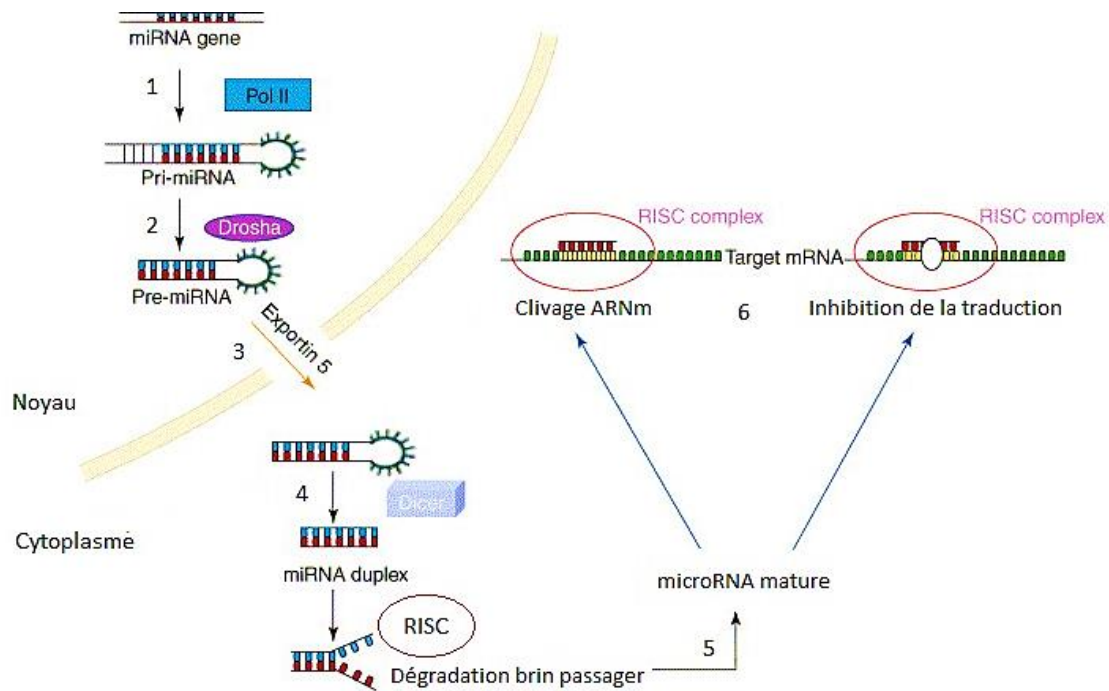
L'équipe de Lee découvre le premier microRNA chez le ver nématode *Caenorhabditis elegans* en 1993 appelé *lin-4* généré à partir du gène du même nom (R. C. Lee et al., 1993). Ce miRNA empêche la traduction de l'ARNm *lin-14* via une complémentarité de séquences avec l'UTR 3' de l'ARNm de *lin-14*. Cette interaction entraîne l'inhibition de l'expression du gène *lin-14* ce qui assure le bon développement de la larve de nématode. En effet, la diminution de l'expression de *lin-14* à la fin de la première étape du développement permet d'initier la seconde (Wightman et al., 1993; Olsen & Ambros, 1999).

Depuis 1993, le nombre de miRNA identifiés augmente sans cesse. En 2019, la base de données miRBase répertorie 38 589 précurseurs en épingle à cheveux et 48 860 microRNA matures dans 271 organismes, dont 2654 chez l'Homme, 469 chez *Drosophila melanogaster* et 437 chez *Caenorhabditis elegans* (Kozomara et al., 2019).

### 2) Nomenclature des microRNA

Au moment de leur découverte, les microRNA étaient nommés selon leur phénotype associé (*lin-4* ou *let-7*). Plus tard, les microRNA identifiés par clonage ou par séquençage se sont vu attribuer un numéro (miR-21, miR-125). Les chercheurs ont mis en évidence des familles de microRNA. Les microRNA appartenant à la même famille possèdent la même séquence minimale d'interaction avec l'ARNm cible : la *seed sequence* et sont donc différenciés par l'ajout d'une lettre (miR-125a et miR-125b). Les microRNA d'une même famille sont dits redondants car ils ciblent les mêmes ARNm. En 2014, 196 familles de microRNA conservées entre les mammifères sont dénombrées (Ha & Kim, 2014).

Par ailleurs, un même microRNA peut être transcrit à partir de plusieurs loci différents. Ils seront différenciés par l'ajout d'un chiffre (miR-125b-1, miR-125b-2) et posséderont les mêmes ARNm cibles. De plus, un seul et même transcrit peut être précurseur de plusieurs microRNA : c'est l'unité polycistronique. Les microRNA n'appartiennent pas à la même famille et ne possèdent pas la même *seed sequence*. Le cluster impliqué dans le développement bilatéral des animaux miR-100/let-7/miR-125 est l'unité polycistronique la plus conservée (Ha & Kim, 2014).



**Figure 9 : Voie de biosynthèse canonique des microRNA.** 1) Les microRNA sont transcrits par l'ARN polymérase II sous la forme d'un pri-miRNA. 2) Le pri-miRNA est clivé par l'endonucléase Drosha. 3) Obtention d'un pré-miRNA qui est exporté dans le cytoplasme par l'exportine 5. 4) Dans le cytoplasme, le pré-miRNA est clivé par Dicer : obtention d'un duplex de microARN qui est ensuite pris en charge par le complexe RISC (*RNA-induced silencing complex*). 5) Dégradation du brin passager. 6) Maturation du microRNA qui se fixera sur ses ARNm cibles pour induire le clivage ou l'inhibition de leur traduction. (Adapté de Garzon et al., 2006).

Selon les règles de nomenclature, les gènes permettant la formation de microRNA sont notés « mir-xxx », alors que les microRNA matures sont notés « miR-xxx » (Tétreault & De Guire, 2013). Les microRNA dans la cellule forment un duplex d'ARN. Au sein de ce duplex, le premier brin d'ARN est appelé brin guide (miR-xxx-5p) et le second brin, le brin passager qui est souvent dégradé au cours de la maturation du microRNA (miR-xxx-3p ou miR\*). Dans certains cas, ce brin miR-xxx-3p peut être fonctionnel et avoir des ARNm cibles.

En 2006, il est admis qu'environ 30% des gènes codants pour une protéine peuvent être régulés par un microRNA (Garzon et al., 2006). En 2014, cette proportion a augmenté et est passée à 60% (Ha & Kim, 2014). Dans les années à venir, il est facile d'imaginer que cette proportion continuera d'augmenter selon l'avancée de la recherche et la découverte de nouveaux mécanismes de régulation. De plus, un microRNA peut réguler l'expression de plusieurs ARNm différents et contrôler l'expression de plusieurs gènes. Cependant, pour la majorité des microRNA, leur fonction précise au sein de la cellule reste méconnue.

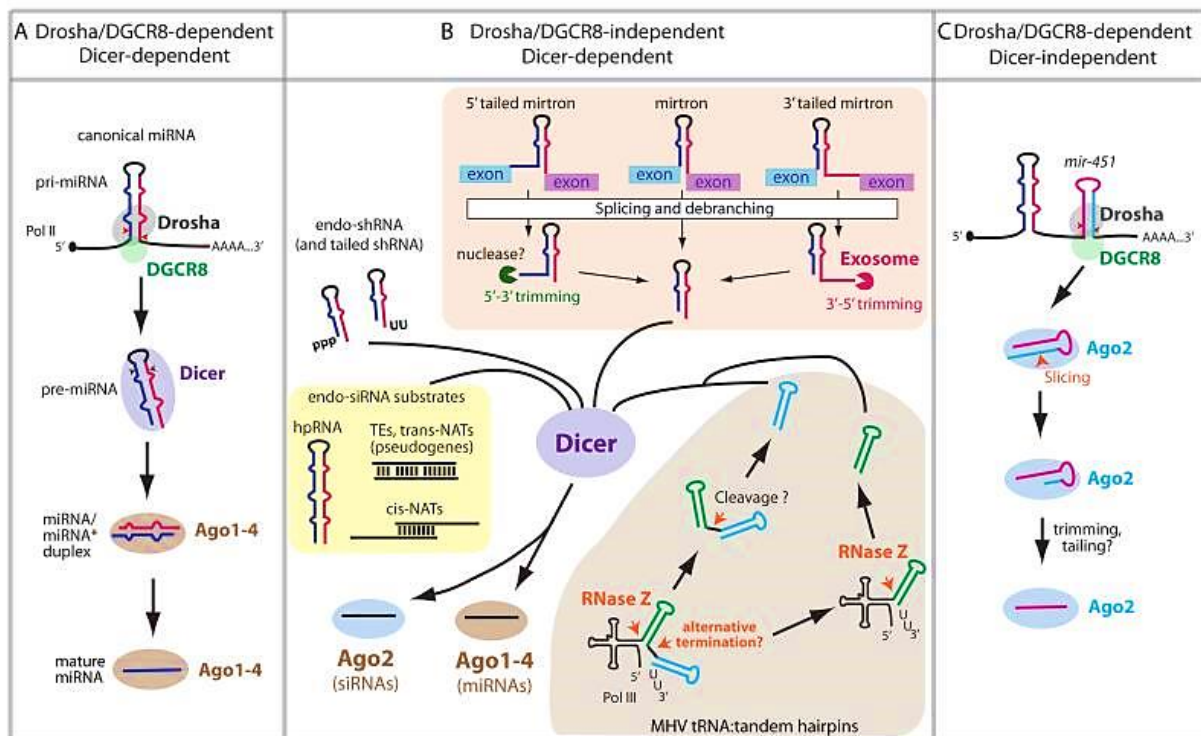
### **3) Voies de synthèse des microRNA**

Deux grandes voies de synthèse sont à l'origine de la formation des miRNA : une voie majoritaire dite canonique et une voie minoritaire dite non-canonique.

#### *a. Voie canonique*

Les gènes codants un miRNA sont transcrits en un pri-miRNA par l'ARN polymérase II (Figure 9.1). Le pri-miRNA possède une taille d'environ 1kb et contient une structure de type tige-boucle. Cette tige est composée de 30 à 35 nucléotides. Le pri-miRNA est porté par les introns des ARNm, par leurs UTR, par les ARN non codants ou plus rarement, par les exons. Quand le pri-miRNA est transcrit, la tige-boucle est reconnue par la protéine Drosha qui possède une activité RNase (Figure 9.2). Cette protéine va interagir avec la protéine stabilisatrice DGCR8 pour former le complexe microprocesseur. Ce complexe va alors cliver le pri-miRNA pour générer le pré-miRNA, qui sera ensuite exporté vers le cytoplasme grâce à l'exportine 5 (Figure 9.3) (Ha & Kim, 2014; Treiber et al., 2019).

La protéine Drosha est une endonucléase de 160 kDa spécifique des ARN double brin. Elle est composée de 3 parties : une partie N-terminale pour la localisation nucléaire, une partie intermédiaire pour le recrutement de la protéine DGCR8 et une partie C-terminale qui contient le domaine RNase III (RIIIda et RIIIDb) en tandem et un domaine de liaison aux ARN double brin (Ha & Kim, 2014; Treiber et al., 2019).



**Figure 10 : Voies de biosynthèse non-canonique des microRNA.** **A.** Voie de synthèse canonique. **B.** Voie de synthèse non-canonique Drosha-indépendante. Lors de l'épissage des ARNm, les introns peuvent être reconnus comme des pré-miRNA appelés mirtrons. Ces mirtrons sont reconnus par l'endonucléase Drosha pour générer un ARN double brins. Dans certains cas, l'action d'une exonucléase 3'→5' ou 5'→3' peut être requise. Les ARN de transfert peuvent former un pré-miRNA reconnu par Dicer après clivage des RNases Z et P. **C.** Voie de synthèse non-canonique Dicer-indépendante. Lorsque Drosha clive son substrat, elle génère un pré-miRNA d'une taille de 18 nucléotides qui ne pourra pas être reconnu par Dicer. Ce pré-miRNA sera reconnu directement par le complexe RISC qui dégradera la boucle et permettra la maturation du miRNA. (Adapté de J.-S. Yang & Lai, 2011).

Dans le cytoplasme, le pré-miRNA est clivé par une seconde enzyme appelée Dicer (Figure 9.4). La protéine Dicer est une endonucléase de 200 kDa de type RNase III. Elle est également composée de 3 parties : une partie N-terminale comportant une hélicase qui reconnaît et interagit avec le pré-miRNA, une partie intermédiaire contenant un domaine PAZ (PIWI/AGO/ZWILLE) qui interagit avec la partie terminale du pré-miRNA, et une partie C-terminale qui contient un domaine RNase III en tandem qui forme le centre catalytique de la protéine (Ha & Kim, 2014; Treiber et al., 2019).

L'endonucléase Dicer génère un duplex de miRNA de 22 nucléotides qui sera pris en charge par une protéine de type Argonaute (AGO) pour ainsi former le complexe RISC (*RNA-induced silencing complex*). Au sein de ce complexe, le brin passager du duplex sera dégradé, permettant la maturation complète du miRNA (Figure 9.5). Il n'existe pas de marque spécifique pour discriminer le brin passager du brin guide. Néanmoins, le brin possédant une extrémité 5' thermodynamiquement moins stable est le brin passager. De plus, la présence d'un U en position N-terminale peut aussi être une caractéristique distincte du brin guide (Ha & Kim, 2014; Treiber et al., 2019).

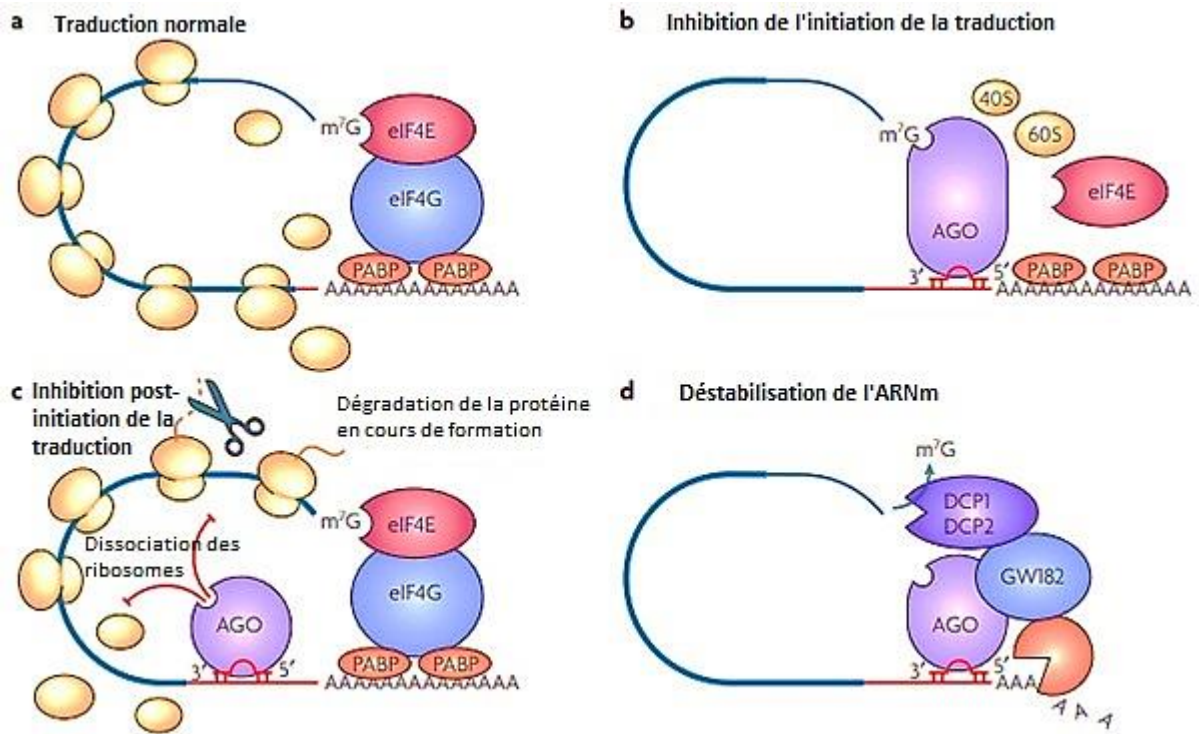
Chez l'homme, 4 protéines AGO sont décrites pour former le complexe RISC. La protéine AGO2 permet le clivage de l'ARNm cible tandis que les trois autres (AGO1, AGO3, AGO4) empêchent la traduction de l'ARNm cible (Figure 9.6). L'objectif est d'avoir une inhibition complète de l'expression du gène ciblé (Ha & Kim, 2014; Treiber et al., 2019).

#### *b. Voies dites non-canoniques*

Les voies de biosynthèse des microRNA dites non-canoniques sont plus rares. En effet, chez les vertébrés, seulement 1% des miRNA sont transcrits à partir des voies non-canoniques. Deux sous-voies non-canoniques sont décrites : la voie Drosha-indépendante et la voie Dicer-indépendante.

#### ❖ Voie Drosha-indépendante ou Voie indépendante du microprocesseur

Lors de l'épissage des ARNm, les introns excisés peuvent être reconnus comme des pré-miRNA sans avoir besoin du clivage par le microprocesseur. Les miRNA synthétisés à partir d'introns sont appelés les « mirtrons ». Une enzyme de « débranchement » est nécessaire pour permettre la structuration sous forme de pré-miRNA qui sera reconnu par Dicer et pris en charge par le complexe RISC. Certains mirtrons sont appelés « tailed mirtrons » car ils possèdent des extensions en 5' et en 3' qui devront être raccourcies avant l'export du mirtron (Figure 10B) (Treiber et al., 2019).



**Figure 11 : Modes d'action des microRNA.** **A.** Mécanismes normaux de la traduction des ARNm. **B.** Après le recrutement du complexe RISC, les microRNA se fixent sur l'UTR3' des ARNm. Ils interagissent avec la coiffe en 5' bloquant la fixation du complexe d'initiation de la traduction sur l'UTR5' et la fixation des ribosomes sur l'ARNm. **C.** La protéine AGO2 peut réprimer la phase d'élongation de la traduction en dissociant les ribosomes de l'ARNm. La protéine en cours de formation sera dégradée. **D.** La protéine AGO2 s'associe avec les protéines GW182 et DCP1/2 permettant la déstabilisation de l'ARNm cible par dégradation de la queue polyA et de la coiffe en 5'. (Adapté de Stefani & Slack, 2008).

Les microRNA peuvent également être produits à partir d'ARN non codants comme les petits ARN nucléolaires (snoRNAs) ou les ARN de transfert (tRNA) qui sont transcrits par l'ARN polymérase III (Figure 10B). Par exemple, l'ARN de transfert à l'isoleucine (tRNA-Ile) est digéré par les RNases P et Z et génère ainsi un ARN semblable à un pré-miRNA reconnu par Dicer pour former le miR-1983 (Babiarz et al., 2008).

Au cours de la transcription par l'ARN polymérase III, des petits ARN ayant une structure secondaire de type épingle à cheveux peuvent être produits. Ils seront exportés dans le cytoplasme par l'exportine 1 et reconnus par Dicer qui clivera la boucle de l'épingle et formera un duplex de microRNA (Ha & Kim, 2014).

#### ❖ Voie Dicer-indépendante

Dans la littérature, la voie de synthèse non-canonique indépendante de Dicer n'est associée qu'à la synthèse du miR-451 (Cheloufi et al., 2010; Cifuentes et al., 2010; J.-S. Yang et al., 2010). Dans un premier temps, le pri-miR-451 est clivé par Drosha dans le noyau pour former un pré-miR-451 de 18 nucléotides (Figure 10C). Le pré-miRNA est exporté dans le cytoplasme par l'exportine 5. Dans le cytoplasme, il ne sera pas reconnu par Dicer puisqu'il est trop court néanmoins il possède une taille suffisante pour être pris en charge directement par le complexe RISC. La boucle du pré-miR-451 est ensuite clivée par la protéine AGO2 possédant une activité RNase pour obtenir le miR-451 mature (Yoda et al., 2013).

## 4) Modes d'actions des microRNA

De nombreuses études démontrent le rôle biologique important des microRNA. En effet, ils sont impliqués dans le développement embryonnaire, la prolifération cellulaire et la différenciation. De plus, ils influencent aussi la transduction du signal intracellulaire, l'apoptose ou la tumorigenèse.

### a. Régulation négative par les microRNA

Les microRNA exercent une régulation négative de façon post-transcriptionnelle sur leurs ARNm cibles pour les dégrader ou inhiber leur traduction en se fixant sur les UTR3' (Figure 11). Cette régulation est permise grâce à l'association du complexe RISC avec des cofacteurs et/ou par la présence de protéines spécifiques sur les ARNm. De plus, le mode d'action des microRNA est déterminé par une complémentarité de séquence entre le microRNA et son ARNm cible.

Si une complémentarité parfaite est observée, l'ARNm cible est dégradé par l'activité endonucléase de la protéine AGO2 (clivage entre les nucléotides 10 et 11 suivi de la dégradation de l'ARNm par l'action d'exonucléase 5'→3' et 3'→5') (Hutvagner & Zamore, 2002; Martinez & Tuschl, 2004).



Cependant, si la complémentarité est imparfaite (surtout entre les nucléotides 10 et 11), l'ARNm cible n'est pas traduit. Une déadénylation et la perte de sa coiffe en 5' modifient sa stabilité (Behm-Ansmant et al., 2006; Standart & Jackson, 2007).

Les mécanismes entraînant la répression de la traduction de l'ARNm ne sont pas bien décrits. Cependant, des études montrent que le microRNA empêche la fixation du complexe d'initiation de la traduction (Figure 11B) alors que d'autres montrent que le microRNA empêche l'élongation de la protéine (Figure 11C) (Maroney et al., 2006; Nottrott et al., 2006). En effet, quand le complexe RISC est fixé avec le microRNA sur l'UTR3' de l'ARNm cible, la protéine AGO2 interagit avec la coiffe en 5' empêchant le recrutement de la protéine eIF4E qui initie la traduction des ARNm (Humphreys et al., 2005; Mathonnet et al., 2007). De plus, AGO2 est capable d'interagir avec certains cofacteurs comme les protéines GW182 ou DCP1/2 pour supprimer la coiffe en 5' et la queue polyA en 3' de l'ARNm qui sera dégradé (Figure 11D) (Standart & Jackson, 2007).

#### *b. Régulation positive par les microRNA*

Les microRNA peuvent également exercer une régulation positive au niveau cellulaire. En effet, le miR-369-3p interagit avec des séquences riches en AU de l'ARNm *TNF $\alpha$*  et réprime sa traduction pour promouvoir la prolifération cellulaire. Lors de la prolifération, le microRNA est associé au complexe RISC et induit une répression de la traduction de l'ARNm. En revanche, lorsque les cellules sont en arrêt dans le cycle cellulaire, la protéine AGO2 se fixe à la protéine FXR1. Cette protéine FXR1 est présente au niveau des séquences riches en AU et induit un effet positif du microRNA sur son ARNm cible. L'étude démontre que lorsque le cycle cellulaire est à l'arrêt, les microRNA ont un mode d'action positif sur leurs ARNm cibles (Vasudevan et al., 2007).

Le second exemple est celui du miR-10a. Des motifs 5'TOP régulent la synthèse des protéines ribosomales et sont sensibles aux signaux de stress cellulaire et au statut nutritif des cellules. Le miR-10a se fixe sur l'UTR5' d'ARNm de protéines ribosomales grâce à ces motifs. En absence de nutriment, la traduction des protéines ribosomales est plus élevée. De plus, le miR-10a peut aussi interagir avec l'UTR3' de ces ARNm entraînant une inhibition de la traduction des ARNm cibles. La régulation positive du miR-10a est donc permise grâce à la privation nutritive, à la présence de motifs 5'TOP et à la fixation du miR-10a sur l'UTR5' de l'ARNm (Ørom et al., 2008).

#### *c. Autres modes de régulation*

L'effet d'un microRNA sur son ARNm cible peut être modulé en fonction de l'interaction avec des cofacteurs protéiques. En effet, quand la protéine DND1 se fixe sur les ARNm *NANOS1* et *TDRD7*, elle empêche le miR-430 de dégrader ces ARNm (Mishima et al., 2006; Kedde et al., 2007).



Le second exemple est celui de la protéine HuR qui se fixe sur l'UTR3' de l'ARNm *CAT1*, bloquant la fixation du miR-122. L'interaction de la protéine HuR avec *CAT1* permet une relocalisation de l'ARNm vers le cytoplasme (Bhattacharyya et al., 2006). La protéine HuR peut également avoir un effet négatif sur l'ARNm *MYC* car elle possède un mode d'action synergique avec let-7 (H. H. Kim et al., 2009). De plus, la protéine HuR régule la formation de microRNA au cours du développement embryonnaire. Cette protéine s'associe avec le lncRNA *H19* empêchant la formation du miR-675 (Keniry et al., 2012).

## 5) MicroRNA et cancer

Les microRNA sont impliqués dans de nombreux processus cellulaires et une dérégulation de leur expression peut être responsable de l'apparition de cancer. En 2005, l'équipe d'Iorio met en évidence une dérégulation de l'expression d'une trentaine de microRNA dans le cancer du sein (Iorio et al., 2005). De plus, l'association des niveaux d'expression de certains de ces microRNA permet à de nouvelles techniques de diagnostic et de prise en charge thérapeutiques des patientes atteintes de cancer du sein d'être mises au point (Shimomura et al., 2016; Nassar et al., 2017). De façon similaire que les gènes, les microRNA peuvent agir en tant qu'oncogène ou comme suppresseur de tumeur.

### a. Suppresseur de tumeur

Les microRNA suppresseur de tumeur sont mis en évidence pour la première fois dans les leucémies lymphoïde chronique (LLC) (Garzon et al., 2006) : ce sont les miR-15a et miR-16-1 (Calin et al., 2002). Ces deux microRNA régulent négativement l'expression du gène *BCL2* (*B-cell CLL/lymphoma 2*), fréquemment surexprimé dans les LLC. Lors du développement du cancer, l'expression des miR-15a et miR-16-1 est réprimée due à une délétion génique. Le gène *BCL2* est alors surexprimé ce qui induit une prolifération accrue des cellules B matures.

Les microRNA de la famille let-7 peuvent aussi agir comme suppresseur de tumeur. Dans de nombreux cancers, comme le cancer du sein ou du poumon, une diminution de l'expression de ces microRNA est observée (Balzeau et al., 2017).

### b. Oncogène

Le premier microRNA oncogène, miR-155, est mis en évidence dans la maladie de Hodgkin, dans les lymphomes B diffus à larges cellules, dans les LLC à cellules B et dans les cancers du poumon et du sein. Il est codé à partir du gène *BIC* et réprime l'expression de l'histone désacétylase 4 (HDAC4). HDAC4 est une protéine co-répresseur de l'expression de *BCL6* (*B-cell lymphoma 6*). Le miR-155, en réprimant HDAC4, permet l'expression de *BCL6* ce qui entraîne une augmentation de la prolifération et de la survie des cellules B (Sandhu et al., 2012).

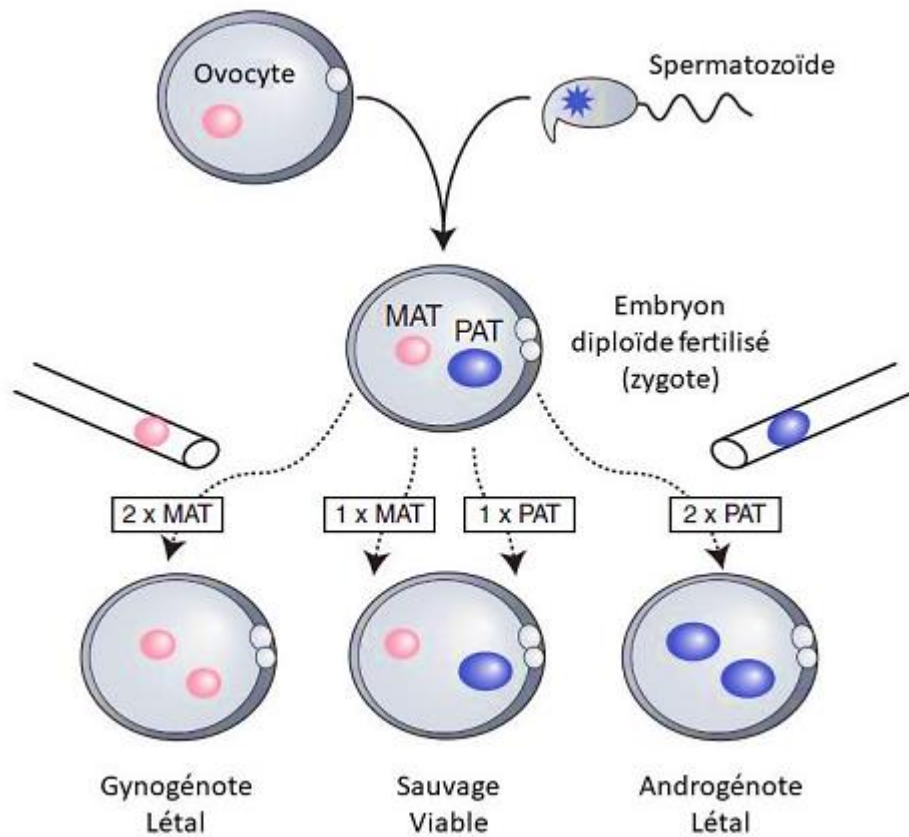
c. Oncogène ou suppresseur de tumeur ?

Si le rôle des microRNA précédents est bien établi dans les cancers, ce n'est pas le cas pour la majorité d'entre eux. En effet, le miR-146 peut jouer un rôle d'oncogène ou de suppresseur de tumeur selon le modèle d'étude. Dans les cancers du sein, de la prostate et de l'ovaire, l'expression du miR-146 est augmentée (Dahiya et al., 2008; Volinia et al., 2006; X. Wang et al., 2008). Dans le cancer du sein, il régule négativement l'expression de *BRCA1* (Garcia et al., 2011). Dans ce modèle, le miR-146 possède un rôle d'oncogène. Au contraire, dans les cellules hématopoïétiques, la diminution de l'expression du miR-146 est corrélée à l'augmentation de la survie, de la prolifération et de la cancérisation des cellules (Boldin et al., 2011). Le miR-146 régule négativement l'expression des activateurs de la voie NF- $\kappa$ B, impliquée dans la survie cellulaire. Dans ce modèle, le miR-146 possède alors un rôle de suppresseur de tumeur. D'autre part, l'expression du miR-146 est régulée positivement par la voie NF- $\kappa$ B. Le rôle oncogène ou suppresseur de tumeur du miR-146 est déterminé par une boucle de rétrocontrôle positive de la voie NF-  $\kappa$ B (Taganov et al., 2006).

Le second exemple de microRNA possédant un double rôle est le miR-29. Dans le modèle de leucémie aiguë myéloblastique et dans le cancer du poumon, le miR-29 induit l'apoptose des cellules après xénogreffe en souris immunodéficientes (Fabbri et al., 2007; Garzon et al., 2009). Le miR-29 semble posséder un rôle de suppresseur de tumeur dans ces modèles. A l'inverse, dans les LLC, le miR-29 réprime l'expression de la protéine d'adhésion cellulaire PXDN (*peroxidasin homolog*) et joue un rôle d'oncogène (Santanam et al., 2010).

**Les microRNA jouent un rôle essentiel dans le développement des différents processus cellulaires. Ils exercent, pour la majorité, une régulation négative en dégradant leur ARNm cible ou en inhibant leur traduction. Cependant, les microRNA peuvent exercer une régulation positive sur leur ARNm cible. Lors du développement tumoral, les microRNA peuvent jouer un rôle d'oncogène ou de suppresseur de tumeur. Il semble donc primordial d'étudier les niveaux d'expression et le rôle des microRNA dans les différents modèles de cancers pour permettre d'améliorer les techniques de diagnostic et de mettre en place de nouvelles stratégies thérapeutiques plus spécifiques.**





**Figure 12 : Expériences de co-injection des génomes maternel et paternel.** Injection dans un ovocyte fécondé dépourvu de pro-nucléus du génome maternel seul (gynogénote) ou en association avec le génome paternel. Le génome paternel est aussi injecté seul (androgénote) ou en association avec le génome maternel. Les zygotes gynogénote ou androgénote ne sont pas viables. Seul le zygote ayant reçu le génome maternel et le génome paternel sont viables. (Adapté de Barlow & Bartolomei, 2014).

## Le locus *H19/IGF2*

Avant d'aborder les caractéristiques du locus *H19/IGF2*, nous allons décrire l'empreinte génomique parentale. Dans un premier temps, la découverte de l'empreinte génomique sera évoquée. Puis, les mécanismes permettant la mise en place et le maintien de l'empreinte génomique seront décrits.

### I. L'empreinte génomique parentale

#### 1) Découverte de l'empreinte

Les mammifères sont des organismes diploïdes dont chaque paire de chromosome est composée d'un chromosome d'origine maternelle et d'un chromosome d'origine paternelle. La majorité des gènes présents sur ces chromosomes ont une expression bi-allélique. En 1970, la notion « d'empreinte chromosomique » fait son apparition chez les mammifères avec les découvertes du dosage d'expression génique lors de la régulation du chromosome X. Cette empreinte permet une expression similaire des gènes entre les individus mâles et les individus femelles (Cooper et al., 1971; Crouse et al., 1971).

En parallèle, des études de translocations géniques sont menées pour mettre en évidence les régions chromosomiques nécessaires au développement embryonnaire. En effet, les souris possédant certaines translocations ne sont pas viables (Searle & Beechey, 1978). Ces observations peuvent s'expliquer par le fait que ces gènes ne sont présents ou exprimés qu'à partir de leur chromosome d'origine. Dans les années 1980, d'autres études complètent ces observations. En effet, les chercheurs injectent, dans des ovocytes fécondés dépourvus de pro-nucléi, soit deux génomes maternels (gynogénote), soit deux génomes paternels (androgénote), soit un génome maternel et un génome paternel (condition normale) (Figure 12). Ni les zygotes gynogénotes, ni les zygotes androgénotes ne sont viables (McGrath & Solter, 1984a, 1984b; Surani et al., 1984). L'ensemble de ces observations démontrent que les génomes maternel et paternel expriment, de manière spécifique, des gènes non redondants nécessaires au bon développement de l'embryon.

Les bases de l'empreinte génomique parentale sont établies lors de la découverte du premier gène soumis à l'empreinte génomique : le gène *Igf2r* (*Insulin-like growth factor type 2 receptor*) (Barlow et al., 1991). En effet, ce gène est exprimé uniquement à partir de l'allèle maternel. Quelques mois après, deux autres gènes appartenant au même locus sont identifiés comme soumis à l'empreinte génomique. Il s'agit des gènes *Igf2* et *H19* (Bartolomei et al., 1991; DeChiara et al., 1991; Ferguson-Smith et al., 1991). *Igf2* est exprimé à partir de l'allèle paternel tandis qu'*H19* est exprimé à partir de l'allèle maternel.

L’empreinte génomique parentale est un mécanisme de régulation complexe, finement régulé et repose sur des modifications épigénétiques. Elle se définit comme « l’expression exclusive d’un seul des deux allèles d’un gène selon son origine parentale et qui résulte de modifications épigénétiques différentes sur chacun des allèles. De plus, les modifications épigénétiques sont des modifications chromosomiques réversibles et transmissibles qui s’ajoutent à la séquence nucléotidique apportant une information supplémentaire et se manifestant par une expression phénotypique ».

A l’heure actuelle, environ cent gènes sont soumis à l’empreinte génomique parentale. Ces gènes sont regroupés en clusters dont la taille varie de 100 à 4000 kpb. Un cluster contient 3 à 12 gènes, dont au minimum un gène produisant un ARN non codant. Le centre de régulation de l’empreinte nommé IC (*imprinting control*) ou IR (*imprinting region*) est une zone riche en îlots CpG, appelée DMR (*Differentially-methylated region*). Le locus contient d’autres DMR appelés DMR secondaires dont la méthylation se fera en fonction de l’état de méthylation du centre de régulation de l’empreinte.

## **2) Mise en place et maintien de l’empreinte**

La mise en place de l’empreinte génomique requiert la reconnaissance de l’allèle d’origine maternelle et de l’allèle d’origine paternelle dans l’embryon. Cette distinction s’effectue avant la fécondation puisque dans l’embryon, sans marque spécifique, il est impossible de différencier les deux allèles. L’empreinte génomique se met en place lors de la gamétogenèse.

L’empreinte génomique est spécifique du gamète d’origine (maternel ou paternel), transmissible aux cellules filles du zygote lors des différentes mitose et labile dans les gamètes de l’embryon. Cette dernière caractéristique est essentielle puisque l’individu mâle ou femelle doit produire uniquement un type de gamètes (mâle ou femelle).

Comme sa définition le dit, l’empreinte génomique résulte de modifications épigénétiques différentes sur chacun des allèles. En effet, l’allèle maternel est hyperméthylé tandis que l’allèle paternel est hypométhylé. Le niveau de méthylation est maintenu dans les cellules somatiques de l’embryon et de l’individu adulte. Au contraire, dans les cellules germinales, les marques épigénétiques sont effacées à un stade précoce. Les nouvelles marques spécifiques du sexe de l’individu considéré sont alors apposées sur les gamètes. L’empreinte génomique est transmise aux générations suivantes.

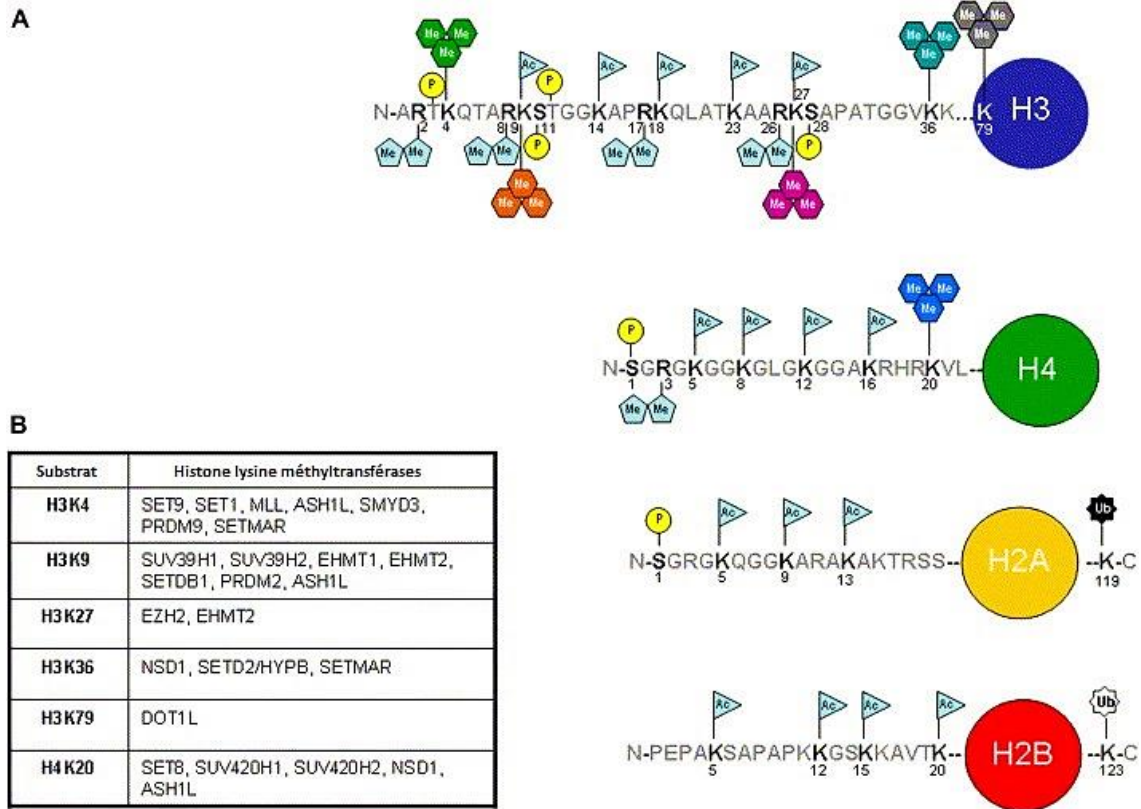
Les modifications épigénétiques responsables de l’empreinte génomique sont variées. Les modifications épigénétiques majoritaires sont la méthylation des cytosines et les modifications post-traductionnelles des histones.

*a. Méthylation des cytosines*

La méthylation des cytosines est la seule modification épigénétique qui se produit sur l’ADN. Elle a lieu au niveau des îlots CpG et est catalysée chez l’homme par l’enzyme DNMT1 (Bestor, 1988). Lors des divisions cellulaires, l’enzyme DNMT1 permet le maintien de la marque épigénétique. Cette enzyme est également nécessaire au développement normal. En effet, chez la souris, une délétion du gène *Dnmt1* est létale au stade embryonnaire (Leonhardt et al., 1992; E. Li et al., 1992; Y. Liu et al., 1998). D’autres méthyltransférases complémentaires sont impliquées dans la méthylation *de novo* de l’ADN comme DNMT3A et DNMT3B (Okano et al., 1998). Certaines méthyltransférases jouent le rôle de cofacteurs lors de la méthylation de l’ADN, c’est le cas de DNMT3L qui ne possède pas d’activité méthyltransférase. Elle contribue à la formation du complexe DNMT3A/DNMT3B et permet l’interaction de ce complexe avec la chromatine.

Si ces enzymes sont absentes, la méthylation des régions soumises à l’empreinte est modifiée. Les gènes possèdent une expression bi-allélique, synonyme de syndromes pathologiques du développement. Dans certains cas, l’absence de méthylation induit une perte d’expression génique suggérant que la méthylation de l’ADN réprime et active aussi l’expression des gènes.

Dans l’embryon précoce, la méthylation générale des allèles est enlevée sauf au niveau des IC/IR. Ces régions conservent leur état de méthylation pour maintenir l’empreinte génomique parentale. Les îlots CpG méthylés sont reconnus par un certain nombre de protéines, notamment les protéines MBD (*methyl-binding domain*) telle que MBD3. Ces protéines se fixent sur l’ADN méthylé, empêchant sa déméthylation dans l’embryon. L’empreinte génomique parentale est alors conservée au niveau des loci concernés.



**Figure 13 : Modifications post-traductionnelles des histones.** A. Les modifications post-traductionnelles des histones sont la méthylation (Me) sur les résidus arginine et lysine, l'acétylation (Ac) sur les résidus lysine, la phosphorylation (P) sur les résidus sérine et thréonine, l'ubiquitinylation (Ub) sur les résidus lysine. B. Enzymes responsables de la méthylation des résidus lysine des histones H3 ou H4. (Adapté de Völkel & Angrand, 2007).



*b. Modifications post-traductionnelles des histones*

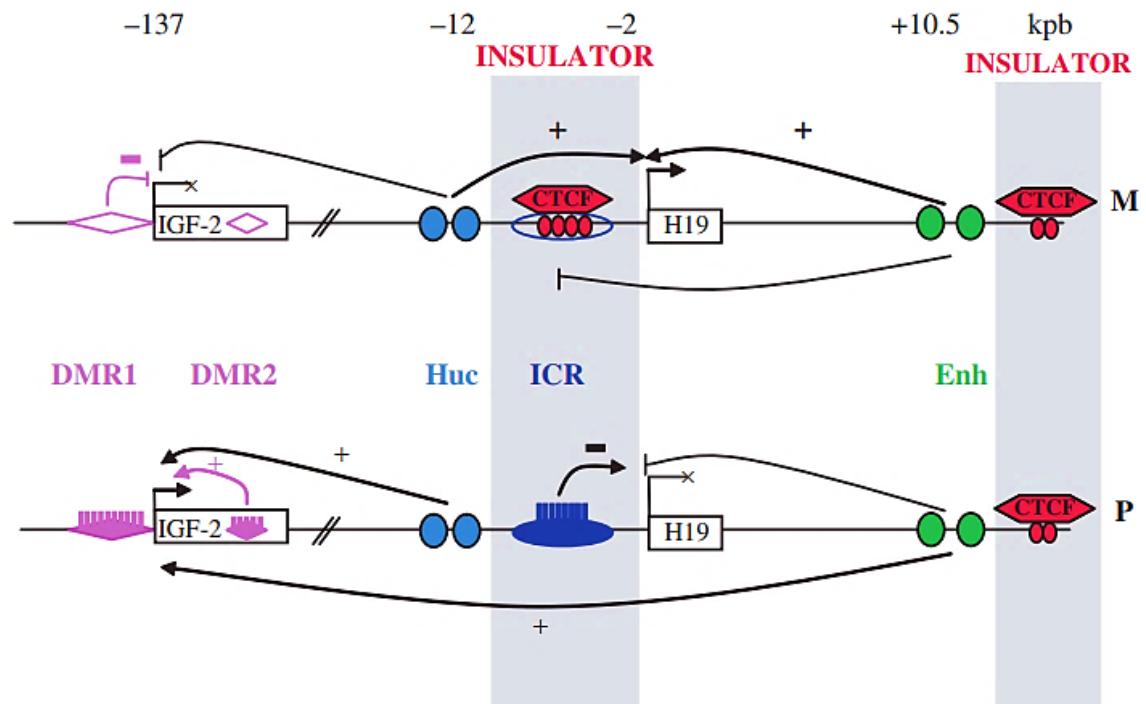
L'empreinte génomique parentale est établie par des modifications post-traductionnelles des histones qui sont la méthylation, la désacétylation, la phosphorylation, la sumoylation ou l'ubiquitinylation des histones (Figure 13A). Ces modifications épigénétiques conduisent à la modulation du niveau de compaction de la chromatine et donc à la régulation de l'expression des gènes.

La méthylation des histones se produit sur des résidus arginine (modification épigénétique activatrice de l'expression) ou sur des résidus lysine. Selon la lysine méthylée, la marque épigénétique peut être activatrice (H3K4, H3K36, H3K79) ou inhibitrice (H3K9, H3K27, H4K20) de l'expression des gènes. Ces marques épigénétiques sont permises par les protéines HMT (Figure 13B) (Völkel & Angrand, 2007).

Lors de l'empreinte génomique parentale, la marque épigénétique répressive H3K27me3 est catalysée par le complexe PRC2 et reconnue par les protéines du complexe PRC1. PRC1 permet l'ubiquitinylation de la lysine 119 sur l'histone H2A puisqu'il est composé d'une lysine 119 histone H2A E3 ubiquitine ligase. Cette modification épigénétique entraîne la compaction de la chromatine et donc la répression génique au niveau de cette zone (Völkel & Angrand, 2007).

La désacétylation des histones constitue une marque répressive de l'expression génique catalysée par les HDAC (Seto & Yoshida, 2014). L'action de ces enzymes est régulée par 3 complexes différents : Sin3, NuRD et CoREST qui peuvent être recrutés par des protéines à domaine MBD.

De nombreuses études mettent en évidence un lien direct entre la méthylation de l'ADN et les modifications post-traductionnelles des histones. En effet, DNMT1, DNMT3A, DNMT3B et DNMT3L sont capables de recruter les enzymes HDAC ou la protéine EZH2 (Fuks et al., 2000, 2001; Deplus et al., 2002; Fuks, 2003; Viré et al., 2006). De plus, la répression des gènes par les DNMT est levée lorsque les cellules sont traitées avec un inhibiteur spécifique des HDAC. Les enzymes impliquées dans les modifications épigénétiques sont conjointement régulées et participent au verrouillage de la chromatine et à la répression génique.



**Figure 14 : Locus *H19/IGF2*.** L'expression des gènes *H19* et *IGF2* est régulée par le centre de régulation de l'empreinte (ICR) et deux sets d'enhancers (Huc et Enh). En l'absence de méthylation de l'ICR, la protéine CTCF se fixe sur celui-ci et empêche l'action des enhancers sur le promoteur d'*IGF2* (allèle maternel). Le gène *H19* est exprimé qu'à partir de l'allèle maternel. Au contraire, sur l'allèle paternel, la méthylation de l'ICR réprime l'expression d'*H19* et empêche la fixation de la protéine CTCF. Les enhancers peuvent activer l'expression du gène *IGF2*. L'empreinte génomique parentale permet l'expression d'*H19* à partir de l'allèle maternel et l'expression d'*IGF2* à partir de l'allèle paternel. (Issu de Berteaux et al., 2010).

## II. L’empreinte génomique du locus *H19/IGF2*

### 1) Généralités de l’empreinte génomique du locus *H19/IGF2*

Le locus *H19/IGF2* est situé sur le chromosome 11 en position p15. Il est soumis à l’empreinte génomique parentale et possède son propre centre de régulation de l’empreinte. Ce locus s’étend sur environ 140 kpb et contient 2 gènes dont un ARN non codant : *IGF2* et *H19*. Tous les gènes soumis à l’empreinte génomique, dont les gènes *IGF2* et *H19*, sont fortement exprimés pendant le développement embryonnaire puis réprimés à la naissance dans la majorité des tissus. Le gène *H19* est transcrit en un ARN non codant de 2,3 kb possédant un rôle de suppresseur de tumeur pendant le développement embryonnaire (Brannan et al., 1990; Hao et al., 1993). Le gène *IGF2* (*Insulin-like growth factor 2*) code un facteur de croissance impliqué dans la croissance de l’embryon (DeChiara et al., 1990).

L’empreinte génomique est permise par un ICR (DMR primaire) localisé 2 kpb en amont du gène *H19* (Figure 14) (Tremblay et al., 1997). L’ICR contient 4 sites de fixation pour la protéine CTCF (*CCCTC-binding factor*) chez la souris et 7 sites chez l’Homme (Hark et al., 2000; Szabó et al., 2000; Takai et al., 2001). Cette protéine se fixe sur l’ICR quand il n’est pas méthylé. Son rôle est d’empêcher la méthylation *de novo* de cette région riche en îlots CpG. Elle joue également un rôle d’isolateur chromatinien pour permettre la mise en place et le maintien de l’empreinte génomique.

L’expression des gènes du locus *H19/IGF2* est permise par deux sets d’enhancers d’origine mésodermique et endodermique, localisés respectivement à 12 kpb en amont du gène *H19* et 10,5 kpb en aval du même gène (Figure 14) (Drewell, Arney, et al., 2002; Ishihara & Sasaki, 2002). L’action de ces enhancers est régulée par la méthylation de l’ICR et par la présence de CTCF. En effet, une région est méthylée sur l’allèle paternel en amont du gène *H19*, montrant que la méthylation de l’ICR régule l’expression des gènes du locus (Hark & Tilghman, 1998).

Sur l’allèle maternel, l’ICR n’est pas méthylée donc la protéine CTCF se fixe sur cette région empêchant l’action des enhancers sur le promoteur du gène *IGF2*. Seul le gène *H19* est exprimé (Hark et al., 2000). De plus, les DMR secondaires (DMR1 et DMR2) localisées dans le promoteur et le gène *IGF2* sur ce même allèle ne sont pas méthylées ce qui réprime aussi l’expression du gène *IGF2* (Figure 14) (Constância et al., 2000). Enfin, une acétylation des histones sur cet allèle au niveau du promoteur du gène *H19* permet également son expression (Grandjean et al., 2001).

Sur l’allèle paternel, la protéine CTCF n’interagit pas avec l’ICR méthylée. L’expression du gène *H19* est alors réprimée par hyperméthylation de son promoteur (Srivastava et al., 2000). Les enhancers favorisent ainsi l’expression du gène *IGF2*. De plus, la méthylation de l’ICR entraîne la

méthylation des DMR secondaires (DMR1 et DMR2) qui activent l'expression d'*IGF2* sur cet allèle (Murrell et al., 2001). En conclusion, *H19* est exprimé à partir de l'allèle maternel alors qu'*IGF2* est exprimé à partir de l'allèle paternel (Figure 14).

La majorité des gènes soumis à l'empreinte génomique parentale, comme *IGF2* et *H19*, sont fortement exprimés pendant le développement embryonnaire. Leur expression est localisée dans les tissus dérivés des trois feuilletts embryonnaires : endodermique, mésodermique et ectodermique (Hemberger et al., 1998; Poirier et al., 1991; Lustig et al., 1994). Au cours du développement embryonnaire, le profil d'expression spatio-temporel de ces gènes est identique, puisqu'ils sont régulés par des enhancers commun (Ohlsson et al., 1994). A la naissance, ces gènes sont réprimés sauf dans certains tissus où subsiste un niveau basal d'expression. En effet, l'expression du gène *H19* est retrouvée dans le muscle squelettique (Pachnis et al., 1984; Leibovitch et al., 1995; Milligan et al., 2000), dans les poumons, le cœur, le thymus (Poirier et al., 1991), la glande mammaire (Dugimont et al., 1995; Adriaenssens et al., 1998), les glandes surrénales (J. Liu et al., 1995) et l'utérus (Ariel et al., 1997). Encore à l'âge adulte, l'expression du gène *H19* est d'origine maternelle. Cependant, *IGF2* est exprimée de façon bi-allélique dans le foie, le plexus choroïde et les leptoméniges (Feil et al., 1994; Ohlsson et al., 1994). L'empreinte génomique parentale est régulée de manière spatio-temporelle. Ce mécanisme est dynamique et finement régulé.

L'organisation tridimensionnelle de la chromatine sur ce locus joue un rôle essentiel lors de l'empreinte génomique. Elle est identifiée par des expériences de 3C (*chromosome conformation capture*). Ces études montrent que la protéine CTCF est impliquée dans la mise en place de l'empreinte et la mise en conformation de la chromatine (Hagège et al., 2007; Murrell et al., 2004). En effet, la protéine CTCF peut interagir avec plusieurs régions présentes au niveau du locus *H19/IGF2* permettant la formation d'une boucle bloquant l'expression du gène *H19* ou *IGF2* selon l'allèle considéré.

De plus, l'empreinte génomique parentale du locus *H19/IGF2* fait intervenir des modifications épigénétiques en association avec la méthylation de l'ADN. En effet, la protéine CTCF est capable de recruter la protéine SUZ12 (une sous-unité du complexe PRC2) au promoteur d'*IGF2* (T. Li et al., 2008; H. Zhang et al., 2011). Le complexe PRC2 induit la triméthylation de la lysine 27 de l'histone H3 (H3K27me3) pour réprimer l'expression d'*IGF2* sur l'allèle maternel.

La méthylation de l'ICR sur l'allèle paternel est reconnue par une protéine à domaine MBD nommée MeCP2. Cette protéine possède un domaine de fixation sur les îlots CpG méthylé et un domaine de répression transcriptionnel. Elle est capable de recruter une HDAC et une HMT

(Drewell, Goddard, et al., 2002; Fuks et al., 2003). Ces deux enzymes entraînent la désacétylation puis la méthylation de la lysine 9 de l'histone H3 (H3K9me3) du promoteur de *H19* pour réprimer son expression.

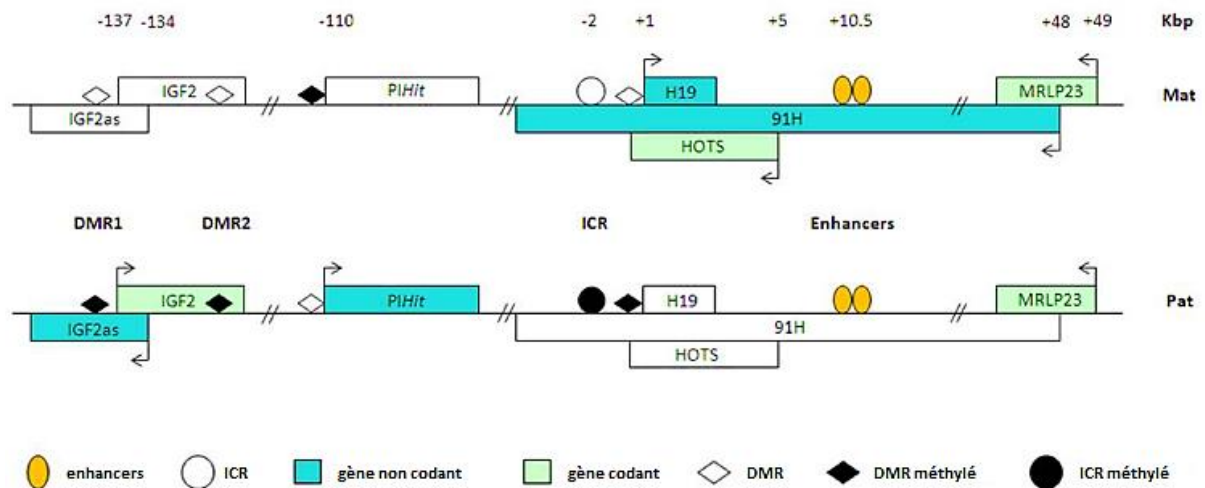
En conclusion, l'association de la méthylation du promoteur de *H19* par les DNMT et de la désacétylation/méthylation des histones par les HDAC et HMT résulte d'un verrouillage de la chromatine réprimant l'expression du gène *H19* à partir de l'allèle paternel.

## **2) Pathologies associées au locus *H19/IGF2***

Des modifications de l'empreinte génomique au niveau du locus 11p15 sont associées à deux syndromes développementaux : le syndrome de Silver-Russell et le syndrome de Beckwith-Wiedemann. Ces pathologies sont diagnostiquées pendant la grossesse ou à la naissance et sont à l'origine de malformations ou de défauts de croissance de l'embryon.

Le syndrome Silver-Russell est une maladie génétique rare. Il affecte une naissance sur 100 000 environ. Les signes cliniques majeurs sont : un retard de croissance du fœtus et du nouveau-né, une dysmorphie cranio-faciale particulière et une asymétrie des membres dans 50 à 60% des cas. Sur le plan génétique, ce syndrome est associé à une perte d'expression du gène *IGF2* au locus *H19/IGF2* et d'une expression bi-allélique du gène *H19*. Dans 7 à 10% des cas, une disomie parentale maternelle du chromosome 7 est responsable de ce syndrome (Chang & Bartolomei, 2020).

Le syndrome de Beckwith-Wiedemann est un syndrome de croissance excessive prédisposant au développement de tumeurs notamment rénales appelées Tumeurs de Wilms et aux rhabdomyosarcomes. Il affecte une naissance sur 12 000 environ. Les principaux symptômes sont : un gigantisme du nouveau-né à la naissance, une viscéromégalie et une macroglossie pouvant entraîner des troubles de nutrition, d'élocution et de sommeil. Du côté génétique, ce syndrome est caractérisé par une expression bi-allélique du gène *IGF2* et d'une perte d'expression du gène *H19*. Cette perte d'expression génique est étendue à tous les gènes du locus 11p15 exprimés à partir de l'allèle maternel. Cette région contient le locus *H19/IGF2* et le locus voisin *Kcnq1/Kcnq1ot1* (K. H. Wang et al., 2019).



**Figure 15 : Nouveaux transcrits identifiés au locus *H19/IGF2*.** Sur l'allèle maternel, deux nouveaux transcrits sont décrits : *91H*, un ARN non codant et *HOTS*, un gène codant. Sur l'allèle paternel, *IGF2as* et *PIHit*, deux ARN non codants, sont identifiés. Les transcrits non codants sont représentés en bleu lorsqu'ils sont exprimés. Les gènes codants sont représentés en vert lorsqu'ils sont exprimés. Les différences d'expression génique entre les allèles maternel et paternel sont représentées. Le statut de méthylation de l'ADN au niveau des éléments de régulation ICR et DMR est indiqué. (Adapté de Angrand et al., 2015).

### 3) Autres transcrits au locus *H19/IGF2*

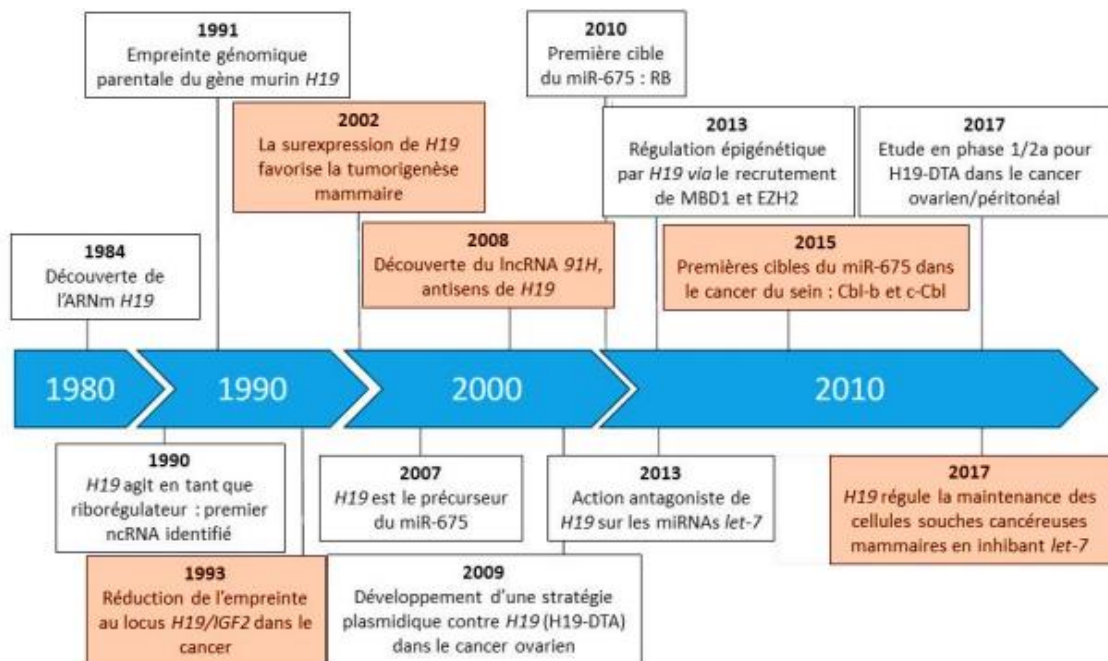
De nouveaux transcrits sont identifiés au locus *H19/IGF2*. Ils sont également soumis à l’empreinte génomique parentale (Figure 15). Ce sont, pour une grande majorité, des transcrits antisens aux gènes *H19* et *IGF2*.

L’un des premiers transcrits identifiés est *IGF2as* qui est en orientation antisens par rapport au gène *IGF2*. Il est exprimé uniquement à partir de l’allèle paternel tout comme *IGF2* (Okutsu et al., 2000). Cependant, aucune phase ouverte de lecture n’y est identifiée, il s’agirait donc d’un ARN non codant. Cet ARN n’est associé à aucune fonction spécifique mais il est souvent surexprimé dans les tumeurs de Wilms. En 2013, une étude met en évidence que l’ARN *IGF2as* est exporté dans le cytoplasme et est associé aux polysomes et pourrait donc coder une protéine (Duart-Garcia & Braunschweig, 2013).

Notre équipe a montré l’existence d’un transcrit antisens par rapport au gène *H19* et exprimé à partir de l’allèle maternel que nous avons appelé *91H* (Berteaux et al., 2008). Ce transcrit est un long ARN non codant de 120 kb chez l’homme. Il est produit à partir d’un promoteur contenu dans l’intron 1 du gène *MRLP23*. Ce lncRNA a aussi été retrouvé chez la souris. Nous avons mis en évidence que le lncRNA *91H* est surexprimé dans les cancers du sein et possède un rôle oncogène (Vennin et al., 2017).

En 2011, une équipe montre la présence, chez l’Homme uniquement, d’un transcrit maternel antisens au gène *H19* et compris dans l’ARN non codant *91H*, appelé *HOTS* (*H19 opposite tumor suppressor*). Ce transcrit code la protéine du même nom. Cette protéine empêche la formation de tumeur de Wilms, des rhabdomyosarcomes et des choriosarcomes. Au contraire, l’inactivation de ce gène augmente la croissance tumorale *in vivo* (Onyango & Feinberg, 2011).

Enfin, le dernier transcrit identifié au locus *H19/IGF2* est *PIHit* (*paternally-expressed IGF2/H19 intergenic transcript*). Il est transcrit à partir de l’allèle paternel et localisé 110 kb en amont du gène *H19*. Ce gène code un ARN non codant de 5-6 kb (Court et al., 2011).



**Figure 16 : Découvertes majeures du gène *H19* et son implication dans le cancer du sein.** Les informations concernant l'implication d'*H19* dans le cancer du sein sont colorées en orange. (Adapté de Collette et al., 2017).



**Figure 17 : Structure secondaire du lncRNA *H19*.** La structure secondaire prédictive du lncRNA *H19* est modélisée grâce au site <http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAfold.cgi>.



### III. Gène *H19*

#### 1) Historique

Le gène *H19* est identifié en 1984 chez la souris lors d'un criblage d'une banque de données de foie fœtal (Pachnis et al., 1984, 1988). Les auteurs cherchent à identifier les gènes dont l'expression est contrôlée par les gènes *Rif* et *Raf* qui régulent l'expression de l' $\alpha$ -fœtoprotéine après la naissance. Ils identifient le clone 19 de la ligne H comme régulé par *Raf* et l'appellent *H19*. Les découvertes majeures du gène *H19* sont détaillées dans la [Figure 16](#).

*H19* est le premier long ARN non codant décrit. En effet Brannan *et al.* démontrent qu'aucune protéine n'est associée à ce gène et proposent qu'il pourrait avoir une action cellulaire *via* son ARN (Brannan et al., 1990).

En 1991, le gène *H19* est mis en évidence comme soumis à l'empreinte génomique parentale chez la souris (Bartolomei et al., 1991). Un an plus tard, Zhang et Tycko démontrent qu'*H19* est aussi soumis à l'empreinte génomique parentale chez l'Homme (Y. Zhang & Tycko, 1992). Il est situé dans un locus soumis à l'empreinte génomique, en effet, seul l'allèle maternel est exprimé. Le gène *H19* est constitué de 5 exons séparés par des introns très courts et code un ARN mature de 2,3 kb transcrit par l'ARN polymérase II, polyadénylé en 3' et coiffé en 5'. Il est ensuite exporté dans le cytosol. L'ARN *H19* possède toutes les caractéristiques d'un ARNm classique cependant il est admis qu'*H19* est un ARN riborégulateur.

En effet, plusieurs codons d'initiation de la traduction sont identifiés dans l'exon 1 de l'ARN *H19* mais sont rapidement suivis par des codons stop. Les potentielles phases ouvertes de lecture (*ORF, open reading frame*) générées sont très courtes (Brannan et al., 1990). Ces phases ouvertes de lectures ne sont pas conservées entre les espèces alors que la structure secondaire de l'ARN l'est (Juan et al., 2000). En effet, 16 structures types épingle à cheveux sont conservées entre les mammifères ([Figure 17](#)).

De plus, la phase ouverte de lecture la plus grande permettrait la synthèse théorique d'une protéine de 26 kDa. Cette protéine pourrait être obtenue après délétion et/ou mutation ponctuelle de l'UTR 5' d'*H19* (Joubel et al., 1996). L'UTR 5' réprime donc la traduction de l'ORF.

L'expression du gène *H19* est également impliquée dans la régulation de la croissance embryonnaire. En effet, des expériences de knockdown sur des souris révèlent que la perte de l'expression d'*H19* augmente la taille et le poids des souris d'environ 10% par rapport aux souris contrôles (Leighton et al., 1995; Ripoche et al., 1997). Il est pourtant difficile de conclure sur un effet spécifique de *H19* sur la croissance et le développement embryonnaire puisque l'expression

de *IGF2* est devenue bi-allélique. Une autre étude met en évidence que la délétion d'inhibiteurs d'expression (*silencers*) spécifiques du gène *H19* permet son expression bi-allélique et la formation d'individus plus petits tandis que l'expression de *IGF2* n'est pas modifiée (Drewell et al., 2000). En condition normale, l'ARN *H19* réduit la croissance de l'embryon.

## 2) Gène *H19* dans l'empreinte génomique

Le gène *H19* est soumis à l'empreinte génomique parentale. Son expression est uniquement d'origine maternelle et il est co-régulé avec le gène *IGF2*, exprimé à partir de l'allèle paternel.

Plusieurs études montrent que l'expression du gène *H19* peut agir sur son propre locus en modulant l'expression de *IGF2* en *trans* (Wilkin et al., 2000; Lottin et al., 2002). Ces deux gènes sont régulés par les mêmes enhanceurs et sont en compétition pour ces derniers. De plus, la forte expression du gène *H19* est associée à la diminution de l'expression du gène *IGF2*. Cependant, le mécanisme responsable de ce phénomène n'est pas encore précisément décrit. Dans les cellules de choriocarcinomes, l'ARN *H19* s'associe aux polysomes pour réprimer la traduction de l'ARNm *IGF2* (Y. M. Li et al., 1998). Ces résultats démontrent que *H19* régule en *trans* la transcription et la traduction du gène *IGF2*.

Enfin, *H19* est capable de réguler l'expression de plusieurs gènes soumis à l'empreinte génomique parentale (Monnier et al., 2013). En effet, *H19* interagit avec la protéine MBD1, contenant un domaine MBD. Cette protéine se fixe sur les îlots CpG méthylés et recrutent des HMT, notamment Suv39. L'association entre *H19* et MBD1 est nécessaire au maintien de l'empreinte génomique parentale en maintenant la marque répressive H3K9me3 sur différents gènes cibles dont *IGF2*. Ce travail met en évidence le mode d'action employé par *H19* pour réguler l'expression du gène *IGF2*.

## 3) Régulation de l'expression du gène *H19*

En plus de l'empreinte génomique parentale, l'expression du gène *H19* est régulée par des hormones, des facteurs de croissance et des protéines.

Notre équipe a mis en évidence un niveau basal d'expression du gène *H19* chez l'adulte dans la glande mammaire (Dugimont et al., 1995; Adriaenssens et al., 1998). Cependant, cette expression basale est localisée dans certaines structures de la glande mammaire et n'est pas constante au cours de son évolution (Adriaenssens et al., 1999). Par des expériences d'hybridation *in situ*, nous avons montré que l'expression de *H19* est ubiquitaire dans la glande mammaire lors du développement embryonnaire. A la naissance, *H19* est réprimé dans la majorité des cellules. Lors de la puberté, une forte expression de *H19* est retrouvée dans les nouveaux bourgeons

terminaux. Au cours de la grossesse, *H19* est exprimé dans les cellules épithéliales des acini. Pendant la lactation, l'expression de *H19* n'est pas détectée mais son expression est ré-exprimé dans certaines cellules épithéliales pendant l'involution. Ces variations d'expression sont également retrouvées dans l'utérus. En effet, *H19* est fortement exprimé pendant les phases d'œstrus et de metœstrus puis réprimé pendant la phase de latence. Le gène *H19* semble être principalement exprimé dans les cellules épithéliales en prolifération. De plus, nous avons démontré que *H19* est régulé positivement par le **17-β-œstradiol** et régulé négativement par la **progestérone**. L'expression de *H19* est corrélée aux variations hormonales de la glande mammaire.

Dans la prostate, l'expression de *H19* est régulée positivement par la **prolactine** (hormone peptidique impliquée dans le développement normal de la prostate et dans la fonction testiculaire) et négativement par la **dihydrotestostérone** (DHT, forme active de la testostérone) (Berteaux et al., 2004).

Plusieurs facteurs de croissance dans les cellules cancéreuses mammaires régulent positivement l'expression de *H19* tels que les facteurs de croissance **HGF/SF**, **EGF** et **FGF-2** (Adriaenssens et al., 2002). En présence du HGF/SF, les cellules ont des capacités de prolifération et de migration augmentées et elles surexpriment *H19*. Cependant, il n'existe pas de boucle de rétrocontrôle de l'expression de *H19* et IGF-2 dans les cellules mammaires puisque le TNF-α, le TGF-β1, ou IGF-2 ne sont pas capables de réguler l'expression de *H19*. Dans les glandes surrénales et les testicules, l'expression de *H19* est contrôlée par plusieurs facteurs. Elle est activée par IGF-1, IGF-2 et l'acide rétinoïque et réprimée par le TGFβ, le TNF-α et l'INFγ (Voutilainen et al., 1994; Kopf et al., 1998). Ces travaux montrent que selon le modèle considéré, les effets des hormones sur l'expression de *H19* peuvent varier.

L'expression de *H19* peut également être régulée par des protéines ou des facteurs de transcription. En effet, le promoteur de *H19* possède des éléments de réponse à la protéine **p53** (Dugimont et al., 1998). L'activité de la protéine p53 réprime l'expression de *H19*. En revanche, le facteur de transcription **E2F1** régule positivement *H19* (Berteaux et al., 2005). Dans le cancer du sein et du poumon, le facteur de transcription **c-Myc** régule l'expression de *H19* en agissant en hétérodimère avec la protéine Max (Baryste-Lovejoy et al., 2006; E. Zhang et al., 2016). Ce facteur de transcription interagit avec des séquences spécifiques appelées E-boxes situées à proximité de l'ICR du locus *H19/IGF2*. Le recrutement des histones acétylases et l'activation de la transcription du locus par c-myc entraîne la production d'ARN *H19*. Ces résultats suggèrent que *H19* participe aux effets oncogènes de la protéine c-Myc. Dans les cancers de la vessie, l'expression de *H19* est

régulée positivement par la protéine oncogène YAP (*yes associated protein*) favorisant la prolifération et la migration des cellules (S. Li et al., 2015).

De plus, l'expression du gène *H19* est corrélée à la surexpression du gène *Afp* codant l' $\alpha$ -fœtoprotéine dans le foie fœtal (Pachnis et al., 1984). En 2005, les auteurs cartographient le locus contenant le gène *Afp* et identifient le gène *Zhx*, orthologue du gène *Zhx2* chez l'Homme (Perincheri et al., 2005). Ce gène *Zhx* régule négativement *H19*. En effet, après la naissance, chez des souris déficientes pour le gène *Zhx*, une forte expression de *H19* est observée. L'expression du gène *Zhx* est plus importante dans le foie adulte que le foie fœtal. L'expression de ce gène pourrait donc être responsable de la répression de *H19* observée à la naissance.

En plus des facteurs de croissance, des protéines et des facteurs de transcription, le **microenvironnement tumoral** est capable d'influer sur l'expression de certains gènes. Dans la glande mammaire, nous avons montré que *H19* est principalement exprimé au niveau des interactions entre l'épithélium et le mésenchyme (Adriaenssens et al., 1999). Dans les cancers du sein, l'expression de *H19* est retrouvée principalement au niveau des interactions entre l'épithélium et le stroma tumoral (Dugimont et al., 1995; Adriaenssens et al., 1998). Les cellules épithéliales mammaires traitées avec un milieu conditionné de fibroblastes humains normaux présente une augmentation de l'expression du gène *H19* (Adriaenssens et al., 2002). Ces cellules possèdent des capacités de motilité et de morphogenèse accrues, des propriétés connues pour ce milieu conditionné.

En fonction de la distance des vaisseaux sanguins, les tumeurs sont composées de zones plus ou moins hypoxiques. Les zones hypoxiques sont connues pour être responsables de la résistance aux chimiothérapies, car elles sont les plus éloignées de la circulation sanguine et ne reçoivent pas ou peu de drogues. Les cellules tumorales en condition hypoxique mettent en place deux voies de signalisation : la voie HIF-1 $\alpha$  et la voie p53. La voie HIF-1 $\alpha$  permet l'adaptation des cellules à leur nouvel environnement alors que la voie p53 permet l'induction de la mort cellulaire. Le facteur HIF-1 $\alpha$  régule l'expression du gène *H19* lorsque la protéine p53 est mutée (Matouk et al., 2010). Ces données sont en accord avec les résultats obtenus par l'équipe puisque nous avons montré que p53 réprime l'expression de *H19* (Dugimont et al., 1998). En condition hypoxique, *H19* favorise la survie et l'adaptation des cellules tumorales pour leur conférer un avantage sélectif de croissance.

La régulation de l'expression de *H19* n'est pas seulement transcriptionnelle, elle peut être aussi post-transcriptionnelle. En effet, une étude montre l'accumulation d'ARN *H19* dans les cellules musculaires de souris due à sa stabilisation par une protéine inconnue (Milligan et al., 2000). Cette

régulation a déjà été décrite dans le foie fœtal (Jouvenot et al., 1999). Dans des tumeurs mammaires de souris, des études montrent que l'association entre l'ARN *H19* et la protéine CRD-BP (*cMyc mRNA coding region instability determinant binding protein*) entraîne une stabilisation de l'ARN et sa relocalisation (Tessier et al., 2004). Chez l'Homme, la protéine IMP1 (*IGF-2 mRNA binding protein 1*) est un orthologue de la protéine CRD-BP. Elle possède 4 sites de fixation au niveau des exons 4-5 de l'ARN *H19*. Cette protéine est localisée dans les lamellipodes et les régions périnucléaires des fibroblastes (Runge et al., 2000; Nielsen et al., 2001). Des expériences *in vivo* démontrent que la protéine IMP3 se fixe sur l'ARN *H19*. Cependant, son invalidation par un siRNA n'affecte pas l'expression de *H19* (B. Liao et al., 2005).

#### **4) *H19* dans les cancers**

De nombreuses études décrivent le rôle oncogénique du lncRNA *H19* et du miR-675. Pourtant, certaines équipes montrent également un rôle suppresseur de tumeur pour *H19*. En effet, l'absence d'expression du gène *H19* est associée au développement du syndrome de Beckwith-Wiedemann (Reik et al., 1995). De plus, la perte de l'empreinte génomique conduit à l'expression bi-allélique du gène *IGF2* puis à l'apparition de tumeurs de Wilms (tumeurs rénales) chez l'enfant (Rainier et al., 1993).

En 2008, une étude est réalisée sur deux types de modèles murins transgéniques pour le locus *H19/IGF2* pour identifier le rôle de *H19* dans les cancers : *H19 $\Delta$ 3* (délétion du gène *H19* sur l'allèle maternel) et *H19 $\Delta$ Enh* (délétion des enhanceurs en aval du gène *H19* sur l'allèle maternel) (Yoshimizu et al., 2008). Ces souris sont croisées avec des souris transgéniques formant des tumeurs spontanées chez l'embryon (tératome), et chez l'adulte (colon, foie). Les auteurs mettent en évidence que l'absence d'expression du gène *H19* favorise l'apparition des tumeurs et l'obtention de tumeurs plus grosses pour les trois types de tumeurs étudiées. Au stade embryonnaire ou 4 mois après la naissance, ces tumeurs sont obtenues et une légère surexpression du gène *IGF2* est identifiée. Les auteurs réalisent des expériences similaires sur des souris *IGF2*<sup>-/-</sup> et obtiennent les mêmes résultats. Ces données confirment que l'effet observé sur la tumorigenèse est lié à la perte d'expression du gène *H19*. *H19* posséderait un rôle suppresseur de tumeur lors du développement embryonnaire et après la naissance.

Dans le modèle de leucémie aigüe pro myélocytaire, *H19* inhibe l'activité de la télomérase en empêchant l'interaction TERT et *TERC* (El Hajj et al., 2018). Alors que, dans le cancer du foie, *H19* favorise l'activité de la télomérase par un autre mécanisme (Pu et al., 2015). Ces exemples illustrent la complexité d'attribuer un rôle oncogénique ou suppresseur de tumeur à *H19*. Pourtant, la majorité des études montrent les fonctions pro-tumorigéniques de *H19*.

*H19* est exprimé pendant le développement embryonnaire et réprimé à la naissance, excepté dans certains tissus comme la glande mammaire et l'utérus (Dugimont et al., 1995; Adriaenssens et al., 1998; Ariel et al., 1997; Lottin et al., 2005). *H19* est impliqué dans différents cancers (Raveh et al., 2015), notamment dans les cancers de l'ovaire (Z. Zhu et al., 2015), de la vessie (C. Liu et al., 2016), du poumon (Kondo et al., 1995), du foie (Ariel et al., 1998) et de l'œsophage (Hibi et al., 1996). Des études de méta-analyse basées sur le niveau d'expression de *H19* dans différents cancers révèlent une corrélation entre une forte expression de *H19* et un mauvais pronostic (F. Liu, Pan, et al., 2016; Yu et al., 2020). Ainsi, le lncRNA *H19* pourrait être un nouveau marqueur moléculaire prédictif dans les tumeurs solides.

Dans le cancer du sein, notre équipe a mis en évidence que *H19* est surexprimé dans 70% des cas (Dugimont et al., 1995; Adriaenssens et al., 1998) et accroît les propriétés tumorigènes des cellules cancéreuses mammaires (Lottin et al., 2002). De plus, nous avons montré que l'expression de *H19* est régulée positivement par le facteur E2F1 ce qui favorise la transition G1/S du cycle cellulaire (Berteaux et al., 2005). Par ailleurs, de plus en plus d'études montrent que *H19* pourrait être un nouveau biomarqueur sanguin. En effet, l'expression de *H19* est significativement augmentée dans les biopsies du cancer du sein et dans le plasma des patientes par rapport aux témoins sains (K. Zhang et al., 2016), mais aussi dans le cancer gastrique (X. Zhou, Yin, et al., 2015; Yörüker et al., 2018), et pulmonaire (J. Luo et al., 2018).

## **5) Modes d'action du lncRNA *H19***

De nombreux modes d'action pro-tumorigènes sont associés au lncRNA *H19* (Figure 18). En effet, l'ensemble de ces mécanismes, ainsi que les cibles du miR-675 dont il est le précurseur, favorisent la progression tumorale. *H19* est impliqué dans l'augmentation de la prolifération, de la migration, de l'invasion et de la résistance des cellules cancéreuses et régule les cellules souches cancéreuses (Annexe 1). *H19* exerce ses modes d'action dans le noyau et dans le cytoplasme des cellules. Il peut former des duplex d'ARN avec les ARN antisens transcrits à partir du locus *H19/IGF2* comme *91H* ou *HOTS* (Figure 18.5). L'ARN antisens *91H* est surexprimé dans les cancers du sein. Notre équipe a montré que *91H* augmente la croissance cellulaire (Vennin et al., 2017). *H19* intervient également dans la régulation de l'expression génique, comme précurseur du miR-675, comme éponge à miRNA ou comme interactant protéique.

### ***a. Précurseur du miR-675***

En 2007, Cai et Cullen démontrent qu'*H19* est un précurseur de microRNA, le miR-675 (X. Cai & Cullen, 2007). *H19* génère deux microRNA matures à partir d'une structure en tige-boucle dans l'exon 1, le miR-675-3p et le miR-675-5p qui possèdent chacun leurs gènes cibles (Figure 18.3). La

synthèse de ces microRNA utilise la voie canonique, elle dépend donc de Drosha et de Dicer ([Chapitre 2, Partie II, Paragraphe 3a](#)). La première cible du miR-675 est identifiée en 2010 au cours d'une étude sur le cancer du côlon. En effet, le miR-675-5p se fixe sur l'UTR 3' de l'ARNm de *Rb* et régule négativement son expression (Tsang et al., 2010).

De plus en plus de cibles du miR-675 sont identifiées dans le modèle de développement normal et dans le modèle cancéreux. Dans les cellules du placenta, le miR-675-3p réprime l'expression d'*IGF1R* en induisant la dégradation de son ARNm. L'analyse révèle que la synthèse du miR-675 n'est pas constante pendant le développement de l'embryon tandis que l'expression de *H19* l'est. L'expression du miR-675-3p n'est détectée qu'à partir du 11<sup>ème</sup> jour de développement embryonnaire et ce uniquement dans les cellules du placenta sans variation du niveau d'expression de *H19*. L'expression du miR-675 est régulée négativement par la protéine HuR qui se fixe sur l'ARN *H19* en amont du pri-miR-675. Le site de clivage est alors masqué par cette protéine empêchant l'action de Drosha. Au 11<sup>ème</sup> jour de développement embryonnaire, l'expression de la protéine HuR diminue, le miR-675 est synthétisé et pourra interagir avec ses ARNm cibles. Cette régulation entraîne une diminution de la croissance du placenta pour permettre la préparation à l'accouchement.

Dans les cancers, le miR-675 possède de nombreuses cibles impliquées dans des processus cellulaires permettant la tumorigenèse tels que la prolifération, la migration, l'invasion cellulaire, la régulation de l'EMT et l'apoptose ([Tableau 5](#)). Dans le cancer du sein, nous avons montré que le miR-675-5p cible deux ubiquitines ligase E3, Cbl-b et c-Cbl. La surexpression du miR-675-5p induit une régulation négative des protéines c-Cbl et Cbl-b induisant une augmentation de la stabilité de l'activité de l'EGFR (*Epidermal growth factor receptor*) et de c-Met (récepteur de l'hépatocyte growth factor). L'activation des voies de signalisation Akt (protéine kinase B) et ERK (*extracellular signal-regulated kinases*) entraîne une augmentation de la prolifération et de la migration dans le cancer du sein (Vennin et al., 2015).

<b>Cancers</b>	<b>Cibles du miR-675</b>	<b>Fonction cellulaire</b>	<b>Références</b>
<b>Sein</b>	Cbl-b, c-Cbl	Ubiquitine ligase E3	(Vennin et al., 2015; J. Wang et al., 2017)
<b>Colorectal</b>	. RB . DDB2	. Suppresseur de tumeur . Répresseur transcriptionnel	(Tsang et al., 2010) (Costa et al., 2017)
<b>Œsophage</b>	REPS2	Répresseur de la prolifération et de la migration cellulaire	(Y.-W. Zhou et al., 2016)
<b>Estomac</b>	. CALN1 . RUNX1 . FADD	. Protéine de liaison au calcium . Facteur de transcription . Adaptateur apoptotique qui recrute la caspase 8 ou 10	(H. Li et al., 2014) (G. Liu et al., 2016) (Yan et al., 2017)
<b>Gliome</b>	Cadhérine 13	Cadhérine atypique sans domaine cytoplasmique	(Y. Shi et al., 2014)
<b>Poumon</b>	GPR55	Récepteur couplé aux protéines G	(D. He et al., 2015)
<b>Foie</b>	. HP1 . RB . TWIST1	. Assembleur et régulateur de l'hétérochromatine . Suppresseur de tumeur . Facteur de transcription impliqué dans l'EMT	(H. Li et al., 2015) (Hernandez et al., 2013) (Hernandez et al., 2013)
<b>Ovaire</b>	Slug	Facteur de transcription impliqué dans l'EMT	(Matouk et al., 2014)
<b>Prostate</b>	TGF-β1	Facteur de croissance	(M. Zhu et al., 2014)
<b>Ostéosarcome</b>	CALN1	Protéine de liaison au calcium	(Gong et al., 2018)

**Tableau 5 : Cibles connues du miR-675 dans les cancers.** (Adapté de Collette et al., 2017; Lecerf et al., 2019).



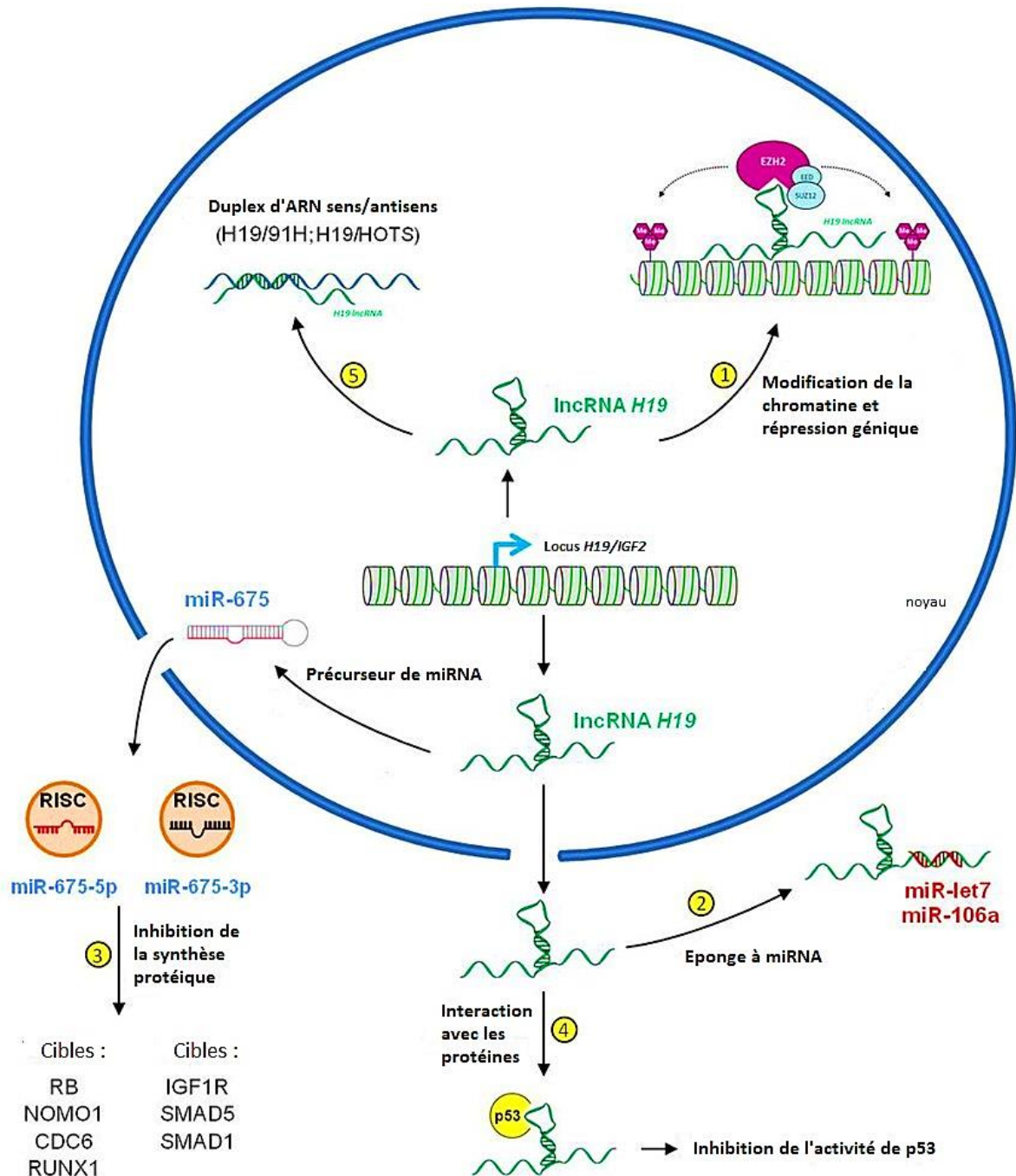
*b. Eponge à microRNA*

Le lncRNA *H19* a une double interaction avec les microRNA : il est le précurseur du miR-675 comme nous venons de le voir, mais il a également une action négative sur les microRNA. En effet, il peut servir d'éponge à miRNA en les séquestrant et inhibant leur action (Figure 18.2). Par exemple, *H19* séquestre les miRNA *let-7* impliqués dans la régulation de la différenciation des cellules musculaires. La famille de miRNA *let-7* possède 4 sites potentiels de fixation sur l'ARN *H19* (Kallen et al., 2013). En absence de l'expression de *H19*, les auteurs observent une augmentation de la différenciation des cellules musculaires. Ainsi, ils démontrent que *H19* régule la quantité de miRNA *let-7* mais aussi son activité dans un tissu pour permettre l'expression de ses gènes cibles en séquestrant les miRNA *let-7*.

La fonction d'éponge à microRNA est aussi décrite dans les cancers. Dans le cancer de l'ovaire et des myoblastes, *H19* peut interagir avec le miR-106a. En effet, l'exon 1 de *H19* possède des éléments de réponse au miR-106a. L'interaction entre *H19* et le miR-106a augmente l'expression des gènes cibles du miR-106a favorisant la prolifération cellulaire (Imig et al., 2015). De plus, *H19* augmente l'expression de l'ADN méthyltransférase DNMT1 en séquestrant le miR-152, entraînant la croissance et l'invasion cellulaire de cellules de cancer du sein (Z. Li et al., 2017). *H19* séquestre le miRNA *let-7* maintenant les cellules souches cancéreuses mammaires (Peng et al., 2017). Enfin, *H19* favorise l'expression des protéines ZEB1 et ZEB2 (*zinc finger E-box-binding homeobox 1/2*) en interagissant avec le miR-138 et le miR-200a dans le cancer colorectal et le miR-141 dans le cancer gastrique. Ces protéines sont des facteurs de transcription qui participent à la transition épithélio-mésenchymateuse en activant l'expression de marqueurs mésenchymateux (W.-C. Liang et al., 2015; X. Zhou, Ye, et al., 2015). *H19* favorise donc la migration, l'invasion des cellules cancéreuses et est impliqué dans la dissémination métastatique.

*c. Interactant protéique*

*H19* est capable d'interagir avec des protéines pour orienter leur fonction comme des complexes de remodelage de la chromatine tel que le complexe PRC2 (*polycomb repressive complex 2*) (Figure 18.1) ou des facteurs de transcription (p53) (Figure 18.4). En effet, *H19* se lie et recrute l'histone méthyltransférase EZH2 au niveau du promoteur de BIK (*BCL-2 interacting killer*) dans le cancer du sein, entraînant un remodelage de la chromatine par triméthylation de la lysine 27 de l'histone H3 et une inhibition de la transcription du gène pro-apoptotique BIK. Cette inhibition rend les cellules résistantes à la chimiothérapie (Si et al., 2016).



**Figure 18 : Modes d'action du lncRNA H19.** (1) H19 peut agir au niveau de l'organisation de la chromatine en recrutant le complexe de remodelage de la chromatine PRC2. (2) Il peut servir d'éponge à miRNA en les séquestrant et en inhibant leur action. (3) Il est le précurseur du miR-675 qui régulera post-transcriptionnellement ses gènes cibles. (4) Il peut également interagir avec p53 qui sera séquestré dans le cytoplasme et ne pourra plus être transloqué dans le noyau cellulaire. (5) Enfin, il peut former un duplex avec les transcrits antisens 91H et HOTS. (Adapté de Angrand et al., 2015).

Dans le cancer de la vessie, *H19* recrute le complexe PRC2 en interagissant avec EZH2 au niveau du promoteur du gène codant la E-cadhérine, entraînant le remodelage de la chromatine par triméthylation de la lysine 9 de l'histone H3, entraînant la répression de la E-cadhérine. Cette protéine joue un rôle dans l'attachement des cellules à la matrice extracellulaire. Lorsqu'elle est absente, les cellules sont capables de réaliser la transition épithélio-mésenchymateuse. Cette transformation est nécessaire à la dissémination des cellules cancéreuses dans l'organisme (M. Luo et al., 2013).

De plus, *H19* est capable d'interagir avec d'autres protéines comme p53 (Figure 18.4). L'association entre *H19* et p53 est corrélée à l'augmentation de la prolifération cellulaire dans le cancer gastrique. Les auteurs supposent que la fixation de *H19* sur la protéine p53 réprime l'activité de p53. En effet, p53 est une protéine suppresseur de tumeur activée lors de dommages à l'ADN. Si les dommages sont réparables, p53 induira un arrêt du cycle. En revanche, si les dommages sont trop importants, p53 induira l'apoptose. Ainsi, lorsque *H19* empêche la fonction de p53, il favorise l'instabilité génomique des cellules cancéreuses et par conséquent la progression tumorale.

**Tous les modes d'action de *H19* décrits tendent à favoriser la tumorigenèse et la progression tumorale. Il est donc essentiel de décrypter le rôle et les acteurs moléculaires associés au lncRNA *H19* et au miR-675, dont il est le précurseur, lors de l'émergence des métastases du cancer du sein dans le but de proposer de nouvelles opportunités thérapeutiques.**



## *OBJECTIFS DE LA THESE*



A l'heure actuelle, le cancer du sein est un problème majeur de santé publique en France et dans le monde. Malgré les progrès réalisés en termes de dépistages et de traitements, le cancer du sein reste la première cause de mortalité par cancer chez la femme. Bien que cette mortalité chez la femme soit stable depuis 15 ans en France, le nombre de nouveaux cas ne cesse d'augmenter chaque année. La mortalité découle de la survenue de métastases. Ces données montrent l'importance d'étudier les mécanismes impliqués dans la tumorigenèse et la progression tumorale du cancer du sein. En effet, les lncRNA sont impliqués dans de nombreuses fonctions physiologiques et dans de nombreux cas, les altérations des lncRNA sont associées à des pathologies humaines. Dans le cancer du sein, le rôle oncogénique de *H19* est bien établi même si les mécanismes moléculaires précis impliqués dans la tumorigenèse ne sont pas encore totalement compris. De plus, très peu de données existent sur le rôle de *H19* et de son précurseur, le miR-675, dans la survenue et la croissance des métastases.

L'objectif de mon projet de thèse est de **décrypter, dans les cellules cancéreuses mammaires, le rôle et les mécanismes d'actions du lncRNA *H19* ainsi que les parts relatives de l'ARNm et du miR-675 sur les phénotypes observés lors du développement métastatique.**

Dans un premier temps, j'ai déterminé l'implication et la contribution relative de *H19* et du miR-675 dans l'augmentation du potentiel métastatique du cancer du sein. J'ai montré que le lncRNA *H19* et le miR-675 augmentent tous deux la migration ainsi que l'invasion cellulaire dans des modèles *in vitro* et *in vivo*. J'ai mis en évidence, pour la première fois, que le miR-675 comme son précurseur *H19*, augmentent les propriétés souches des cellules cancéreuses du sein. J'ai également démontré que le lncRNA *H19* et le miR-675 ont des actions séquentielles et complémentaires.

Dans un second temps, j'ai voulu approfondir les déterminants moléculaires régulés par le lncRNA *H19* lors de l'émergence métastatique du cancer du sein. Nous avons identifié le gène *BST2* étant le plus surexprimé dans nos cellules surexprimant stablement *H19*. J'ai mis en évidence par des expériences de perte et de gain de fonction qu'il existe une régulation croisée entre *H19* et *BST2*. De plus, j'ai identifié une nouvelle cible du miR-675, le gène *BST2*. Enfin, comme *H19*, *BST2* augmente les phénotypes du processus métastatique.

Dans un dernier temps, j'ai mis en évidence une interaction entre *H19* et p53. Cette interaction empêche p53 d'être transloqué dans le noyau cellulaire. De plus, nous avons démontré que *H19* forme un complexe tripartite avec p53 et avec MDM2 afin de réguler négativement l'activité transcriptionnelle de p53 dans nos modèles de cancer du sein. Nous avons également montré que *H19* favorise l'instabilité génomique entraînant l'accumulation de mutations.





## *MATERIELS & METHODES*



## I. Culture cellulaire

La lignée cancéreuse mammaire humaine MCF-7 (ATCC) est de type luminal-like, elle exprime les récepteurs aux œstrogènes (ER), à la progestérone (PR) et exprime une version non altérée de p53. Cette lignée provient d'une effusion pleurale de patiente atteinte d'adénocarcinome métastatique du sein. Elle est cultivée dans du Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Gibco®) supplémenté par 10% de sérum de veau fœtal (SVF, Dutscher) et du Zell Shield® 1% (Clinisciences). Nous avons utilisé d'autres lignées dérivées des MCF-7 WT : les MCF-7-pcDNA3.1-H19 surexprimant stablement le long ARN non codant *H19* (Vennin et al., 2015), les MCF-7-pcDNA3.1-BST2 surexprimant stablement le gène *BST2*, les MCF-7-pEGFP-C1-miR-675 surexprimant le miR-675.

La lignée cancéreuse mammaire humaine MDA-MB-231 (ATCC) est une lignée triple négative, elle n'exprime ni les récepteurs aux œstrogènes et à la progestérone, ni le récepteur HER2 et exprime une version mutée de la protéine p53. Cette lignée provient d'une effusion pleurale de patiente atteinte d'adénocarcinome métastatique du sein. Elle est cultivée dans du Roswell Park Memorial Institute (RPMI-1640, Gibco®) supplémenté par 10% de sérum de veau fœtal (SVF, Dutscher) et du Zell Shield® 1% (Clinisciences). Nous avons utilisé d'autres lignées dérivées des MDA-MB-231 WT : les MDA-MB-231-pcDNA3.1-H19 surexprimant stablement le long ARN non codant *H19* (Vennin et al., 2015), les MDA-MB-231-pcDNA3.1-BST2 surexprimant stablement le gène *BST2*, les MDA-MB-231-pEGFP-C1-miR-675 surexprimant le miR-675 (Vennin et al., 2015).

La lignée cancéreuse humaine T47D (ATCC) est de type luminal-like, elle exprime les récepteurs aux œstrogènes, à la progestérone et présente une version mutée de p53. Cette lignée provient d'une effusion pleurale de patiente atteinte d'adénocarcinome métastatique du sein. Elle est cultivée dans du Roswell Park Memorial Institute (RPMI-1640, Gibco®) supplémenté par 10% de sérum de veau fœtal (SVF, Dutscher) et du Zell Shield® 1% (Clinisciences). Nous avons également utilisé une lignée T47D-pcDNA3.1-H19 surexprimant stablement le long ARN non codant *H19* dérivée de la lignée sauvage.

La lignée cancéreuse humaine SUM159PT (ATCC) est une lignée triple négative, elle n'exprime ni les récepteurs aux œstrogènes et à la progestérone, ni le récepteur HER2 et présente une version mutée de p53. Cette lignée provient d'une effusion pleurale de patiente atteinte d'un carcinome primaire du cancer du sein. Elle est cultivée dans du Ham's F-12 Nutrient Mixture (F12, Gibco®) supplémenté par 5% de sérum de veau fœtal (SVF, Dutscher), 1% de Zell Shield® (Clinisciences), 500 µL d'insuline (10 mg/mL ; #I9278, Sigma-Aldrich), 27,8 µL d'hydrocortisone (100 mg/mL ; Sigma-Aldrich) et 5 mL d'HEPES 1M (Gibco®). Nous avons utilisé une autre lignée cellulaire dérivée de la lignée native : une lignée SUM159PT-pH19-mCherry exprimant la protéine

fluorescente mCherry sous le contrôle du promoteur minimal du gène *H19* (Peperstraete et al., 2020).

La lignée cancéreuse humaine Calu-6 (ATCC) est cultivée dans du Roswell Park Memorial Institute (RPMI-1640, Gibco®) supplémenté par 10% de sérum de veau fœtal (SVF, Dutscher) et du Zell Shield® 1% (Clinisciences). Cette lignée provient d'une effusion pleurale de patiente atteinte d'adénocarcinome métastatique pulmonaire. Cette lignée présente une version nulle de p53. Nous avons utilisé une lignée surexprimant stablement le long ARN non codant *H19* : Calu-6-pcDNA3.1-H19.

La lignée animale CHO-K1 (ATCC) est cultivée dans du milieu F12 (Gibco) supplémenté par 10% de sérum de veau fœtal (SVF, Dutscher) et du Zell Shield® 1% (Clinisciences). Cette lignée provient de l'épithélium ovarien de hamster chinois. Nous avons utilisé une lignée surexprimant stablement le long ARN non codant *H19* : CHO-K1-pcDNA3.1-H19.

Les cellules sont entretenues dans une atmosphère humide, à 37°C et à 5% de CO<sub>2</sub>. A pré-confluence, les cellules sont dissociées avec de la trypsine/0.25% EDTA (Gibco®) et réensemencées selon la lignée cellulaire utilisée.

## II. Traitements

Les cellules sont traitées à la doxorubicine (D1515, Sigma-Aldrich) 24h après ensemencement à une concentration de 0,6 µg/mL pendant 24h à 37°C pour l'analyse du cycle cellulaire (Pic Sub-G1) ou à une concentration de 0,2 µg/mL pendant 24h à 37°C pour l'analyse protéique de p53 déterminée par western blot. L'arrêt du traitement est effectué après rinçage des cellules au PBS 1X. Les cellules sont analysées immédiatement après l'arrêt du traitement.

Les cellules sont traitées au DAP (2,6-Diaminopurine) 24h après ensemencement à une concentration de 0,025 nM. Pour le contrôle, les cellules sont traitées au DMSO.

## III. Génération des plasmides

Les plasmides pcDNA3.1-H19 et pEGFP-C1-miR-675 étaient déjà disponibles au laboratoire.

### a. Obtention du plasmide pH19-mCherry

Le plasmide pH19-mCherry a été créé au laboratoire grâce à la technologie e-Zyvec. Cette technologie permet de créer des vecteurs en combinant des briques moléculaires issues de vecteurs divers. Le brevet pour cette technologie a été déposé en 2015 en France et à l'internationale en 2016 : PCT/FR2016/050305. L'expression de la protéine fluorescente mCherry

est contrôlée par le promoteur minimum du gène *H19* (1000 pb), codé en aval de la séquence codante de la protéine.

*b. Obtention du plasmide pcDNA3.1-BST2*

La séquence nucléotidique du gène *BST2* (NM\_004335.4) est amplifiée par PCR (GoTaq® DNA Polymerase, Promega) à partir de l'ADNc des MDA-MB-231 surexprimant stablement *H19* et des amorces *BST2* auxquelles est ajouté un site de restriction *XhoI* en 5' pour l'amorce sens et un site de restriction *BamHI* en 3' pour l'amorce antisens (Tableau 6). Ces amorces spécifiques contiennent des sites de restriction pour permettre leur insertion aux extrémités de la séquence de *BST2*. L'amplicon de 590 pb est cloné dans un vecteur intermédiaire pCR-Blunt II-TOPO® (Invitrogen). Une digestion enzymatique est réalisée ainsi qu'une linéarisation du vecteur pcDNA3.1(-) pour y cloner la séquence de *BST2* par restriction-ligation enzymatique. L'amplicon *BST2* est purifié sur gel d'agarose (MinElute® Gel Extraction Kit, Qiagen). La ligation est réalisée avec la T4 ligase (NEB) entre l'amplicon *BST2* et le plasmide pcDNA3.1(-) linéarisé. Le vecteur est ensuite amplifié dans des bactéries chimiocompétentes One Shot™ TOP10 (Thermo Fisher Scientific). Après criblage des colonies, la purification des plasmides est réalisée avec le kit QiAprep Spin mini/midi prep (Qiagen). Les plasmides sont vérifiés par digestion enzymatique.

Nom	Séquence 5'→ 3'
<i>BST2_cloning_XhoI</i>	ACTCGAGAACTCTAAAGGGGAGATCTGGATG
<i>BST2_cloning_BamHI</i>	TGGATCCTTTCCTGGGATCTCACTGCA

Tableau 6. Séquences des amorces utilisées lors du clonage moléculaire.

#### IV. Transfection de plasmide

Les cellules sontensemencées au nombre d'un million puis transfectées à l'aide du kit JetPEI® selon le protocole du fournisseur (Polyplus transfection). Pour établir nos modèles de surexpression stable à partir des lignées sauvage MCF-7, T47D, MDA-MB-231 et SUM159PT, nous avons utilisé les vecteurs disponibles au laboratoire : pcDNA3.1-H19, pEGFP-C1-miR-675, pH19-mCherry et pcDNA3.1-BST2. Les cellules ayant intégré le vecteur sont sélectionnées pendant un mois à la généticine (G418, 1 mg/mL pour les MCF-7, T47D et MDA-MB-231) ou l'hygromycine B (0,6 mg/mL pour les SUM159PT).

## V. Transfection de siRNA

Les cellules sontensemencées au nombre de 100 000 cellules dans des plaques 6 puits et transfectées à l'aide du kit jetPRIME® selon le protocole du fournisseur (Polyplus Transfection). Les séquences de siRNA sont validées par un « blast » sur l'ensemble du génome humain de façon à éviter toute inhibition non spécifique. Tous les siRNA sont synthétisés par Eurogentec® (Tableau 7). Les cellules sont lysées 48h après la transfection.

Nom	Séquence 5' → 3'
<i>siCtrl</i>	Référence SR-CL000-005 Eurogentec®
<i>siBST2A</i>	GGCAUCUACUUCGUAUGACUA
<i>siBST2B</i>	CACUACAUAACCAUAAGCU
<i>siH19A</i>	ACGAGGCCAGGUCUCCAGCUG
<i>siH19B</i>	1 : UAAGGUGUUCAGGAAGGCC 2 : AGCUUCACCUUCCAGAGCC

Tableau 7. Séquences des siRNA utilisés.

## VI. Transfection de mimics/anti-miR

Les cellules sontensemencées au nombre de 100 000 cellules dans des plaques 6 puits et transfectées à l'aide du kit DharmaFECT™ Duo selon le kit du fournisseur (Thermo Fisher Scientific Dharmacon). Les séquences du mimic, de l'antagomiR et de leurs contrôles respectifs sont déterminées grâce à la miRIDIAN microRNA Mimic Library ou la miRIDIAN microRNA Hairpin Inhibitor Library (Horizon) (Tableau 8). Les cellules sont lysées 48h après la transfection.

Nom	Référence
<i>Ctrl mimic</i>	miRIDIAN mimic negative control (Dharmacon)
<i>Mimic</i>	miRIDIAN mimic Hsa-miR-675-5p (Dharmacon)
<i>Ctrl anti-miR</i>	miRIDIAN Hairpin inhibitor negative control (Dharmacon)
<i>Anti-miR</i>	miRIDIAN Hairpin inhibitor Hsa-miR-675-5p (Dharmacon)

Tableau 8. Références des mimics et anti-miR utilisés.

## VII. Extraction d'ARN, rétro-transcription (RT) et RT-PCR en temps réel (qPCR)

L'extraction des ARN se fait à l'aide du kit RNeasy (Qiagen) selon les recommandations du fournisseur. La rétrotranscription est réalisée avec le kit SensiFAST™ cDNA Synthesis (Bioline®) selon le protocole du fournisseur. Le programme du thermocycleur de RT-PCR est le suivant : une

étape de 15 secondes à 25°C, une étape de 30 min à 42°C, une étape de 15 min à 48°C et enfin une étape de 5 min à 85°C. La PCR en temps réel se réalise sur les échantillons d'ADN complémentaire obtenus après la RT. L'expression des gènes d'intérêts est rapportée à l'expression d'un gène rapporteur *RPLP0* (*Ribosomal protein lateral stalk subunit P0*). Les amorces sont diluées à une concentration de 5 µM (Tableau 9) et les échantillons sont dilués dans 60 µL d'H<sub>2</sub>O. Par gène, un tube contenant du SyBR Green master mix (Qiagen), de l'eau et les amorces 5 µM est déposé en triplicata sur une plaque 96 puits auquel est ajouté une dilution d'ADNc. Le programme de qPCR est composé de plusieurs étapes : une étape d'activation de l'enzyme à 95°C pendant 5 min, une étape de dénaturation à 95°C pendant 10 sec et une étape d'hybridation et d'élongation à 60°C pendant 30 sec, le tout répété pendant 40 cycles.

Pour détecter l'expression du miR-675, les ARN sont extraits selon la méthode phénol-chloroforme (TRIzol reagent, Ambion™). Après centrifugations, la phase aqueuse de chaque échantillon est récupérée et incubée avec de l'isopropanol pendant 20 min à -20°C. Les ARN sont rincés plusieurs fois puis élués avec de l'eau RNase-free. Les ARN sont digérés à la DNase I (Roche®) pour éliminer l'ADN génomique. Pour chaque échantillon, 50 ng d'ARN sont nécessaires pour la rétrotranscription avec le kit miRCURY LNA™ Universal RT (Exiqon). Le programme de rétrotranscription est décomposé comme suit : 60 min à 42°C puis 5 min à 95°C. L'expression du miR-675 est rapportée à l'expression d'un gène rapporteur (*Human U6 RNA*). Par gène, un tube contenant du Master Mix (Exiqon), de l'eau et les amorces mix (*hsa-miR-675-5p* LNA PCR primer set, UniRT, Exison) est déposé en duplicata sur une plaque 96 puits auquel est ajoutée une dilution d'ADNc. Le programme de qPCR est composé de différentes étapes : une étape d'activation de l'enzyme à 95°C pendant 2 min, une étape de dénaturation à 95°C pendant 10 sec et une étape d'hybridation et d'élongation à 56°C pendant 60 sec, le tout répété pendant 40 cycles.

L'appareil utilisé est le QuantStudio™ 3 Real-Time PCR System (Thermo Fisher Scientific). Les résultats sont exprimés en quantité relative normalisée par rapport au gène rapporteur *RPLP0* ou *U6* par la méthode des  $\Delta\Delta Ct$  qui permet de calculer le rapport suivant :

$$R = E_{\text{gène cible}}^{[\Delta Ct \text{ gène cible}]} / E_{\text{RPLP0/U6}}^{[\Delta Ct \text{ RPLP0/U6}]}$$

$$\text{avec } \Delta Ct_{\text{gène cible}} = [Ct_{\text{gène cible}} \text{ contrôle} - Ct_{\text{gène cible}} \text{ échantillon}]$$

$$\text{et } \Delta Ct_{\text{RPLP0/U6}} = [Ct_{\text{RPLP0/U6}} \text{ contrôle} - Ct_{\text{RPLP0/U6}} \text{ échantillon}]$$

E correspond à l'efficacité des amorces

Nom	Antisens 5' → 3'	Sens 5' → 3'
<i>ABCG2</i>	GCTGCAAAGCCGTAAATCCATATC	ACAACCATTGCATCTTGGCTGTC
<i>ALDH1A1</i>	CCCCTCTCAATGAGGTCAAG	GTTGAGCGGGCTAAGAAGTAT
<i>ALDH1A3</i>	ATAAAGGGCGGTGAGAGGTGTCT	ACCATCCCCACAGATGACAA
<i>BRAF</i>	TGGTTGGAATCTGCTCGTCT	AGTAGGCTTGGCATGACAGT
<i>BRMS1L</i>	TTGGCGACCGTTGAAATGTC	GAGGACGAGGACACTGAGAG
<i>BST2</i>	TTCCTGGGATCTCACTGCAG	CATAAGCTTCAGGACGCGTC
<i>C/EBPα</i>	TTGTCACTGGTCAGCTCCAG	TGGACAAGAACAGCAACGAG
<i>H19</i>	TACAACCACTGCACTACCTG	TGGCCATGAAGATGGAGTCG
<i>KISS 1</i>	AGCTGCTGGCCTGTGGGTCT	ACCCAGCCAGGTGGTCTCGT
<i>NANOG</i>	ACACAGTGGGCCTGAAGA	GTGATTTGTGGGCCTGAAGA
<i>NOTCH1</i>	CTGTGAGGAAAATATCGAC	GTAAGTACTGCTCCACTCT
<i>NR4A3</i>	TCGGGTTATATCGGGAAGGG	TCCTCCTACACTCTCAGCCT
<i>OCT 3/4</i>	GTGAAGTGAGGGCTCCATA	GAAGGATGTGGTCCGAGTGT
<i>PIK3CA</i>	AATCTGGTCGCCTCATTTGC	CCTATTGTCGTGCATGTGGG
<i>PRLR</i>	GCAAGCAGTACACCTCCATG	GAGCGTGAACCAACCAGTTT
<i>ROBO1</i>	AGTCAGTAGTCTGGTCGTTCT	CAGATGACACATGACGCCAG
<i>RPLP0</i>	GATGACCAGCCAAAGGAGA	GTGATGTGCAGCTGATCAAGACT
<i>SOX2</i>	CGGGGCCGTATTATAATC	TAACCCAAGATGCACAATC
<i>TXN1P</i>	AGAGGCAGATCATTTAAGAGTG	AGAGCCAACAGAACAGAAGAA

Tableau 9. Séquences des amorces utilisées en qPCR.

### VIII. Extraction de protéines et Western blot

Les cellules sont lysées sur glace dans un tampon RIPA contenant des inhibiteurs de protéases et de phosphatases (*protease inhibitor P8340* ; *phosphatase inhibitor cocktail 2 P5726*, Sigma-Aldrich). Après une incubation d'une nuit à -80°C, le lysat cellulaire est récupéré et centrifugé à 14 000 g pendant 10 min à 4°C. Le surnageant contenant les protéines est dosé par la méthode BCA (*Bicinchronic acid* ; Sigma-Aldrich).

Les échantillons sont préparés avec du tampon de charge 4X (NuPAGE LDS sample buffer, Invitrogen™) et du réducteur 10X (NuPAGE reducing agent, Invitrogen™) puis sont chauffés à 70°C pendant 10 min. Les échantillons sont déposés sur un gel d'acrylamide SDS 4-12% (NuPAGE 4-12% Bis-Tris Midi Gel, Invitrogen™). La séparation des protéines se fait selon leur taille par électrophorèse. Les protéines sont ensuite transférées sur une membrane de nitrocellulose (0,45 µm, PROTRAN®) ou de PVDF (Immobilon-P, PVDF 0,45 µm ; Millipore®). La membrane est saturée avec du tampon de blocage (TBS 1X ; 0,2% caséine ; 0,05% Tween) puis la membrane est incubée avec l'anticorps primaire pendant une nuit à 4°C (Tableau 10). L'anticorps secondaire (anti-IgG de lapin, dilué au 1/5000<sup>ème</sup> Cell Signaling Technology® ; anti-IgG de souris, dilué au 1/5000<sup>ème</sup> Cell Signaling Technology®) couplé à une HRP (*horse radish peroxydase*) est ajouté sur la membrane après des lavages au TBST (TBS 1X-Tween 0,1%) pendant 1h à température ambiante. La



membrane est révélée par une solution de chimiluminescence (Super Signal® West Femto Maximum Sensibility Substrate, Super Signal® West Dura Extended Duration, Thermo Scientific) avec un appareil d'imagerie de chimiluminescence (Fusion FX Spectra, Vilber).

La quantification des western blot est basée sur une technique de densitométrie qui prend en compte la densité et la quantité du signal des bandes. Elle est effectuée par le logiciel ImageJ qui permet de calculer un ratio entre l'intensité de la bande d'intérêt par rapport à l'intensité de la bande de la  $\beta$ -actine utilisée comme gène rapporteur. Le ratio est ensuite rapporté au contrôle indexé à 1. Les résultats de quantification représentent la moyenne d'au moins 3 expériences indépendantes avec leurs écart-types.

Nom	Référence	Tampon de blocage	Dilution
<i>Actine</i>	Sigma A-2066	TBST + Caséine 0,8 %	1/10000 <sup>ème</sup>
<i>BST2</i>	Atlas HPA017060	TBST + Caséine 0,8 %	1/1000 <sup>ème</sup>
<i>E-cadhérine</i>	Cell Signaling #9782	TBST + lait 5 %	1/1000 <sup>ème</sup>
<i>MDM2</i>	Santa Cruz sc-965	TBST + BSA 5%	1/1000 <sup>ème</sup>
<i>N-cadherine</i>	Cell Signaling #9782	TBST + Caséine 0,8 %	1/1000 <sup>ème</sup>
<i>P53 (DO-1)</i>	Santa Cruz sc-126	TBST + BSA 5%	1/1000 <sup>ème</sup>
<i>Snail</i>	Cell Signaling #9782	TBST + Caséine 0,8 %	1/1000 <sup>ème</sup>
<i>TCF8/ZEB1</i>	Cell Signaling #9782	TBST + Caséine 0,8 %	1/1000 <sup>ème</sup>
<i>Vimentine</i>	Cell Signaling #9782	TBST + Caséine 0,8 %	1/1000 <sup>ème</sup>
<i>ZO1</i>	Cell Signaling #9782	TBST + Caséine 0,8 %	1/1000 <sup>ème</sup>

**Tableau 10. Liste des anticorps utilisés en western blot.**

### **IX. Immunoprécipitation des protéines**

Les cellules sont lysées dans un tampon contenant de l'HEPES ainsi que des inhibiteurs de protéases et de phosphatases (protease inhibitor P8340 ; phosphatase inhibitor cocktail 2 P5726, Sigma-Aldrich). Après centrifugation, le surnageant contenant les protéines est récupéré et dosé avec la méthode BCA. Dans le surnageant, l'anticorps primaire est ajouté et les échantillons sont incubés à 4°C pendant 2h sous agitation. Des billes de protéines G préalablement saturées sont ajoutées dans chaque condition. Après une incubation à 4°C pendant 2h sous agitation, les billes sont rincées avec un tampon de lyse, puis les protéines immunoprécipitées sont éluées et réduites dans un tampon de Laemmli pendant 7 min à 95°C. Les protéines sont ensuite séparées sur gel d'acrylamide et analysées en western blot comme décrit précédemment.

## **X. Immunofluorescence**

Les cellules sontensemencées dans une chambre de culture Lab-Tek™ (Thermo Fisher Scientific) puis fixées avec du paraformaldéhyde 4% et perméabilisées avec un tampon PBS/triton X-100 0,5%. Après un blocage avec un tampon TBST-Caséine 0,8%, les cellules sont incubées avec l'anticorps primaire ( $\beta$ -caténine #9782, Cell Signaling Technology) dilué au 1/100<sup>ème</sup> sur la nuit à 4°C sous agitation. Après deux rinçages au PBS 1X, les cellules sont incubées avec l'anticorps secondaire Alexa Fluor 488 (AF488 rabbit, Cell Signaling Technology) dilué dans le même tampon. Les cellules sont marquées au Hoechst 33258 1 mM et les lames sont montées avec le liquide de montage fluoro-mount (Dako). Les marquages sont imagés au microscope à fluorescence (Eclipse Ti-U, Nikon) et les photos sont analysées avec le logiciel ImageJ.

## **XI. Test de migration et d'invasion cellulaire**

La migration et l'invasion cellulaire sont déterminées par des tests de Transwell. Lors des tests de migration, 40 000 cellules sontensemencées dans les inserts de culture (0,8  $\mu$ m, BD Bioscience) préalablement recouverts par du collagène de type I a une concentration de 0,045 mg/mL (Millipore), dans des plaques 12 puits. Après 8h, les cellules sont rincées au PBS 1X et fixées au méthanol glacé pendant 10 minutes à température ambiante. Les inserts sont rincés et la face supérieure est grattée à l'aide d'un coton tige pour éliminer les cellules qui n'ont pas traversé la membrane. Les cellules qui ont migré et envahi l'autre côté de la membrane sont colorées au Hoechst 33258 1mM. La membrane est découpée et montée entre lame et lamelle avec le liquide de montage Glycergel (Dako). Les cellules migrantes sont ensuite comptées en microscopie.

Pour les tests d'invasion, 40 000 cellules sontensemencées dans les inserts de culture (0,8  $\mu$ m, BD Bioscience) préalablement recouverts par du collagène de type I a une concentration de 3 mg/mL (Millipore), dans des plaques 12 puits. Après 24h, les cellules sont rincées au PBS 1X et fixées au méthanol glacé pendant 10 minutes à température ambiante. Les inserts sont rincés et la face supérieure est grattée à l'aide d'un coton tige pour éliminer les cellules qui n'ont pas traversé la membrane. Les cellules qui ont migré et envahi l'autre côté de la membrane sont colorées au Hoechst 33258 1mM. La membrane est découpée et montée entre lame et lamelle avec le liquide de montage Glycergel (Dako). Les cellules invasives sont ensuite comptées en microscopie.

## **XII. Test de résistance à l'anoïkis**

Le poly HEMA est dissout dans de l'éthanol 95 % (2,4 g de poly HEMA ; P3932, Sigma-Aldrich dans 20 mL) à 55°C sous agitation pendant une nuit. Cette solution est diluée au 1/10<sup>ème</sup> dans de l'éthanol 95 % puis filtrée à l'aide d'un filtre 0,22 µm (MILLEXR Syringe Driven Filter Unit, Millipore™). Les plaques 96 puits sont recouvertes par la solution filtrée puis laissées sous PSM jusqu'à évaporation totale de l'éthanol avant rinçage au PBS 1X. Dix mille cellules sontensemencées dans 100 µL de milieu de culture en condition non adhésive. La viabilité cellulaire est mesurée grâce à la résazurine (StemCell) selon le protocole du fournisseur. La résazurine est un colorant dont la couleur passe du bleu au violet selon son niveau de réduction par les cellules viables. L'absorbance est mesurée à deux longueurs d'ondes différentes, correspondant à la forme oxydée (600 nm) ou réduite (570 nm) de la résazurine, grâce au spectrophotomètre MultiskanGO (Thermo Fisher Scientific). Le résultat est présenté comme le ratio entre ces 2 longueurs d'ondes.

## **XIII. Test de clonogénicité**

La capacité des cellules à former des colonies est déterminée par l'ensemencement de 250 cellules dans une boîte 100 cm<sup>2</sup> (10 mL/boîte, une boîte par condition). Après 15 jours de culture, les cellules sont rincées au PBS 1X puis fixées au paraformaldéhyde 4 %. Les colonies sont colorées au cristal violet 0,4 % puis comptées à l'œil nu (taille de la colonie > 50 cellules).

## **XIV. Test de formation de sphères**

Les cellules sont cultivées dans un milieu spécifique DMEM-F12 sans phénol red (Gibco®) contenant 0,4 % de BSA (Sigma-Aldrich), 10 mL de supplément B27 (Invitrogen), 5 mg/mL d'insuline (Sigma-Aldrich), 4 µg/mL d'héparine (Sigma-Aldrich) et 20 ng/mL de facteur de croissance épidermal (EGF) et de facteur de croissance fibroblastique (FGF) (Biotechne). Les cellules sontensemencées en plaques 96 puits non adhésives, avec une concentration allant de 1024 cellules par puits à 1 cellule par puits. Le nombre de sphères par puits est déterminé après 4 jours d'incubation.

## **XV. Test de prolifération**

La prolifération cellulaire est évaluée par l'ensemencement de 20 000 en plaque 6 puits. Après 24, 48, 72 et 96 heures, les cellules sont isolées après trypsinisation et le nombre de cellules par puits est compté à la lame de Malassez.

## **XVI. Analyse du cycle cellulaire**

L'analyse de la population cellulaire en phase sub-G1 s'effectue après un traitement à la doxorubicine pendant 24h (voir paragraphe Traitements). Ensuite, les cellules sont perméabilisées avec de l'éthanol 70% pendant 30 min à température ambiante puis rincées avec une solution de PBS contenant de l'iodure de propidium (1 µg/mL) et de la RNase A (1mg/mL) (R6513, Sigma-Aldrich) pendant 30 min à 37°C. L'analyse de la population cellulaire est réalisée par cytométrie de flux (CytoFLEX S, Beckman Coulter) et les données sont traitées à l'aide du logiciel FlowJo.

## **XVII. Xénogreffe de poissons zèbres transgéniques (fli1 : GFP)**

Les cellules SUM159PT pH19-mCherry<sup>neg/high</sup> et MDA-MB-231 sont incubées pendant 40 min dans une atmosphère à 37°C et à 5% de CO<sub>2</sub>, avec une solution de traceurs lipophiles (Vybrant Dil labeling solution pour les mCherry<sup>high</sup> et les MDA-MB-231 surexprimant stablement *H19* et miR-675 ; Vybrant DiD labeling solution pour les mCherry<sup>neg</sup> et les MDA-MB-231 contrôles ; Invitrogen) préparée dans 1 mL de milieu de culture sans sérum. Les cellules sont ensuite dissociées avec de la trypsine/0,25% EDTA (Gibco®) puis comptées. Un million de cellules de chaque condition sont prélevées avant d'être centrifugées à 100 g pendant 5 min. Le culot est resuspendu avec 100 µL de PBS/EDTA 5 mM. Dès la ponte, les poissons zèbres transgéniques (fli1 : GFP) sont placés dans du 1-phényl-2-thio-urée 0,2 mM (Sigma) pour empêcher la pigmentation jusqu'à 48h post-fécondation. Les poissons sont anesthésiés avec 0,04 mg/mL de tricaine méthane sulfonate (MS-222 A5040, Sigma). Les cellules mCherry<sup>neg</sup> et mCherry<sup>high</sup> ou les cellules MDA-MB-231 surexprimant *H19* et son contrôle ou les cellules MDA-MB-231 surexprimant miR-675 et son contrôle sont co-injectées à l'aide d'un stéréomicroscope (M125, Leica) et d'un microinjecteur (FemtoJET, Eppendorf) dans le sac vitellin des poissons. Après l'injection, les poissons sont placés dans une solution, renouvelée tous les 2 jours, de phénylthiourée et de pénicilline-streptomycine (Gibco®) à 28°C dans l'obscurité. Pendant 48h, la température d'incubation des poissons varie (30°C à 24h, 32°C à 48h jusqu'à 6 jours post-injection) pour favoriser le développement cellulaire. Les poissons sont fixés avec une solution de paraformaldéhyde 4% et placés dans des boîtes de Pétri à fond en verre. Les photos sont prises à l'aide d'un logiciel d'acquisition d'image automatisée (ZEISS) via un microscope confocal à fluorescence (LSM 880, ZEISS).

## **XVIII. Tests statistiques**

Les résultats d'au moins trois expériences indépendantes sont analysés à l'aide du t-test de Student. Les résultats dont la *p-value* est inférieure à 0,05 sont considérés comme significatifs de la manière suivante : \* : *p-value* < 0,05 ; \*\* : *p-value* < 0,01 ; \*\*\* : *p-value* < 0,001.





## *RESULTATS*





## **I. Contribution et parts relatives de *H19* et du miR-675 lors de l'émergence des métastases du cancer du sein**

Les longs ARN non codants sont essentiels à la biologie cellulaire. Leurs dysfonctionnements jouent un rôle critique dans le développement et la progression du cancer. Comme abordé précédemment, nous avons démontré le rôle oncogénique du gène *H19* dans la tumorigenèse mammaire. Afin de préciser les modes d'action du lncRNA *H19* lors de l'émergence et du développement des métastases du cancer du sein, nous avons étudié l'implication et la part relative du gène *H19* et de son microRNA, le miR-675, dans le processus métastatique dans différents types cellulaires représentatifs des différents sous-types du cancer du sein présentant une sur- ou une sous-expression de *H19* ou de son miR-675. En effet, nous avons voulu discriminer les phénotypes associés à l'expression du miR-675 et ceux dus à l'ARNm lui-même lors de la migration, de l'invasion cellulaire, de la transition épithélio-mésenchymateuse, de la formation de colonies, de la formation de sphères et des propriétés souches de nos cellules cancéreuses mammaires.

**Article publié dans *Cancers* en juin 2020, Volume 12 Numéro 7 Page 1730.**

**<https://doi.org/10.3390/cancers12071730>**

**Enhancement of Breast Cancer Cell Aggressiveness by lncRNA H19 and its miR-675  
Derivative: Insight into Shared and Different Actions**

Evodie Peperstraete <sup>1,†</sup>, Clément Lecerf <sup>1,†</sup>, Jordan Collette <sup>1</sup>, Constance Vennin <sup>1</sup>, Ludivine Raby <sup>1</sup>, Pamela Völkel <sup>1</sup>, Pierre-Olivier Angrand <sup>1</sup>, Marie Winter <sup>1</sup>, François Bertucci <sup>2</sup>, Pascal Finetti <sup>2</sup>, Chann Lagadec <sup>1</sup>, Samuel Meignan <sup>1,3</sup>, Roland P. Bourette <sup>1</sup>, Xuefen Le Bourhis <sup>1</sup> and Eric Adriaenssens <sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> University Lille, CNRS, INSERM, CHU Lille, Centre Oscar Lambret, UMR 9020–UMR 1277–Cancer–Cancer Heterogeneity, Plasticity and Resistance to Therapies, F-59000 Lille, France

<sup>2</sup> Laboratoire d’Oncologie Prédictive, CRCM, Institut Paoli-Calmettes, INSERM UMR1068, CNRS UMR7258, Aix-Marseille Université, Département d’Oncologie Médicale, Institut Paoli-Calmettes, 13009 Marseille, France

<sup>3</sup> Tumorigenesis and Resistance to Treatment Unit, Centre Oscar Lambret, F-59000 Lille, France

\* Author to whom correspondence should be addressed.

† The two first authors contributed equally to this work.

*Cancers* **2020**, *12*(7), 1730; <https://doi.org/10.3390/cancers12071730>

**Keywords:** lncRNA; *H19* gene; breast cancer; miR-675; cancer stem cell; tumoral progression

## **Abstract**

Breast cancer is a major public health problem and the leading world cause of women death by cancer. Both the recurrence and mortality of breast cancer are mainly caused by the formation of metastasis. The long non-coding RNA *H19*, the precursor of miR-675, is involved in breast cancer development. The aim of this work was to determine the implication but, also, the relative contribution of *H19* and miR-675 to the enhancement of breast cancer metastatic potential. We showed that both *H19* and miR-675 increase the invasive capacities of breast cancer cells in xenografted transgenic zebrafish models. In vitro, *H19* and miR-675 enhance the cell migration and invasion, as well as colony formation. *H19* seems to induce the epithelial-to-mesenchymal transition (EMT), with a decreased expression of epithelial markers and an increased expression of mesenchymal markers. Interestingly, miR-675 simultaneously increases the expression of both epithelial and mesenchymal markers, suggesting the induction of a hybrid phenotype or mesenchymal-to-epithelial transition (MET). Finally, we demonstrated for the first time that miR-675, like its precursor *H19*, increases the stemness properties of breast cancer cells. Altogether, our data suggest that *H19* and miR-675 could enhance the aggressiveness of breast cancer cells through both common and different mechanisms.

## 1. Introduction

Long non-coding RNAs (lncRNAs) (>200 nt) are essential in cell biology, and their dysfunction plays a critical role in cancer development and progression. Indeed, lncRNAs are involved in diverse cellular processes such as cell proliferation, apoptosis, differentiation and pluripotency, but their mechanisms of action remain largely undeciphered [1]. Among these lncRNAs, *H19*, the first lncRNA discovered located in the *H19/IGF2* locus, is a subject of interest.

*H19* is submitted to genomic imprinting [2] and is expressed during embryonic development. Its expression is repressed after birth, except in a few tissues like the mammary gland, renal gland and uterus [3,4,5,6]. Many studies have shown that *H19* promotes tumor phenotypes and induces metastasis in various cancers like gastric, colorectal, bladder, renal, lung and breast cancers but, also, in glioblastoma [7,8,9,10,11,12,13]. We have previously shown that *H19* is overexpressed in 70% of breast cancer and promotes the tumorigenic properties of cancer cells [3,14]. The *H19* gene is upregulated by transcription factors such as E2F1 to enhance the cell cycle progression and cell invasion [12].

*H19* can exert its protumorigenic function through diverse molecular mechanisms like the targeting of transcriptional factors or chromatin modifier complexes such as PRC2 (polycomb repressive complex 2) [1]. *H19* binds and recruits the histone methyltransferase EZH2 to the promoter of the proapoptotic gene *BIK* (BCL-2 interacting killer), inducing a reshaping of the chromatin (by trimethylation of the lysine 27 of histone H3) and an inhibition of the *BIK* transcription [15]. *H19* also interacts with microRNAs (regulatory small non-coding RNAs) to serve as a sponge by sequestering them and inhibiting their actions. For instance, *H19* sponges miR-let7 to maintain the breast cancer stem cells status [16]. Moreover, *H19* increases the expression of DNMT1, a DNA methyltransferase, by sponging miR-152, thus inducing the growth and invasion of breast cancer cells [17].

In addition, *H19* could generate two mature miRNAs, miR-675-5p (miR-675) and miR-675-3p (miR-675\*) [18]. These miRNAs mainly act as posttranscriptional repressors by interacting with the mRNA target [19]. *H19*-derived miR-675 favors the tumor progression by repressing several well-known tumor suppressor genes, such as *Rb* [20], *Twist1* [21] or *RUNX1* [22]. We have identified c-Cbl and Cbl-b, two ubiquitin ligase E3, as specific targets of miR-675-5p in breast cancer cells [23].

We have already demonstrated the oncogenic role of the *H19* gene in breast tumorigenesis [14], and *H19*-derived miR-675 has been reported to promote the tumorigenesis of several cancers [20,22,23]. In this study, we examined the involvement and the relative contribution of *H19* and miR-675 in promoting breast cancer cell aggressiveness. Our results indicate that *H19* and miR-675 are in favor of cell migration, invasion and stemness through both common and different mechanisms.

## 2. Results

### 2.1. LncRNA H19 and miR-675 Promote Breast Cancer Cell Invasion in Zebrafish Xenograft Model

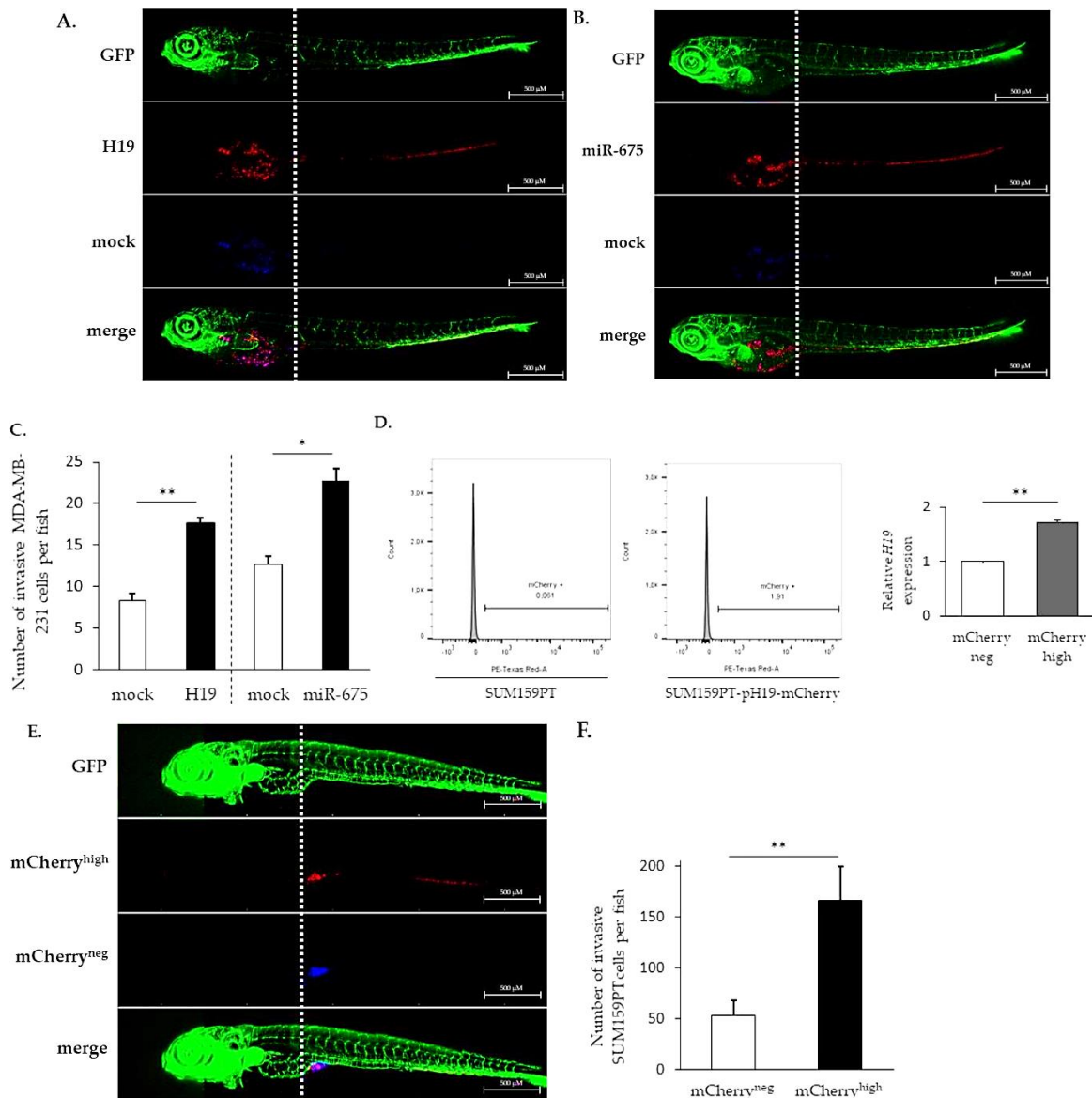
A tumor cell transplantation in zebrafish embryos represents a simple and rapid approach to study a tumor cell invasion and metastasis. The optical transparency of the embryos offers the advantage to monitor cancer cell behavior within a few days after the transplantation [24]. In order to investigate the relative contribution of *H19* and miR-675 in the metastatic process in vivo, breast cancer cells, stained with liposoluble fluorophores, were injected into the yolk sac of transparent transgenic zebrafish embryos having their entire vascular system labeled with green fluorescence, and the invasion of the injected cells was evaluated three days post-injection, as described in Materials and Methods. An increased invasion was observed for MDA-MB-231 breast cancer cells stably overexpressing *H19* or miR-675 compared to the control cells (**Figure 1A–C**).

In order to highlight the role of the *H19* gene without ectopic overexpression, the SUM159PT breast cancer cell line was transfected with a vector expressing the stable red fluorescent protein mCherry under the control of the *H19* promoter. This reporter system allowed us to select cells overexpressing *H19* within the total population without modulating its expression.

As expected, the mCherry<sup>high</sup> cell fraction displayed a higher *H19* expression when compared to the mCherry<sup>neg</sup> cell fraction (**Figure 1D**), validating the established cellular model. Of note, the level of *H19* in mCherry<sup>high</sup> cells may vary according to the experiments (2 to 14 times higher than mCherry<sup>neg</sup> cells). Thus, we were able to isolate cells overexpressing lncRNA *H19* from a heterogeneous cellular population, and we chose a population overexpressing two-fold the *H19* gene to conduct further experiments.

SUM159PT pH19-mCherry<sup>neg/high</sup> cells, stained with liposoluble fluorophores, were coinjected into the yolk sac of transgenic zebrafishes. We showed that mCherry<sup>high</sup> cells move further towards the caudal end through the dorsal aorta, caudal artery and then caudal vein compared to mCherry<sup>neg</sup> cells (**Figure 1E**). As shown in **Figure 1E,F**, mCherry<sup>high</sup> cells were three times more invasive than mCherry<sup>neg</sup> cells, further confirming that cells expressing higher levels of *H19* were more invasive.

The *H19*- and miR-675-enhanced breast cancer cell invasions in vivo prompted us to determine if and how *H19* and miR-675 could affect breast cancer cells in vitro in terms of migration, invasion, epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) and stemness, as all these processes are known to be involved in tumor invasion.



**Figure 1.** *H19* and miR-675 both promote cancer cell invasion in vivo. **(A)** Invasive capacities of MDA-MB-231 stably overexpressing *H19* and the control, stained with lipophilic tracers, in transgenic zebrafish. Fluorescent pictures were captured using automated image acquisition software. **(B)** Invasive capacities of MDA-MB-231 stably overexpressing miR-675 and the control, stained with lipophilic tracers, in transgenic zebrafish. Fluorescent pictures were captured using automated image acquisition software. **(C)** Quantification of invasive cells per zebrafish. **(D)** mCherry protein fluorescence in SUM159PT transfected or not with pH19-mCherry plasmid. Fluorescence intensity is categorized in mCherry<sup>neg</sup> and mCherry<sup>high</sup> cellular subpopulations. Relative *H19* expression in those subpopulations is figured. **(E)** Invasive capacities of mCherry<sup>neg</sup> and mCherry<sup>high</sup> cellular subpopulations, stained with lipophilic tracers, in transgenic zebrafish. Fluorescent pictures were captured using automated image acquisition software. **(F)** Quantification of invasive cells per zebrafish. For each experiment, forty embryos were used. \* $p < 0.05$  and \*\* $p < 0.01$ .

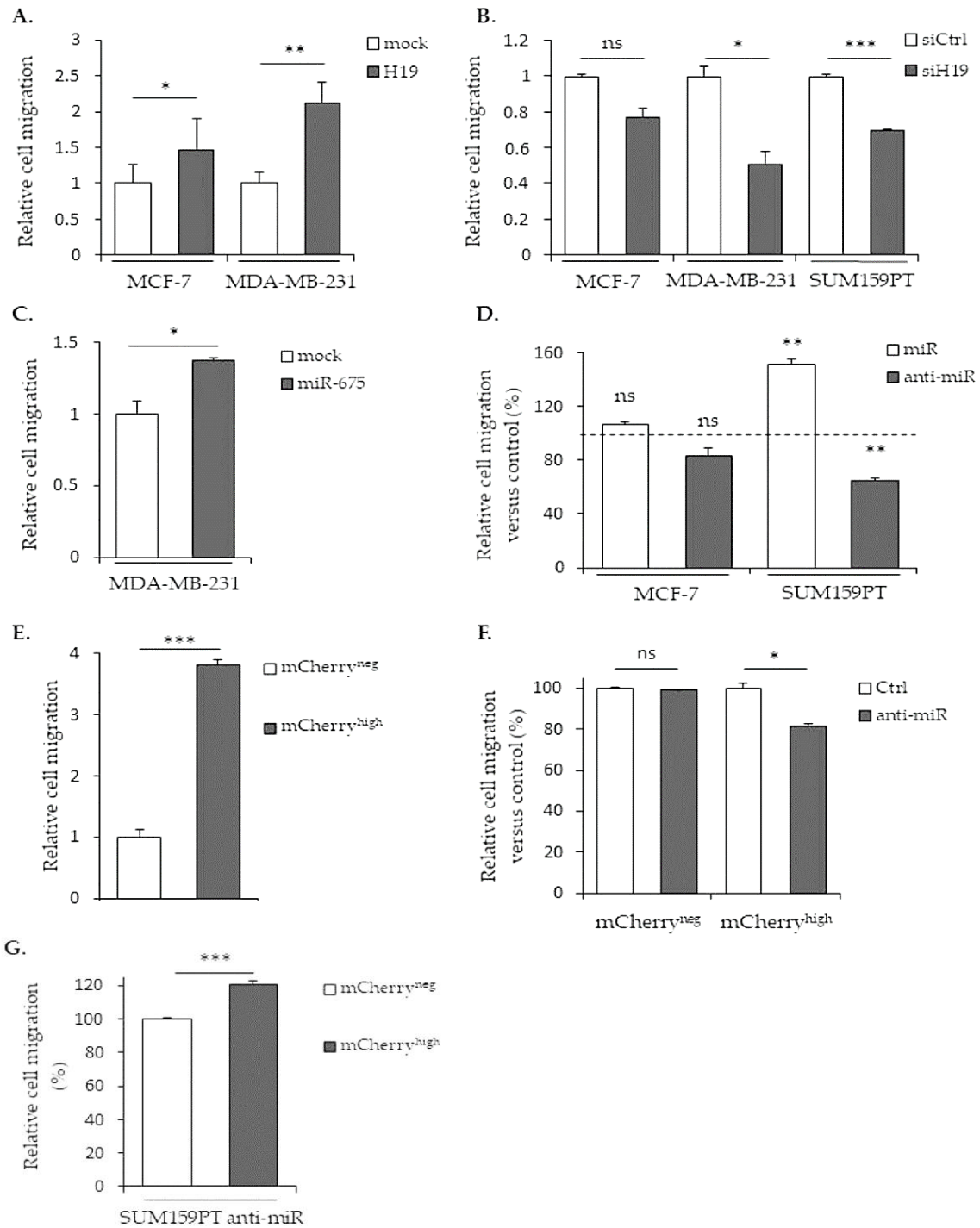
## 2.2. lncRNA H19 and miR-675 Enhance Breast Cancer Cell Migration and Invasion in Collagen Gel

The migratory capacities of breast cancer cells overexpressing or not *H19* or miR-675 were determined by using Transwell assays. In MCF-7 or MDA-MB-231 cells stably overexpressing *H19* mRNA, the cell migration was significantly increased (**Figure 2A**). On the contrary, in parental MDA-MB-231 and SUM159PT cells treated with siRNA targeting *H19*, the cell migration was significantly decreased (**Figure 2B**). In MDA-MB-231 cells stably overexpressing miR-675, the cell migration was significantly increased (**Figure 2C**). Similarly, parental SUM159PT cells transfected with miR-675 anti-miR exhibited decreased migration (**Figure 2D**).

Then, we checked the migration abilities in the SUM159PT pH19-Cherry model. We observed a three-fold increase of the migration with the mCherry<sup>high</sup> fraction compared to the mCherry<sup>neg</sup> fraction (**Figure 2E**). As expected, the use of a miR-675 inhibitor reduced 25% of the migration in the mCherry<sup>high</sup> fraction compared to the mCherry<sup>neg</sup> control cells (**Figure 2F**). However, when we compared the cell migration with the miR-675 inhibitor in the mCherry<sup>neg</sup> and mCherry<sup>high</sup> fractions, we observed an increase of the migration in the presence of the miR-675 inhibitor in mCherry<sup>high</sup> (**Figure 2G**). This suggests that, with a two-fold gene expression, the lncRNA *H19* per se is able to increase the migration independently of miR-675.

We next determined the role of *H19* and miR-675 in the cell invasion by using Transwell previously coated with collagen. In MCF-7 or MDA-MB-231 cells stably overexpressing *H19* mRNA, the cell invasion was significantly increased compared to the mock cells (**Figure 3A**). Accordingly, *H19* knockdown using siRNA reduced the invasive capacities of parental MCF-7, MDA-MB-231 or SUM159PT cells (**Figure 3B**). The miR-675 expression significantly increased the invasion, as observed in MDA-MB-231 cells stably overexpressing miR-675 (**Figure 3C**) or in MCF-7 and SUM159PT cells transfected with miR-675 mimics (**Figure 3D**). The invasion of mCherry<sup>high</sup> cells was also increased when compared to mCherry<sup>neg</sup> cells (**Figure 3E**). The miR-675 inhibitor diminished the invasion of mCherry<sup>high</sup> cells compared to the control cells (**Figure 3F**), highlighting the involvement of miR-675 in the *H19*-induced invasion. However, in the same way as for the cell migration, we observed an increase of the invasion in the presence of the miR-675 inhibitor in mCherry<sup>high</sup> (**Figure 3G**), suggesting that the lncRNA *H19*-induced invasion does not require miR-675 action.

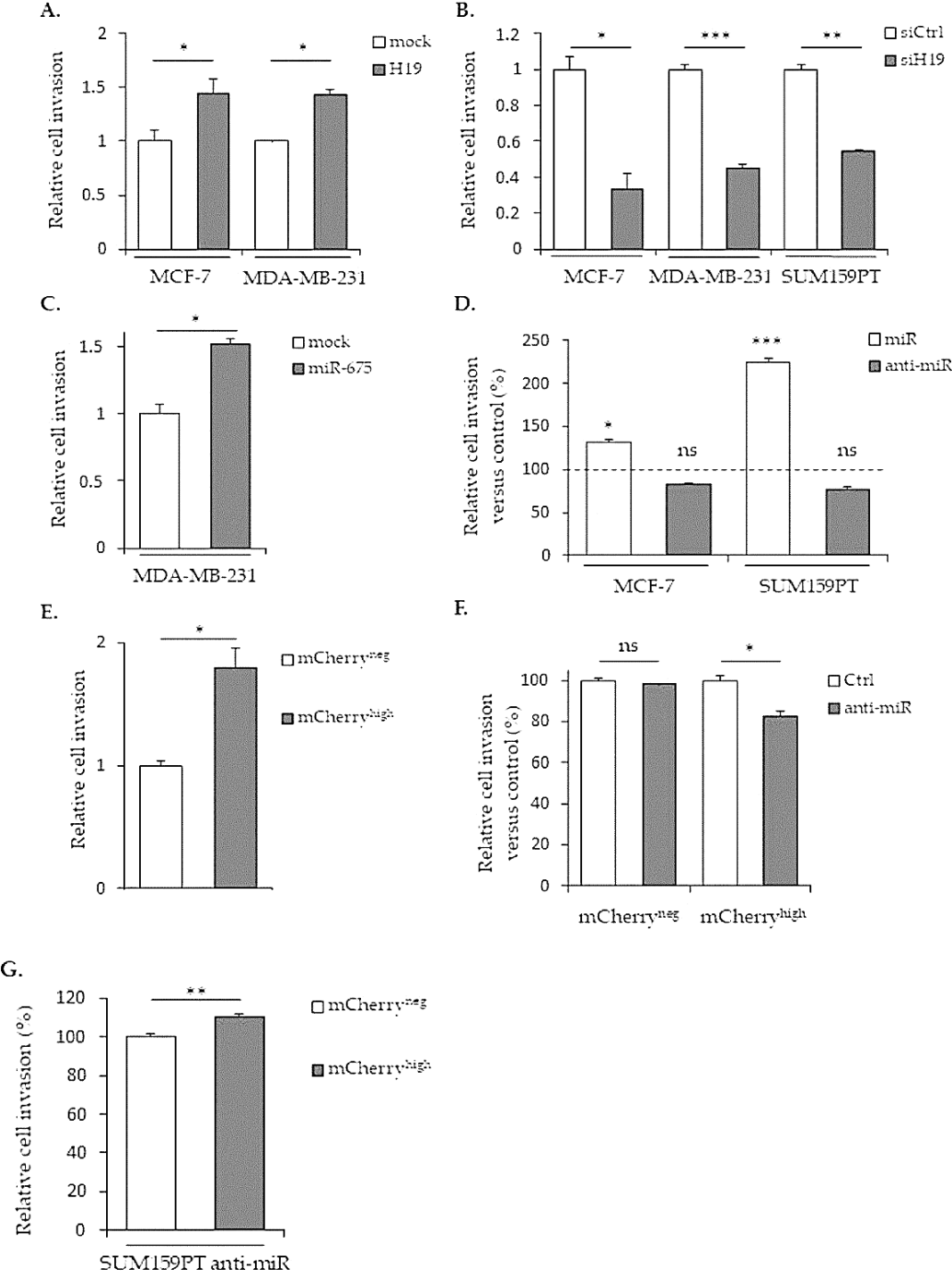
All together, these data show that both *H19* and miR-675 are able to promote the migration and invasion of breast cancer cells.



**Figure 2.** *H19* and miR-675 both promote breast cancer cell migrations. **(A)** Control (mock) or *H19*-stably overexpressing cells (*H19*) were cultured in Transwell for 24 h. Migrated cells were then incubated with 1-mM Hoescht 33258 and counted. **(B)** Migratory capacities of the control (siCtrl) and *H19*-knockdown cells (siH19) determined by Transwell assay. **(C)** MDA-MB-231 control (mock) or miR-675-stably overexpressing cells (miR-675) were cultured in Transwell for 24 h. Migrated cells were then incubated with 1-mM Hoescht 33258 and counted. **(D)** Migratory capacities of miR-675-transfected cells (miR) or miR-675-specific inhibitor transfected cells (anti-miR) determined by Transwell assay. Results are presented as a percentage of the control. **(E)** Relative migratory capacities



of SUM159PT-pH19-mCherry<sup>neg</sup> versus SUM159PT-pH19-mCherry<sup>high</sup> determined by Transwell assay. (F) Migratory capacities of miR-675-specific inhibitor transfected cells (anti-miR). Results are presented as a percentage of the control. (G) Migratory capacities of miR-675-specific inhibitor transfected cells (anti-miR). Results are presented as a percentage of the mCherry<sup>neg</sup> condition. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ ; ns: not significant.



**Figure 3.** *H19* and miR-675 participate in the breast cancer cells invasion. (A) Control (mock) or *H19*-stably overexpressing cells (*H19*) were cultured in Transwell for 24 h. Invasive cells were then

incubated with 1-mM Hoescht 33258 and counted. **(B)** Invasive capacities of the control (siCtrl) and *H19*-knockdowned cells (siH19) determined by Transwell assay. **(C)** MDA-MB-231 control (mock) or miR-675-stably overexpressing cells (miR-675) were cultured in Transwell for 24 h. Invasive cells were then incubated with 1-mM Hoescht 33258 and counted. **(D)** Invasive capacities of miR-675-transfected cells (miR) or miR-675-specific inhibitor transfected cells (anti-miR) determined by Transwell assay. Results are presented as the percentage of the control. **(E)** Relative invasive capacities of SUM159PT-pH19-mCherry<sup>neg</sup> versus SUM159PT-pH19-mCherry<sup>high</sup> determined by Transwell assay. **(F)** Invasive capacities of miR-675-specific inhibitor transfected cells (anti-miR). Results are presented as the percentage of the control. **(G)** Invasive capacities of miR-675-specific inhibitor transfected cells (anti-miR). Results are presented as a percentage of the mCherry<sup>neg</sup> condition. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ ; ns: not significant.

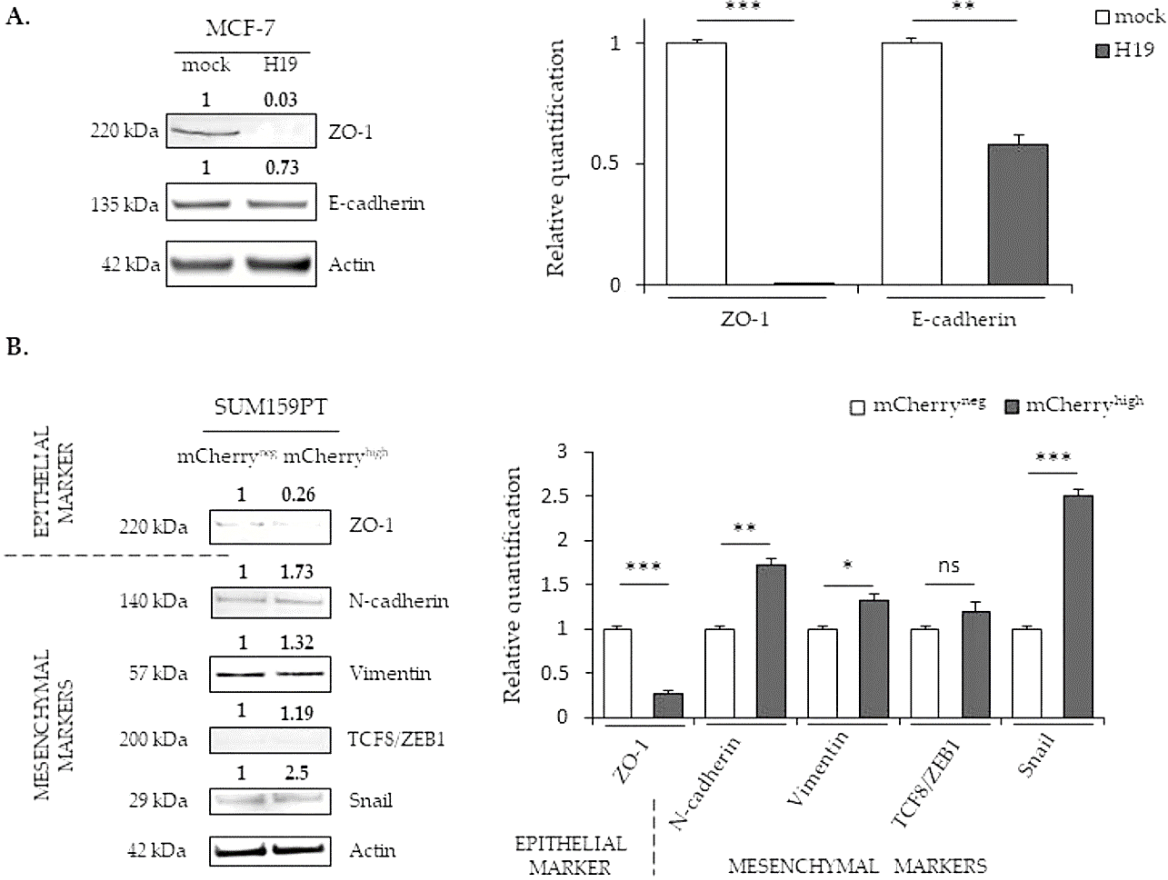
### 2.3. LncRNA H19 and miR-675 Differentially Regulate the Expression of Epithelial and Mesenchymal Markers

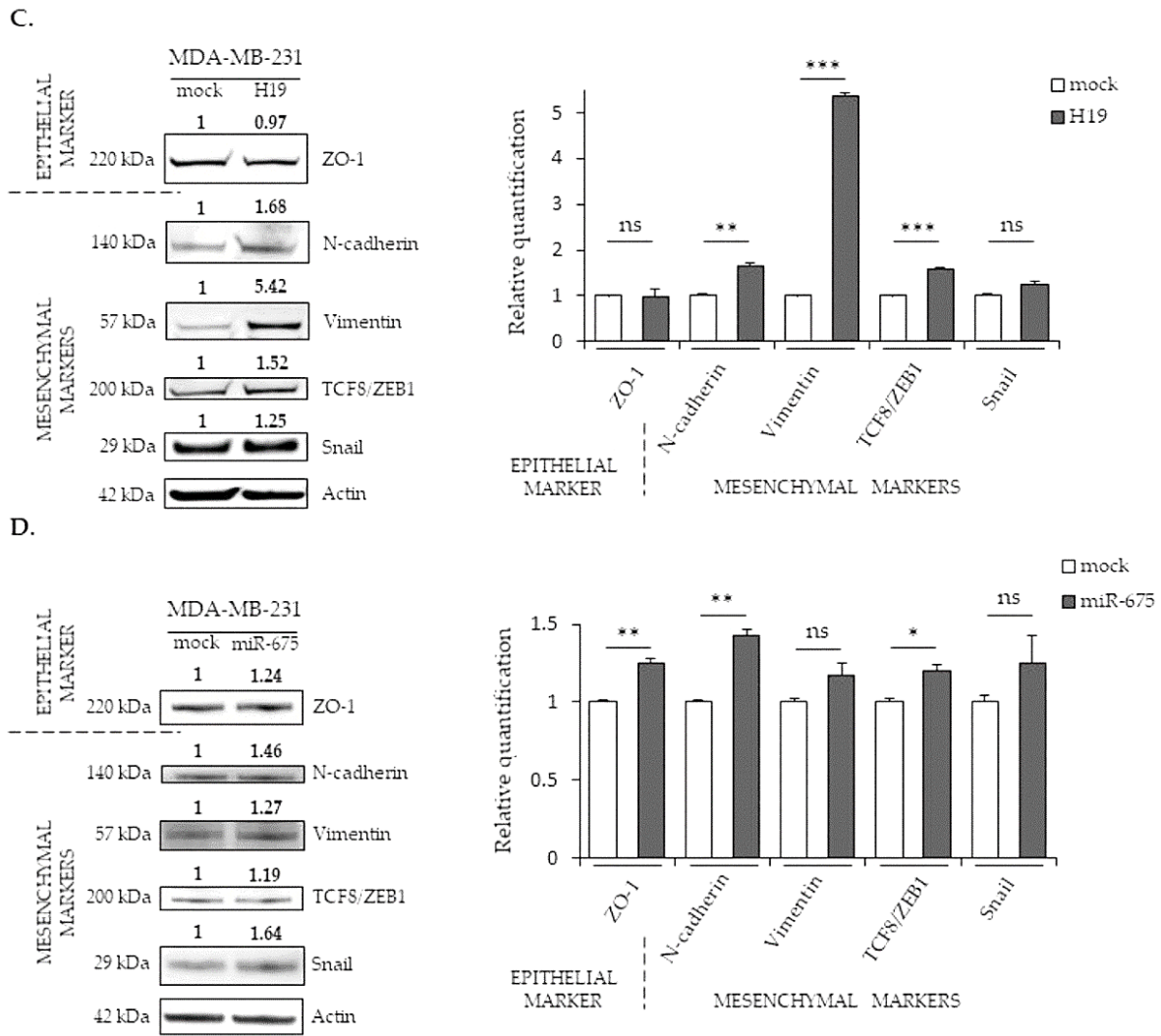
Enhanced mobility and invasive abilities are required for cancer cells to invade the surrounding tissues and promote metastatic development. These properties are also part of the phenotype changes due to the epithelial-to-mesenchymal transition (EMT). The EMT is a process in which cells lose their epithelial characteristics to acquire new properties of mesenchymal cells. During the EMT, epithelial cells undergo dramatic molecular modifications with the downregulation of tight- and adherent-junction proteins such as ZO-1 and E-cadherin and the upregulation of specific markers of mesenchymal cells, including N-cadherin, vimentin and fibronectin. The expression of these markers is regulated by numerous transcriptional factors such as TCF8/ZEB1 and Snail. In a first approach to study the EMT process, we measured, by Western blot, the expression of molecular markers of epithelial or mesenchymal phenotypes (**Figure 4**).

ZO-1 is a protein that forms tight junctions. It binds transmembrane proteins to the actin cytoskeleton. E-cadherin participates in intramembrane junctions to modify the cell morphology by modulating the cytoskeleton. The TCF8/ZEB1 transcription factor inhibits adhesion junctions by suppressing the expression of E-cadherin, whereas the Snail transcription factor suppresses ZO-1 expression. Vimentin is of mesenchymal origin; it modulates the structural dynamics and reorganizes the intermediate filaments. In MCF-7 cells displaying an epithelial phenotype, the expression of mesenchymal markers is not detected in whatever *H19* level. However, ZO-1 and E-cadherin proteins (epithelial markers) are less expressed in MCF-7 cells overexpressing *H19* compared to control cells (**Figure 4A**). In SUM159PT cells presenting less epithelial phenotypes than MCF-7 cells, a decrease of the ZO-1 expression and an increase of N-cadherin, vimentin, and Snail protein levels were observed in the mCherry<sup>high</sup> cells compared to the mCherry<sup>neg</sup> cells (**Figure 4B**). Interestingly, the expressions of mesenchymal markers (TCF8/ZEB1, N-cadherin, vimentin and Snail) were further enhanced in MDA-MB-231 cells stably overexpressing *H19* (**Figure 4C**). Together, these data indicate that, whatever the

initial phenotypes of the cells, high levels of *H19* promote the EMT by decreasing the expression of epithelial markers and/or increasing the expression of mesenchymal markers.

The expression profile of the EMT markers in MDA-MB-231 cells stably overexpressing miR-675 was quite surprising, with an increased expression for both the epithelial marker ZO-1 and the mesenchymal markers TCF8/ZEB1 and N-cadherin (Figure 4D). In addition, vimentin and Snail expressions were not significantly modified (Figure 4D). These modifications suggest a hybrid phenotype induced by miR-675.





**Figure 4.** The effects of *H19* and miR-675 on the expressions of the epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) markers. (A) EMT protein expressions in the MCF-7 control (mock) or *H19*-stably overexpressing cells (H19), determined by Western blot analysis. (B) EMT protein expressions in SUM159PT-pH19-mCherry<sup>neg</sup> (mCherry<sup>neg</sup>) or SUM159PT-pH19-mCherry<sup>high</sup> (mCherry<sup>high</sup>), determined by Western blot analysis. (C) EMT protein expressions in the MDA-MB-231 control (mock) or *H19*-stably overexpressing cells (H19), determined by Western blot analysis. (D) EMT protein expressions in the MDA-MB-231 control (mock) or miR-675-stably overexpressing cells (miR-675), determined by Western blot analysis. For each panel, actin was used as the equi-loading control. The relative signal intensities were quantified by ImageJ and shown above the protein bands for the representative experiment figure. The quantification of the triplicate is figured in the graph beside. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ ; ns: not significant. Uncropped blots are shown in **Figures S1–S22**.

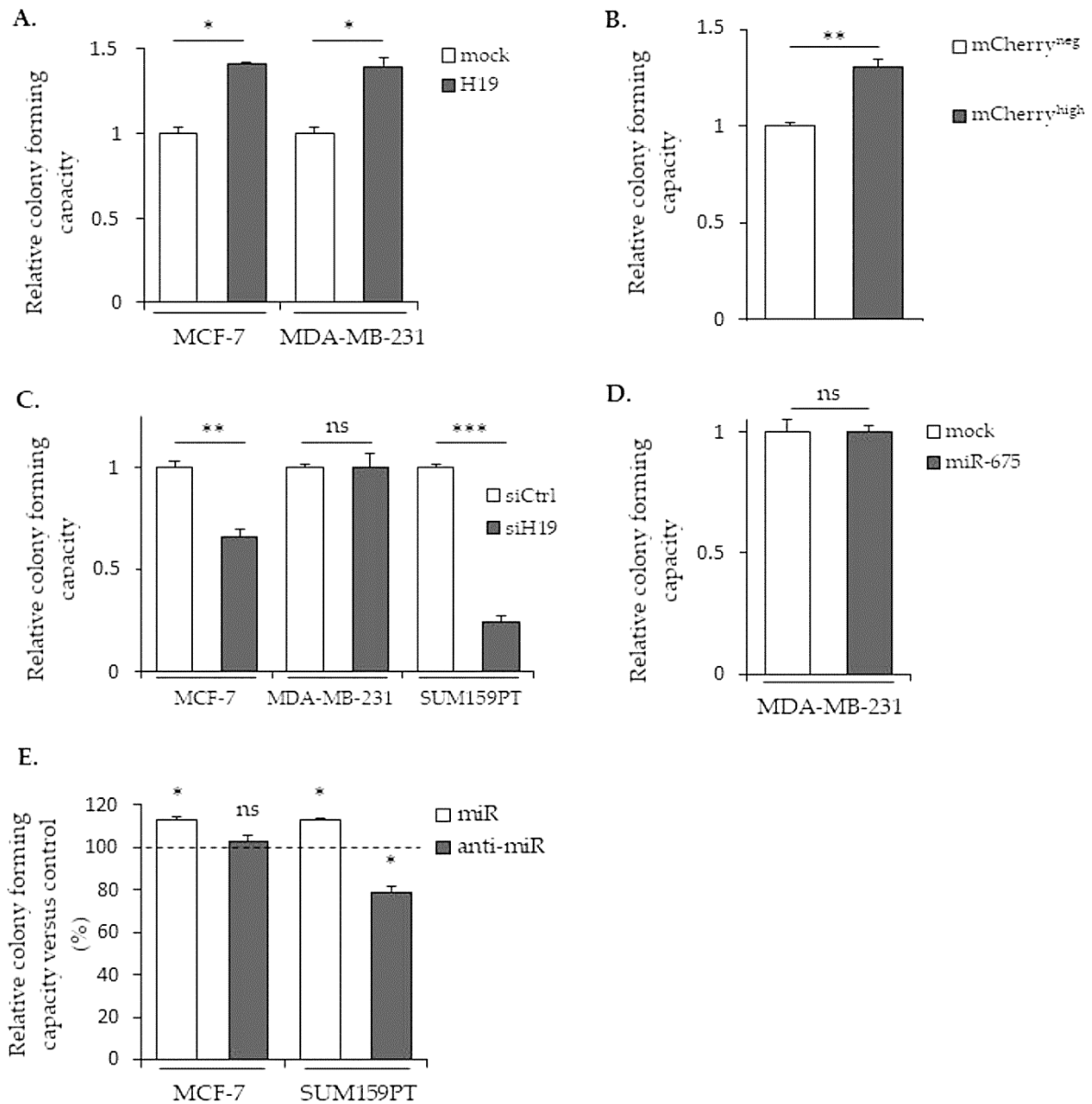
#### 2.4. LncRNA H19 and miR-675 Promote Breast Cancer Colony Formation

The clonogenic assay is an in vitro cell survival assay based on the ability of a single cell to survive and grow into a colony, which is indicative of cancer cell aggressiveness. We thus performed clonogenicity assays with cells expressing different levels of *H19* and miR-675 (**Figure 5**). As shown in **Figure 5A**, MCF-7 and MDA-MB-231 cells stably overexpressing *H19* formed more colonies compared to the controls. Similar results were observed in mCherry<sup>high</sup> compared to mCherry<sup>neg</sup> SUM159PT cells (**Figure 5B**). Furthermore, *H19* knockdowns using siRNA induced a decrease in colony formation of native MCF-7 and of SUM159PT cell lines (**Figure 5C**). These results indicate that *H19* is able to enhance the clonogenicity of breast cancer cells. The effect of miR-675 in colony formations varied according to the cell lines used: MDA-MB-231 cells stably overexpressing miR-675 displayed a similar colony formation ability when compared to the control cells (**Figure 5D**). In contrast, miR-675 mimics increased colony formations in MCF-7 and SUM159PT cells, while anti-miR-675 decreased colony formations only in SUM159PT cells (**Figure 5E**).

#### 2.5. LncRNA H19 and miR-675 Enhance the Stemness Properties of Breast Cancer Cells

To further investigate the involvement of LncRNA *H19* and miR-675 in breast cancer cell aggressiveness, we then investigated if LncRNA *H19* and miR-675 could endow the cells with stemness properties. For this, a meta-analysis on the gene expression data of more than 5000 breast tumor samples [25] was first carried out to explore the correlation of *H19* expression and that of the stem cell gene signature. Two published gene signatures were used, one obtained with cells expressing the ALDH1a1 isoform [26] and the other with cells harboring a combination of the overexpression of CD44 and a low expression of CD24 (CD44+/CD24-) [27]. Tumors were classified as *H19*<sup>high</sup> and *H19*<sup>low</sup> according to the expression of *H19* higher or lower, respectively, to the median expression value. For each stem cell signature tested, we observed a higher expression of *H19* in tumors expressing the signature, suggesting that LncRNA *H19* may play a role in breast cancer stem cells (**Figure 6A**).

We then analyzed by RT-qPCR the expression of the different markers involved in the cancer stem cells' biology (*Sox2*, *Oct3/4*, *Notch1*, *Nanog*, *Abcg2*, *Aldh1a1* and *Aldh1a3*). As expected, a correlation was found between *H19* and miR-675. Of note, although the expressions of *H19* and miR-675 were generally correlated with that of cancer stem cell markers, some differences existed depending on the considered cell line. For example, diminutions of *Notch1*, *Aldh1a1* and *Aldh1a3* expressions were observed in the MCF-7 and MDA-MB-231 cell lines, contrary to SUM159PT cells. Similarly, the *Nanog* expression was increased in MDA-MB-231 and in SUM159PT cells but not in MCF-7 cells (**Figure 6B**).



**Figure 5.** Effects of *H19* and miR-675 in colony formations. **(A)** The clonogenic capacities of the control (mock) or *H19*-overexpressing cells (H19). **(B)** The relative clonogenic capacities of SUM159PT-pH19-mCherry<sup>neg</sup> versus SUM159PT-pH19-mCherry<sup>high</sup>. **(C)** The clonogenic capacities of the control (siCtrl) and *H19*-knockdown cells (siH19). **(D)** The clonogenic capacities of the MDA-MB-231 control (mock) or miR-675-overexpressing cells (miR-675). **(E)** The clonogenic capacities of the miR-675-transfected cells (miR) or miR-675-specific inhibitor transfected cells (anti-miR). Results are presented as a percentage of the control. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ ; ns: not significant.

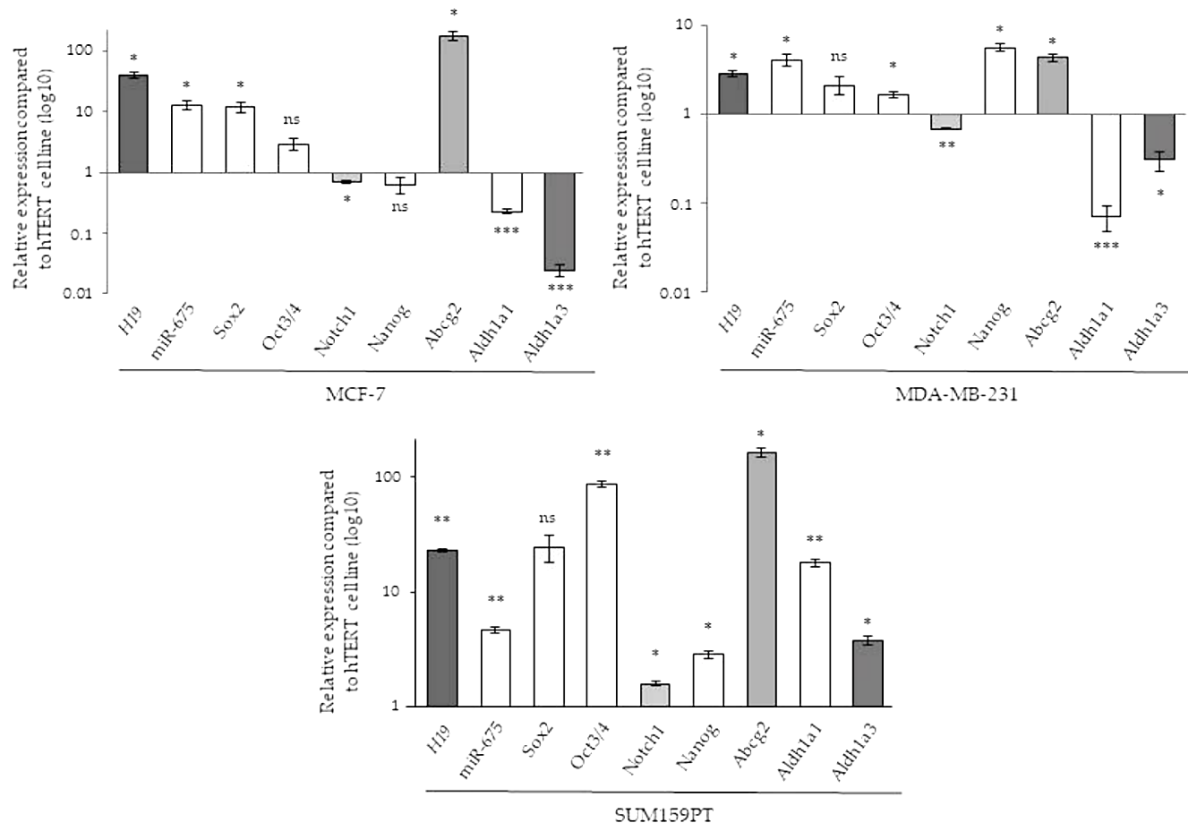
A.

	Aldh1a1 negative	Aldh1a1 positive	p-value
H19 low	49 %	51 %	1,27E-10
H19 high	39 %	61 %	

	CD44+/CD24- negative	CD44+/CD24- positive	p-value
H19 low	91 %	9 %	4,07E-24
H19 high	81 %	19 %	

B.



**Figure 6.** The expression of *H19*, miR-675 and different stem cell markers. **(A)** The expression of the *H19* gene in mammary tumors expressing or not stem cell signatures. The table represents the *H19* gene expression dependent on the gene signature of the tumors. Two gene signatures were used, one obtained in cell expressing ALDHA1 and the other in CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup>. **(B)** The relative expression of *H19*, *Sox2*, *Oct3/4*, *Notch1*, *Nanog*, *Abcg2*, *Aldh1a1* and *Aldh1a3* genes and miR-675 in MCF-7, MDA-MB-231 and SUM159PT cells. The expression levels were related to the expression levels in hTERT cells indexed to 1. For panel A, a Fisher's exact test was performed. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ ; ns: not significant

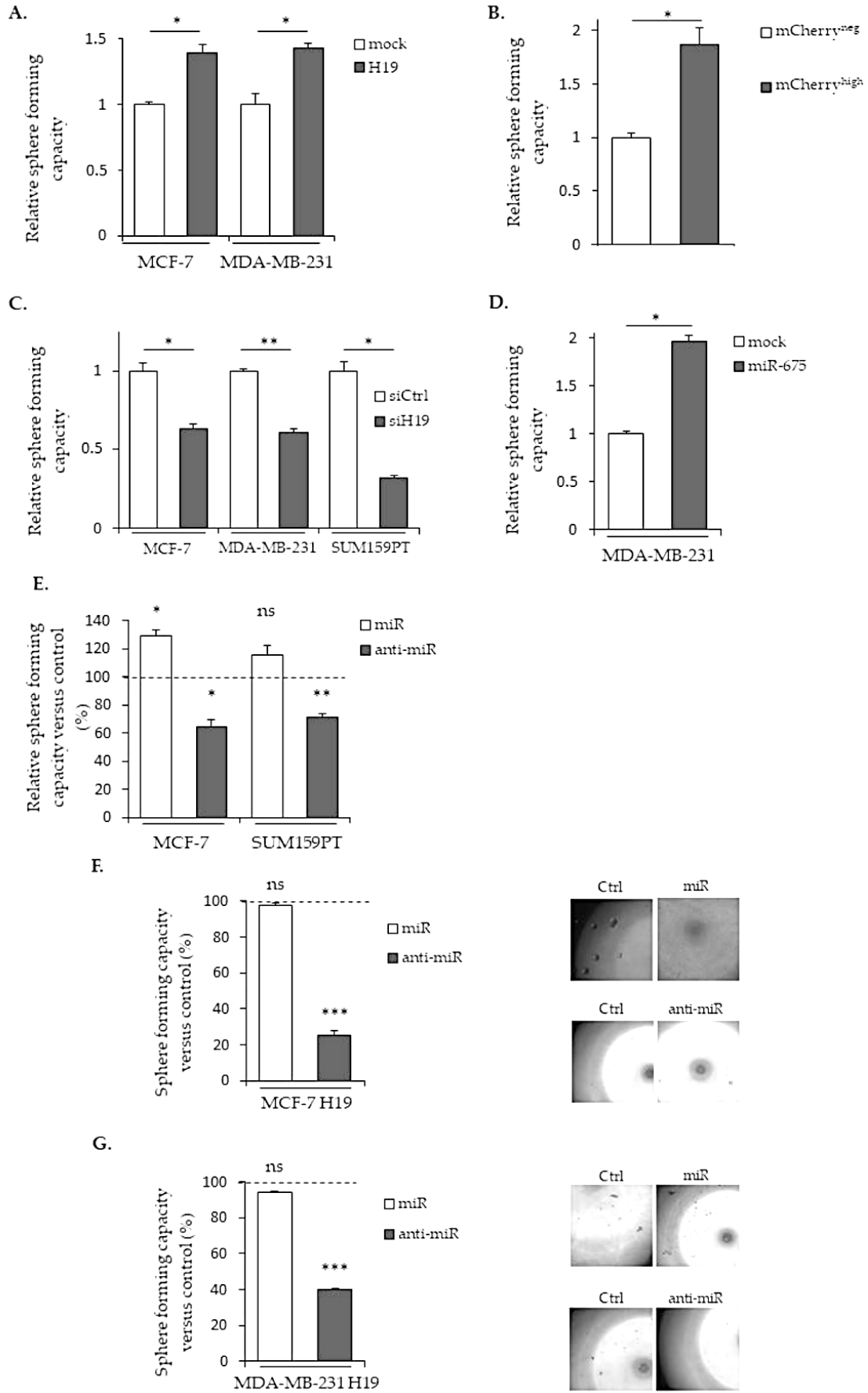


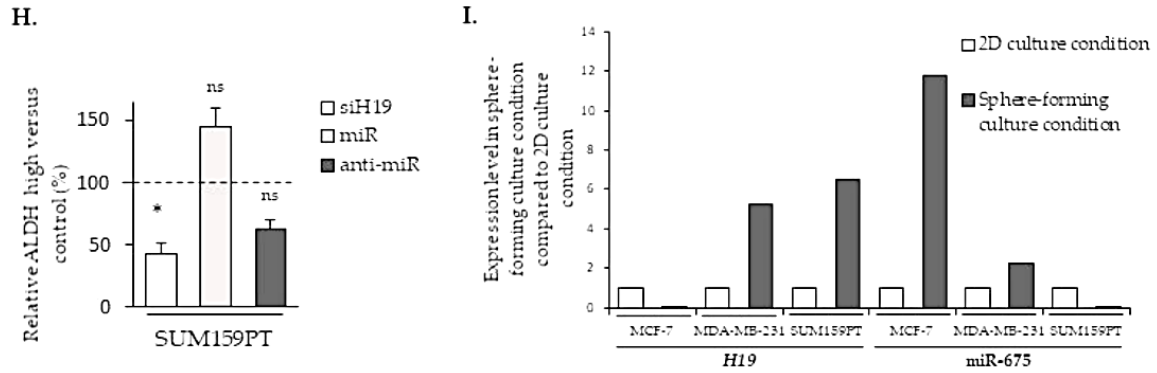
The sphere-forming capacity of cells is used as the gold standard in an in vitro functional assay to analyze the ability of cancer stem cells to proliferate under anchorage-independent conditions in a defined medium [28]. As shown in **Figure 7A**, the MCF-7 and MDA-MB-231 cells stably overexpressing *H19* formed more spheres compared to the controls. Similarly, the ability of cells to form spheres was also increased in mCherry<sup>high</sup> SUM159PT cells compared to mCherry<sup>neg</sup> ones (**Figure 7B**). A decrease of the sphere-forming capacity was observed in the native three cell lines when *H19* was knocked down with siRNA (**Figure 7C**), confirming that *H19* was able to enhance the sphere-forming capacity of breast cancer cells. On the other hand, MDA-MB-231 cells stably overexpressing miR-675 also formed more mammospheres (**Figure 7D**). Similarly, the miR-675 mimic increased and the miR-675 inhibitor decreased the sphere-forming capacity of native MCF-7 and SUM159PT cells (**Figure 7E**), indicating that miR-675 was also involved in the sphere-forming capacity of breast cancer cells. Interestingly, the miR-675 mimic did not further increase the sphere formation in MCF-7 and MDA-MB-231 cells overexpressing *H19*. However, the anti-miR transient expression induced a decrease of the sphere formation by 70% in MCF-7 cells (**Figure 7F**) and by 60% in MDA-MB-231 cells *H19* (**Figure 7G**). Complementarily, we performed an ALDEFLUOR assay on the intact and viable cells after the siRNA *H19*, miR-675 mimic and miR-675 inhibitor transient expressions. The siRNA *H19* induced a diminution of the ALDH<sup>high</sup> subpopulation compared to the control cells, suggesting that *H19* enriched for breast cancer stem cells. Similar trends, though not significant, were observed in cells that were transfected with the miR-675 mimic or inhibitor (**Figure 7H**).

Enhanced sphere formations by *H19* and miR-675 prompted us to determine their expressions in native cells under culture conditions favoring stem cell proliferations. We observed an increased expression of *H19* in MDA-MB-231 and SUM159PT and an increased expression of miR-675 in MCF-7 in these conditions when compared to a monolayer culture (**Figure 7I**).

Collectively, these results demonstrate the involvement of *H19* and miR-675 in the enrichment of cancer stem cells.







**Figure 7.** *H19* and miR-675 enhance the sphere formation of breast cancer cells. (A) Sphere-forming capacities of the control (mock) or *H19*-stably overexpressing cells (*H19*). (B) The relative sphere-forming capacities of SUM159PT-p*H19*-mCherry<sup>neg</sup> versus SUM159PT-p*H19*-mCherry<sup>high</sup>. (C) The sphere-forming capacities of the control (siCtrl) and *H19*-knockdown cells (si*H19*). (D) The sphere-forming capacities of the MDA-MB-231 control (mock) or miR-675-stably overexpressing cells (miR-675). (E) The sphere-forming capacities of miR-675-transfected cells (miR) or miR-675-specific inhibitor transfected cells (anti-miR). Results are presented as a percentage of the control. (F) The sphere-forming capacities of MCF-7 *H19*-stably overexpressing cells transfected with miR-675 (miR) or the miR-675-specific inhibitor (anti-miR). Results are presented as a percentage of the control. Representative pictures for each condition are shown. (G) The sphere-forming capacities of MDA-MB-231 *H19*-stably overexpressing cells transfected with miR-675 (miR) or the miR-675-specific inhibitor (anti-miR). Results are presented as a percentage of the control. Representative pictures of each condition are shown. (H) ALDEFLUOR-positive subpopulations defined by the ALDEFLUOR assay in *H19*-knockdown cells (si*H19*), miR-675-transfected cells (miR) or miR-675-knockdown cells (anti-miR). Results are presented as a percentage of the ALDEFLUOR-positive subpopulation in the native cells. (I) The expression levels of *H19* and miR-675 in the cell lines cultured in sphere-forming conditions versus the same cell lines cultured in 2D conditions. \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ ; ns: not significant.

### 3. Discussion

The long non-coding RNA *H19* has been shown to intervene at multiple steps of tumorigenesis, such as cell proliferation, migration, invasion, induction of the epithelial-to-mesenchymal transition and metastasis [13]. However, several data indicate that *H19*-derived miR-675 could also be implicated in these oncogenic cellular processes [20,22,23]. Our work focuses on the roles of both *H19* and miR-675 in metastasis-related phenotypes such as migration, invasion, the EMT, colony formation and stemness properties.

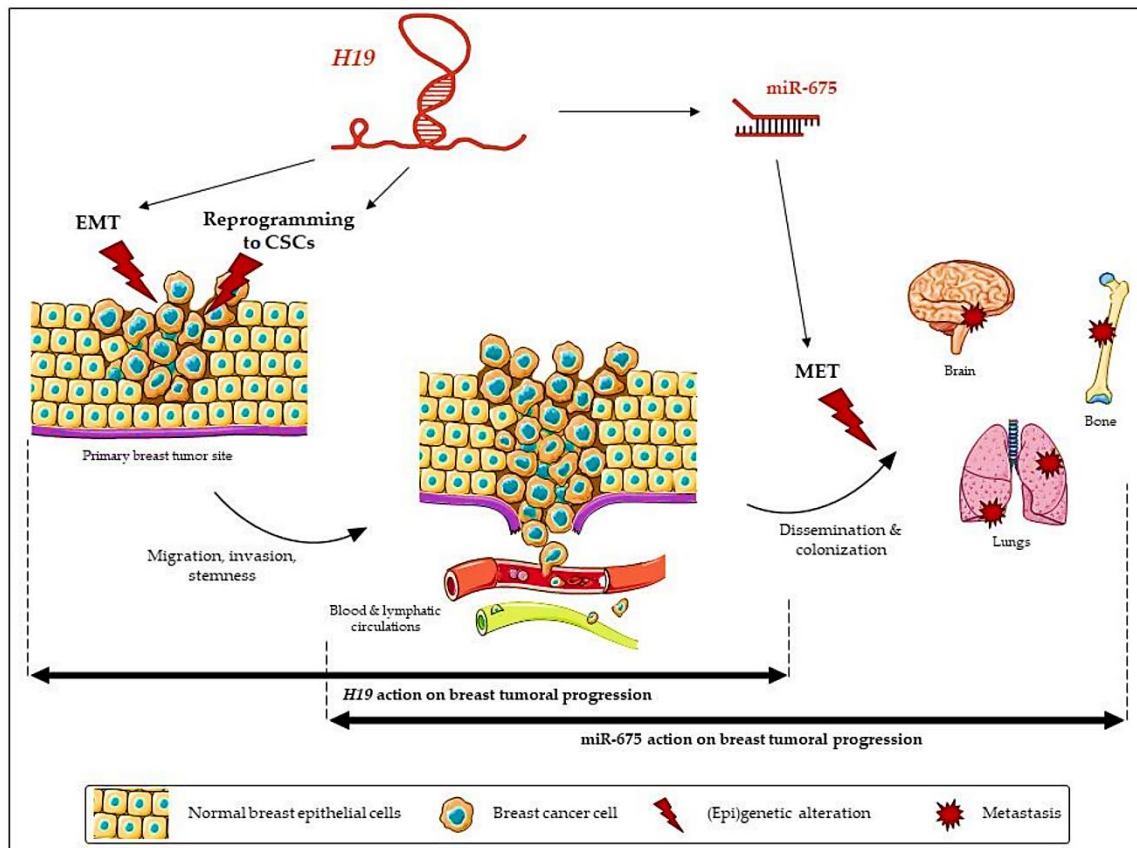
We assessed the breast cancer invasion by the transplantation of cells in zebrafish embryos. Indeed, cell lines from a variety of human cancers, including metastatic melanoma, pancreatic, ovarian, breast, glioma and colorectal cell lines, are capable of proliferating, invading and forming tumor masses in the zebrafish embryo during xenotransplantation studies [29,30]. The Tg(*fli1*:GFP) transgenic

line used in this study allowed us to visualize blood vessels in the living host and to allow for the analysis of cancer cells after their intravasation into the blood vessels. We demonstrated that both *H19* and miR-675 overexpressing cells were able to more efficiently colonize zebrafish.

In vitro, *H19* and miR-675, alone or together, participate in cellular migration and invasion; migration and invasion are enhanced by both the miR-675 mimic transient expression and miR-675 overexpression but, also, by *H19* overexpression. On the contrary, decreases in the migration and invasion are observed upon *H19*-silencing or miR-675-inhibitor transient expressions. However, we observed that the miR-675 inhibitor has different effects according to the cell types, probably reflecting their basal levels of *H19* expressions or their molecular classifications. Indeed, the MCF-7 cell line is a luminal-like subtype, whereas the MDA-MB-231 cell line is a triple-negative subtype. To reinforce this hypothesis, it has been shown that *H19* is associated with a poor prognosis in triple-negative breast cancer patients [31].

Both *H19* and miR-675 are able to modulate the expressions of the EMT markers, although their actions differ according to the cell types. In the MCF-7 cell line, *H19*-overexpressing cells displayed decreased expressions of epithelial markers. By contrast, in MDA-MB-231 and in SUM159PT pH19-mCherry<sup>high</sup> cells, high levels of *H19* were associated with increased expressions of mesenchymal markers, and, very interestingly, SUM159PT pH19-mCherry<sup>high</sup> cells also displayed decreased expressions of the epithelial marker ZO-1. Our results are in agreement with the work of Liao et al., who demonstrated that the lncRNA *H19* induces the proliferation and invasion of lung cancer cells via the overexpression of N-cadherin and vimentin and the decrease of E-cadherin [32]. In MDA-MB-231 cells, miR-675 promotes ZO-1 and N-cadherin expressions. These results highlight an interesting difference of action between *H19* and miR-675. In the same cell line, *H19* favors the expression of EMT markers, whereas the action of miR-675 seems ambiguous by favoring the expression of both mesenchymal and epithelial markers, suggesting the role of miR-675 in both the EMT and mesenchymal-to-epithelial transition (MET). Indeed, the miR-675 alone does not induce the same molecular determinants as *H19*. These data reveal that *H19* and miR-675 participate in both the migration and invasion, yet *H19* and miR-675 do not exert the same role during the molecular events of the EMT. The MET is essential to colonize and proliferate in the different stages of metastasis [33]. Thus, *H19* and miR-675 could have sequential effects leading to metastasis; *H19* would favor the departure of cells from the primary tumor by promoting the EMT, while miR-675 would also favor a metastatic colonization and the development of secondary tumors by inducing the MET (Figure 8). Alternately, an intermediate status between the epithelial and mesenchymal phenotypes, i.e., the hybrid epithelial-mesenchymal state, is increasingly described to be involved in migration and invasion. The hybrid phenotype endows cancer cells with a more plastic status to adapt the stressful

environment for the metastasis formation [34]. Indeed, the hybrid phenotype may contribute to the cancer collective cell migration and, in fine, to metastasis [35]. Our data suggested that miR-675 could favor the acquisition of this hybrid phenotype to favor metastases.



**Figure 8.** The relative contribution of long non-coding (lnc)RNA *H19* and its miR-675 in breast cancer progression.

The epithelial-to-mesenchymal transition is an important cellular mechanism corresponding to a differentiation from an epithelial cell to a mesenchymal-like cell. It involves multiple molecular pathways [36]. The EMT appears essential for embryonic development and tissue repair but, also, for the progression of cancer and metastases [37]. The role of miR-675 in the EMT is not described, and the role of *H19* in the EMT appears contradictory. Numerous data indicate that *H19* promotes the EMT [38,39,40] in various tissues, including the breast [41], but Zhang and collaborators demonstrated that *H19* is implied in the metastasis suppression of hepatocellular carcinoma [42]. Our results showing the contrary effects of *H19* and miR-675 could explain these discrepancies.

As previously indicated, the lncRNA *H19* can act at multiple levels of regulation, more particularly by sponging microRNAs. For instance, Lv et al. demonstrated that the upregulation of *H19* promotes the migration and invasion in bladder cancer by sponging miR-29b-3p. However, the knockdown of *H19* allowed miR-29b-3p to facilitate the MET [43]. It is also known that the miR-200 family (miR-

200a, miR200b, miR-200c, miR-141 and miR-429) is involved in the EMT via the ZEB1/E-cadherin pathway [44,45]. Indeed, these microRNAs regulate ZEB1 and ZEB2 proteins through the repressed E-cadherin expression. ZEB1 and ZEB2 are transcriptional factors implicated in metastasis. When the miR-200 family is inhibited, the EMT is induced, and, conversely, the expression of these microRNAs leads to the MET [46]. Many studies show that *H19* inhibits members of miR-200 family [47]. Indeed, *H19* sponges miR-200a or miR-200b/c to promote cancer metastasis through ZEB1 and ZEB2 upregulations [48,49].

Complementarily, we explored the role of *H19* and miR-675 in the resistance to anoikis. Anoikis is a cell death induced by the detachment of a cell from the extracellular matrix. This cellular phenotype is involved in the metastatic development; indeed, during invasion, cells have to break their adhesions so that they can reach the secondary tumor site. To evaluate the role of *H19* and miR-675 in this process, we studied the resistance to anoikis in breast cancer cell lines overexpressing *H19* or miR-675. The anoikis resistance assay in MCF-7 cells stably overexpressing or not *H19* does not show any long-term statistical differences. In the same way, the viability of MDA-MB-231 cells overexpressing *H19* or miR-675 does not show any significant variation compared to the control.

In connection with the phenotypes linked to the EMT, we further investigated the involvement of *H19* in the regulation of breast cancer stem cells. Indeed, *H19* has already been associated with stemness in breast cancer [16,31,50], in part by favoring symmetric division. In this report, we highlight a correlation between the expression of the *H19* gene and the presence of stem cell markers in a cohort of more than 5000 breast cancer clinical samples. A gene signature of cells expressing two stemness markers, CD44+/CD24- and ALDH1A1 [51,52], is correlated with the *H19* expression. In addition, our results indicate that the overexpression of *H19* and miR-675 observed in cancer cells is accompanied overall with an overexpression of different stem cell markers such as *Sox2*, *Oct3/4* and *Abcg2* in breast cancer cell lines. We observed an increase of *Nanog* only in MDA-MB-231 and SUM159PT triple-negative breast cancer cells and an increase of *Notch1*, *Aldh1a1* and *Aldh1a3* only in the SUM159PT cell line. In these latter cells, the activity of ALDH is decreased with siRNA-targeting *H19* and with the miR-675 inhibitor but is enhanced by the transient expression of the miR-675 mimic. To our knowledge, it is the first time that the role of miR-675 on cancer cells' stemness has been described. *Nanog*, *Sox2* and *Oct3/4* are transcription factors largely described in the literature for their involvement in the maintenance of self-renewal and pluripotency of embryonic stem cells [53]. Their implication in cancer stem cells' regulation has also been demonstrated [54]. *Abcg2* is an efflux pump associated with the drug resistance of cancer stem cells [54]. A transcriptional regulatory network involving *Sox2*, *Oct3/4* and c-Myc ensures the maintenance of the stem cell pluripotency [53]. Interestingly, c-Myc has been shown to bind alleles

specifically upstream of the promoter of the *H19* gene in order to promote its transcription [55]. Similarly, *Sox2* and *Oct3/4* are able to bind upstream of the *H19* gene [56]. This fixation prevents the promoter methylation on the maternal allele and, therefore, contributes to the gene expression. The control of the *H19* gene by these three factors suggests that *H19* may be a factor involved in the stem cell regulation.

It is often described that miRNAs have a similar role to the host genes that produce it. However, in several cases, miRNAs have antagonistic actions against its host gene [57]. For instance, in breast cancer, miR-301 derived from *SKA2* gene, which has an oncogenic action, negatively regulates tumor suppressors such as PTEN [58]. Conversely, miR-483-5p, derived from the *IGF2* gene, inhibits angiogenesis, unlike its host gene [59]. In our work, we show a similar role and/or antagonist actions of miR-675 and its host gene *H19*, depending on the phenotype studied. Indeed, *H19* and miR-675 have similar functions during the cellular migration and invasion and seem to regulate stemness in the same manner. By contrast, their role would be antagonistic during the epithelial-to-mesenchymal transition and colony formation.

We show that miR-675 modulates the phenotypes associated with the occurrence of metastases in breast cancer cells. However, miR-675 generates two mature miRNAs (miR-675-5p and miR-675-3p), both of which have different targets [60]. A logical continuation of this work will therefore be to determine which mature miRNA is associated with these phenotypes.

In continuation of this investigation, it would be interesting to study the molecular targets involved in the occurrence and the development of breast cancer metastases. Despite the similarity of the phenotypes observed, lncRNA *H19* and miR-675 may not have the same molecular determinants and, therefore, use distinct signaling pathways. lncRNA *H19* induces the cell migration and invasion by different mechanisms, depending on the cancers. Indeed, *H19* promotes the migration and invasion of colon cancer cells via the MAPK signaling pathway [61] and those of human osteosarcoma through the NF- $\kappa$ B pathway [62]. It would be relevant to investigate if these signaling pathways are similarly activated in breast cancer cells, as a better knowledge of the molecular determinants associated with the *H19* and miR-675 phenotypes in breast cancer progression would provide new therapeutic opportunities.

## **4. Materials and Methods**

### **4.1. Cell Culture**

The breast cancer cell lines MCF-7 estrogen-sensitive, MDA-MB-231 and SUM159PT estrogen-insensitive were maintained routinely in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Gibco), Roswell Park Memorial Institute medium (RPMI, Gibco) and Ham's F-12 Nutrient Mix (Gibco), respectively,

containing 10% fetal bovine serum (FBS) and 0.01% ZellShield (Clinisciences). F-12 medium was supplemented with 500  $\mu$ L of insulin (10 mg/mL), 27.8  $\mu$ L of hydrocortisone (100 mg/mL) and 5 mL of HEPES 1M. Each cell lines were obtained from the American Type Culture Collection and cultured at 37 °C with 5% CO<sub>2</sub> and 95% of air-humidified atmosphere. The MCF-7 and MDA-MB-231 cells arose from a pleural effusion of patients with metastatic breast adenocarcinoma. The SUM159PT cells came from a pleural effusion of patients with pleomorphic breast carcinoma. The immortalized cell line, hTERT, was cultured in MEGM (Lonza, Levallois, France) supplemented with 1% penicillin/streptomycin and served as the controls for the relative expression of the pluripotency genes.

#### 4.2. Establishment of H19 and miR-675 Overexpressing Cell Lines

To establish the cell lines overexpressing *H19*, the SUM159PT cell line was transfected with 1  $\mu$ g of pH19-mCherry using Nucleofector Amaxa (Lonza), and cells were allowed to recover for 48 h. Cells were then selected in the presence of hygromycin B at 0.6 mg/mL for at least one month before their use for in vitro experiments. The *H19* overexpressing MCF-7 and MDA-MB-231 cell lines and the miR-675 overexpressing MDA-MB-231 cell line were previously described [23].

#### 4.3. siRNA and miRNA Transfection

For siRNA transfection,  $1 \times 10^5$  cells were plated in 6-well plates. After 24h, cells were transfected with negative control (SR-CL000-005; Eurogentec) or *H19* siRNA (Table S1) using jetPRIME® Transfection Reagent, according to the manufacturer's guidelines (Polyplus Transfection®). Cells were lysed 48 h after transfection.

For miRNA transfection,  $1 \times 10^5$  cells were plated in 6-well plates. After 24 h, cells were transfected with Hsa-miR-675-5p mimic or its hairpin inhibitor with DharmaFECT-Duo, according to the manufacturer's guidelines (Thermo Fischer Scientific Dharmacon). Cells were lysed 48 h after transfection.

#### 4.4. RNA Extraction, Reverse Transcription and Real-time RT-PCR

RNA extraction and qRT-PCR were performed as previously described [63]. Primers used for qRT-PCR are described in Table S2.

miRNA extraction and qRT-PCR were performed as previously described [23].

#### 4.5. Migration and Invasion Assays

Cell migration and invasion were determined by Transwell assay. For migration assay,  $1 \times 10^4$  cells were seeded on a 0.045-mg/mL collagen (Millipore)-coated insert (0.8  $\mu$ M; BD Biosciences) of 12-well plates. After 8 h, cells migrating to the other side of the filter were stained with Hoescht 33258 1 mM and counted. For the invasion assay,  $4 \times 10^4$  cells were seeded on a 3-mg/mL collagen (Millipore)-



coated insert (0.8  $\mu$ M; BD Biosciences) of 12-well plates. After 24 h, cells invading to the other side of the filter were stained with Hoescht 33258 1 mM and counted.

#### 4.6. Colony-forming and Sphere-forming Capacities

In the clonogenic assay, 250 cells were seeded in 100-mm<sup>2</sup> dishes. After 15 days, wells were fixed with 4% paraformaldehyde and stained with 0.5% crystal violet and counted.

For the sphere-forming capacity, a ranging from 1024 cells to 1 cell were cultured in a sphere medium consisting of phenol red-free DMEM-F12 (Gibco), 0.4% bovine serum albumin (Sigma-Aldrich, St Quentin Fallavier, France), 10 mL of B27 additive (Invitrogen, Illkirch, France), 5 mg/mL of insulin (Sigma-Aldrich), 4  $\mu$ g/mL of heparin and 20 ng/mL of epidermal growth factor (EGF) and fibroblast growth factor (FGF) (Biotechne, Abingdon, OX, United Kingdom). Cells were seeded in 96-well low-adhesion plates. The number of spheres per well were counted 4 days later.

#### 4.7. Aldefluor Assay

To measure the ALDH1 enzyme activity,  $1 \times 10^6$  cells were suspended in a ALDEFLUOR assay buffer containing ALDH1 substrate (BAAA, 1  $\mu$ mol/L; StemCell) and incubated for 30 min at 37 °C. In each experiment, a sample of cells was incubated, under identical conditions, with 50 mmol/L of diethylaminobenzaldehyde as a negative control. Only the 30% most-negative cells were collected as ADLH- cells. Flow cytometry data were acquired on a CyAn ADP cytometer (Beckman Coulter, Villepinte, France) with Summit software. All analyses were performed with FlowJo software.

#### 4.8. Western Blot Analysis

Cell lysis, electrophoresis, protein transfer, immunoblotting and signal revelation were performed as previously described [23]. Primary antibodies used were anti-E-cadherin, anti-N-cadherin, anti-Snail, anti-TCF8/ZEB1, anti-vimentin, anti-ZO-1 (#9782; Cell Signaling) and anti-actin (A2066-2ML; Sigma, St Quentin Fallavier, France) as a loading control.

#### 4.9. Transgenic Zebrafish Xenograft

SUM159PT pH19-mCherry<sup>neg/high</sup> and MDA-MB-231 cells were incubated for 40 min in an atmosphere at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub>, with a solution of lipophilic tracers (Vybrant DiI labeling solution for mCherry<sup>high</sup> and for MDA-MB-231 cells overexpressing *H19* and miR-675, Vybrant DiD labeling solution for mCherry<sup>neg</sup> and, for each, a MDA-MB-231 control; Invitrogen) prepared in 1 mL of culture medium without FBS. Then, cells were dissociated with trypsin/0.25% EDTA (Gibco) and counted. One million cells of each condition were centrifuged at 100 *g* for 5 min. The pellet was resuspended with 100  $\mu$ L of PBS/EDTA 5 mM. From the laying, transgenic zebrafish (*fli1:GFP*) were placed in 0.2-mM 1-phenyl-2-thio-urea (Sigma) to prevent pigmentation up to 48 h postfertilization. Fish were anaesthetized with



0.04-mg/mL MS-222 (Sigma, A5040), and SUM159PT pH19-mCherry<sup>neg</sup> (DiD) and pH19-mCherry<sup>high</sup> (DiI) cells or MDA-MB-231 control cells (DiD) and MDA-MB-231-overexpressed *H19* or MDA-MB-321 control cells (DiD) and MDA-MB-231-overexpressed miR-675 cells (DiI) were coinjected using a stereomicroscope (LEICA M125) and a microinjector (FemtoJET; Eppendorf) in a yolk sac. After injection, zebrafish were placed in a solution of phenylthiourea and penicillin-streptomycin renewed every 2 days at 28 °C in the dark. During 48 h, the incubation temperature of the zebrafish varied (30 °C at 24 h and 32 °C at 48 h up to 3 days postinjection) to promote cell development. Fish were fixed with 4% paraformaldehyde solution and placed in Petri dishes with glass bottoms. Fluorescent pictures were captured using automated image acquisition software from ZEISS with a LSM 880 microscope. Transgenic Tg(fli1:EGFP)<sup>v1</sup> zebrafish [64] were maintained in compliance with the French and European Union guidelines for the handling of laboratory animals (Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes). The experimental procedures carried out on zebrafish were reviewed and approved by the local ethics committee, CEEA 75 Nord Pas-de-Calais and the French Ministry of Higher Education and Research (APAFiS approval number 13527-2018011722529804\_v3).

#### 4.10. Statistical Analysis

Data are expressed as the mean values  $\pm$  standard error of the mean of at least 3 independent experiments. The statistical analysis was done by using a Student's *t*-test, and a *p*-value < 0.05 was considered significant. \* *p* < 0.05, \*\* *p* < 0.01 and \*\*\* *p* < 0.001.

### 5. Conclusions

In conclusion, this work highlights the involvement and relative contribution of lncRNA *H19* and miR-675 in the occurrence and development of breast cancer metastasis. In most cases, *H19* and miR-675 exert similar effects. Indeed, we show that both *H19* and miR-675 participate in the migration, invasion and stemness of breast cancer cells. Yet, miR-675 does not have the same effect as the lncRNA *H19* during the EMT. Their actions appear to be complementary and contribute to the metastasis development. These results highlight the interactions between lncRNA and miRNA to influence the EMT and, after further validation, might be taken into account in the therapy of breast cancer.

#### Supplementary Materials

The following are available online at <https://www.mdpi.com/2072-6694/12/7/1730/s1>, Figure S1: Uncropped western blot membranes (visible condition) corresponding to Figure S2, Figure S2: Revelation of uncropped western blot membranes showing the detection of ZO-1 protein expression in MCF-7 control (mock) or *H19*-stably overexpressing cells (H19), and in MDA-MB-231 control

(mock), *H19*-stably overexpressing cells (H19) or miR-675-stably overexpressing cells (miR-675). Actin was used as an equiloading control, Figure S3: Uncropped western blot membranes (visible condition) corresponding to Figure S4, Figure S4: Revelation of uncropped western blot membranes showing the detection of E-cadherin protein expression in MCF-7 control (mock) or H19-stably overexpressing cells (H19). Actin was used as an equiloading control. Figure S5: Uncropped western blot membranes (visible condition) corresponding to Figure S6. Figure S6: Revelation of uncropped western blot membranes showing the detection of TCF8/ZEB1 protein expression in MDA-MB-231 control (mock), H19-stably overexpressing cells (H19) or miR-675-stably overexpressing cells (miR-675). Actin was used as an equiloading control, Figure S7: Uncropped western blot membranes (visible condition) corresponding to Figure S8, Figure S8: Revelation of uncropped western blot membranes showing the detection of N-cadherin protein expression in MDA-MB-231 control (mock), H19-stably overexpressing cells (H19) or miR-675-stably overexpressing cells (miR-675). Actin was used as an equiloading control, Figure S9. Uncropped western blot membranes (visible condition) corresponding to Figure S10, Figure S10: Revelation of uncropped western blot membranes showing the detection of vimentin protein expression in MDA-MB-231 control (mock), H19-stably overexpressing cells (H19) or miR-675-stably overexpressing cells (miR-675). Actin was used as an equiloading control, Figure S11: Uncropped western blot membranes (visible condition) corresponding to Figure S12, Figure S12: Revelation of uncropped western blot membranes showing the detection of snail protein expression in MDA-MB-231 control (mock), H19-stably overexpressing cells (H19) or miR-675-stably overexpressing cells (miR-675). Actin was used as an equiloading control, Figure S13: Uncropped western blot membranes (visible condition) corresponding to Figure S14, Figure S14: Revelation of uncropped western blot membranes showing the detection of ZO-1 protein expression in SUM159PT-pH19-mCherry<sup>neg</sup> (mCherry<sup>neg</sup>) or SUM159PT-pH19-mCherry<sup>high</sup> (mCherry<sup>high</sup>) cells. Actin was used as an equiloading control, Figure S15: Uncropped western blot membranes (visible condition) corresponding to Figure S16, Figure S16: Revelation of uncropped western blot membranes showing the detection of TCF8/ZEB1 protein expression in SUM159PT-pH19-mCherry<sup>neg</sup> (mCherry<sup>neg</sup>) or SUM159PT-pH19-mCherry<sup>high</sup> (mCherry<sup>high</sup>) cells. Actin was used as an equiloading control, Figure S17: Uncropped western blot membranes (visible condition) corresponding to Figure S18, Figure S18: Revelation of uncropped western blot membranes showing the detection of N-cadherin protein expression in SUM159PT-pH19-mCherry<sup>neg</sup> (mCherry<sup>neg</sup>) or SUM159PT-pH19-mCherry<sup>high</sup> (mCherry<sup>high</sup>) cells. Actin was used as an equiloading control, Figure S19: Uncropped western blot membranes (visible condition) corresponding to Figure S20, Figure S20: Revelation of uncropped western blot membranes showing the detection of vimentin protein expression in SUM159PT-pH19-mCherry<sup>neg</sup> (mCherry<sup>neg</sup>) or SUM159PT-pH19-mCherry<sup>high</sup> (mCherry<sup>high</sup>) cells. Actin was used as an equiloading control, Figure S21: Uncropped western blot membranes (visible condition) corresponding to Figure S22, Figure S22:

Revelation of uncropped western blot membranes showing the detection of snail protein expression in SUM159PT-pH19-mCherry<sup>neg</sup> (mCherry<sup>neg</sup>) or SUM159PT-pH19-mCherry<sup>high</sup> (mCherry<sup>high</sup>) cells. Actin was used as an equiloading control, Table S1: References of H19 siRNA transient transfection, Table S2. Primer used for qRT-PCR.

### Author Contributions

Conceptualization, E.A. and X.L.B.; Methodology, C.L. (Clément Lecerf), E.P. and E.A.; Investigation and data acquisition, E.P., C.L. (Clément Lecerf), J.C., C.V., C.L. (Chann Lagadec), R.P.B., P.F., F.B., L.R., M.W., P.V., S.M. and P.-O.A.; Writing—Original draft preparation, C.L. (Clément Lecerf), E.P. and E.A.; Writing—Review and editing, E.A. and X.L.B.; Project administration, E.A. and funding acquisition, E.A. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

### Funding

This research was funded by INSERM and a grant from INCA (PLBio 2010-180), “Ligue contre le cancer” and “Cancéropôle Nord-Ouest/projets émergents 2017”. C.L. (Clément Lecerf), E.P. and J.C. were supported by doctoral fellowships from the University of Lille. C.V. was supported by doctoral fellowships from the University of Lille 2 and by ARC Foundation fellowships.

### Acknowledgments

The authors thank members of the laboratory for helpful discussions and administrative and technical support.

### Conflicts of Interest

The authors declare no conflicts of interest.

### References

1. Angrand, P.O.; Vennin, C.; Le Bourhis, X.; Adriaenssens, E. The role of long non-coding RNAs in genome formatting and expression. *Front Genet.* **2015**, *6*, e165.
2. Brannan, C.I.; Dees, E.C.; Ingram, R.S.; Tilghman, S.M. The product of the H19 gene may function as an RNA. *Mol Cell Biol.* **1990**, *10*, 28–36.
3. Adriaenssens, E.; Dumont, L.; Lottin, S.; Bolle, D.; Leprêtre, A.; Delobelle, A.; Bouali, F.; Dugimont, T.; Coll, J.; Cury, J.J. H19 overexpression in breast adenocarcinoma stromal cells is associated with tumor values and steroid receptor status but independent of p53 and Ki-67 expression. *Am. J. Pathol.* **1998**, *153*, 1597–1607.
4. Adriaenssens, E.; Lottin, S.; Dugimont, T.; Fauquette, W.; Coll, J.; Dupouy, J.P.; Boilly, B.; Cury, J.J. Steroid hormones modulate H19 gene expression in both mammary gland and uterus. *Oncogene* **1999**, *18*, 4460–4473.

5. Liu, J.; Kahri, A.I.; Heikkilä, P.; Ilvesmäki, V.; Voutilainen, R. H19 and insulin-like growth factor-II gene expression in adrenal tumors and cultured adrenal cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **1995**, *80*, 492–496.
6. Ariel, I.; Weinstein, D.; Voutilainen, R.; Schneider, T.; Lustig-Yariv, O.; de Groot, N.; Hochberg, A. Genomic imprinting and the endometrial cycle. *The expression of the imprinted gene H19 in the human female reproductive organs. Diagn Mol Pathol Am. J. Surg. Pathol. Part B* **1997**, *6*, 17–25.
7. Liu, G.; Xiang, T.; Wu, Q.F.; Wang, W.X. *Long Noncoding RNA H19-Derived miR-675 Enhances Proliferation and Invasion via RUNX1 in Gastric Cancer Cells*; Cognizant Communication Corporation: Putnam Valley, NY, USA, 2016; Volume 23, pp. 99–107.
8. Liang, W.C.; Fu, W.M.; Wong, C.W.; Wang, Y.; Wang, W.M.; Hu, G.X.; Zhang, L.; Xiao, L.J.; Wan, D.C.; Zhang, J.F.; et al. The lncRNA H19 promotes epithelial to mesenchymal transition by functioning as miRNA sponges in colorectal cancer. *Oncotarget* **2015**, *6*, 22513–22525.
9. Liu, C.; Chen, Z.; Fang, J.; Xu, A.; Zhang, W.; Wang, Z. H19-derived miR-675 contributes to bladder cancer cell proliferation by regulating p53 activation. *Tumor Biol.* **2016**, *37*, 263–270.
10. Wang, L.; Cai, Y.; Zhao, X.; Jia, X.; Zhang, J.; Liu, J.; Zhen, H.; Wang, T.; Tang, X.; Liu, Y.; et al. Down-regulated long non-coding RNA H19 inhibits carcinogenesis of renal cell carcinoma. *Neoplasma* **2015**, *62*, 412–418.
11. Shi, Y.; Wang, Y.; Luan, W.; Wang, P.; Tao, T.; Zhang, J.; Qian, J.; Liu, N.; You, Y. Long Non-Coding RNA H19 Promotes Glioma Cell Invasion by Deriving miR-675. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e86295.
12. Berteaux, N.; Lottin, S.; Monté, D.; Pinte, S.; Quatannens, B.; Coll, J.; Hondermarck, H.; Cury, J.J.; Dugimont, T.; Adriaenssens, E. H19 mRNA-like noncoding RNA promotes breast cancer cell proliferation through positive control by E2F1. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 29625–29636.
13. Lecerf, C.; Le Bourhis, X.; Adriaenssens, E. The long non-coding RNA H19: An active player with multiple facets to sustain the hallmarks of cancer. *Cell Mol. Life Sci.* **2019**, *76*, 4673–4687.
14. Lottin, S.; Adriaenssens, E.; Dupressoir, T.; Berteaux, N.; Montpellier, C.; Coll, J.; Dugimont, T.; Cury, J.J. Overexpression of an ectopic H19 gene enhances the tumorigenic properties of breast cancer cells. *Carcinogenesis* **2002**, *23*, 1885–1895.
15. Si, X.; Zang, R.; Zhang, E.; Liu, Y.; Shi, X.; Zhang, E.; Shao, L.; Li, A.; Yang, N.; Han, X.; et al. LncRNA H19 confers chemoresistance in ER $\alpha$ -positive breast cancer through epigenetic silencing of the pro-apoptotic gene BIK. *Oncotarget* **2016**, *7*, 81452–81462.
16. Peng, F.; Li, T.T.; Wang, K.L.; Xiao, G.Q.; Wang, J.H.; Zhao, H.D.; Kang, Z.J.; Fan, W.J.; Zhu, L.L.; Li, M.; et al. H19/let-7/LIN28 reciprocal negative regulatory circuit promotes breast cancer stem cell maintenance. *Cell Death Dis.* **2017**, *8*, e2569.

17. Li, Z.; Li, Y.; Li, Y.; Ren, K.; Li, X.; Han, X.; Wang, J. Long non-coding RNA H19 promotes the proliferation and invasion of breast cancer through upregulating DNMT1 expression by sponging miR-152. *J. Biochem. Mol. Toxicol.* **2017**, *31*, e21933.
18. Cai, X.; Cullen, B.R. The imprinted H19 noncoding RNA is a primary microRNA precursor. *RNA* **2007**, *13*, 313–316.
19. Garzon, R.; Fabbri, M.; Cimmino, A.; Calin, G.A.; Croce, C.M. MicroRNA expression and function in cancer. *Trends Mol. Med.* **2006**, *12*, 580–587.
20. Tsang, W.P.; Ng, E.K.O.; Ng, S.S.M.; Jin, H.; Yu, J.; Sung, J.J.Y.; Kwok, T.T. Oncofetal H19-derived miR-675 regulates tumor suppressor RB in human colorectal cancer. *Carcinogenesis* **2010**, *31*, 350–358.
21. Hernandez, J.M.; Elahi, A.; Clark, C.W.; Wang, J.; Humphries, L.A.; Centeno, B.; Bloom, G.; Fuchs, B.C.; Yeatman, T.; Shibata, D. miR-675 Mediates Downregulation of Twist1 and Rb in AFP-Secreting Hepatocellular Carcinoma. *Ann Surg. Oncol.* **2013**, *20*, 625–635.
22. Zhuang, M.; Gao, W.; Xu, J.; Wang, P.; Shu, Y. The long non-coding RNA H19-derived miR-675 modulates human gastric cancer cell proliferation by targeting tumor suppressor RUNX1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2014**, *448*, 315–322.
23. Vennin, C.; Spruyt, N.; Dahmani, F.; Julien, S.; Bertucci, F.; Finetti, P.; Chassat, T.; Bourette, R.P.; Le Bourhis, X.; Adriaenssens, E. H19 non coding RNA-derived miR-675 enhances tumorigenesis and metastasis of breast cancer cells by downregulating c-Cbl and Cbl-b. *Oncotarget* **2015**, *6*, 29209–29223.
24. Hill, D.; Chen, L.; Snaar-Jagalska, E.; Chaudhry, B. Embryonic zebrafish xenograft assay of human cancer metastasis. *F1000Research* **2018**, *7*, e1682.
25. Daulat, A.M.; Bertucci, F.; Audebert, S.; Sergé, A.; Finetti, P.; Josselin, E.; Castellano, R.; Birnbaum, D.; Angers, S.; Borg, J.P. PRICKLE1 Contributes to Cancer Cell Dissemination through Its Interaction with mTORC2. *Dev. Cell* **2016**, *37*, 311–325.
26. Charafe-Jauffret, E.; Ginestier, C.; Iovino, F.; Wicinski, J.; Cervera, N.; Finetti, P.; Hur, M.J.; Diebel, M.E.; Monville, F.; Dutcher, J.; et al. Breast cancer cell lines contain functional cancer stem cells with metastatic capacity and a distinct molecular signature. *Cancer Res.* **2009**, *69*, 1302–1313.
27. Creighton, C.J.; Li, X.; Landis, M.; Dixon, J.M.; Neumeister, V.M.; Sjolund, A.; Rimm, D.L.; Wong, H.; Rodriguez, A.; Herschkowitz, J.I.; et al. Residual breast cancers after conventional therapy display mesenchymal as well as tumor-initiating features. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2009**, *106*, 13820–13825.

28. Ishiguro, T.; Ohata, H.; Sato, A.; Yamawaki, K.; Enomoto, T.; Okamoto, K. Tumor-derived spheroids: Relevance to cancer stem cells and clinical applications. *Cancer Sci.* **2017**, *108*, 283–289.
29. Grolez, G.P.; Hammadi, M.; Barras, A.; Gordienko, D.; Slomianny, C.; Völkel, P.; Angrand, P.O.; Pinault, M.; Guimaraes, C.; Potier-Cartereau, M.; et al. Encapsulation of a TRPM8 Agonist, WS12, in Lipid Nanocapsules Potentiates PC3 Prostate Cancer Cell Migration Inhibition through Channel Activation. *Sci. Rep.* **2019**, *9*, e7926.
30. Raby, L.; Völkel, P.; Le Bourhis, X.; Angrand, P.O. La transplantation de cellules tumorales chez le poisson zèbre: De la recherche translationnelle à la médecine personnalisée. *Bull Cancer* **2020**, *107*, 30–40.
31. Shima, H.; Kida, K.; Adachi, S.; Yamada, A.; Sugae, S.; Narui, K.; Miyagi, Y.; Nishi, M.; Ryo, A.; Murata, S.; et al. Lnc RNA H19 is associated with poor prognosis in breast cancer patients and promotes cancer stemness. *Breast Cancer Res. Treat.* **2018**, *170*, 507–516.
32. Liao, S.; Yu, C.; Liu, H.; Zhang, C.; Li, Y.; Zhong, X. Long non-coding RNA H19 promotes the proliferation and invasion of lung cancer cells and regulates the expression of E-cadherin, N-cadherin, and vimentin. *Oncotargets Ther.* **2019**, *12*, 4099–4107.
33. Matouk, I.J.; Halle, D.; Raveh, E.; Gilon, M.; Sorin, V.; Hochberg, A. The role of the oncofetal H19 lncRNA in tumor metastasis: Orchestrating the EMT-MET decision. *Oncotarget* **2016**, *7*, 3748–3765.
34. He, P.; Qiu, K.; Jia, Y. Modeling of mesenchymal hybrid epithelial state and phenotypic transitions in EMT and MET processes of cancer cells. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, e14323.
35. Mayor, R.; Etienne-Manneville, S. The front and rear of collective cell migration. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2016**, *17*, 97–109.
36. Satoh, K.; Hamada, S.; Shimosegawa, T. Involvement of epithelial to mesenchymal transition in the development of pancreatic ductal adenocarcinoma. *J. Gastroenterol.* **2015**, *50*, 140–146.
37. Liu, F.; Gu, L.N.; Shan, B.E.; Geng, C.Z.; Sang, M.X. Biomarkers for EMT and MET in breast cancer: An update. *Oncol. Lett.* **2016**, *12*, 4869–4876.
38. Chen, M.J.; Deng, J.; Chen, C.; Hu, W.; Yuan, Y.C.; Xia, Z.K. LncRNA H19 promotes epithelial mesenchymal transition and metastasis of esophageal cancer via STAT3/EZH2 axis. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2019**, *113*, 27–36.
39. Liu, L.; Liu, L.; Lu, S. LncRNA H19 promotes viability and epithelial-mesenchymal transition of lung adenocarcinoma cells by targeting miR-29b-3p and modifying STAT3. *Int. J. Oncol.* **2019**, *54*, 929–941.

40. Liang, W.Q.; Zeng, D.; Chen, C.F.; Sun, S.M.; Lu, X.F.; Peng, C.; Lin, H.Y. Long noncoding RNA H19 is a critical oncogenic driver and contributes to epithelial-mesenchymal transition in papillary thyroid carcinoma. *Cancer Manag. Res.* **2019**, *11*, 2059–2072.
41. Xiong, H.; Shen, J.; Chen, Z.; Yang, J.; Xie, B.; Jia, Y.; Jayasinghe, U.; Wang, J.; Zhao, W.; Xie, S.; et al. H19/let-7/Lin28 ceRNA network mediates autophagy inhibiting epithelial-mesenchymal transition in breast cancer. *Int. J. Oncol.* **2020**, *56*, 794–806.
42. Zhang, L.; Yang, F.; Yuan, J.; Yuan, S.; Zhou, W.; Huo, X.; Xu, D.; Bi, H.S.; Wang, F.; Sun, S.H. Epigenetic activation of the MiR-200 family contributes to H19-mediated metastasis suppression in hepatocellular carcinoma. *Carcinogenesis* **2013**, *34*, 577–586.
43. Lv, M.; Zhong, Z.; Huang, M.; Tian, Q.; Jiang, R.; Chen, J. lncRNA H19 regulates epithelial–mesenchymal transition and metastasis of bladder cancer by miR-29b-3p as competing endogenous RNA. *Biochim Biophys Acta BBA. Mol. Cell. Res.* **2017**, *1864*, 1887–1899.
44. O’Brien, S.J.; Carter, J.V.; Burton, J.F.; Oxford, B.G.; Schmidt, M.N.; Hallion, J.C.; Galandiuk, S. The role of the miR-200 family in epithelial–mesenchymal transition in colorectal cancer: A systematic review. *Int. J. Cancer* **2018**, *142*, 2501–2511.
45. Title, A.C.; Hong, S.J.; Pires, N.D.; Hasenöhrl, L.; Godbersen, S.; Stokar-Regenscheit, N.; Bartel, D.P.; Stoffel, M. Genetic dissection of the miR-200-Zeb1 axis reveals its importance in tumor differentiation and invasion. *Nat. Commun.* **2018**, *9*, e4671.
46. Gregory, P.A.; Bert, A.G.; Paterson, E.L.; Barry, S.C.; Tsykin, A.; Farshid, G.; Vadas, M.A.; Khew-Goodall, Y.; Goodall, G.J. The miR-200 family and miR-205 regulate epithelial to mesenchymal transition by targeting ZEB1 and SIP1. *Nat. Cell Biol.* **2008**, *10*, 593–601.
47. Li, M.; Chen, H.; Zhao, Y.; Gao, S.; Cheng, C. H19 Functions as a ceRNA in Promoting Metastasis Through Decreasing miR-200s Activity in Osteosarcoma. *DNA Cell Biol.* **2016**, *35*, 235–240.
48. Zhao, Y.; Feng, C.; Li, Y.; Ma, Y.; Cai, R. lncRNA H19 promotes lung cancer proliferation and metastasis by inhibiting miR-200a function. *Mol. Cell Biochem.* **2019**, *460*, 1–8.
49. Zhou, S.; He, Y.; Yang, S.; Hu, J.; Zhang, Q.; Chen, W.; Xu, H.; Zhang, H.; Zhong, S.; Zhao, J.; et al. The regulatory roles of lncRNAs in the process of breast cancer invasion and metastasis. *Biosci. Rep.* **2018**, *38*, 1–2.
50. Wang, M.; Li, Y.; Xiao, G.D.; Zheng, X.Q.; Wang, J.C.; Xu, C.W.; Qin, S.; Ren, H.; Tang, S.H.; Sun, X. H19 regulation of oestrogen induction of symmetric division is achieved by antagonizing Let-7c in breast cancer stem-like cells. *Cell Prolif.* **2019**, *52*, e12534.
51. Al-Hajj, M.; Wicha, M.S.; Benito-Hernandez, A.; Morrison, S.J.; Clarke, M.F. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2003**, *100*, 3983–3988.



52. Tomita, H.; Tanaka, K.; Tanaka, T.; Hara, A. Aldehyde dehydrogenase 1A1 in stem cells and cancer. *Oncotarget* **2016**, *7*, 11018–11032.
53. Kim, J.; Chu, J.; Shen, X.; Wang, J.; Orkin, S.H. An extended transcriptional network for pluripotency of embryonic stem cells. *Cell* **2008**, *132*, 1049–1061.
54. Hadjimichael, C.; Chanoumidou, K.; Papadopoulou, N.; Arampatzi, P.; Papamatheakis, J.; Kretsovali, A. Common stemness regulators of embryonic and cancer stem cells. *World J. Stem Cells* **2015**, *7*, 1150–1184.
55. Baryshte-Lovejoy, D.; Lau, S.K.; Boutros, P.C.; Khosravi, F.; Jurisica, I.; Andrulis, I.L.; Tsao, M.S.; Penn, L.Z. The c-Myc oncogene directly induces the H19 noncoding RNA by allele-specific binding to potentiate tumorigenesis. *Cancer Res.* **2006**, *66*, 5330–5337.
56. Abi Habib, W.; Azzi, S.; Brioude, F.; Steunou, V.; Thibaud, N.; Das Neves, C.; Le Jule, M.; Chantot-Bastaraud, S.; Keren, B.; Lyonnet, S.; et al. Extensive investigation of the IGF2/H19 imprinting control region reveals novel OCT4/SOX2 binding site defects associated with specific methylation patterns in Beckwith-Wiedemann syndrome. *Hum Mol. Genet.* **2014**, *23*, 5763–5773.
57. Gao, X.; Qiao, Y.; Han, D.; Zhang, Y.; Ma, N. Enemy or partner: Relationship between intronic micrnas and their host genes. *IUBMB Life* **2012**, *64*, 835–840.
58. Shi, W.; Gerster, K.; Alajez, N.M.; Tsang, J.; Waldron, L.; Pintilie, M.; Hui, A.B.; Sykes, J.; P'ng, C.; Miller, N.; et al. MicroRNA-301 mediates proliferation and invasion in human breast cancer. *Cancer Res.* **2011**, *71*, 2926–2937.
59. Qiao, Y.; Ma, N.; Wang, X.; Hui, Y.; Li, F.; Xiang, Y.; Zhou, J.; Zou, C.; Jin, J.; Lv, G.; et al. MiR-483-5p controls angiogenesis in vitro and targets serum response factor. *FEBS Lett.* **2011**, *585*, 3095–3100.
60. Collette, J.; Le Bourhis, X.; Adriaenssens, E. Regulation of Human Breast Cancer by the Long Non-Coding RNA H19. *Int. J. Mol. Sci.* **2017**, *18*, e2319.
61. Yang, W.; Redpath, R.E.; Zhang, C.; Ning, N. Long non-coding RNA H19 promotes the migration and invasion of colon cancer cells via MAPK signaling pathway. *Oncol. Lett.* **2018**, *16*, 3365–3372.
62. Zhao, J.; Ma, S.T. Downregulation of lncRNA H19 inhibits migration and invasion of human osteosarcoma through the NF- $\kappa$ B pathway. *Mol. Med. Rep.* **2018**, *17*, 7388–7394.
63. Berteaux, N.; Aptel, N.; Cathala, G.; Genton, C.; Coll, J.; Daccache, A.; Spruyt, N.; Hondermarck, H.; Dugimont, T.; Curgy, J.J.; et al. A novel H19 antisense RNA overexpressed in breast cancer contributes to paternal IGF2 expression. *Mol. Cell Biol.* **2008**, *28*, 6731–6745.
64. Lawson, N.D.; Weinstein, B.M. In vivo imaging of embryonic vascular development using transgenic zebrafish. *Dev. Biol.* **2002**, *248*, 307–318.



## 6. Résultats supplémentaires

De plus, nous avons étudié par immunofluorescence la localisation de la protéine  $\beta$ -caténine. En effet cette protéine est un transducteur du signal intracellulaire appartenant à la voie de signalisation canonique Wnt, et peut interagir avec le domaine cytoplasmique de la E-cadhérine pour inhiber le processus d'EMT des cellules cancéreuses (Huang et al., 2019; Nusse & Clevers, 2017). La  $\beta$ -caténine est alors considérée comme un marqueur de phénotype épithélial si elle est localisée au niveau membranaire ou un marqueur de phénotype mésenchymateux si elle est nucléaire.

Cependant, les résultats d'immunofluorescence n'ont pas montré de différence de localisation de la  $\beta$ -caténine dans les lignées MCF-7 et MDA-MB-231 surexprimant stablement *H19* comparées aux cellules contrôles (Figure 19).

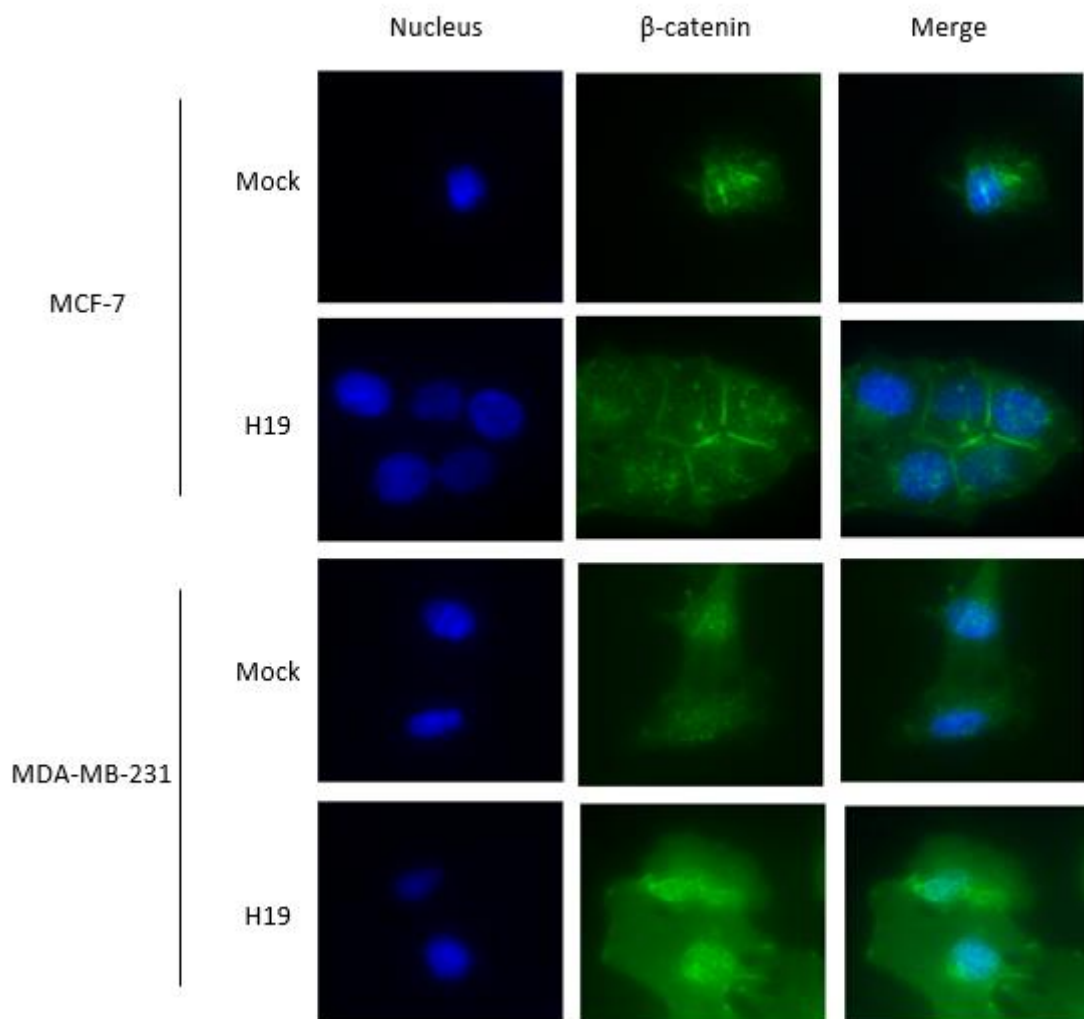
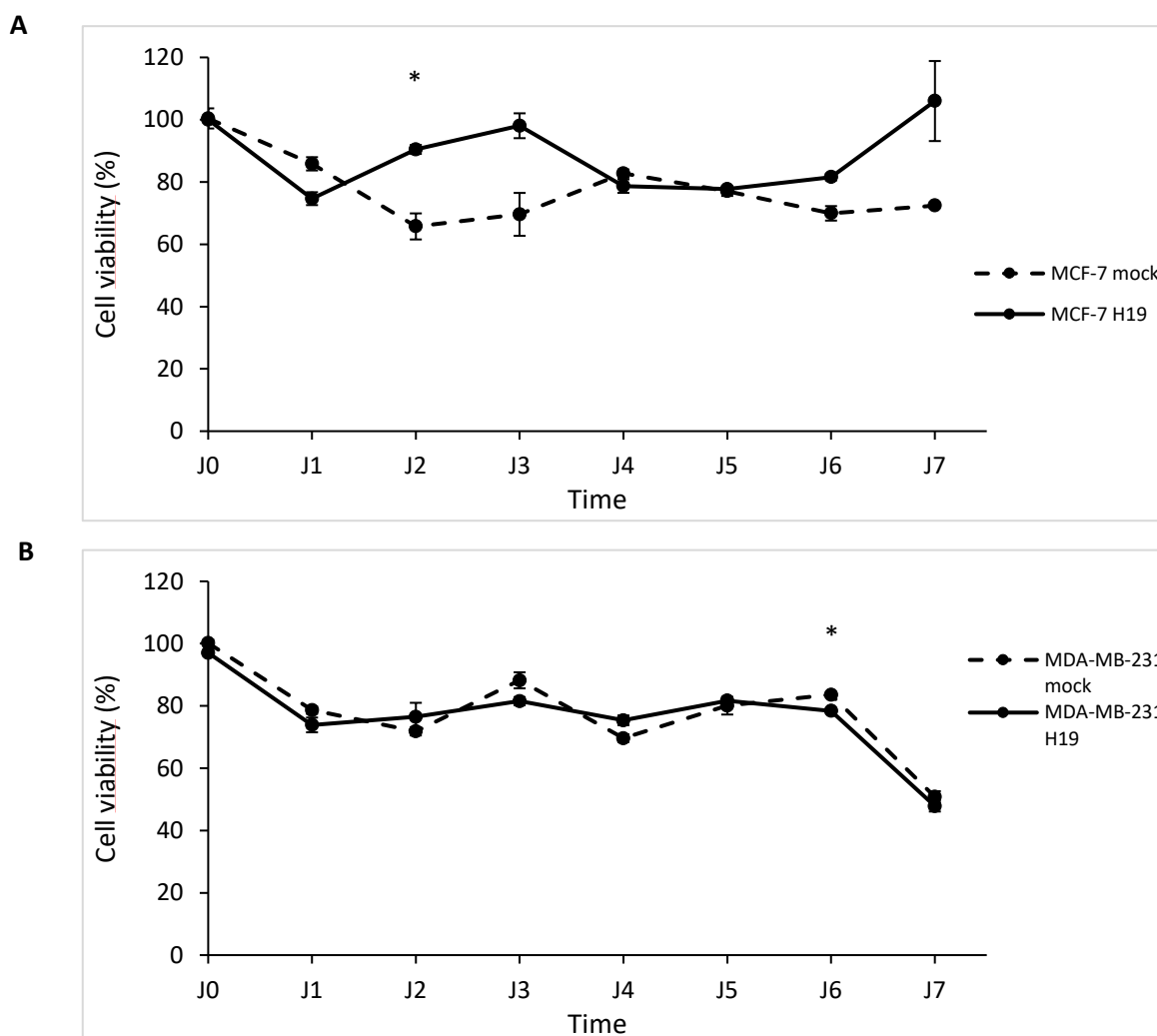


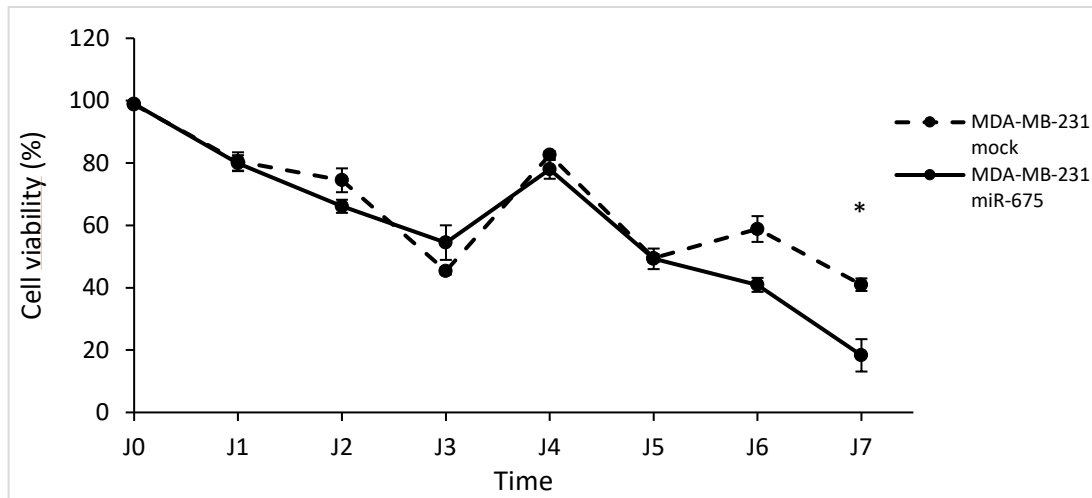
Figure 19 : Localisation de la  $\beta$ -caténine déterminée par immunofluorescence dans les lignées MCF-7 et MDA-MB-231 contrôles (mock) ou surexprimant stablement *H19* (H19).

Nous avons ensuite exploré le rôle du lncARN *H19* et du miR-675 dans la résistance à l'anoïkis. L'anoïkis est une mort cellulaire induite par le détachement d'une cellule de la matrice extracellulaire. Ce phénotype cellulaire est impliqué dans le développement métastatique. En effet, lors de l'invasion, les cellules doivent rompre leur adhérence pour atteindre le site tumoral secondaire. Pour évaluer le rôle de *H19* et du miR-675 dans ce processus, nous avons étudié la résistance à l'anoïkis dans les lignées cellulaires du cancer du sein surexprimant stablement *H19* ou le miR-675.

Le test de résistance à l'anoïkis dans les cellules MCF-7 surexprimant stablement *H19* ou non n'a montré aucune différence statistique à long terme (Figure 20A). De la même manière, la viabilité des cellules MDA-MB-231 surexprimant *H19* (Figure 20B) ou miR-675 (Figure 20C) n'a pas montré de variation significative par rapport au contrôle.



C



**Figure 20 : Résistance à l'anoïkis de lignées cellulaires cancéreuses mammaires surexprimant stablement ou non *H19* ou le miR-675.** A. Résistance à l'anoïkis de cellules MCF-7 surexprimant stablement ou non *H19* déterminée par réduction de la résazurine. B. Résistance à l'anoïkis de cellules MDA-MB-231 surexprimant stablement ou non *H19* déterminée par réduction de la résazurine. C. Résistance à l'anoïkis de cellules MDA-MB-231 surexprimant stablement ou non le miR-675 déterminée par réduction de la résazurine. Les expériences ont été réalisées au moins 3 fois. Sur les graphiques, les données représentent la moyenne de 3 expériences indépendantes et les écarts-types associés. \* :  $p < 0,05$ .

Ensemble, ces données mettent en évidence l'implication et les contributions relatives du lncRNA *H19* et de son miR-675 dans l'émergence et le développement des métastases du cancer du sein. Nous avons montré que *H19* et le miR-675 participent tous deux à la migration, à l'invasion cellulaire *in vitro* et *in vivo* et aux propriétés souches des cellules cancéreuses mammaires. Cependant le miR-675 n'exerce pas les mêmes effets que le lncRNA *H19* pendant l'EMT. En effet, *H19* participe à l'EMT tandis que le miR-675 semble induire la transition mésenchymo-épithéliale. Leurs actions semblent donc séquentielles et complémentaires et ils pourraient contribuer au développement métastatique. Pour poursuivre nos travaux, il serait intéressant d'étudier les cibles moléculaires impliquées dans la survenue et le développement des métastases mammaires. Malgré la similitude des phénotypes observés, le lncRNA *H19* et le miR-675 peuvent ne pas avoir les mêmes déterminants moléculaires et, par conséquent, utiliser des voies de signalisation distinctes.

Gène	Nom	Annotations	Régulation par <i>H19</i>
<b>BRAF</b>	B-raf proto-oncogene	Mutations fréquemment identifiées dans les cancers	Sous-exprimé
<b>BRMS1L</b>	Breast Cancer Metastasis-Suppressor 1-like	- Famille des HDAC - Gène cible de p53	Sous-exprimé
<b>BST2</b>	Bone marrow Stromal cell antigen 2	- Croissance des cellules B - Activité antivirale - Surexprimé dans les cancers	Sur-exprimé
<b>C/EBP<math>\alpha</math></b>	CCAAT Enhancer Binding Protein $\alpha$	Module l'expression des gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire	Sur-exprimé
<b>CST7</b>	Cystatin-7	- Rôle putatif dans la régulation immunitaire - Exprimé dans les cancers	Sur-exprimé
<b>EGR1</b>	Early Growth Response 1	Régulateur transcriptionnel	Sur-exprimé
<b>FGFR4</b>	Fibroblast Growth Factor Receptor 4	Régule la prolifération cellulaire, la différenciation, la migration et le métabolisme lipidique	Sur-exprimé
<b>KISS1</b>	Kiss1 metastasis suppressor	Suppresseur de tumeur	Sur-exprimé
<b>PIK3CA</b>	Phosphatidylinositol-4,5-biphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha	Mutations fréquemment identifiées dans le cancer du sein	Sous-exprimé
<b>TXNIP</b>	Thioredoxin Interacting protein	Régulateur majeur de la signalisation redox cellulaire qui protège les cellules du stress oxydatif	Sur-exprimé

**Tableau 11. Liste des gènes cibles modulés par l'expression de *H19* dans les cellules MDA-MB-231.** Les résultats du RNA-sequencing sur des cellules MDA-MB-231 surexprimant ou non *H19* ont été couplés avec les données publiques de gènes impliqués dans le développement métastatique.

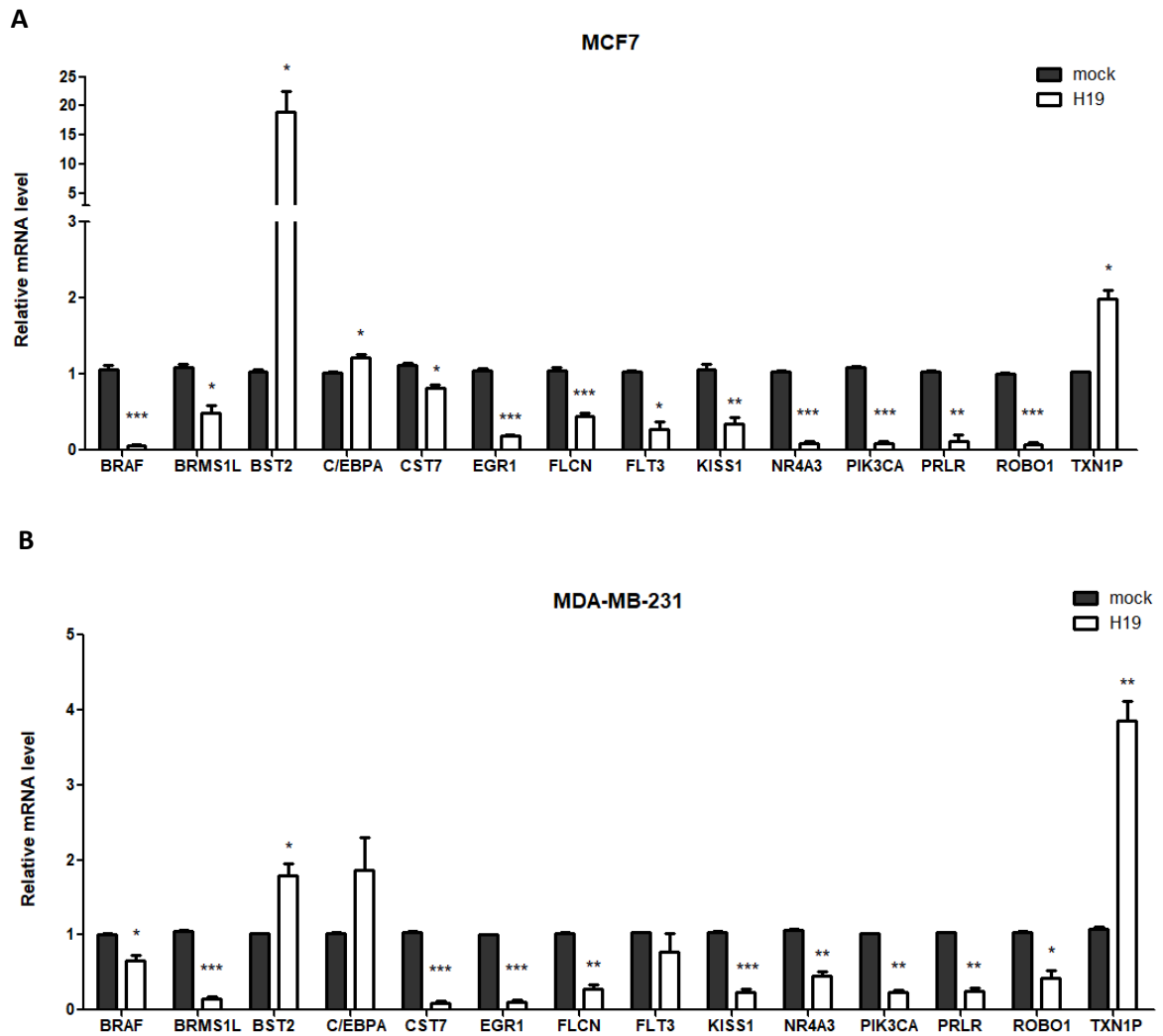
## II. Implication de *BST2* dans les phénotypes associés au lncRNA *H19* lors de l'émergence des métastases du cancer du sein

Mon équipe a réalisé une analyse transcriptomique par séquençage des ARN (RNA-sequencing) sur les cellules MCF-7 et MDA-MB-231 surexprimant stablement ou non *H19* afin de définir une liste d'acteurs régulés positivement ou négativement par *H19*. En regroupant ces résultats avec une liste de gènes impliqués dans le développement métastatique (GO Term Analysis, Gene Ontology), nous avons mis en évidence plusieurs gènes potentiellement impliqués dans les phénotypes observés par *H19* (Tableau 11 et 12).

Nous avons identifié 10 gènes présentant une expression différentielle dans les MDA-MB-231 surexprimant ou non *H19* (Tableau 11) et 9 gènes dans les MCF-7 surexprimant ou non *H19* (Tableau 12). Certains gènes sont connus dans la littérature comme participant au développement métastatique tels que *BRMS1L*, *BST2*, *KISS1* et *ROBO1*. Il nous a paru intéressant d'étudier davantage ces gènes cibles dans nos différents modèles cellulaires afin de comprendre les déterminants moléculaires associés aux phénotypes observés par *H19* et le miR-675 lors des métastases du cancer du sein.

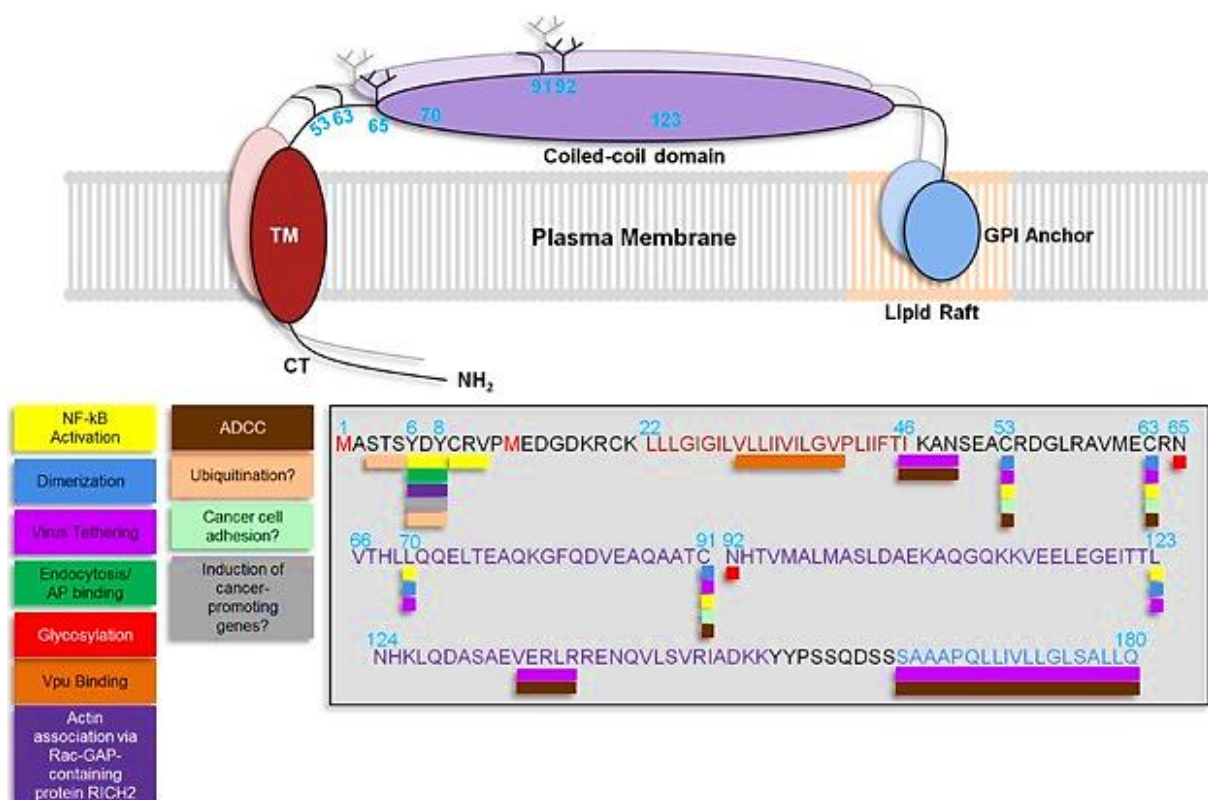
Gène	Nom	Annotations	Régulation par <i>H19</i>
<b>BIN1</b>	Bridging integrator 1	Protéine adaptatrice nucléocytoplasmique	Sous-exprimé
<b>BST2</b>	Bone marrow Stromal cell antigen 2	- Croissance des cellules B - Activité antivirale - Surexprimé dans les cancers	Sur-exprimé
<b>COL1A1</b>	Collagen type 1 alpha 1 chain	Composant de la matrice extracellulaire	Sur-exprimé
<b>CDKN1A = p21</b>	Cyclin dependant kinase inhibitor 1A	Régule le cycle cellulaire	Sous-exprimé
<b>FLCN</b>	Folliculin	Suppresseur de tumeur	Sur-exprimé
<b>FLT3</b>	Fms related tyrosine kinase 3	Récepteur à tyrosine kinase	Sur-exprimé
<b>NR4A3</b>	Nuclear receptor subfamily 4 group A member 3	Activateur transcriptionnel	Sous-exprimé
<b>PRLR</b>	Prolactin receptor	Récepteur de la prolactine	Sous-exprimé
<b>ROBO1</b>	Roundabout guidance receptor 1	Immunoglobuline intervenant dans le guidage axonal et la migration des cellules précurseurs neuronales	Sous-exprimé

**Tableau 12.** Liste des gènes cibles modulés par l'expression de *H19* dans les cellules MCF-7. Les résultats du RNA-sequencing sur des cellules MCF-7 surexprimant ou non *H19* ont été couplés avec les données publiques de gènes impliqués dans le développement métastatique.



**Figure 21 : Expression relative des gènes identifiés par RNA-sequencing régulés positivement ou négativement par H19.** **A.** Expression relative de *BRAF*, *BRMS1L*, *BST2*, *c/EBP $\alpha$* , *CST7*, *EGR1*, *FLCN*, *FLT3*, *KISS1*, *NR4A3*, *PIK3CA*, *PRLR*, *ROBO1* et *TXN1P* dans les MCF-7 contrôles (mock) ou surexprimant stablement H19 (H19) déterminée par qRT-PCR. **B.** Expression relative de *BRAF*, *BRMS1L*, *BST2*, *c/EBP $\alpha$* , *CST7*, *EGR1*, *FLCN*, *FLT3*, *KISS1*, *NR4A3*, *PIK3CA*, *PRLR*, *ROBO1* et *TXN1P* dans les MDA-MB-231 contrôles (mock) ou surexprimant stablement H19 (H19) déterminée par qRT-PCR. Les expériences ont été réalisées au moins 3 fois. Sur les graphiques, les données représentent la moyenne de 3 expériences indépendantes et les écarts-types associés. \* :  $p < 0,05$  ; \*\* :  $p < 0,01$  ; \*\*\* :  $p < 0,001$ .

Dans un premier temps, j'ai vérifié les résultats obtenus *in silico* dans nos modèles cellulaires *in vitro* (Figure 21). D'après l'analyse transcriptomique et les résultats de qRT-PCR, le gène *BST2* est le gène le plus surexprimé dans les deux lignées cellulaires surexprimant stablement *H19* par rapport aux cellules contrôles. Le gène *BST2* code une protéine transmembranaire de type II, active sous une forme dimérisée et principalement décrite dans les processus antiviraux. La protéine est composée de différentes parties : une courte extrémité N-terminale qui est suivie d'un domaine transmembranaire, d'un ectodomaine en hélice-alpha et d'une ancre à glycosylphosphatidylinositol (GPI) en C-terminal (Figure 22) (Kupzig et al., 2003). Dans la littérature, *BST2* est décrit comme impliqué dans des processus associés à la réponse antivirale (Matsuda et al., 2003; Mangeat et al., 2009; Masuyama et al., 2009; M.-Q. Liu et al., 2012; Yoo et al., 2016). Depuis quelques années, de nombreuses études démontrent que *BST2* est également impliqué dans la survenue de métastases de différents cancers (D. Cai et al., 2009; Jones et al., 2013; Mahauad-Fernandez et al., 2014; Kuang et al., 2017; W. Liu et al., 2018; X. Xu et al., 2020). De plus, Woodman *et al*, montrent que *BST2* est de mauvais pronostic pour les cancers du sein ER négatifs (Woodman et al., 2016).



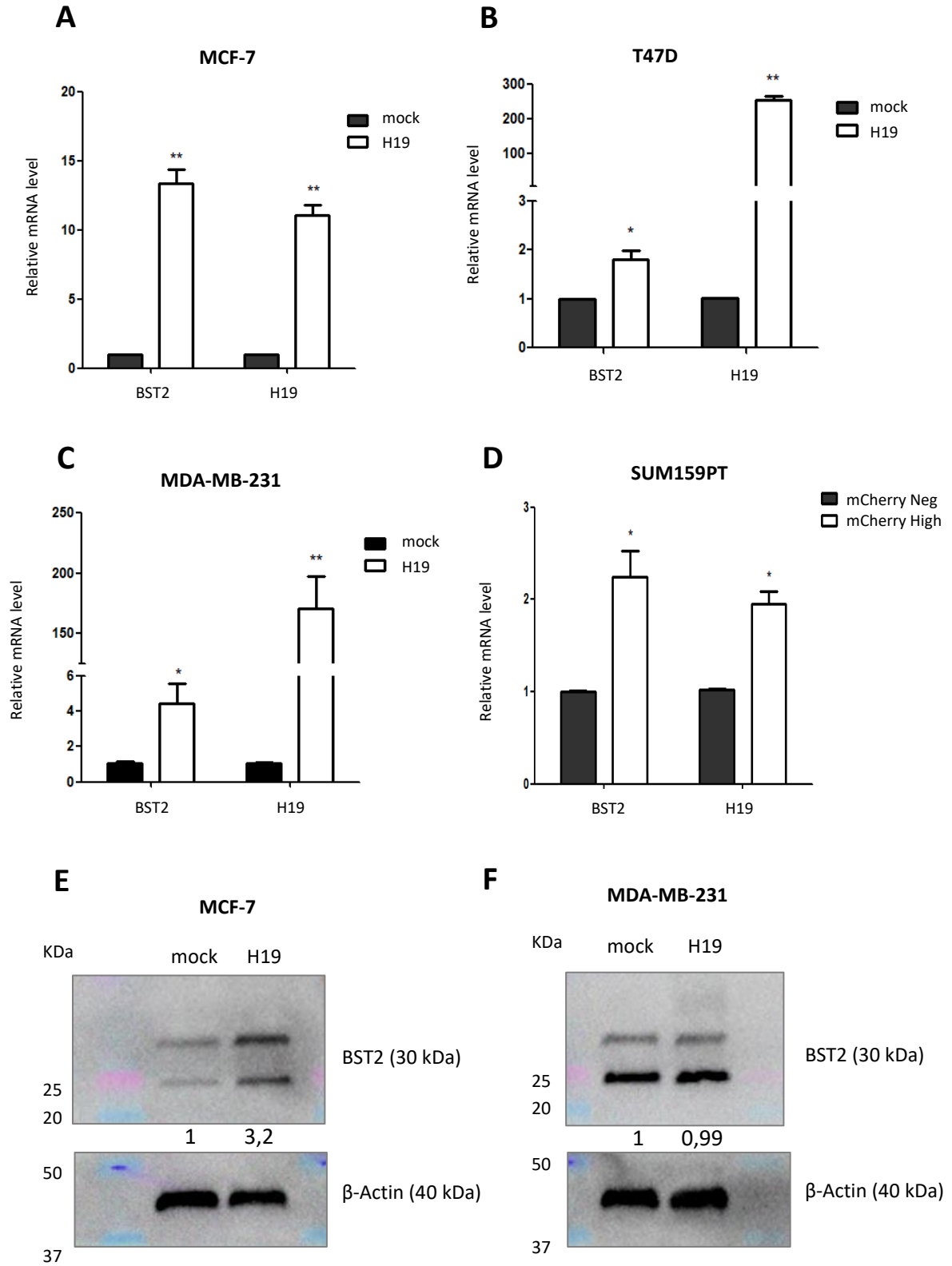
**Figure 22 : Structure fonctionnelle de BST2.** BST2 est une protéine transmembranaire de type II composée d'une queue cytoplasmique (CT) en N-terminal suivie d'un domaine transmembranaire (TM), d'un ectodomaine super-enroulé (coiled-coil domain) et d'une ancre glycosylphosphatidylinositol (GPI anchor) intégrée dans des radeaux lipidiques (lipid Raft) de la membrane cellulaire. La séquence d'acides aminés de BST2 est également représentée

et schématisée par des couleurs. Les nombres au-dessus des acides aminés correspondent à leurs emplacements. Sous les séquences d'acides aminés se trouvent des cases colorées correspondant à différentes fonctions et caractéristiques de BST2, notamment l'activation de NF- $\kappa$ B en jaune, la dimérisation en bleu, l'attachement du virus en violet clair, la liaison endocytose/protéine adaptatrice (AP) en vert, les sites de glycosylation en rouge, la liaison Vpu en orange, l'association d'actine en violet, les motifs d'induction ADCC en marron. Sont également figurées certaines caractéristiques hypothétiques de BST2, comme les sites d'ubiquitination en orange clair, l'adhésion des cellules cancéreuses en vert clair et l'induction de gènes favorisant le cancer tels que les métalloprotéinases matricielles en gris. BST2 contient deux sites pouvant débiter la traduction : la méthionine 1 ou la méthionine 13 (rouge) générant une isoforme longue ou une isoforme courte. L'isoforme courte ne peut pas induire l'activation de NF- $\kappa$ B car elle est dépourvue du motif YxY. BST2 forme des homo-dimères et des tétramères grâce à trois résidus cytosine conservés aux positions 53, 63 et 91. Les résidus leucine aux positions 70 et 123 sont importants pour le maintien de la structure de BST2 et pour la fixation du virus qui nécessite également l'ancre GPI en C-terminal. L'ectodomaine de BST2 est modifié après la traduction par N-glycosylation de deux résidus asparagine aux positions 65 et 92. (Issu de Mahauad-Fernandez & Okeoma, 2016).

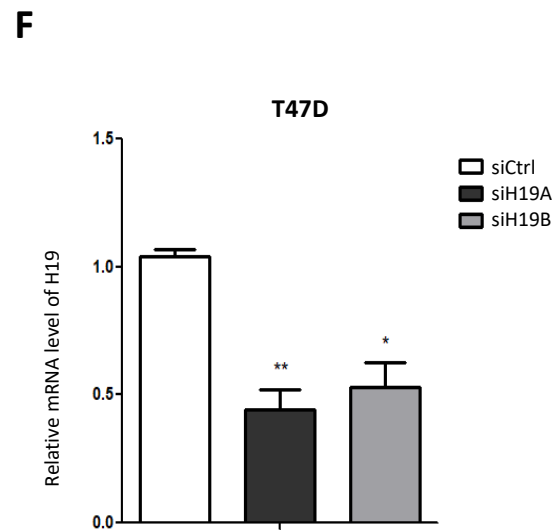
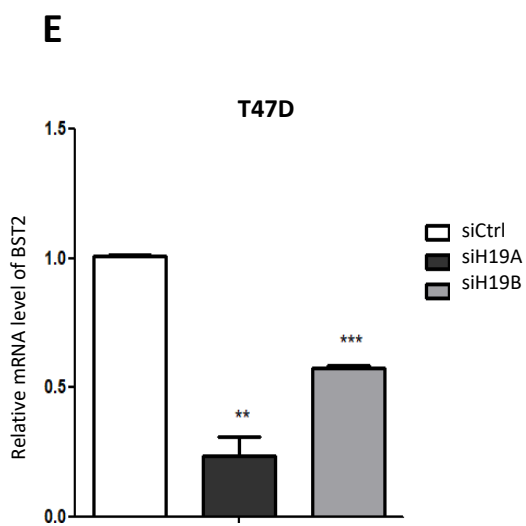
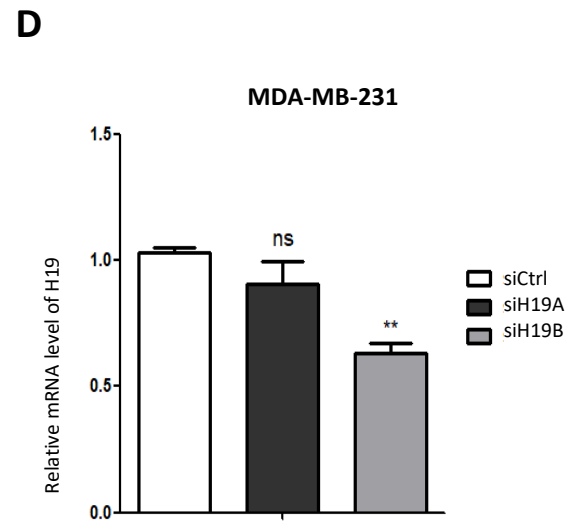
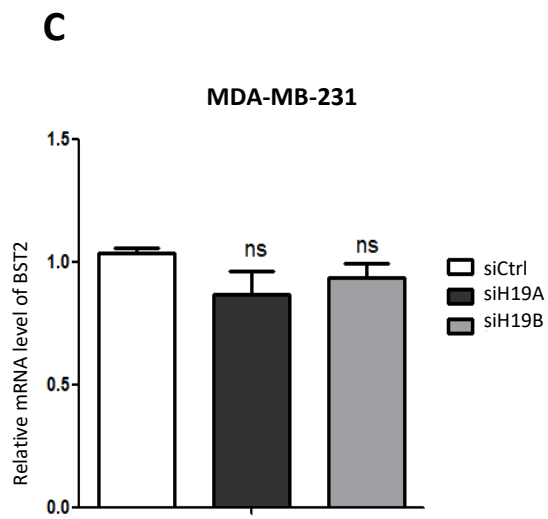
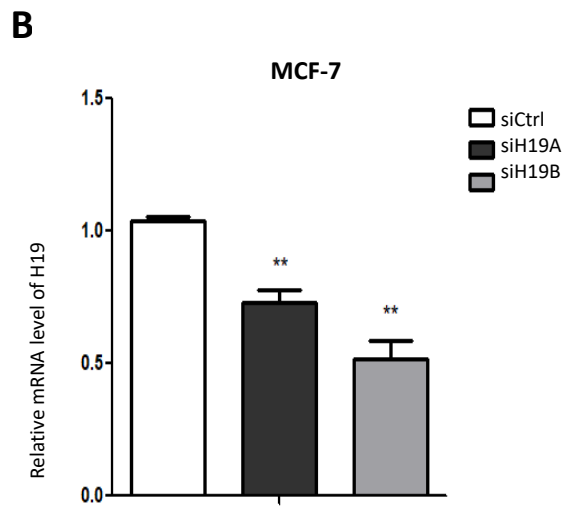
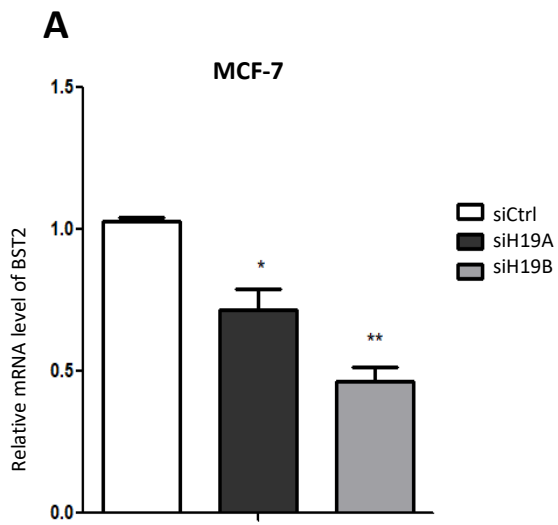
Nous avons donc choisi d'étudier de manière approfondie le gène *BST2*. Pour cela, les résultats obtenus précédemment ont été confirmés dans d'autres lignées cellulaires (Figure 23). En effet, l'expression de *BST2* est augmentée dans les lignées MCF-7 (Figure 23A), T47D (Figure 23B) et MDA-MB-231 (Figure 23C) surexprimant stablement *H19*. Pour mettre en évidence le rôle du gène *H19* sans surexpression ectopique, les cellules SUM159PT ont été transfectées avec le vecteur qui exprime la protéine fluorescente mCherry sous le contrôle du promoteur *H19* décrit dans l'article 1 de la partie I. Nous avons observé une augmentation de l'expression de *BST2* dans la fraction mCherry<sup>High</sup> corrélée à l'augmentation de l'expression de *H19* par rapport à la fraction mCherry<sup>Neg</sup> (Figure 23D).

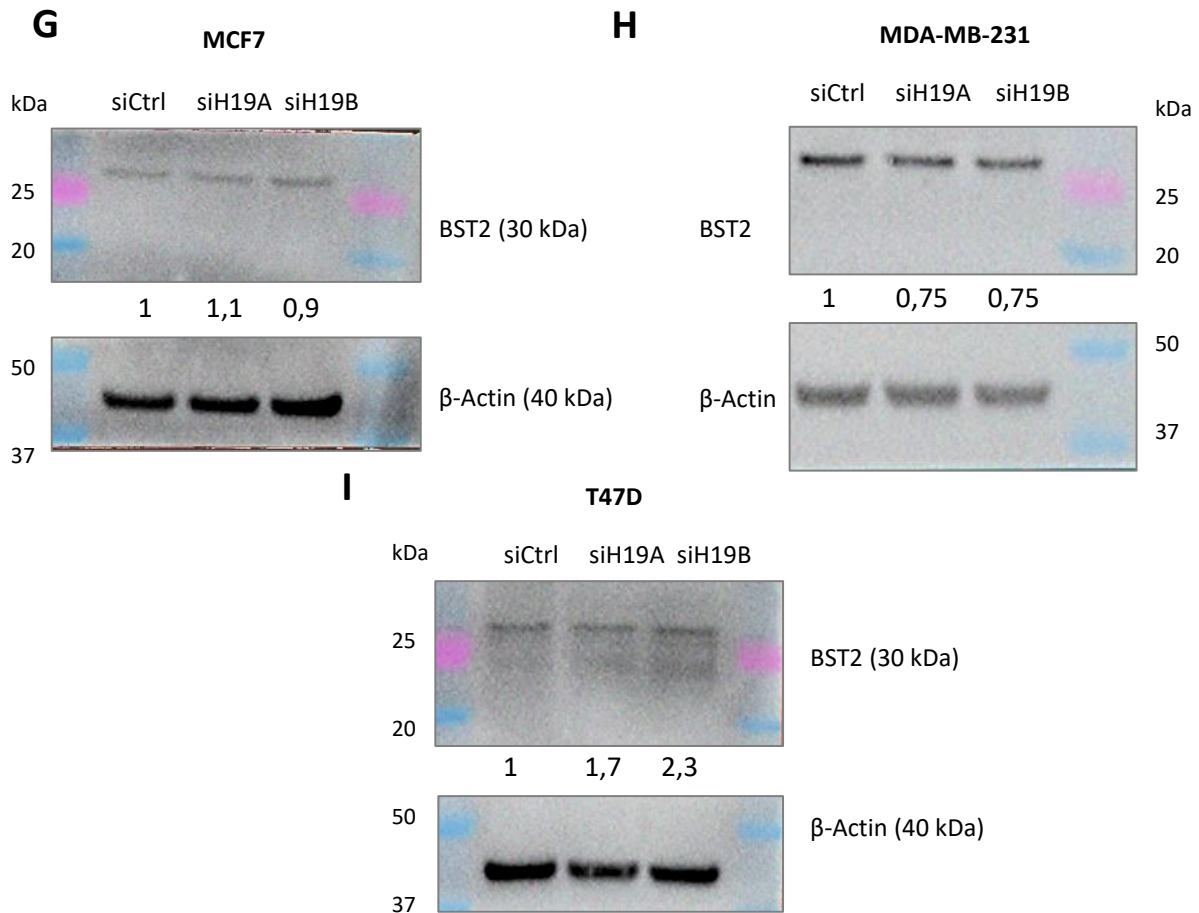
De plus, nous avons étudié l'expression protéique de BST2 dans nos différents modèles cellulaires. BST2 est une protéine transmembranaire capable de se dimériser au niveau de cystéine et est modifiée par N-glycosylation (Andrew et al., 2009; Mahauad-Fernandez & Okeoma, 2017). L'anticorps utilisé anti-BST2 reconnaît deux formes de BST2 : la forme glycosylée et la forme non glycosylée. Nous détectons alors deux bandes correspondant à BST2. Nous avons observé une augmentation de BST2 dans les MCF-7 (Figure 23E) et T47D (Figure 23G) surexprimant stablement *H19*, et dans les SUM159PT mCherry<sup>High</sup> (Figure 23H). Cependant, nous n'avons pas visualisé de différence dans les MDA-MB-231 (Figure 23F) qui pourrait s'expliquer par un faible niveau endogène de *BST2* dans ces cellules (Figure 23C). De plus, une étude démontre que la glycosylation de *BST2* est cellule-dépendante (Kühl et al., 2011), ce qui pourrait expliquer les différences de profils de migration protéiques observées dans nos cellules.



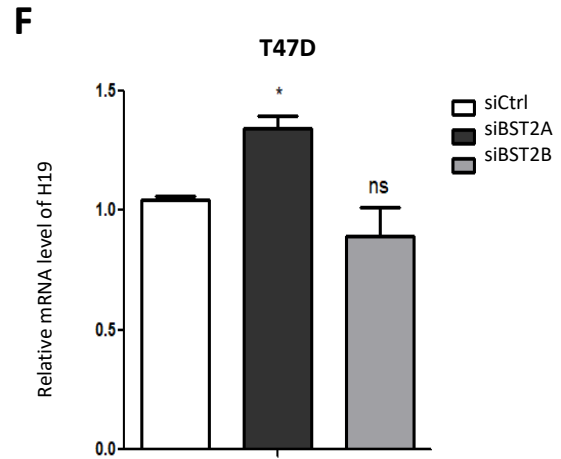
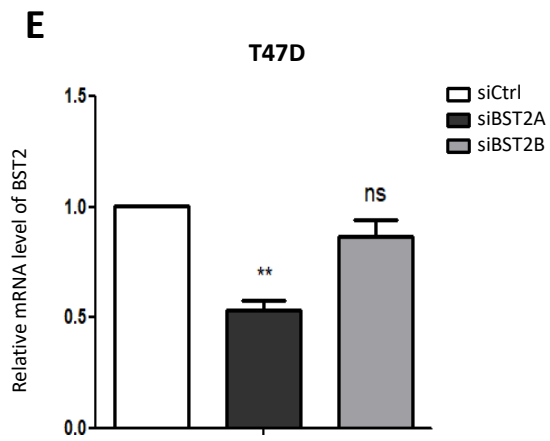
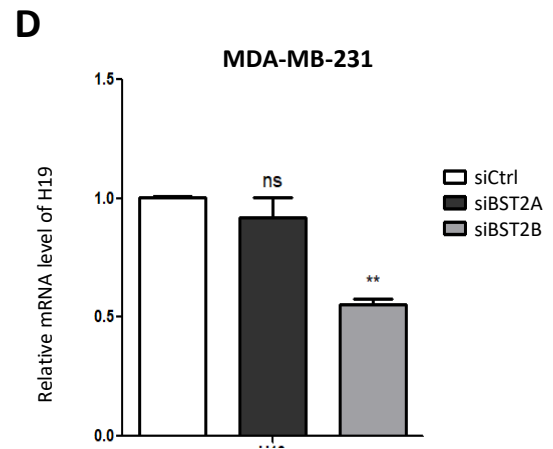
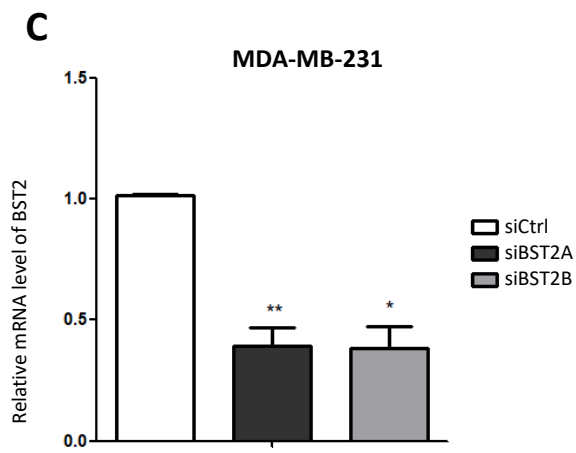
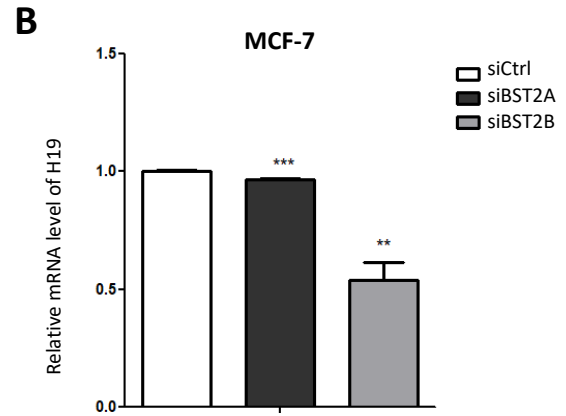
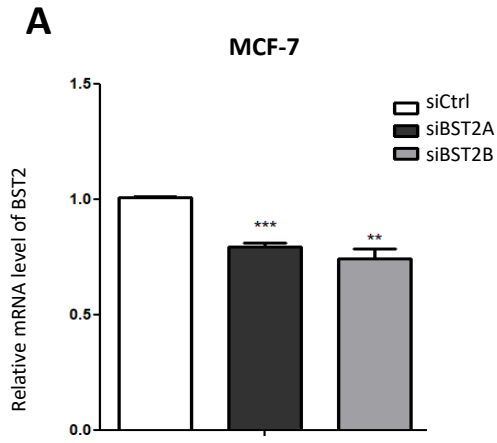


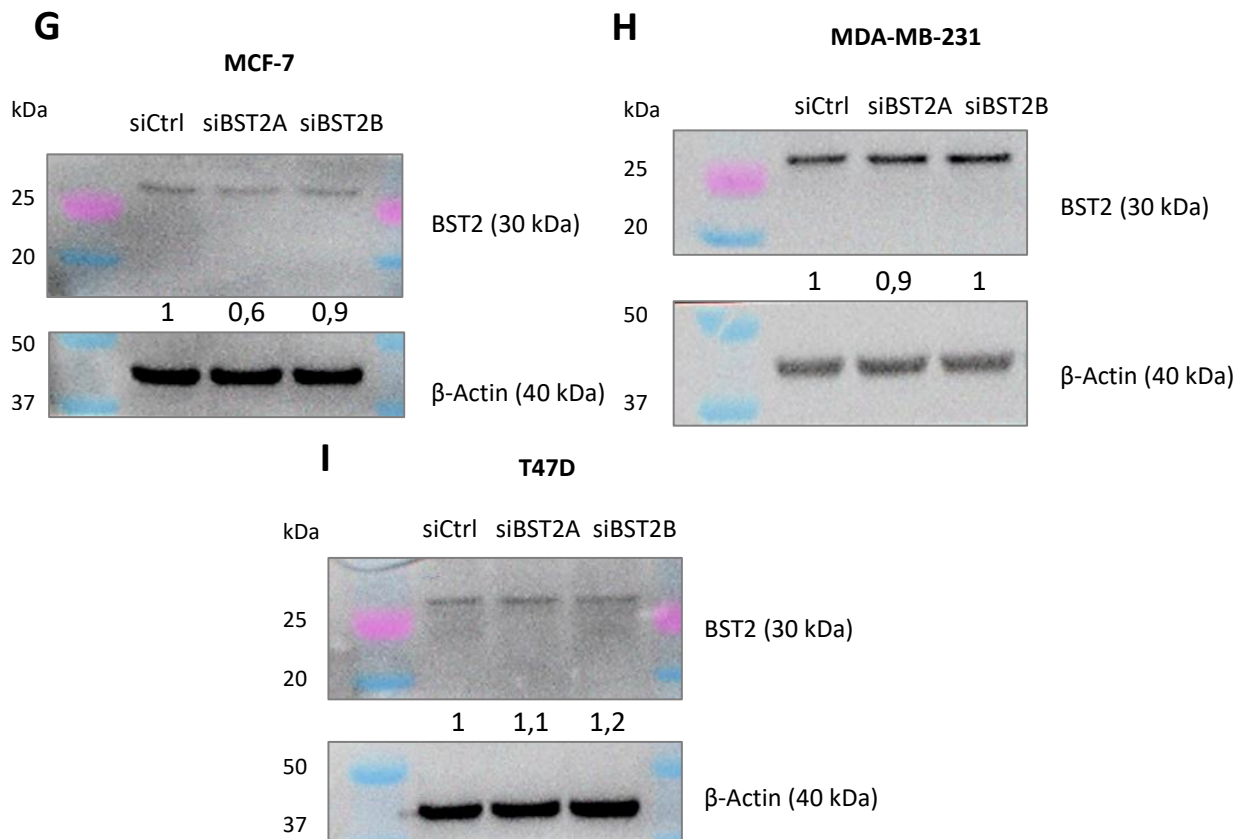






**Figure 24 : Effets du knockdown de *H19*.** **A.** Expression relative de *BST2* dans les MCF-7 contrôles (siCtrl) ou de cellules H19-knockdown (siH19A, siH19B) déterminée par qRT-PCR. **B.** Expression relative de *H19* dans les MCF-7 contrôles (siCtrl) ou de cellules H19-knockdown (siH19A, siH19B) déterminée par qRT-PCR. **C.** Expression relative de *BST2* dans les MDA-MB-231 contrôles (siCtrl) ou de cellules H19-knockdown (siH19A, siH19B) déterminée par qRT-PCR. **D.** Expression relative de *H19* dans les MDA-MB-231 contrôles (siCtrl) ou de cellules H19-knockdown (siH19A, siH19B) déterminée par qRT-PCR. **E.** Expression relative de *BST2* dans les T47D contrôles (siCtrl) ou de cellules H19-knockdown (siH19A, siH19B) déterminée par qRT-PCR. **F.** Expression relative de *H19* dans les T47D contrôles (siCtrl) ou de cellules H19-knockdown (siH19A, siH19B) déterminée par qRT-PCR. **G.** Expression protéique de *BST2* dans les cellules MCF-7 contrôles (siCtrl) ou de cellules H19-knockdown (siH19A, siH19B) déterminée par analyse western blot. **H.** Expression protéique de *BST2* dans les cellules MDA-MB-231 contrôles (siCtrl) ou de cellules H19-knockdown (siH19A, siH19B) déterminée par analyse western blot. **I.** Expression protéique de *BST2* dans les cellules T47D contrôles (siCtrl) ou de cellules H19-knockdown (siH19A, siH19B) déterminée par analyse western blot. Les intensités relatives des bandes ont été quantifiées par ImageJ. Les expériences ont été réalisées au moins 3 fois. Pour chaque expérience, l'actine a été utilisée comme contrôle d'équi-charge. Sur les graphiques, les données représentent la moyenne de 3 expériences indépendantes et les écarts-types associés. \* :  $p < 0,05$  ; \*\* :  $p < 0,01$  ; \*\*\* :  $p < 0,001$  ; ns : non-significatif.





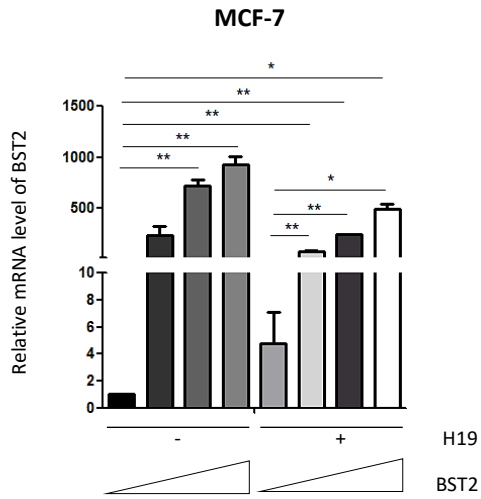
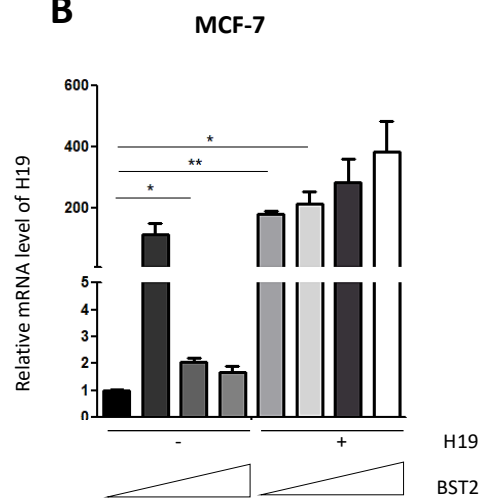
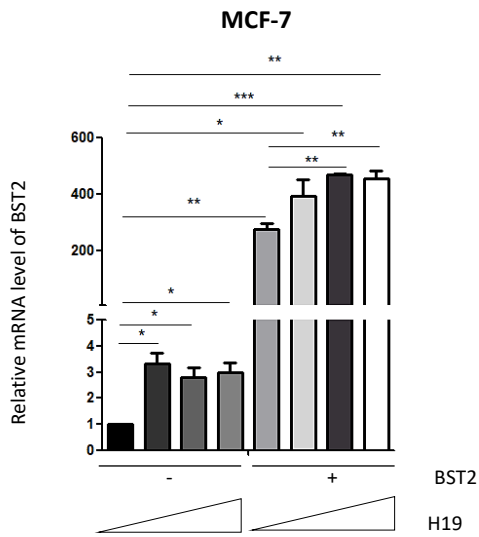
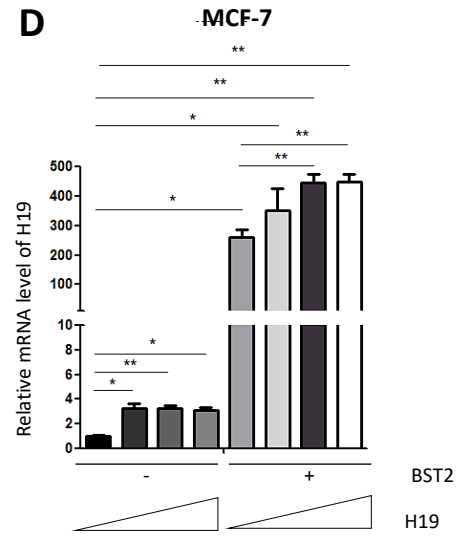
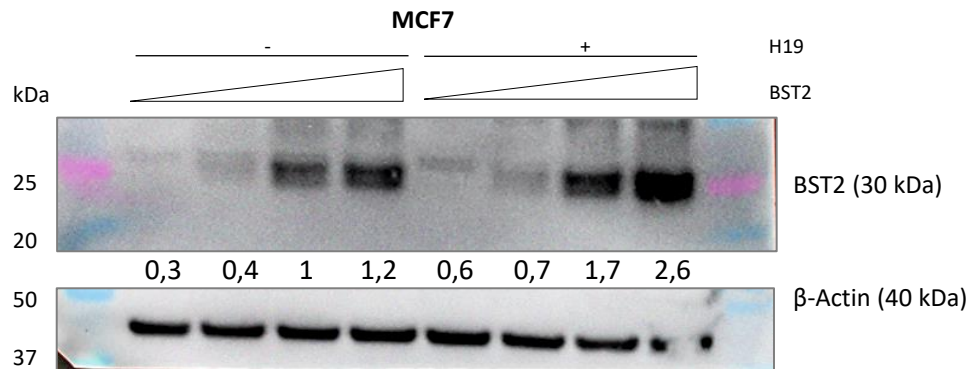
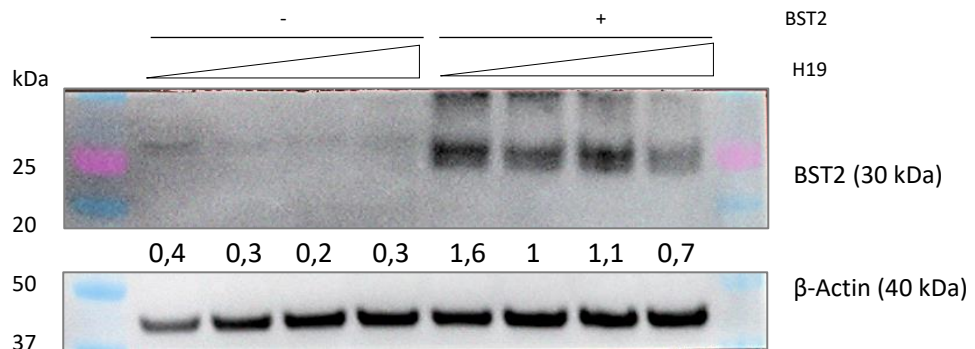
**Figure 25 : Effets du knockdown de *BST2*.** **A.** Expression relative de *BST2* dans les MCF-7 contrôles (siCtrl) ou de cellules *BST2*-knockdown (siBST2A, siBST2B) déterminée par qRT-PCR. **B.** Expression relative de *H19* dans les MCF-7 contrôles (siCtrl) ou de cellules *BST2*-knockdown (siBST2A, siBST2B) déterminée par qRT-PCR. **C.** Expression relative de *BST2* dans les MDA-MB-231 contrôles (siCtrl) ou de cellules *BST2*-knockdown (siBST2A, siBST2B) déterminée par qRT-PCR. **D.** Expression relative de *H19* dans les MDA-MB-231 contrôles (siCtrl) ou de cellules *BST2*-knockdown (siBST2A, siBST2B) déterminée par qRT-PCR. **E.** Expression relative de *BST2* dans les T47D contrôles (siCtrl) ou de cellules *BST2*-knockdown (siBST2A, siBST2B) déterminée par qRT-PCR. **F.** Expression relative de *H19* dans les T47D contrôles (siCtrl) ou de cellules *BST2*-knockdown (siBST2A, siBST2B) déterminée par qRT-PCR. **G.** Expression protéique de *BST2* dans les cellules MCF-7 contrôles (siCtrl) ou de cellules *BST2*-knockdown (siBST2A, siBST2B) déterminée par analyse western blot. **H.** Expression protéique de *BST2* dans les cellules MDA-MB-231 contrôles (siCtrl) ou de cellules *BST2*-knockdown (siBST2A, siBST2B) déterminée par analyse western blot. **I.** Expression protéique de *BST2* dans les cellules T47D contrôles (siCtrl) ou de cellules *BST2*-knockdown (siBST2A, siBST2B) déterminée par analyse western blot. Les intensités relatives des bandes ont été quantifiées par ImageJ. Les expériences ont été réalisées au moins 3 fois. Pour chaque expérience, l'actine a été utilisée comme contrôle d'équi-charge. Sur les graphiques, les données représentent la moyenne de 3 expériences indépendantes et les écarts-types associés. \* :  $p < 0,05$  ; \*\* :  $p < 0,01$  ; \*\*\* :  $p < 0,001$  ; ns : non-significatif.

De la même manière, j'ai créé et transfecté transitoirement deux siRNA dirigés contre *BST2* (siBST2A, siBST2B) dans les cellules MCF-7, MDA-MB-231 et T47D WT (Figure 25). En présence des siRNA dirigés contre *BST2*, nous avons observé une diminution de l'expression de *BST2* dans les 3 lignées cellulaires (Figure 25A, C, E) ainsi qu'une diminution de l'expression de *H19* (Figure 25B, D, F). De façon inattendue, dans les cellules T47D, l'expression de *H19* augmente en présence du siBST2A (Figure 25F). Peut-être que ce siRNA est moins efficace dans cette lignée. Comme précédemment, nous nous sommes intéressés à l'expression protéique de *BST2* en présence des siRNA dirigés contre *BST2*. Étonnamment, nous n'avons observé aucune différence entre les conditions néanmoins nous n'avons détecté qu'une seule bande correspondant à *BST2* (Figure 25G-I).

**Ces premiers résultats semblent démontrer qu'il existe une régulation entre *H19* et *BST2*.**

Afin d'étudier les mécanismes de régulation entre *H19* et *BST2*, nous avons décidé de créer une lignée cellulaire surexprimant stablement ou non *BST2* afin d'étudier l'expression de *H19* ainsi qu'un effet sur les phénotypes associés aux métastases du cancer du sein. Avant l'obtention de cellules surexprimant stablement *BST2*, nous avons vérifié la fonctionnalité du vecteur en créant une gamme effet dose. En effet, dans un premier temps, nous avons transfecté le vecteur pcDNA3.1-*BST2* à différentes concentrations dans les cellules MCF-7 (Figure 26) et MDA-MB-231 (Figure 27) WT pour observer l'expression génique de *BST2* et *H19* ainsi que l'expression protéique de *BST2*.

Nous avons constaté dans les deux lignées cellulaires, une augmentation dose-dépendante de l'expression de *BST2* lorsque la concentration de *BST2* augmente et en absence de *H19* (Figure 26A, 26E, 27A, 27E). En présence de *H19*, l'augmentation de l'expression de *BST2* est également dose-dépendante mais plus faible qu'en absence de *H19* (Figure 26A, 27A). De plus, l'expression protéique de *BST2* est plus importante en présence de *H19* (Figure 26E, 27E). Quant à l'expression de *H19*, elle est augmentée avec la dose la plus faible de *BST2* et en absence de *H19* pour ensuite diminuer avec les concentrations les plus élevées de *BST2* (Figure 26B, 27B). Alors qu'en présence de *H19* et d'une dose croissante de *BST2*, l'expression de *H19* est augmentée de manière dose-dépendante (Figure 26B, 27B).

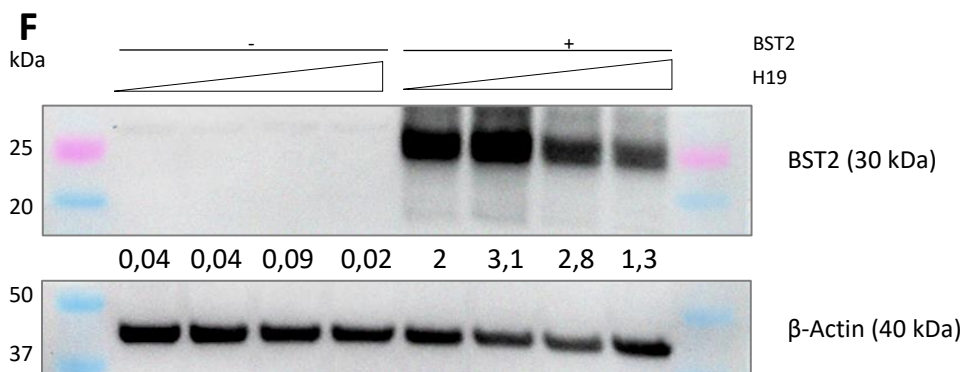
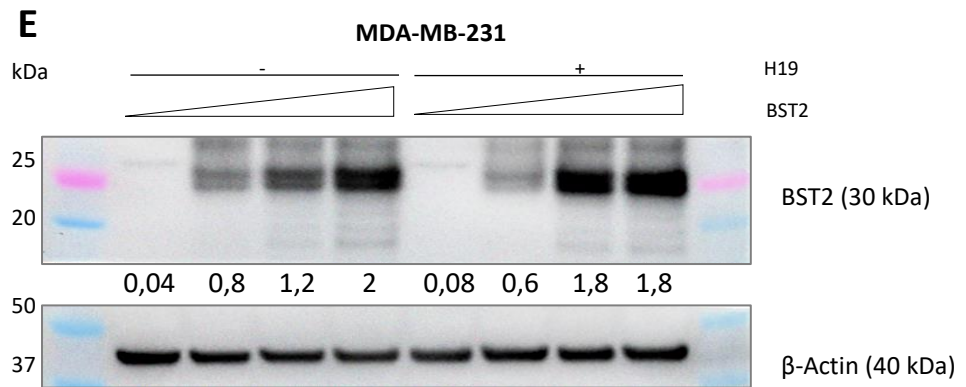
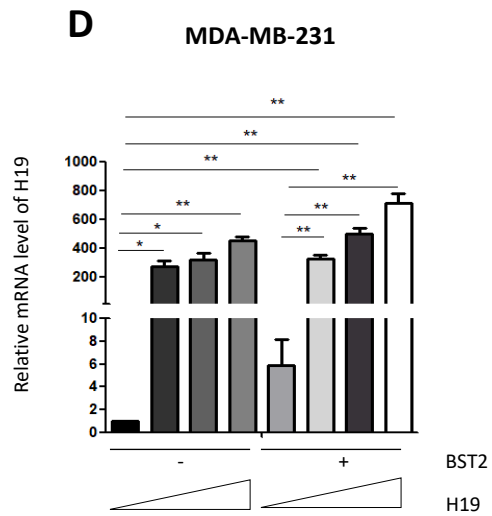
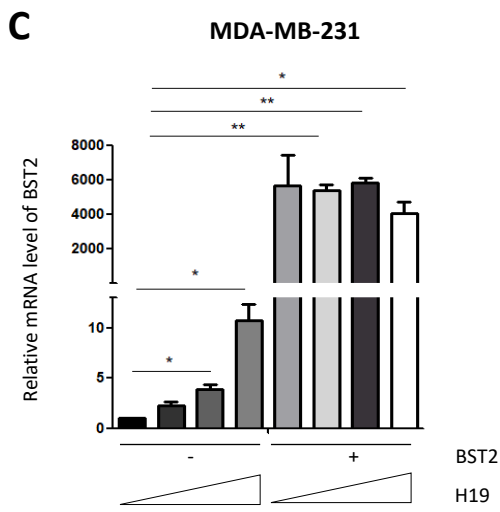
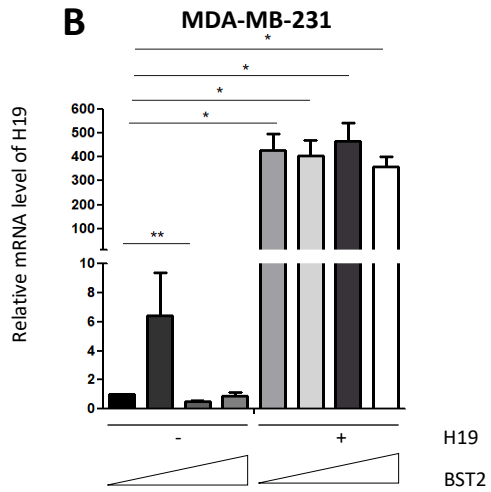
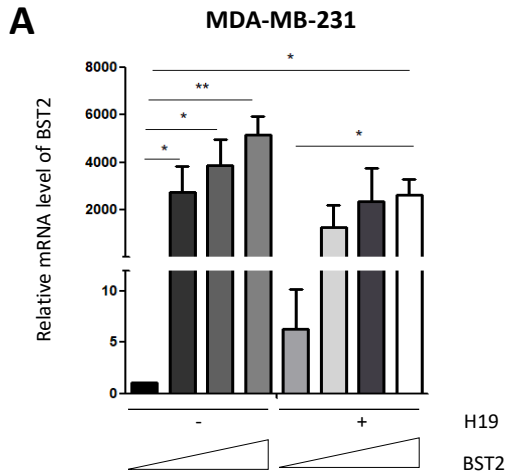
**A****B****C****D****E****F**



**Figure 26 : Effets dose de *BST2* sur les MCF-7 WT.** **A.** Expression relative de *BST2* dans les MCF-7 transfectées sans le vecteur pcDNA3.1-H19 (-) ou avec (+) et une concentration croissante de *BST2* (0 ; 0,25 ; 0,5 ; 0,75 µg) déterminée par qRT-PCR. **B.** Expression relative de *H19* dans les MCF-7 transfectées sans le vecteur pcDNA3.1-H19 (-) ou avec (+) et une concentration croissante de *BST2* (0 ; 0,25 ; 0,5 ; 0,75 µg) déterminée par qRT-PCR. **C.** Expression relative de *BST2* dans les MCF-7 transfectées sans le vecteur pcDNA3.1-*BST2* (-) ou avec (+) et une concentration croissante de *H19* (0 ; 0,25 ; 0,5 ; 0,75 µg) déterminée par qRT-PCR. **D.** Expression relative de *H19* dans les MCF-7 transfectées sans le vecteur pcDNA3.1-*BST2* (-) ou avec (+) et une concentration croissante de *H19* (0 ; 0,25 ; 0,5 ; 0,75 µg) déterminée par qRT-PCR. **E.** Expression protéique de *BST2* dans les cellules MCF-7 transfectées sans le vecteur pcDNA3.1-H19 (-) ou avec (+) et une concentration croissante de *BST2* (0 ; 0,25 ; 0,5 ; 0,75 µg) déterminée par analyse western blot. **F.** Expression protéique de *BST2* dans les cellules MCF-7 transfectées sans le vecteur pcDNA3.1-*BST2* (-) ou avec (+) et une concentration croissante de *H19* (0 ; 0,25 ; 0,5 ; 0,75 µg) déterminée par analyse western blot. Les intensités des bandes ont été quantifiées par ImageJ. Les expériences ont été réalisées au moins 3 fois. Pour chaque expérience, l'actine a été utilisée comme contrôle d'équi-charge. Sur les graphiques, les données représentent la moyenne de 3 expériences indépendantes et les écarts-types associés. \* :  $p < 0,05$  ; \*\* :  $p < 0,01$  ; \*\*\* :  $p < 0,001$  ; ns : non-significatif.

Dans un second temps, nous avons transfecté le vecteur pcDNA3.1-H19 à différentes concentrations dans les cellules MCF-7 (Figure 26) et MDA-MB-231 (Figure 27) WT pour observer l'expression génique de *BST2* et *H19* ainsi que l'expression protéique de *BST2*.

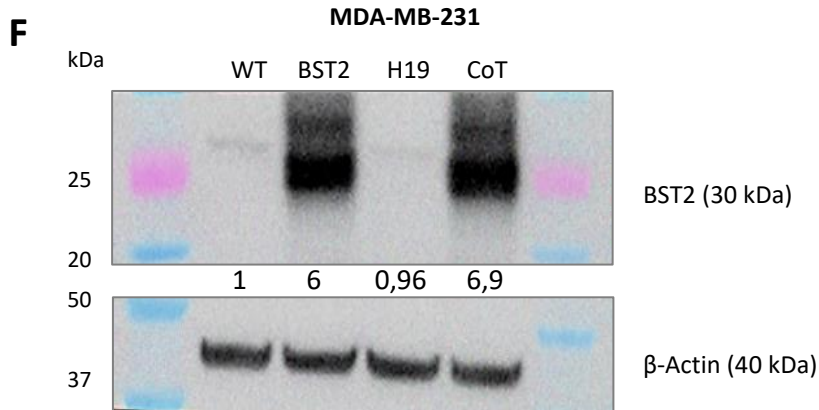
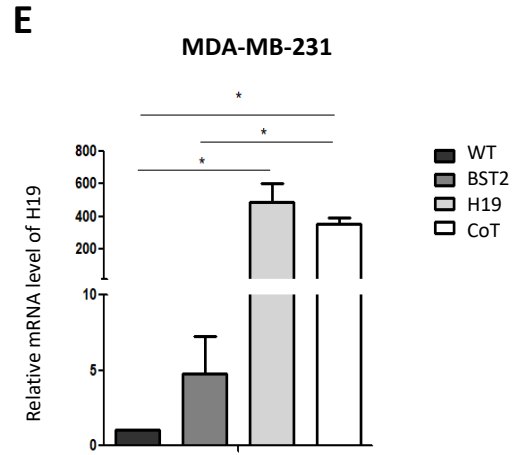
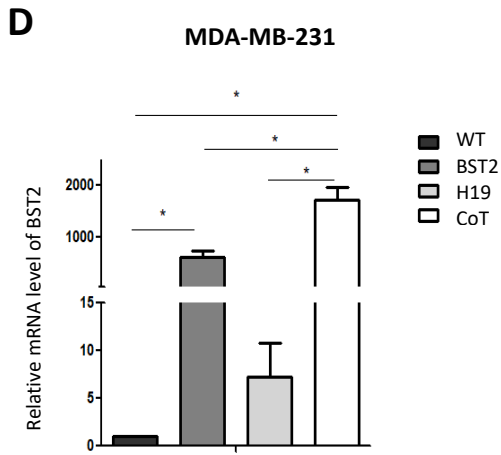
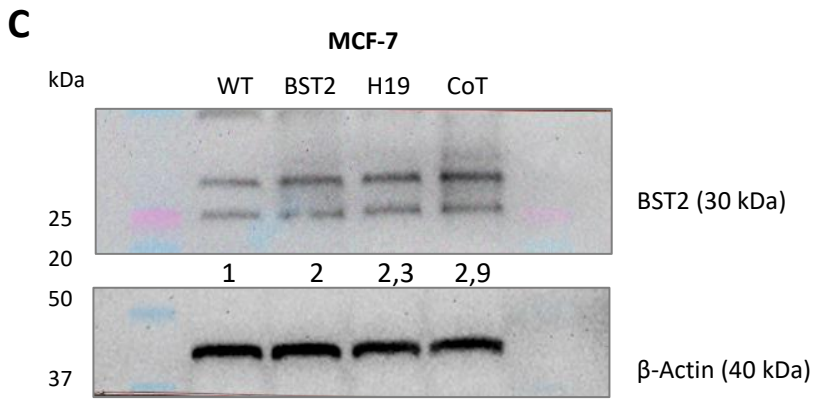
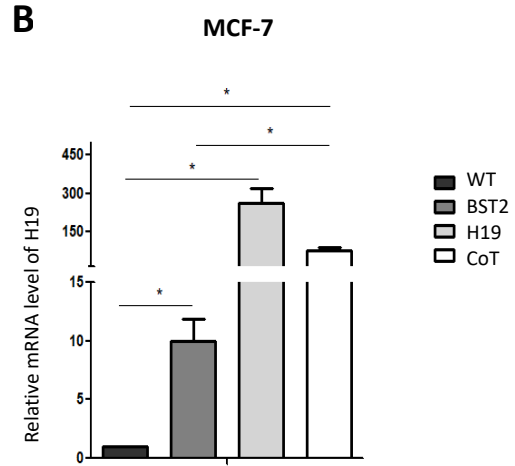
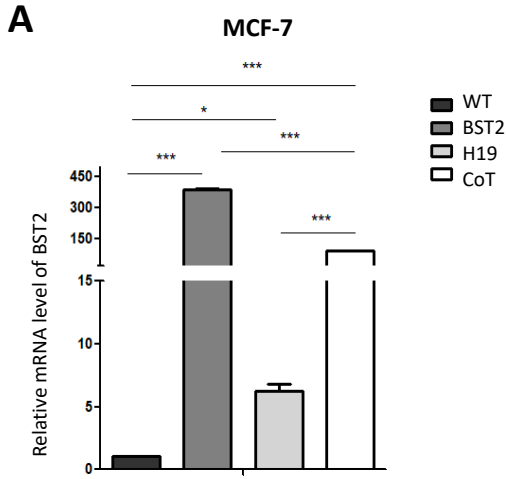
Nous avons observé une augmentation de l'expression de *BST2* et de *H19* lorsque la concentration de *H19* augmente et en absence de *BST2* dans les MCF-7 (Figure 26C, D). En présence de *BST2*, l'expression de *BST2* et de *H19* est augmentée de manière dose-dépendante dans les MCF-7 (Figure 26C, D). Dans les MDA-MB-231, en absence de *BST2*, l'expression de *BST2* et de *H19* est augmentée de manière dose-dépendante (Figure 27C, D). En présence de *BST2*, l'expression de *BST2* et de *H19* est augmentée lorsque la concentration de *H19* est elle-même augmentée (Figure 27C, D). De plus, en absence de *BST2*, nous n'avons pas visualisé l'expression protéique de *BST2* en augmentant la dose de *H19* dans les deux lignées cellulaires (Figure 26F, 27F). De manière étonnante, en présence de *BST2* et lorsque la concentration de *H19* augmente, nous détectons moins de *BST2* (Figure 26F, 27F).



**Figure 27 : Effets dose de *BST2* sur les MDA-MB-231 WT.** **A.** Expression relative de *BST2* dans les MDA-MB-231 transfectées sans le vecteur pcDNA3.1-H19 (-) ou avec (+) et une concentration croissante de *BST2* (0 ; 0,25 ; 0,5 ; 0,75 µg) déterminée par qRT-PCR. **B.** Expression relative de *H19* dans les MDA-MB-231 transfectées sans le vecteur pcDNA3.1-H19 (-) ou avec (+) et une concentration croissante de *BST2* (0 ; 0,25 ; 0,5 ; 0,75 µg) déterminée par qRT-PCR. **C.** Expression relative de *BST2* dans les MDA-MB-231 transfectées sans le vecteur pcDNA3.1-BST2 (-) ou avec (+) et une concentration croissante de *H19* (0 ; 0,25 ; 0,5 ; 0,75 µg) déterminée par qRT-PCR. **D.** Expression relative de *H19* dans les MDA-MB-231 transfectées sans le vecteur pcDNA3.1-BST2 (-) ou avec (+) et une concentration croissante de *H19* (0 ; 0,25 ; 0,5 ; 0,75 µg) déterminée par qRT-PCR. **E.** Expression protéique de *BST2* dans les cellules MDA-MB-231 transfectées sans le vecteur pcDNA3.1-H19 (-) ou avec (+) et une concentration croissante de *BST2* (0 ; 0,25 ; 0,5 ; 0,75 µg) déterminée par analyse western blot. **F.** Expression protéique de *BST2* dans les cellules MDA-MB-231 transfectées sans le vecteur pcDNA3.1-BST2 (-) ou avec (+) et une concentration croissante de *H19* (0 ; 0,25 ; 0,5 ; 0,75 µg) déterminée par analyse western blot. Les intensités des bandes ont été quantifiées par ImageJ. Les expériences ont été réalisées au moins 3 fois. Pour chaque expérience, l'actine a été utilisée comme contrôle d'équi-charge. Sur les graphiques, les données représentent la moyenne de 3 expériences indépendantes et les écarts-types associés. \* :  $p < 0,05$  ; \*\* :  $p < 0,01$  ; \*\*\* :  $p < 0,001$  ; ns : non-significatif.

Parallèlement, nous avons réalisé des expériences de co-transfection des deux vecteurs dans les cellules MCF-7 et MDA-MB-231 WT (Figure 28). En effet, nous avons montré que l'expression de *BST2* est augmentée en présence de *BST2* seul, comme attendu, de *H19* seul et des deux vecteurs (Figure 28A, D). Néanmoins, cette augmentation est moins importante lors de la co-transfection par rapport à la condition *BST2* seul dans les MCF-7 (Figure 28A). De la même manière, l'expression de *H19* est augmentée en présence de *BST2* seul, de *H19* seul, comme attendu, et des deux vecteurs (Figure 28B, E). L'augmentation de l'expression de *H19* est moins forte en présence des deux vecteurs par rapport à la condition *H19* seul (Figure 28B, E). L'expression protéique de *BST2* est augmentée dans les conditions *BST2* seul, *H19* seul et de co-transfection par rapport aux cellules contrôles (Figure 28C).

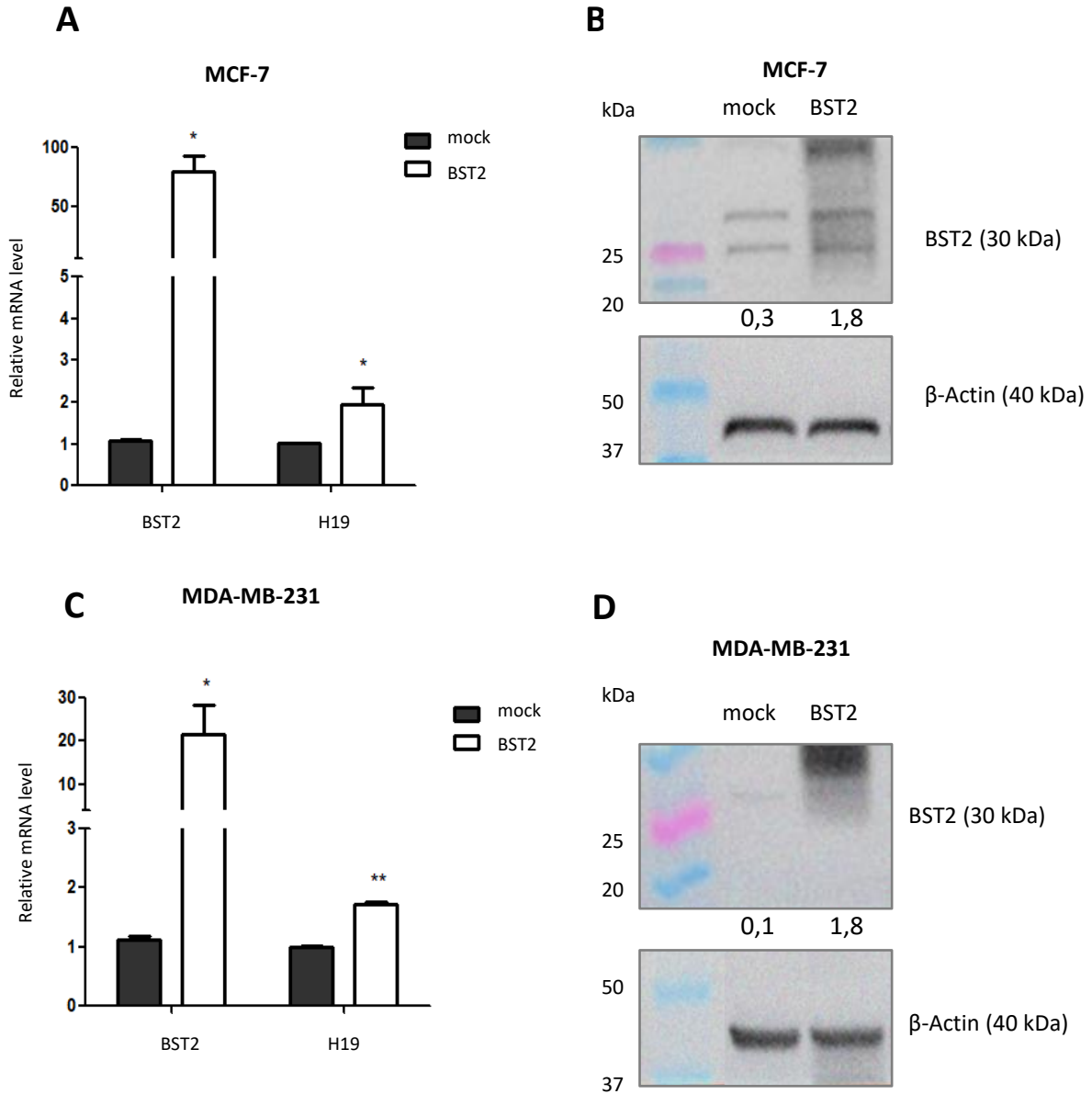
**Ensemble, ces données semblent indiquer qu'il existe une régulation post-transcriptionnelle entre *H19* et *BST2*. En effet, la courte durée de la transfection transitoire de siRNA ne permet pas à la cellule de mettre en place une régulation transcriptionnelle de par un laps de temps trop court. De plus, les vecteurs pcDNA3.1-H19 et pcDNA3.1-BST2 contiennent tous deux des promoteurs « forts », et donc par définition, peu régulables, ce qui réfute l'hypothèse d'une régulation transcriptionnelle entre *BST2* et *H19*. L'hypothèse d'une régulation post-traductionnelle est également écartée puisque *H19* est un ARN non codant.**



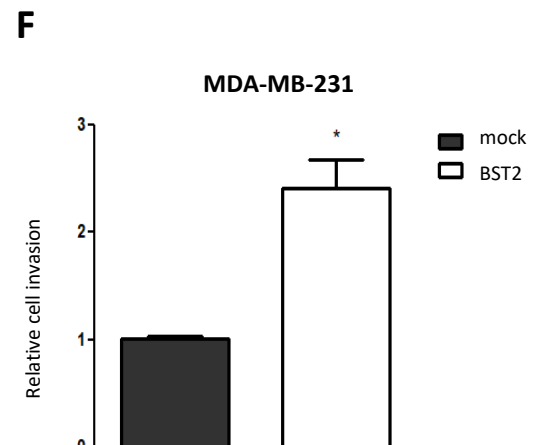
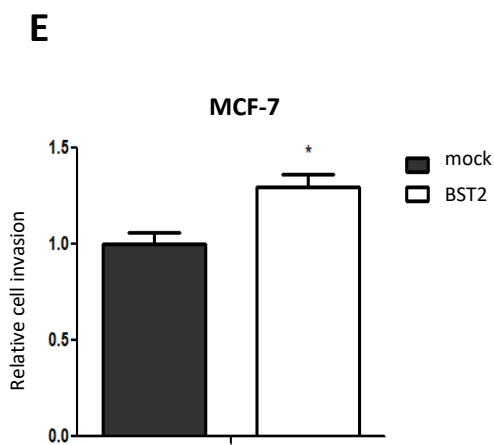
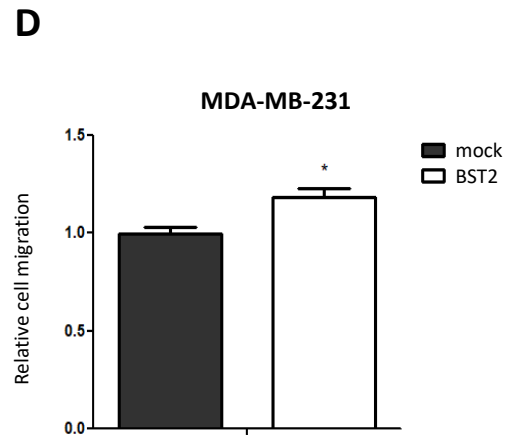
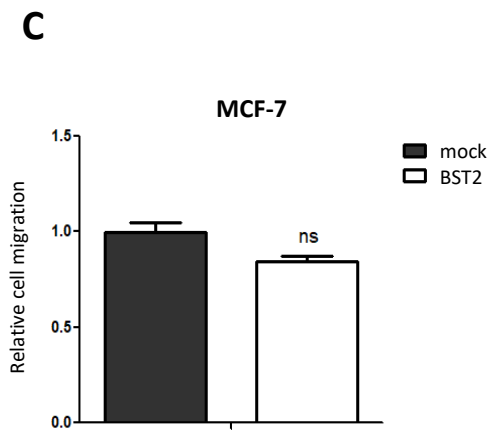
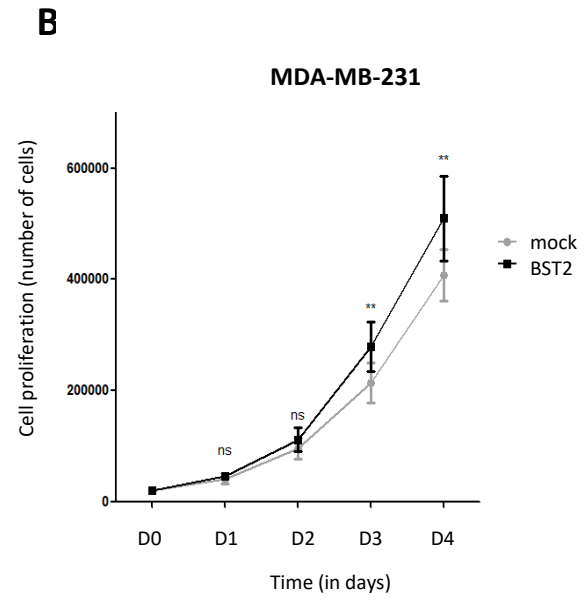
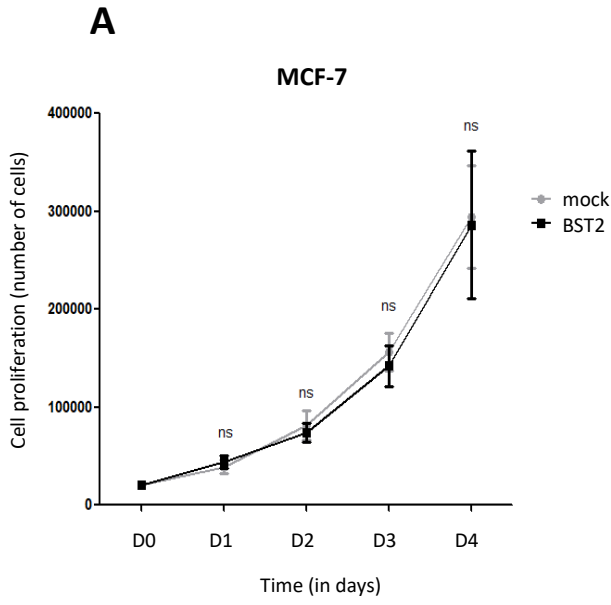
**Figure 28 : Expériences de co-transfection de *BST2* et de *H19* sur les cellules cancéreuses mammaires.** **A.** Expression relative de *BST2* dans les MCF-7 native (WT) ou transfectées soit avec le vecteur pcDNA3.1-*BST2* (*BST2*) soit avec le vecteur pcDNA3.1-*H19* (*H19*) ou avec les deux (CoT) déterminée par qRT-PCR. **B.** Expression relative de *H19* dans les MCF-7 native (WT) ou transfectées soit avec le vecteur pcDNA3.1-*BST2* (*BST2*) soit avec le vecteur pcDNA3.1-*H19* (*H19*) ou avec les deux (CoT) déterminée par qRT-PCR. **C.** Expression protéique de *BST2* dans les cellules les MCF-7 native (WT) ou transfectées soit avec le vecteur pcDNA3.1-*BST2* (*BST2*) soit avec le vecteur pcDNA3.1-*H19* (*H19*) ou avec les deux (CoT) déterminée par analyse western blot. Les intensités relatives des bandes ont été quantifiées par ImageJ. Les expériences ont été réalisées au moins 3 fois. Pour chaque expérience, l'actine a été utilisée comme contrôle d'équi-charge. **D.** Expression relative de *BST2* dans les MDA-MB-231 natives (WT) ou transfectées soit avec le vecteur pcDNA3.1-*BST2* (*BST2*) soit avec le vecteur pcDNA3.1-*H19* (*H19*) ou avec les deux (CoT) déterminée par qRT-PCR. **E.** Expression relative de *H19* dans les MDA-MB-231 natives (WT) ou transfectées soit avec le vecteur pcDNA3.1-*BST2* (*BST2*) soit avec le vecteur pcDNA3.1-*H19* (*H19*) ou avec les deux (CoT) déterminée par qRT-PCR. **F.** Expression protéique de *BST2* dans les cellules les MCF-7 natives (WT) ou transfectées soit avec le vecteur pcDNA3.1-*BST2* (*BST2*) soit avec le vecteur pcDNA3.1-*H19* (*H19*) ou avec les deux (CoT) déterminée par analyse western blot. Les intensités relatives des bandes ont été quantifiées par ImageJ. Les expériences ont été réalisées au moins 3 fois. Pour chaque expérience, l'actine a été utilisée comme contrôle d'équi-charge. Sur les graphiques, les données représentent la moyenne de 3 expériences indépendantes et les écarts-types associés. \* :  $p < 0,05$  ; \*\*\* :  $p < 0,001$ .

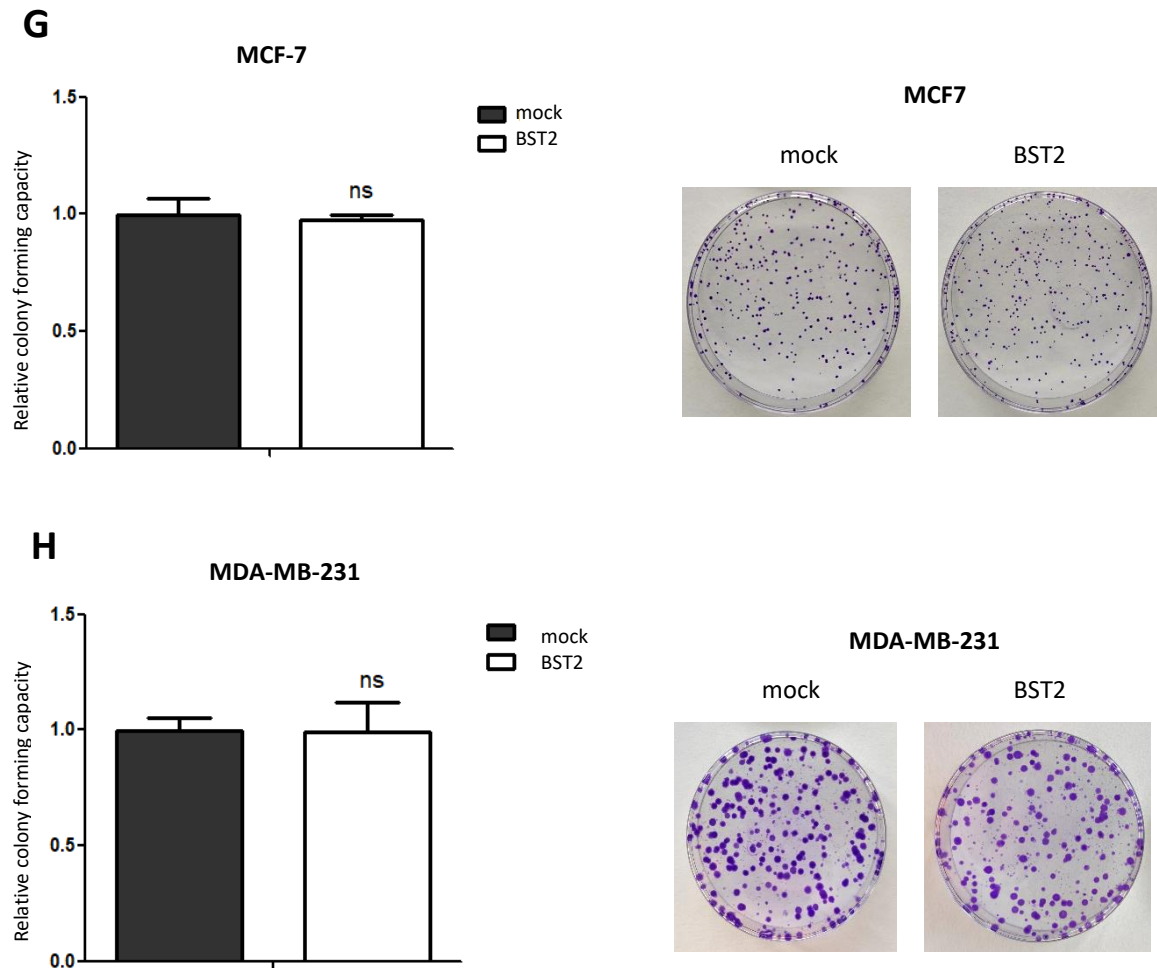
Après validation de notre modèle de surexpression de *BST2*, nous avons décidé de créer les lignées cellulaires MCF-7 et MDA-MB-231 surexprimant stablement ou non *BST2* (Figure 29). Ces lignées nous ont permis d'étudier l'expression de *H19* ainsi que les effets de *BST2* sur les phénotypes associés aux métastases du cancer du sein (Figure 30). En effet, la surexpression de *BST2* a été vérifiée par qRT-PCR (Figure 29A, C) et par western blot (Figure 29B, D). De plus, nous avons mis en évidence, que dans les cellules surexprimant *BST2*, l'expression de *H19* est également augmentée (Figure 29A, C). Ces résultats coïncident avec ceux obtenus précédemment.

Concernant les phénotypes associés au développement de métastases, nous nous sommes intéressés à la prolifération, à la migration, à l'invasion et à la clonogénicité des cellules cancéreuses mammaires surexprimant stablement *BST2* (Figure 30). En effet, nous avons déjà démontré l'implication du lncRNA *H19* dans ces phénotypes (Berteaux et al., 2005; Peperstraete et al., 2020).



**Figure 29 : Effets de la surexpression de *BST2* sur les cellules cancéreuses mammaires.** **A.** Expression relative de *BST2* et de *H19* dans les MCF-7 contrôles (mock) ou surexprimant stablement *BST2* (*BST2*) déterminée par qRT-PCR. **B.** Expression protéique de *BST2* dans les MCF-7 contrôles (mock) ou surexprimant stablement *BST2* (*BST2*) déterminée par analyse western blot. Les intensités des bandes ont été quantifiées par ImageJ. Les expériences ont été réalisées au moins 3 fois. Pour chaque expérience, l'actine a été utilisée comme contrôle d'équi-charge. **C.** Expression relative de *BST2* et de *H19* dans les MDA-MB-231 contrôles (mock) ou surexprimant stablement *BST2* (*BST2*) déterminée par qRT-PCR. **D.** Expression protéique de *BST2* dans les cellules MDA-MB-231 contrôles (mock) ou surexprimant stablement *BST2* (*BST2*) déterminée par analyse western blot. Les intensités des bandes ont été quantifiées par ImageJ. Les expériences ont été réalisées au moins 3 fois. Pour chaque expérience, l'actine a été utilisée comme contrôle d'équi-charge. Sur les graphiques, les données représentent la moyenne de 3 expériences indépendantes et les écarts-types associés. \* :  $p < 0,05$  ; \*\* :  $p < 0,01$ .





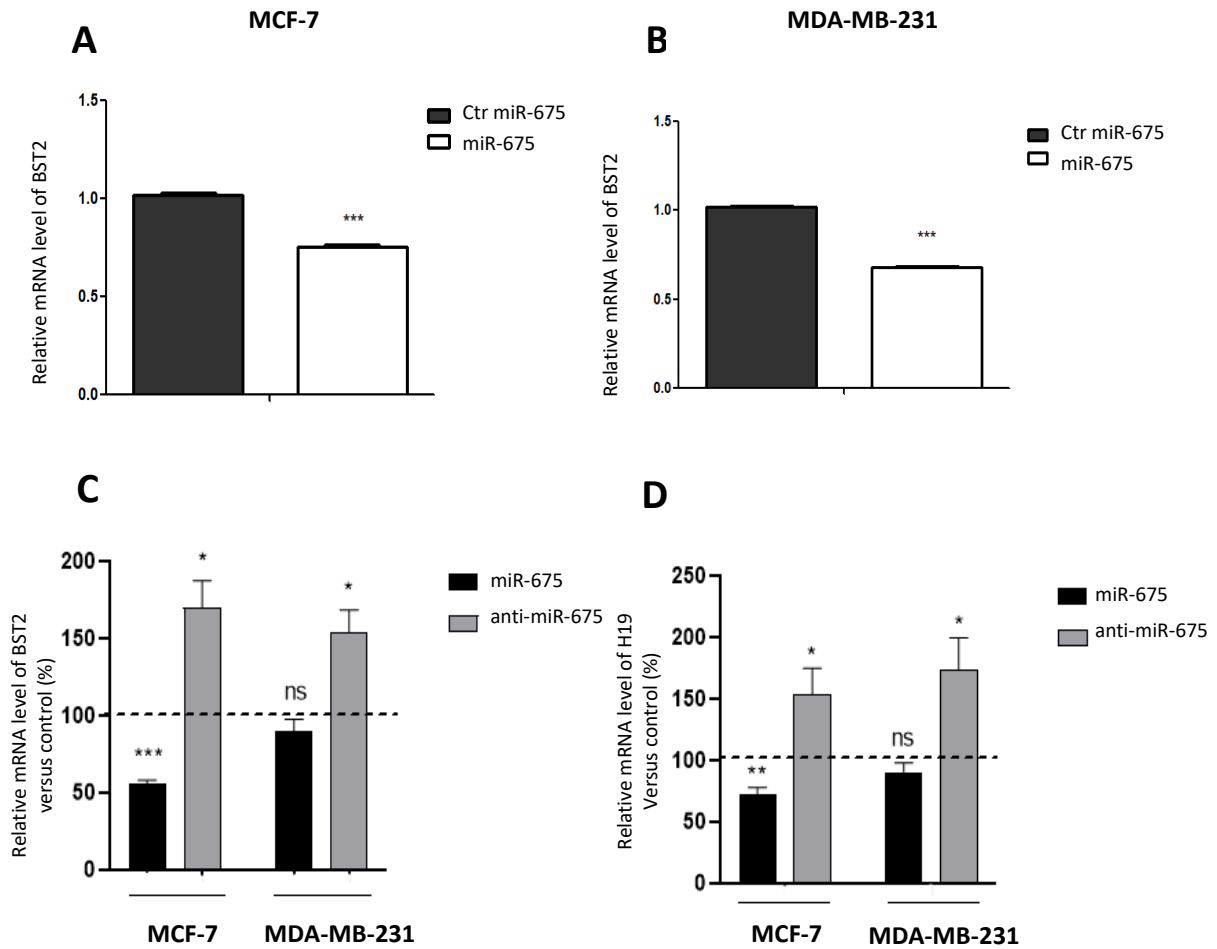
**Figure 30 : Effets de *BST2* sur les phénotypes associés au lncRNA *H19* sur les cellules de cancer du sein. A.** Test de prolifération des cellules MCF-7 contrôles (mock) ou surexprimant stablement *BST2* (BST2). **B.** Test de prolifération des cellules MDA-MB-231 contrôles (mock) ou surexprimant stablement *BST2* (BST2). **C.** Capacités migratoires des cellules MCF-7 contrôles (mock) ou surexprimant stablement *BST2* (BST2) cultivées dans des transwell pendant 8h. Les cellules ayant migré sont colorées avec du Hoechst 33258 1 mM et comptées. **D.** Capacités migratoires des cellules MDA-MB-231 contrôles (mock) ou surexprimant stablement *BST2* (BST2) cultivées dans des transwell pendant 8h. Les cellules ayant migré sont colorées avec du Hoechst 33258 1 mM et comptées. **E.** Capacités invasives des cellules MCF-7 contrôles (mock) ou surexprimant stablement *BST2* (BST2) cultivées dans des transwell pendant 24h. Les cellules invasives sont colorées avec du Hoechst 33258 1 mM et comptées. **F.** Capacités invasives des cellules MDA-MB-231 contrôles (mock) ou surexprimant stablement *BST2* (BST2) cultivées dans des transwell pendant 24h. Les cellules invasives sont colorées avec du Hoechst 33258 1 mM et comptées. **G.** Clonogénicité des cellules MCF-7 contrôles (mock) ou surexprimant stablement *BST2* (BST2). Des photos représentatives sont figurées pour chaque condition. **H.** Clonogénicité des cellules MDA-MB-231 contrôles (mock) ou surexprimant stablement *BST2* (BST2). Des photos représentatives sont figurées pour chaque condition. Les expériences ont été réalisées au moins 3 fois. Sur les graphiques, les données représentent la moyenne de 3 expériences indépendantes et les écarts-types associés. \* :  $p < 0,05$  ; \*\* :  $p < 0,01$  ; ns : non-significatif.



Les résultats de prolifération sur les cellules MCF-7 n'ont pas montré de résultats significatifs sur 4 jours (Figure 30A) tandis que les cellules MDA-MB-231 surexprimant stablement *BST2* prolifèrent plus rapidement que les cellules contrôles (Figure 30B). Lors des tests de migration cellulaire, une fois encore, nous n'avons pas observé de différences significatives pour les cellules MCF-7 (Figure 30C). Cependant, les cellules MDA-MB-231 surexprimant stablement *BST2* ont migré plus rapidement que les cellules contrôles (Figure 30D). Les cellules MCF-7 sont des cellules à faible potentiel prolifératif et migratoire, ce qui peut expliquer les résultats précédents. En revanche, la surexpression de *BST2* induit une augmentation de l'invasion cellulaire des MCF-7 et des MDA-MB-231 (Figure 30E, F). Suite à la migration et l'invasion des cellules dans le réseau vasculaire et lymphatique, les cellules vont être capable de coloniser d'autres organes à partir d'une cellule unique. Nous avons donc étudié l'implication de *BST2* lors de la clonogénicité. *BST2* n'influence pas la clonogénicité des cellules MCF-7 ou MDA-MB-231 (Figure 30G, H).

**En conclusion, *BST2* semble participer à la prolifération et à la migration. Comme *H19*, *BST2* induit l'invasion cellulaire des cellules cancéreuses mammaires mais n'influence pas la clonogénicité. Ces données montrent que *BST2* pourrait contribuer à la formation de métastases dans le cancer du sein. Néanmoins, d'après l'ensemble de nos résultats, d'autres déterminants moléculaires interviennent dans la régulation post-transcriptionnelle entre *BST2* et *H19*. En effet, nous posons l'hypothèse que le miR-675, précurseur de *H19* pourrait être impliqué dans cette régulation.**

Dans le but d'étudier l'implication du miR-675 lors de cette régulation post-transcriptionnelle, nous avons regardé l'expression relative de *BST2* dans des cellules surexprimant stablement ou non le miR-675 (Figure 31A, B). En effet, lorsque le miR-675 est surexprimé dans les cellules MCF-7 et MDA-MB-231, l'expression de *BST2* est diminuée (Figure 31A, B). De plus, nous avons transfecté un miRNA synthétique mimant l'expression du miR-675 (mimic-675) ainsi qu'un inhibiteur spécifique du miR-675 (anti-miR-675). La transfection du mimic-675 diminue l'expression de *BST2* et de *H19* dans les cellules cancéreuses mammaires (Figure 31C, D). A l'inverse, l'anti-miR-675, inhibant par complémentarité l'action du miR-675, augmente l'expression de *BST2* et de *H19* (Figure 31C, D). La différence d'expression de *BST2* entre la lignée MCF-7 et MDA-MB-231 pourrait s'expliquer par des niveaux endogènes plus importants de *BST2* et de *H19* dans la lignée MCF-7.



**Figure 31 : Régulation négative du miR-675 sur *BST2*.** **A.** Expression relative de *BST2* dans les cellules MCF-7 contrôles (Ctr miR-675) ou surexprimant stablement le miR-675 (miR-675) déterminée par qRT-PCR. **B.** Expression relative de *BST2* dans les cellules MDA-MB-231 contrôles (Ctr miR-675) ou surexprimant stablement le miR-675 (miR-675) déterminée par qRT-PCR. **C.** Expression relative de *BST2* dans les cellules MCF-7 et MDA-MB-231 transfectées avec le miR-675 (miR-675) ou transfectées avec un inhibiteur spécifique de miR-675 (anti-miR-675) déterminée par qRT-PCR. Les résultats sont présentés en pourcentage du contrôle. **D.** Expression relative de *H19* dans les cellules MCF-7 et MDA-MB-231 transfectées avec le miR-675 (miR-675) ou transfectées avec un inhibiteur spécifique de miR-675 (anti-miR-675) déterminée par qRT-PCR. Les résultats sont présentés en pourcentage du contrôle. Les expériences ont été réalisées au moins 3 fois. Sur les graphiques, les données représentent la moyenne de 3 expériences indépendantes et les écarts-types associés. \* :  $p < 0,05$  ; \*\* :  $p < 0,01$  ; \*\*\* :  $p < 0,001$  ; ns : non-significatif.

En conclusion, le miR-675 régule négativement l'expression de *BST2*. *BST2* pourrait être une nouvelle cible du miR-675 dans le cancer du sein. Le miR-675 semble être impliqué dans la régulation post-transcriptionnelle entre *H19* et *BST2*. Néanmoins, nous devons poursuivre les analyses afin de déterminer d'autres miRNA participant à cette régulation.



### **III. Rôle du lncRNA *H19* dans la régulation de la protéine p53 contribuant à la progression tumorale mammaire**

Le lncRNA *H19* est de plus en plus décrit comme jouant un rôle clé dans la progression et les métastases des cancers de différentes origines tissulaires. Nous avons précédemment montré que le gène *H19* est activé par E2F, réprimé par les suppresseurs de tumeurs p53 et RB et impliqué dans la progression du cycle cellulaire. Dans le cancer gastrique, *H19* interagit physiquement avec la protéine p53 et cette association entraîne une inactivation partielle de p53 (F. Yang et al., 2012). Cependant, la signification biologique de cette liaison n'est pas claire. Dans cette étude, nous avons identifié de nouveaux mécanismes d'interaction *H19*-p53 dans les cellules cancéreuses du sein et déterminé le rôle de cette association sur la fonction de p53. En effet, nous avons étudié les effets de l'expression de *H19* sur les activités transcriptionnelles de p53, sur le blocage du cycle cellulaire, sur l'induction de l'apoptose et de la sénescence des cellules après des dommages à l'ADN.

**Article soumis pour publication dans BBA – Molecular Basis of Disease**

## **The long non-coding RNA *H19* inhibits p53 and contributes to breast tumoral progression.**

Clément Lecerf <sup>1,§</sup>, Constance Vennin <sup>1,§</sup>, Jordan Collette <sup>1,§</sup>, Evodie Peperstraete <sup>1</sup>, Mélissa Gilles <sup>2</sup>, Nathalie Spruyt <sup>3</sup>, Nathalie Martin <sup>3</sup>, Corinne Abbadie <sup>3</sup>, Mohamed Elati <sup>1</sup>, Fabrice Lejeune <sup>3</sup>, Samuel Meignan <sup>1</sup>, Bruno Lefebvre <sup>2</sup>, Xuefen Le Bourhis <sup>1</sup> and Eric Adriaenssens <sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Univ. Lille, CNRS, INSERM, CHU Lille, Centre Oscar Lambret, UMR 9020 – UMR 1277 – Canther – Cancer Heterogeneity, Plasticity and Resistance to Therapies, F-59000 Lille, France

<sup>2</sup> Univ. Lille, INSERM, CHU Lille, UMR-S 1172 – Lille Neuroscience & Cognition, F-59000 Lille, France

<sup>3</sup> Univ. Lille, CNRS, INSERM, CHU Lille, Institut Pasteur de Lille, UMR 9020 – UMR 1277 – Canther – Cancer Heterogeneity, Plasticity and Resistance to Therapies, F-59000 Lille, France

\* Author to whom correspondence should be addressed.

§ The three first authors contributed equally to this work.

**Keywords :** *H19* ; lncRNA ; breast cancer ; p53 ; genetic instability

### **Abstract**

*H19*, a long non-coding RNA, is increasingly described to play key roles in the progression and metastasis of cancers from different tissue origins. We have previously shown that the *H19* gene is activated by E2F, repressed by p53 and RB tumor suppressors and implicated in cell cycle progression. Here, we studied the effects of *H19* expression on p53 activities in breast cancer cells. We showed that *H19* reduces p53 transcriptional activities and impairs cell cycle blockage, apoptosis induction and senescence of cells after DNA damage. Mechanistically, we highlighted that *H19* interacts not only with p53 but also with MDM2 to form a ternary complex. This interaction favors not only the degradation of p53 but also impedes p53 nuclear translocation. Taken together, our data highlight a novel mechanism of protumoral action of *H19* in breast cancer cells through the repression of p53 and consequently the induction of genetic instability.

## 1. Introduction

The *H19* gene, located in human in 11p15.5 locus, is submitted to genomic imprinting. It is expressed only from the maternal allele and transcribed by the RNA polymerase II [1]. Although the transcript is spliced, polyadenylated, capped and exported into the cytosol, no protein has been associated. Consequently, Brannan *et al.* proposed that *H19* RNA functions as a riboregulatory [2]. *H19* is highly expressed in the embryo, both in extraembryonic (placenta), and fetal tissues. After birth, its expression is repressed even if a basal expression subsists in several tissues including mammary gland, adrenal gland and uterus [3-6]. Although the role of *H19* in cancer is still a matter of debate, increasing studies demonstrate that *H19* is an oncogene in numerous cancers such as bladder, gastric and breast cancer [7-9]. To promote tumorigenesis, the *H19* long non-coding RNA acts as a regulator at different levels of gene expression including chromatin organization, transcriptional regulation, and post-transcriptional control [10].

The p53 protein has been discovered in 1979 [11]. It is a transcription factor of 53 kDa composed of several domains: a transactivator domain, a prolin-rich domain, a DNA-binding domain, a tetramerisation domain and a Ct domain [12, 13]. The p53 protein is constitutively expressed in cells and continuously degraded by the proteasome. In unstressed cells, p53, through its transactivator domain, is associated with the E3 ubiquitin-ligase, MDM2. MDM2 induces the ubiquitination of p53 on its C-terminal domain, which is recognized by the proteasome and promotes p53 proteasomal degradation [14]. Under cellular stress including DNA break, irradiation or genotoxic stress, the activated ATM and ATR proteins phosphorylate p53 and MDM2, inducing the dissociation of p53/MDM2 complex and promoting p53 translocation into the nucleus [14]. According to the cellular stress, p53 promotes cell cycle arrest gene expression such as *p21<sup>waf1</sup>*, or apoptotic gene expression such as *bax* [15]. It is well known that a low level of DNA damage induces a low level of p53-activated *p21<sup>waf1</sup>* expression; whereas a high level of DNA damage induces a high p53 activation which promotes pro-apoptotic gene expression [16]. Thanks to its functions, the p53 protein is thus a genome keeper and prevents the transformation of normal cells to cancer cells.

We have previously shown that *H19* expression is negatively regulated by p53 in breast cancer cells [17]. In gastric cancer cells, it is established that *H19* physically interacts with p53 protein and this association results in partial p53 inactivation [18]. However, the biological significance of this binding is not clear. In this study, we identified new mechanisms of *H19*-p53 interaction in breast cancer cells and determined the role of this association on p53 function. Particularly, we found that *H19* interacts with both p53 and MDM2 in a tripartite manner. This interaction favors p53 degradation, and impairs cell cycle blockage, apoptosis induction and cell senescence after DNA damage.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Cell culture.

The estrogen-sensitive MCF-7 and T-47D breast cancer cell lines were maintained routinely in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco) or *Roswell Park Memorial Institute medium* (RPMI, Gibco) containing 10% foetal bovine serum (FBS) and 1% Zell Shield. The triple negative MDA-MB-231 breast cancer cell line and the Calu-6 lung cancer cell line were maintained routinely in RPMI containing 10% FBS and 1% Zell Shield. Cell lines were obtained from the American Type Culture Collection and cultured at 37°C with 5% CO<sub>2</sub>, 95% of air in humidified atmosphere.

### 2.2. Construction of plasmids.

The p53 and *H19* constructions were performed as previously described [17, 33]. p53 response elements primers were annealed in 95°C gradient. The dimers were cloned in the pGL4.10[luc2] (Invitrogen) plasmid between *Kpn* and *Xho*I enzyme site. The normalising vector pRL-null has no promoter sequence to drive expression of the *Renilla* luciferase gene and was purchased from Promega.

Plasmid productions were performed in *E. Coli* TOP 10 (Invitrogen). Plasmid extraction was performed by using Nucleobond PC100 (Macherey-Nagel).

### 2.3. H19 and p53 cDNA transfection.

*H19* and *p53* encoding-plasmids were transfected in Calu-6 and MCF-7 cells previously seeded at  $1.25 \times 10^5$  cells/well in 6-well plates. The desired quantity of plasmid was transfected with Exgen-500 (Euromedex) according to furnisher recommendations. To maintain the same amount of DNA in each sample, the DNA quantity was maintained at 1.5 µg with pcDNA3.1(-) empty vector (Invitrogen). Transfection medium was removed after 6 h at 37°C. Proteins were extracted 48 h after transfection.

### 2.4. Establishment of H19 overexpressing cell lines.

To establish cell lines stably overexpressing *H19*, Calu-6 and T-47D cell lines were transfected with 1 µg of pcDNA3.1-H19 or pcDNA3.1 empty vector as a control using Exgen-500 and cells were allowed to recover for 48 h. Cells were then selected in the presence of G418 at 0.5 mg/mL (for Calu-6 cell line) or 1 mg/mL (for T-47D cell line) for at least one month before their use for *in vitro* experiments. *H19*-stably overexpressing MDA-MB-231 and MCF-7 cell lines were previously described [33].

### 2.5. siRNA transfection.



For siRNA transfection,  $3 \times 10^6$  MCF-7 cells were plated in 100 mm dishes. After 24 h, cells were transfected with negative control (SR-CL000-005, Eurogentec), p53 or MDM2 siRNA (**Table S1**) using jetPRIME® Transfection Reagent, according to manufacturer's guidelines (Polyplus Transfection®). Cells were lysed 48 h after transfection.

#### 2.6. RNA extraction, reverse transcription and real-time RT-PCR.

RNA extraction and qRT-PCR were performed as previously described [34]. Primers used for qRT-PCR are described in **Table S1**.

#### 2.7. Western blot analysis.

Cells were lysed in RIPA buffer containing protease and phosphatase inhibitors (protease inhibitor P8340; phosphatase inhibitor cocktail 2 P5726, Sigma-Aldrich). Proteins were quantified with BCA protein assay (Pierce) and then reduced in NuPAGE LDS Sample buffer (Invitrogen) with NuPAGE Reducing Agent (Invitrogen) at 70°C for 10 min. Proteins were separated on SDS-PAGE 4-12% (Invitrogen) and transferred onto PolyVinylidene Fluoride (PVDF) membrane (Millipore). After saturation in PBS 0.2% of casein, membranes were incubated with primary antibodies overnight at 4°C: anti-MDM2 (sc-965, Santa Cruz), anti-p53 (DO-1, sc-126, Santa Cruz), anti RAS-GAP (sc-63, Santa Cruz), anti-PARP-1 (sc-7150, Santa Cruz) and anti-actin (A2066-2ML, Sigma). Actin was used as a loading control. Membranes were washed with PBS 0.5% Tween for 30 min and incubated with secondary antibodies conjugated with Horse Radish Peroxidase (HRP) for 2 h at room temperature. Membranes were analyzed with SuperSignal west Dura Chemiluminescence Substrate (Pierce).

#### 2.8. Nuclear and cytoplasmic protein extraction.

Cells were washed twice with ice-cold PBS and lysed in hypotonic buffer (10 mM HEPES, 2 mM  $MgCl_2$ , 10 mM KCl, 0.2 mM PMSF, 3 mM DTT, 10 mM EDTA, 0.1% Igepal). After centrifugation (5 min, 4°C, 12 000g), the supernatants were collected as cytosol. Nuclear extracts were prepared by resuspension of the crude nuclei in high salt buffer (50 mM HEPES, 50 mM  $MgCl_2$ , 300 mM NaCl, 0.2 mM PMSF, 3 mM DTT, 10 mM EDTA, 10% glycerol) during 10 min at 4°C. The nucleoprotein-containing supernatants were collected after centrifugation (5 min, 4°C, 12 000 g) and conserved at -80°C until use.

#### 2.9. Cells transfection and luciferase activity.

A total of  $20 \times 10^4$  cells/well was seeded in 6-well plates. Twenty-four hours after, cells were transfected with 1  $\mu$ g of p53-pGL4 and 12 ng of pRL-null vectors with Exgen-500 (Euromedex) according to manufacturer's guidelines. The luciferase activity was measured 24 h after transfection by using the

dual-luciferase reporter assay system according to manufacturer's instructions (Promega). *Firefly* luciferase was normalized with *Renilla* luciferase.

#### 2.10. Gene expression profiles of tumors.

Tumor transcriptomes raw data were downloaded from the Cancer Genome Atlas Consortium (TCGA) [35]. The name of the TCGA project is "TCGA-BRCA" (Breast Invasive Carcinoma). Both clinical and gene expression profiles were downloaded with the TCGAbiolinks R package [36]. Raw data were normalised using within-lane normalisation and between-lane normalisation from [37]. Within-lane normalisation allows to correct effects on gene-level counts (gene length) and between-lane normalisation allows to correct effects related to between-lane distributional differences (sequencing depth). The TCGA BRCA dataset (1095 samples) was used to assess the correlation between the levels of *H19* and MDM2 expression. TCGA BRCA subtypes are distributed as follows: Basal (190), Her2 (82), LumA (566), LumB (217) and Normal (40). Samples were selected when present in the 90<sup>th</sup> percentile of *H19* expression and/or in the 90<sup>th</sup> percentile of MDM2 expression. A total of 217 samples were thus selected, representing 20% of the initial dataset. The Pearson correlation coefficient was used for the correlation analysis and was computed with the R package stats.

#### 2.11. RNA immunoprecipitation (RIP).

RNA associated with p53 or MDM2 proteins were immunoprecipitated by using "RNA ChIP-IT<sup>®</sup> Magnetic Chromatin Immunoprecipitation Kit" (#53024, Active Motif) and anti-p53 (p53 (DO-1), sc-126, Santa Cruz) or anti-MDM2 (MDM2 (SMP14), sc-965, Santa Cruz) antibody, according to manufacturer's guidelines.

#### 2.12. Co-immunoprecipitation.

Cells were treated with 10  $\mu$ M of proteasome inhibitor MG132 (#474790, Calbiochem) for 6 h and lysed in Hepes buffer (40 mM HEPES pH 7.5, 1 mM EDTA pH 8.0, 120 mM NaCl, 10 mM NaPPi, 1% Triton X-100, 0.1% SDS, 10% glycerol) supplemented with protease and phosphatase inhibitors (50 mM NaF, 1.5 mM sodium orthovanadate, 1mM PMSF, cOmplete<sup>™</sup> protease inhibitor cocktail from Roche 1/100). After centrifugation at 14 000g, 4°C, 10 min, proteins were extracted and quantified with BCA protein assay (Pierce). The protein G beads were blocked with 1 mg of protein 1 h at 4°C on rolling shaker. On the cleared supernatant, 5  $\mu$ g antibody were added and incubated 2 h at 4°C on rolling shaker. Antibodies used were anti-p53, anti-MDM2. Pre-blocked beads were added to antibody-protein complex and incubated for 2 h at 4°C on rolling shaker. The beads were rinsed three times with complete lysis buffer. Immunoprecipitated proteins were eluted and reduced in Laemmli buffer (12.5

mM Tris, 2% glycerol, 0.4% SDS, 1%  $\beta$ -mercaptoethanol, bromophenol blue) at 95°C for 7 min. Proteins were separated on 10% acrylamide gel and analyzed by western blotting as described above.

#### 2.13. GST pull down.

Expression of wild-type GST-tagged MDM2 protein and His-tagged p53 protein was induced in *Escherichia coli* strain One Shot™ BL21 (Invitrogen™). His-tagged p53 protein was purified with Ni-NTA fast start kit (Qiagen). MDM2 protein was purified using Glutathione sepharose 4B beads (Sigma Aldrich). The human p53-(1-393) plasmid was a gift from Cheryl Arrowsmith (Addgene plasmid #24859) and pGEX-4T MDM2 WT plasmid was a gift from Mien-Chie Hung (Addgene plasmid #16237). Modulation of p53 binding to MDM2 by *H19* presence was analyzed using a GST pull down assay. Briefly, GST-tagged MDM2 and His-tagged p53 proteins were generated as described above and *H19* RNA was produced using Riboprobe *in vitro* transcription systems (Promega) and pcDNA3.1-H19 vector [38]. A control RNA, SRA was also generated using an expression vector kind gift of Dr B O'Malley [39]. GST-tagged MDM2 proteins were incubated with glutathione sepharose beads on rolling shaker at 4°C for 1 h, beads were rinsed twice with PBS-T (PBS, 0.1% Triton) and twice with wash buffer (100 mM NaCl). After washing, p53 was added to the mix to allow for its potential binding to MDM2 proteins for 1 h at 4°C. The *in vitro* synthesized RNA was then added to the mix and incubated overnight on rolling shaker at 4°C. The beads were rinsed thrice with wash buffer and proteins were reduced in Laemmli buffer. Proteins were separated by SDS-PAGE and immunoblotted with p53 and MDM2 antibodies as described above.

#### 2.14. Immunocytochemistry.

Cells were seeded on Lab-Tek™ culture chamber (Thermo Fisher Scientific), fixed with paraformaldehyde 4% and permeabilized with PBS/Triton X-100 0.5%. After blocking with TBST/casein 0.8%, cells were incubated with the antibody against p53 (DO-1, sc-126, Santa Cruz, 1/500) overnight at 4°C, rinsed with PBS and then incubated with Alexa Fluor 488 secondary antibody (#4408, Cell Signaling, 1/2000) for 1 h at room temperature. The nuclei were counterstained with Hoechst 33258 1 mM for 10 min. Cell staining was captured under microscope (Eclipse Ti-U, Nikon) and analyzed with ImageJ software.

#### 2.15. Induction of senescence and SA-b-Gal assay.

A total of  $25 \times 10^3$  cells was seeded on 60 mm dish and cultured for 24 h. To induce senescence, cells were treated with 0.067  $\mu$ g/mL doxorubicin for 72 h. To detect senescence, we employed a senescence-associated- $\beta$ -Galactosidase (SA-b-Gal) assay using the C<sub>12</sub>FDG  $\beta$ -Galactosidase substrate.

The C<sub>12</sub>FDG substrate, cleaved by the β-galactosidase, an enzyme highly active in senescent cells, produces a fluorescent product retained by the cells. Senescent cells were stained with C<sub>12</sub>FDG probe (F2756, Sigma-Aldrich) as previously described [40] and cell fluorescence was quantified by flow cytometry using CyAn™ ADP Analyser (Beckman Coulter).

#### 2.16. Cell cycle analysis.

A total of 3x10<sup>5</sup> cells was seeded on 60mm dish and cultured for 24 h. Cells were synchronised in G1/S with 6 μM Aphidicolin (Enzo Life Sciences, BML-CC101) for 24 h. Cells were rinsed twice in PBS and treated with 0.2 μg/mL doxorubicin for another 24 h. Cells were then permeabilized in 70% cold-ethanol overnight, rinsed in PBS and stained in PBS supplemented with propidium iodide (1 μg/mL) and RNase A (1 mg/mL) (R6513, Sigma-Aldrich) for 30 min at 37°C. Cell cycle was analyzed using CyAn™ ADP Analyser (Beckman Coulter) and MultiCycle AV software. To determine the sub-G1 cell population, a total of 3x10<sup>5</sup> cells was seeded on 60mm dish and cultured for 24 h. Cells were rinsed twice in PBS and treated with 0.6 μg/mL doxorubicin for 6 h, 12 h, 18 h or 24 h. Cells were then permeabilized in 70% cold-ethanol for 30 min at room temperature, rinsed in PBS supplemented with propidium iodide (1 μg/mL) and RNase A (1 mg/mL) (R6513, Sigma-Aldrich) for 30 min at 37°C. Sub-G1 cell population was analyzed using CytoFLEX S (Beckman Coulter) and FlowJo Software.

#### 2.17. *In vivo* experiments.

Animals were maintained in compliance with European standards for the care and use of laboratory animals and experimental protocols were approved by the local Animal Ethical Committee (agreement APAFIS# 25871-20200522117321730, Lille, France). T-47D Ctrl or T-47D H19 cells were suspended in 200 μL of FBS, and then injected (10 million) in the fat pad of 8-week-old female NOD/SCID mice (Jackson Laboratory). Tumors were measured with calipers, and volume calculated by the formula:  $\pi/6 L \times l \times (L+l)/2$ . When tumors reached ~ 500 mm<sup>3</sup>, mice were assigned randomly (N=10 tumors) to either control or doxorubicin (6 mg/kg once). Mice were then treated with PBS or doxorubicin (6 mg/kg). Tumors are measured with calipers and volume was calculated as described previously. Results are shown as ratio between tumor volume after treatment and tumor volume before treatment indexed to 100.

#### 2.18. Statistical analysis.

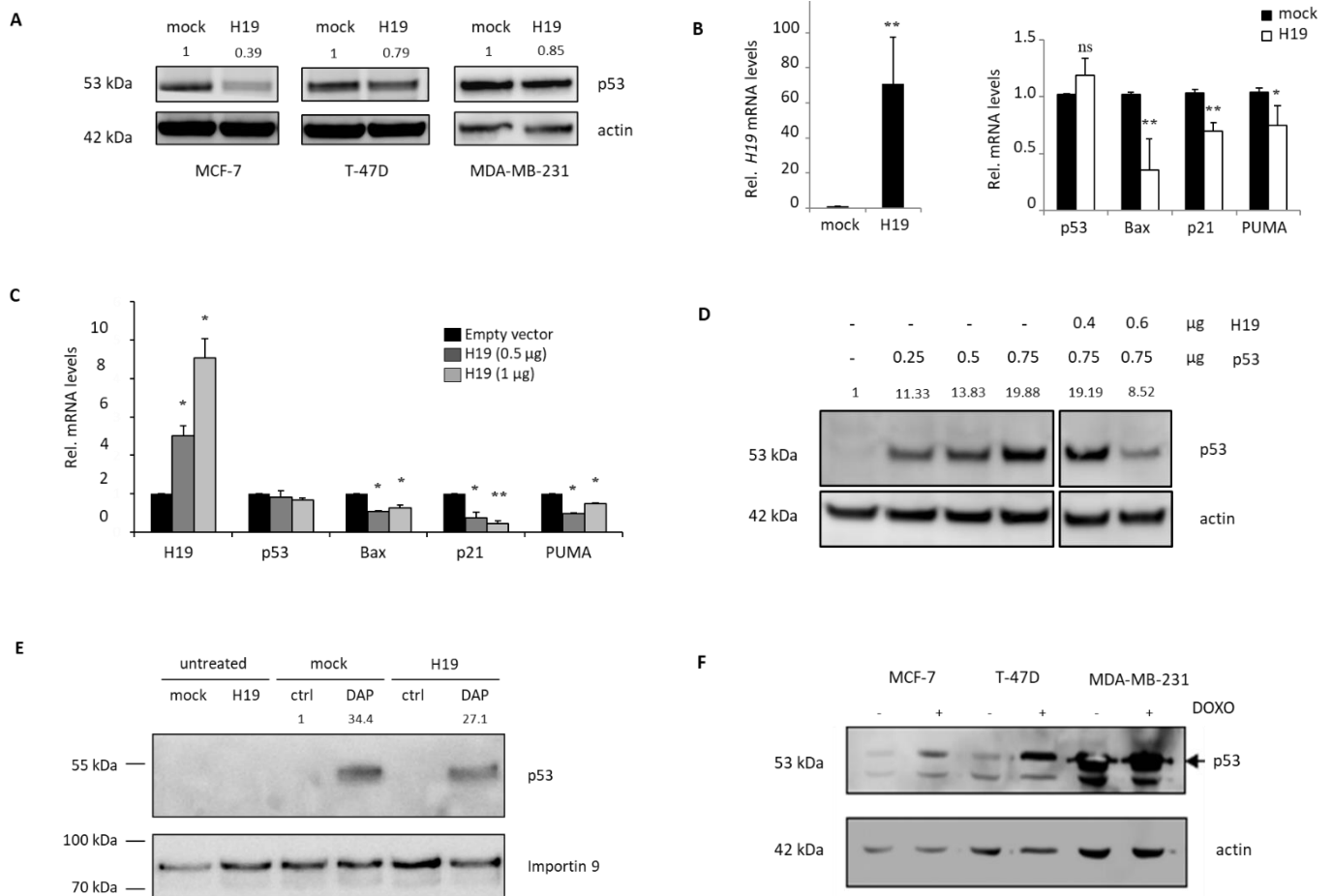
Data are expressed as mean values ± standard error of at least 3 independent experiments. The statistical analysis was done by using Student's *t*-test and *p* value < 0.05 was considered significant.

### 3. Results

#### 3.1 H19 reduces the level of p53 protein.

We previously demonstrated that p53 regulates *H19* gene expression [17] and that *H19* is implicated in cell cycle control [19]. To determine the role of *H19* in the regulation of p53 activities, we first examined the expression level of p53 in control (mock) and *H19*-stably overexpressing (*H19*) cells. As shown in **Figure 1A**, the levels of p53 protein were decreased in *H19*-stably overexpressing breast cancer cells, especially in MCF-7 cells, which possess a wild-type form of p53, but also in T-47D (with mutated form of p53) and to lesser extent in MDA-MB-231 (another breast cancer cell line with mutated form of p53) which expressed high levels of p53. The basal level of p53 in the three cell lines was determined by western blot and done in **Supplemental Figure 1**. In addition, we demonstrated that whatever the mutated status of p53 in these cell lines, p53 remains inducible after DNA damage (**Figure 1F**). Interestingly, the level of p53 mRNA was not significantly modified while the expression of several p53 target genes such as *bax*, *cdkn1a* and *puma* was decreased in MCF-7 cells stably overexpressing *H19* (**Figure 1B**). Similar results were also observed after transient transfection of cells with a plasmid encoding for *H19* (**Figure 1C**). These results indicate that *H19* post-transcriptionally down-regulates p53 protein, leading to a decreased expression of several p53 target genes. To determine if *H19*-induced down-regulation of p53 could be a general mechanism, we co-transfected epithelial Calu-6 cells (p53-null) with different quantities of *p53* and *H19* expression plasmids (**Figure 1D**). Both genes were expressed under the control of strong promoters. As revealed by western blot, in cells transiently transfected with *H19*, the level of p53 protein is strongly decreased. However, by qRT-PCR, we did not detect any effect of *H19* expression on p53 mRNA level.

In Calu-6 cells, *TP53* gene has a UGA nonsense mutation, inducing nonsense-mediated mRNA decay. We have previously shown that 2,6-Diaminopurine is a potent corrector of UGA nonsense mutations [20]. Calu-6 cells treatment by 2, 6-Diaminopurine (DAP) induces p53 expression as revealed by western blot, but *H19* expression impairs in part this induction (**Figure 1E**). Overall, these results indicate that *H19* is able to decrease the level of p53 protein and the expression of p53 target genes.

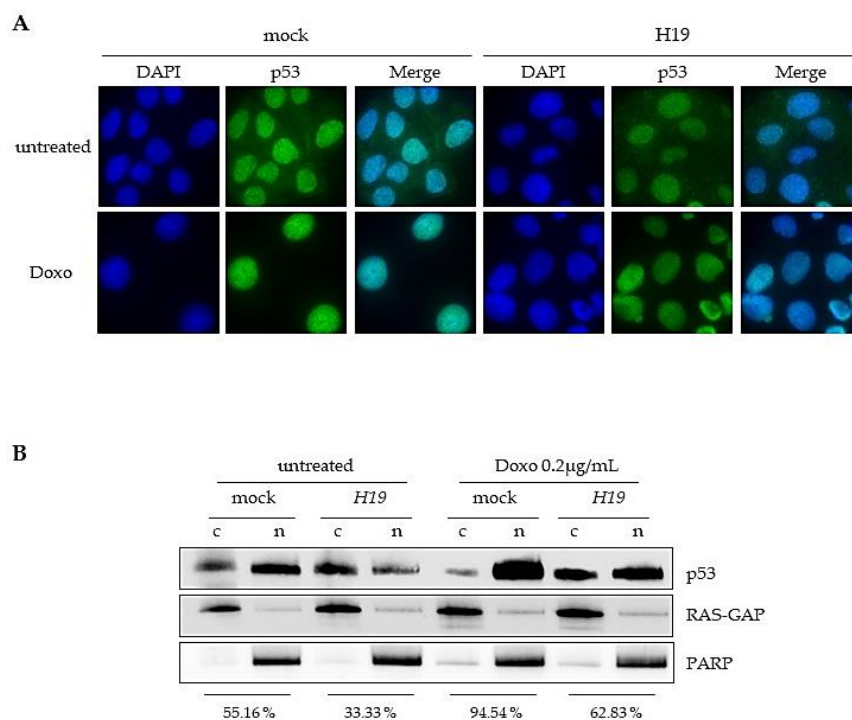


**Figure 1.** *H19* down-regulated p53 protein expression in breast cancer cells. **A.** p53 expression in MCF-7, T-47D or MDA-MB-231 control (mock) or stably overexpressing *H19* (H19), determined by western blot analysis. Actin was used as equiloading control. Relative signal intensities were quantified by ImageJ and shown above the protein bands. **B.** Relative expression of *H19*, *p53*, *p21*, *Bax* and *PUMA* RNA in MCF-7 control (mock) or stably overexpressing *H19* (H19), determined by qRT-PCR. **C.** Relative expression of *H19*, *p53*, *p21*, *Bax* and *PUMA* RNA in MCF-7 transiently transfected with increasing amounts of *H19* encoding plasmid. **D.** Relative expression of p53 in p53-null cells (Calu-6) transfected with *p53* and/or *H19* encoding plasmids. p53 expression was determined by western blot and actin was used as equiloading control. **E.** Calu-6 control (mock) or stably overexpressing *H19* (H19) were treated with DAP. p53 re-expression was determined by western blot analysis. Importin 9 was used as equiloading control. **F.** Parental MCF-7, T-47D or MDA-MB-231 were treated with DOXO and p53 expression was determined by western blot analysis. Actin was used as equiloading control. In all cells, p53 is inducible whatever is mutated status. All experiments were performed at least three times. For graphs, data represent mean of three independent experiments and error bar sem. Statistical analyses were performed as described. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; ns not significant.

### 3.2 H19 impairs p53 translocation from the cytoplasm to the nucleus.

As a transcriptional factor, p53 protein needs to be translocated into the nucleus to induce the expression of its target genes. We determined whether *H19* could modify this process in cells stressed by DNA damage. To do so, we treated MCF-7 cells stably overexpressing or not *H19* with 0.4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  doxorubicin for 24 h (**Figure 2**).

We observed, by immunofluorescence, that after doxorubicin treatment, p53 protein was increased and translocated into the nuclei in control cells (**Figure 2A, left panel**). In *H19*-stably overexpressing cells, p53 seemed to be less increased in the nuclei (**Figure 2A, right panel**). To confirm these observations and precisely quantify the expression levels of p53 in the nucleus and the cytoplasm, we then performed western blot on cytosolic and nuclear fractions. As shown in **Figure 2B**, doxorubicin induced p53 expression. In mock cells, p53 expression is predominantly nuclear (94%), whereas in cells overexpressing *H19*, p53 protein level remains high in the cytoplasm, indicating that *H19* gene expression impairs p53 nuclear translocation.



**Figure 2.** *H19* prevented p53 nuclear translocation upon doxorubicin treatment. **A.** p53 localization determined by immunofluorescence in MCF-7 control (mock) or stably overexpressing *H19* (H19). Cells were treated or not with 0.4  $\mu\text{g}/\text{mL}$  doxorubicin for 24 h. **B.** p53 expression determined by western blot analysis after cell fractionation (c: cytoplasm, n: nucleus) in MCF-7 control (mock) or stably overexpressing *H19* (H19) treated or not with doxorubicin (0.2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) during 2 h. Ras-GAP and PARP were used as cytosol and nucleus markers respectively. Relative signal intensities were quantified by



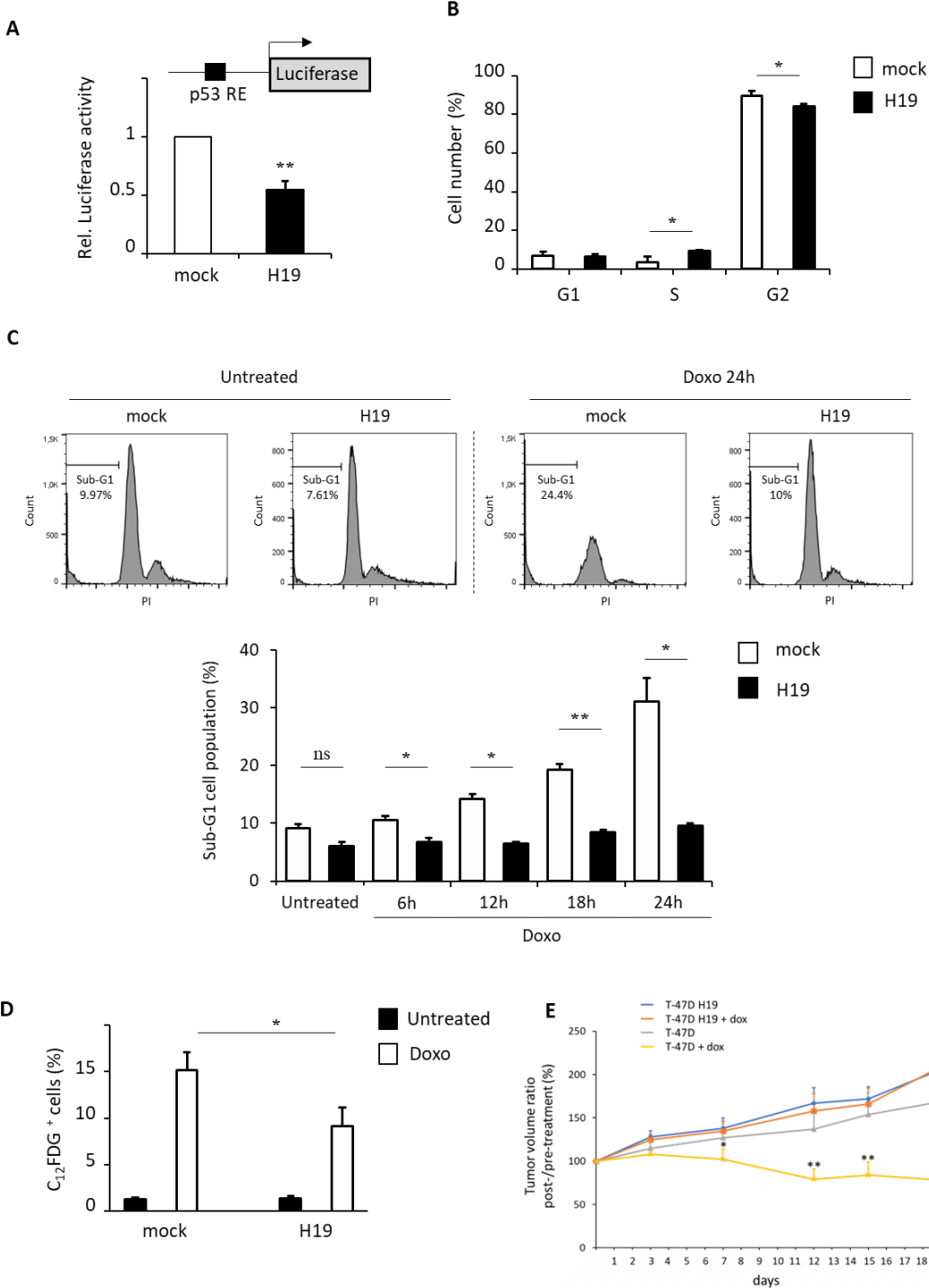
ImageJ and represented as nuclear ratios below the corresponding condition. All experiments were performed at least three times.

### 3.3 H19 impairs cell behaviors regulated by p53.

In order to determine the functional consequence of p53 down regulation by *H19* in breast cancer cells, we first assessed p53 transcriptional activity using a reporter system, in which the luciferase reporter gene was put under the control of p53 response element in pGL4.10[luc2] plasmid. As shown in **Figure 3A**, the relative luciferase activity in *H19*-stably overexpressing cells decreased to 50% of control (mock), indicating that p53 transcriptional activities were impaired by *H19*. We then determined several well-known p53-regulated cellular behaviors including cell cycle arrest, apoptosis induction and senescence by treating breast cancer cells with the genotoxic drug doxorubicin. For cell cycle analysis, we synchronized cells in G1-phase with Aphidicolin (6  $\mu$ M, 24 h) and then treated them with doxorubicin for 24 h, before analysis by flow cytometry. Doxorubicin induced an accumulation of cells in G2-phase in control cells ; in *H19*-stably overexpressing cells, a slight but significant increase of cells in S phase and a decrease of cells in G2 phase were observed, compared to control cells (**Figure 3B**). This indicates that *H19* overexpression reduces the expected cell cycle arrest. To determine the apoptosis level within a cell population, one of the most widely used technique consists to estimate fractional DNA content. Using flow cytometry, propidium iodide-stained cells will show lower intensity and a peak below the G1 peak (sub-G1 peak). The sub-G1 peak corresponds to nuclear and cellular fragments but above all individual apoptotic bodies. To visualize sub-G1 peaks in our model, cells were treated for several times (6 h, 12 h, 18 h and 24 h) with 0.6  $\mu$ g/mL of doxorubicin, before analysis by flow cytometry. Doxorubicin induced the formation of larger sub-G1 peak in control cells; however, in *H19*-stably overexpressing cells, the sub-G1 peak is smaller regardless of the treatment duration (**Figure 3C**). This result indicates that *H19* overexpression impairs cell death. For senescence induction, cells were treated with a lower dose of doxorubicin (0.067  $\mu$ g/mL) for 3 days and senescent cells (C<sub>12</sub>FDG<sup>+</sup>) were detected by flow cytometry (**Figure 3D**). Control cells exhibited 15% of C<sub>12</sub>FDG<sup>+</sup> cells, while 10% of C<sub>12</sub>FDG<sup>+</sup> cells were detected in *H19*-stably overexpressing cells (**Figure 3D**), indicating that *H19* overexpression reduces doxorubicin-induced senescence. To extend our results to another cell line and generalize, we performed proliferation assays in Calu-6 cell treated or not with DAP (**Supplemental Figure 2**). Finally, we sought to test the *in vivo* relevance of our cellular findings. For this, T-47D cells overexpressing *H19* or not were injected subcutaneously into the mammary fat pads of immunodeficient SCID mice. The tumor volumes were measured every three days until they reached 500 mm<sup>3</sup> then treated with doxorubicin. T-47D control xenografts displayed a reduced tumor growth after doxorubicin treatment compared to no treated cells (79.5% vs. 137% at day 12; 78 vs. 169.5% at day 19). For T-47D cells overexpressing *H19* xenografts, doxorubicin treatment had no effect (**Figure**



**3E and Supplemental Figure 3).** Collectively, all these data indicate that *H19* expression reduces transcriptional activities of p53 and impairs cell cycle arrest, apoptosis and senescence, well-known to be mediated by p53 after DNA damage.



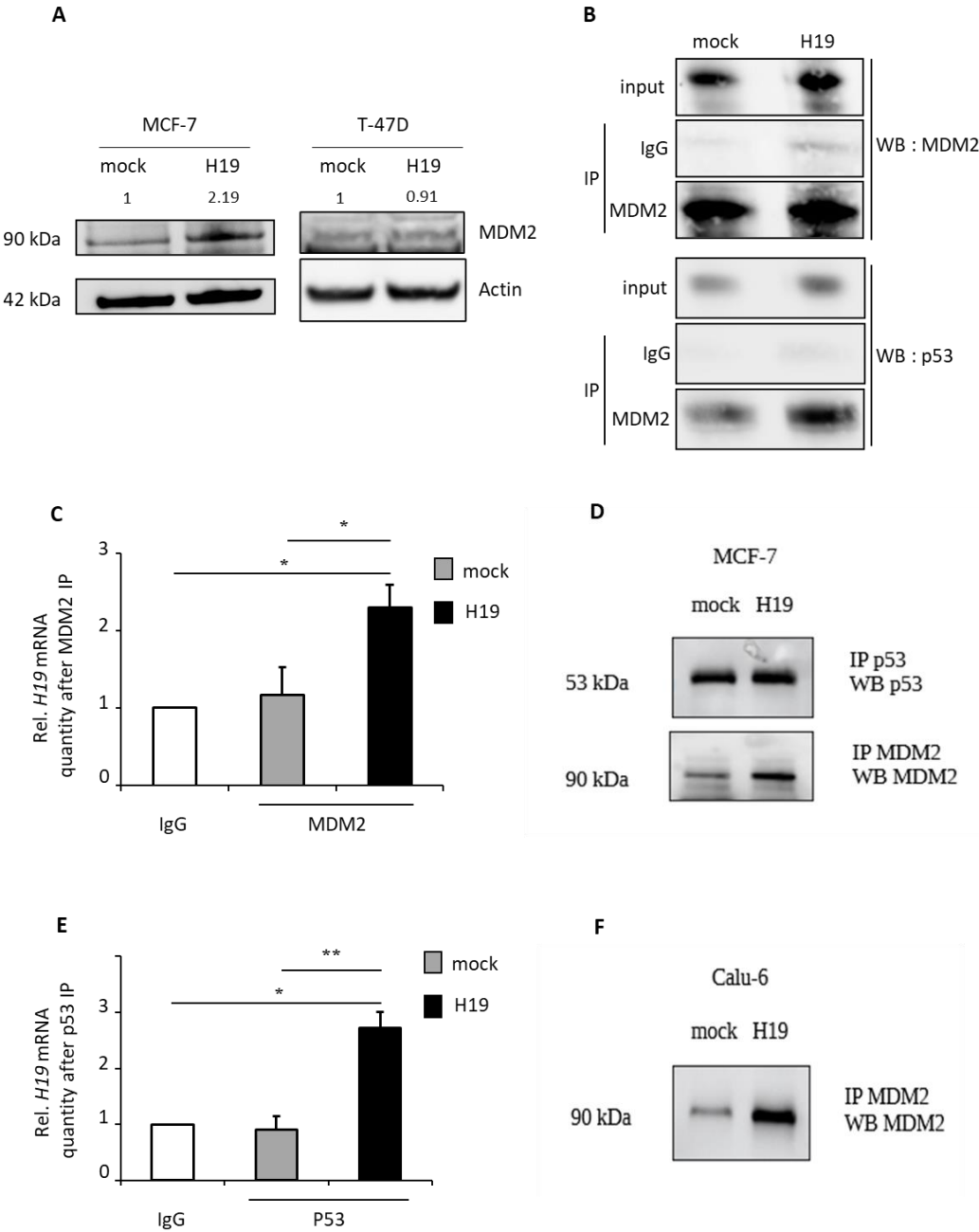
**Figure 3.** H19 repressed p53 activities. **A.** Relative luciferase activity of p53 reporter plasmid derived of pGL4 luc in MCF-7 control (mock) or stably overexpressing H19 (H19). p53 RE indicates a p53 responsive element. **B.** Cell cycle analysis of MCF-7 (mock) or stably overexpressing H19 (H19) treated

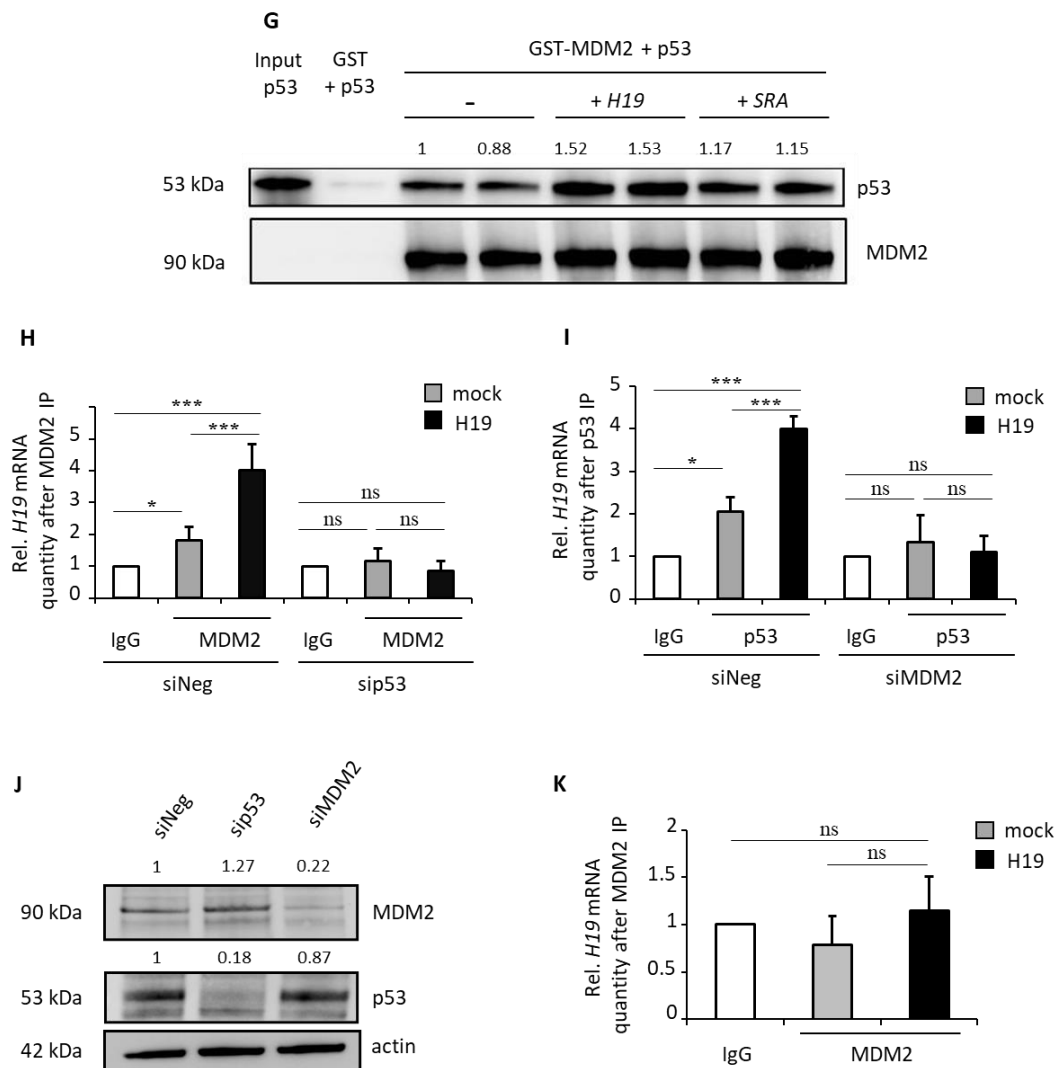
with doxorubicin (0.2  $\mu$ M) after synchronization during 24 h with aphidicolin (6  $\mu$ M). **C.** Propidium iodide (PI) staining and flow cytometric analysis were performed to study the induction of apoptosis after doxorubicin (0.6  $\mu$ g/mL for 24 h) treatment in MCF-7 control (mock) or stably overexpressing *H19* gene (H19). The percentage of sub-G1 cell population is given for each condition (representative experiment). Results shown in the graph were the mean of three independent experiments and error bar sem. Statistical analysis was performed on viable populations. **D.** Percentage of  $C_{12}$ FDG-positive cells in MCF-7 control (mock) or stably overexpressing H19 (H19) treated (or not) with doxorubicin (0.067  $\mu$ M during 72 h). Results shown in the graph were the mean of three independent experiments and error bar sem. Statistical analysis was performed as described. **E.** T-47D cells overexpressing H19 or not were injected subcutaneously (10 mice per group) and tumor volume was measured for 20 days after treatment or not with doxorubicin (6 mg/kg) starting from 500 mm<sup>3</sup>. Ratio between tumor volume after treatment and tumor volume before treatment indexed to 100  $\pm$  SD is shown. \* $p$ <0.05; \*\* $p$ <0.01; \*\*\* $p$ <0.001; ns not significant.

### 3.4 *H19* simultaneously associates with both p53 and MDM2 proteins to induce p53 degradation.

The decreased level of p53 protein and the repression of p53-related activities in *H19* overexpressing cells prompted us to determine if *H19* could favor p53 degradation. It is well known that p53, through its transactivator domain, can associate with the E3 ubiquitin-ligase MDM2, leading to its ubiquitination and proteasomal degradation. We first evaluated the levels of MDM2 in control (mock) and *H19*-stably overexpressing (H19) MCF-7 cells. As revealed by western blot analysis (**Figure 4A**), an increased level of MDM2 protein was observed in *H19*-stably overexpressing MCF-7 cells. However, in T-47D cells no difference of MDM2 expression was observed, so we used this cell line to perform co-immunoprecipitation assay. Moreover, by performing co-immunoprecipitation of p53 and MDM2 in T-47D cells treated with the proteasome inhibitor MG132, we found that p53 and MDM2 association was increased in *H19*-stably overexpressing cells (**Figure 4B**). Thus, *H19* was able to increase p53 association with its main regulator MDM2. We then performed RNA-immunoprecipitation (RIP) assay to determine the potential interaction of *H19* with p53 or MDM2. Significant high levels of *H19* were found to be co-immunoprecipitated with MDM2 (**Figure 4C**) or with p53 (**Figure 4E**) in *H19*-stably overexpressing (H19) cells, indicating that *H19* did interact with both p53 and MDM2. To determine if this interaction was direct or indirect, we performed GST pulldown assays by using an immobilized glutathione S-transferase (GST)-MDM2 fusion protein with *in vitro* translated His-p53 in presence or not of *in vitro* synthesized *H19* mRNA (**Figure 4G**). His-p53 interacted with the GST-MDM2 fusion protein but not with the GST alone. Adding *H19* mRNA increased p53/MDM2 association, when compared to the conditions in absence of any RNA or in presence of the SRA mRNA, thus indicating the direct interaction of *H19* with p53 and/or MDM2. To further determine if *H19* could interact with one of the proteins, independently of the other, we performed RIP analysis after knockdown of p53 or

MDM2 using siRNA approaches (**Figures 4H, I, J**). Efficiency of knockdown was checked by western blotting (**Figure 4J**) as detection of immunoprecipitated proteins (**Figure 4D**). Interestingly, p53 knockdown abolished MDM2/*H19* interaction (**Figure 4F**), and conversely MDM2 knockdown abolished p53/*H19* interaction (**Figure 4H**), and conversely MDM2 knockdown abolished p53/*H19* interaction (**Figure 4I**). In addition, RIP analysis in Calu-6 cells, which are devoid of p53, revealed no enrichment in *H19* mRNA after MDM2 precipitation (**Figure 4K and F**). Taken together, these data demonstrate that *H19* mRNA directly interacts with p53 and MDM2 in a tripartite manner. This interaction favors p53 and MDM2 binding, leading to p53 degradation.

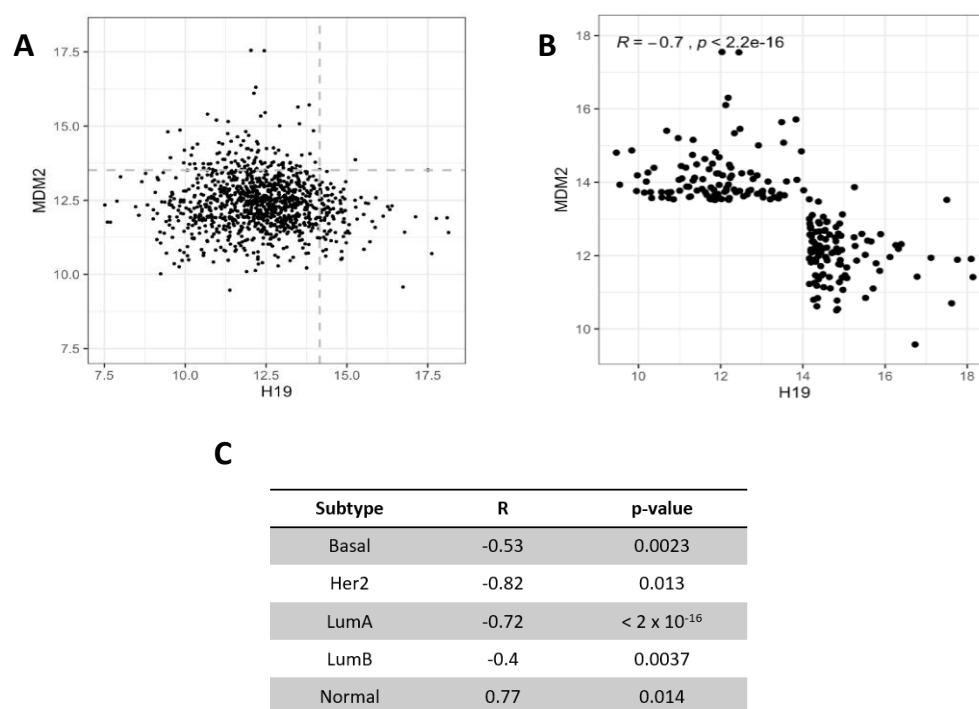




**Figure 4.** Trimeric complex formation of *H19*/p53/MDM2. **A.** MDM2 expression in MCF-7 and T-47D control (mock) or stably overexpressing *H19* (H19), determined by western blot. Actin was used as equiloading control. Relative signal intensities were quantified by ImageJ and shown above the protein bands. **B.** Co-immunoprecipitation of p53 and MDM2 proteins in T-47D (mock) or stably overexpressing *H19* (H19) treated with MG132 for 6 h. Detection of immunoprecipitated proteins were performed by western blot. **C.** *H19* RNA associated to MDM2 proteins were determined by qRT-PCR after MDM2 immunoprecipitation in MCF-7 control (mock) or stably overexpressing *H19* (H19). IgG indexed to 1 was used as control. **D.** Immunoprecipitation of p53 and MDM2 proteins in MCF7 (mock) or stably overexpressing *H19* gene (H19). Detection of immunoprecipitated proteins were performed by western blot. **E.** *H19* RNA associated to p53 proteins were determined by qRT-PCR after p53 immunoprecipitation in breast cancer cells MCF-7 control (mock) or stably overexpressing *H19* (H19). IgG indexed to 1 was used as control. **F.** Immunoprecipitation of MDM2 proteins in Calu-6 (mock) or stably overexpressing *H19* gene (H19). Detection of immunoprecipitated proteins were performed by western blot. **G.** *In vitro* p53/MDM2 binding. His-p53 synthesized by *in vitro* coupled transcription/translation was incubated in the presence of equal amount of GST or GST-MDM2 in the presence or not of *H19* RNA. *SRA* RNA was used as control. Complexes were precipitated with Sepharose-glutathion beads, resolved by 12% SDS PAGE and visualized by western blot analysis with antibodies against p53 or MDM2. Representative western-blot results are shown. **H** and **I.** *H19* RNA associated to MDM2 (**H**) or p53 (**I**) proteins were determined by qRT-PCR after MDM2 (**H**) or p53 (**I**)

immunoprecipitation in MCF-7 control (mock) or stably overexpressing *H19* (H19) previously transfected with siRNA control (siCtrl) or siRNA raised against p53 (sip53) (H) or MDM2 (siMDM2) (I). IgG indexed to 1 was used as control. J. p53 and MDM2 expression after siRNA transfection was checked by western-blotting. Actin was used as equiloading control. Relative signal intensities were quantified by ImageJ and shown above the protein bands. K. *H19* RNA associated to MDM2 proteins were determined by qRT-PCR after MDM2 immunoprecipitation in Calu-6 control (mock) or stably overexpressing *H19* (H19). IgG indexed to 1 was used as control. All experiments are performed at least three times. For graphs, data represent mean of three independent experiments and error bar sem. Statistical analyses were performed as described. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ ; ns not significant.

As *H19* and MDM2 exert similar effect on p53 (inhibition of protein expression), we next evaluated the correlation of *H19* and *MDM2* expression using TCGA transcriptomic datasets. As shown in **Figure 5A**, 1095 samples were used, and subtypes were distributed as follows: Basal (190), Her2 (82), LumA (566), LumB (217) and Normal (40). A total of 217 samples present in the 90<sup>th</sup> percentile of *H19* expression and/or in the 90<sup>th</sup> percentile of *MDM2* expression were selected, representing 20% of the initial dataset (**Figure 5B**). The Pearson correlation coefficient R was computed and a negative correlation was found between *H19* and *MDM2* expression ( $R = -0.7$ ) in different cancer subtypes except for normal subtype (**Figure 5C**). These data seem to indicate that overexpression of *MDM2* and *H19* is mutually exclusive. This is in accordance with the fact that MDM2 and *H19* exert similar effect on p53.



**Figure 5.** *In vivo* inverse correlation of *H19* and *MDM2* expression in TCGA BRCA samples. **A.** Expression of *H19* and *MDM2* in TCGA BRCA 1095 samples. Dashed lines indicate the 90<sup>th</sup> percentile of each gene expression. **B.** Expression of *H19* and *MDM2* in 217 TCGA BRCA samples selected according to the 90<sup>th</sup>

percentile of each gene expression. The Pearson correlation coefficient R is computed, showing a negative correlation. **C.** Correlation analysis of selected samples by subtype.

#### 4. Discussion

Given the importance of p53 in diverse cellular pathways, the level of this protein is under strict control by several sophisticated regulatory systems. Among them, MDM2 the main regulator of p53 expression, is known to induce the ubiquitination and proteosomal degradation of p53. However, other additional mechanisms could participate to p53 expression control. For example, in gastric cancer cells, it is reported that *H19* RNA interacts with the p53 protein [18] though the functional consequences of this interaction remain to be elucidated. *H19*-derived miR-675 has also been reported to reduce p53 protein expression and thus promote cell proliferation in bladder and lung cancers [21, 22]. Similar results were observed in our model, though miR-675 exhibited fewer effects than *H19* RNA (data not shown).

Herein, we demonstrated for the first time that *H19* associates with both p53 and MDM2 in breast cancer cells. This association promotes p53 degradation and prevents p53 activation under DNA damage. In addition, we demonstrated that target genes of p53 such as *p21* or *bax* are down regulated, leading to the decrease of cell cycle arrest, apoptosis induction and probably the accumulation of cells harboring genetic mutations. In this line, *H19* could contribute to tumor progression by enhancing genetic alterations and by sustaining the proliferation of cancer cells despite DNA mutations. More generally, *H19* could favour genomic instability in persons not exposed to genotoxins, through a mechanism involving p53/*H19* interplay. Further experiments should be performed to show if this regulation exists in normal cells.

We have previously shown that *H19* is down regulated by p53 [17]. Our present data indicate that *H19* and p53 are reciprocally regulated and form feedback loops. Interestingly, similar feedback loop exists in the case of lncRNA *RoR*/p53 since p53 transcriptionally induces *RoR* expression which represses, in turn, p53 activities [23]. *H19* seems to exert a pivotal role in cell cycle progression. It is activated by E2F factors [19], negatively regulated by RB [8] and p53 [17] and we showed here that *H19* RNA represses p53 activities to allow cell cycle progression.

MDM2 protein is composed of at least four independent functional domains [24]; a N-terminal domain that recognizes the BOX-1 domain of p53, a core domain involved in the binding of p14<sup>ARF</sup> tumor suppressor gene, a Zinc binding domain and a RINF-finger RNA binding domain [25]. The p53 protein interacts with MDM2 through its BOX-1 domain located in N-terminal region of p53. Importantly, MDM2 can also bind RNAs. Once bound to RNA, MDM2 changes its conformation. This conformational

change reduces MDM2 affinity for the primary binding site in the N-terminal domain of p53 and switches its specificity for a distinct peptide motif in the core domain of p53 [24]. Indeed, MDM2-RNA complexes can bind to p53 protein lacking BOX-1 domain [26]. These data indicate that RNAs can favor MDM2/p53 interaction using binding domains different from those known to be involved in the MDM2/p53 direct interaction. In accordance with our findings, other long non-coding RNAs are known to regulate p53 functions. For example, in atherosclerosis, the association of lincRNA-p21 and MDM2 liberates p53, enabling it to interact with p300 to transactivate its target genes [27]. The lncRNA *RoR* has been described as a strong repressor of p53 in MCF-7 [23]. In this case, *RoR* suppresses p53 translation through direct interaction with hnRNP I. Our data demonstrate for the first time a tripartite interaction between MDM2/*H19*/p53, leading to p53 degradation. To our knowledge, it is also the first time that a long non-coding RNA is found to impair p53 activities by favoring its degradation. Our results together with the previous work of Zhang *et al* [23] indicate that long non-coding RNAs such as *H19* and *LincRNA-RoR* constitute an additional regulatory network in the regulation of p53 expression. In addition, our data demonstrate that *H19* is able to impede p53 translocation to nucleus. Even after treatment with doxorubicin which strongly induces the p53 expression, the phenotypes associated with a transcriptional activity of p53 remain weaker in *H19*-stably overexpressing cells, probably due to p53 retention in the cytoplasm (Figure 6).

The tumor suppressor p53 plays a critical role in preserving DNA fidelity from diverse insults through the regulation of cell cycle checkpoints, DNA repair, senescence and apoptosis. Defects in the p53 tumor suppressor gene have been shown to affect cell cycle control and lead to genetic instability (as gene amplification, allelic loss, karyotype abnormalities) in murine and human cell lines as well as in primary human breast carcinomas [28]. In addition, p53 is altered in more than half of human cancers [14]. This alteration results from the appearance of point mutation or loss of heterozygosity. On the other hand, *H19* is overexpressed in breast carcinomas, independently of molecular subtypes [3, 29]. Our data, showing that *H19* inhibits p53 activities in breast cancer cells and that high expression of *H19* and *MDM2* seems to be mutual exclusive in breast cancer, suggest that loss of p53 activity rather than the mutation alone should be a prognostic factor.

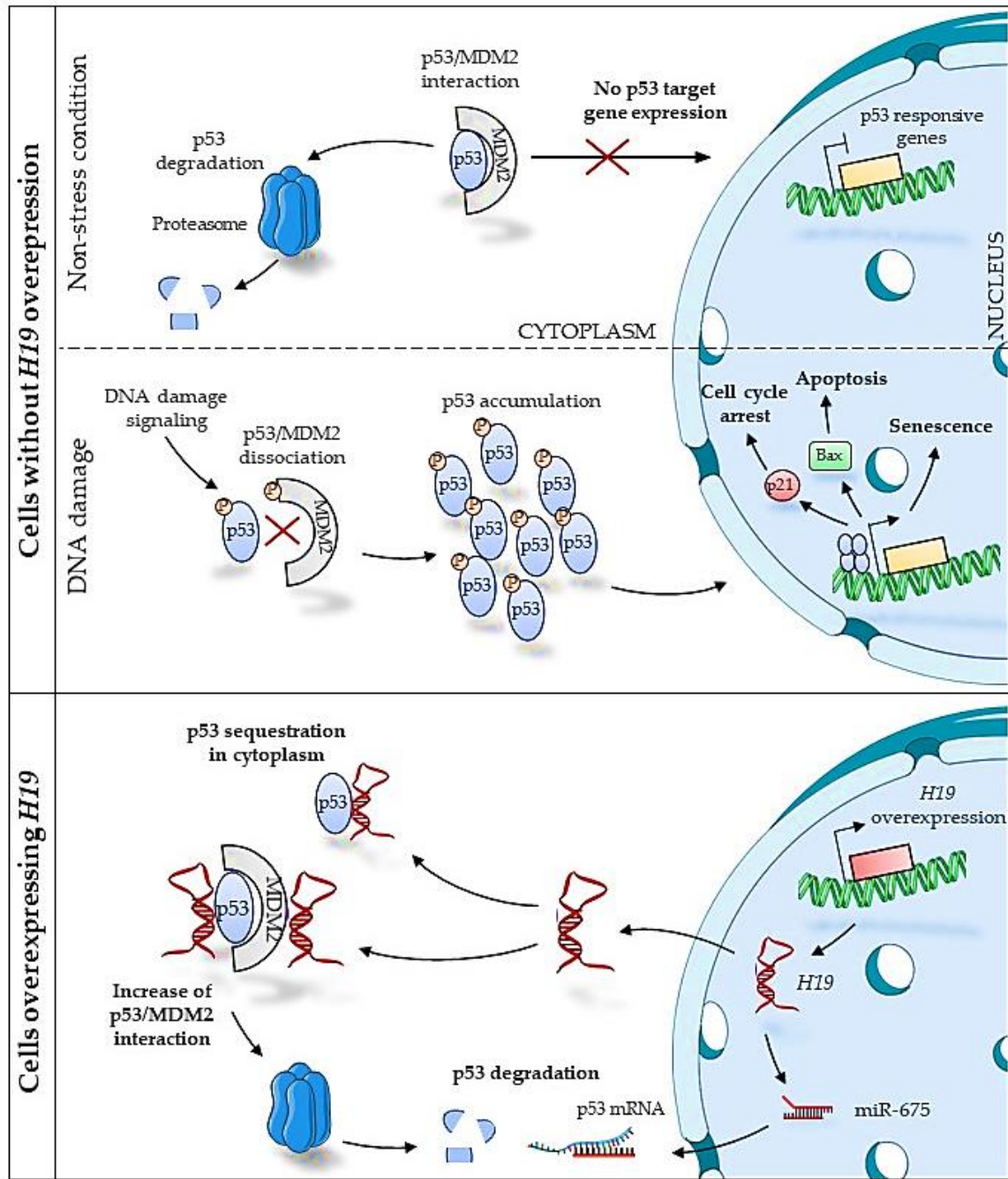
Although p53 mutation status has been recently shown to modify survival of breast cancer patients [30], its status is not used for breast cancer management. Genetic alterations of p53 are common in breast cancer and are associated with molecular subtypes of tumors; 26% of luminal tumors, 50% of tumors amplified by HER2 and 88% of basal carcinomas show p53 mutations [31]. Nevertheless, several clinical studies have performed to evaluate the use of specific inhibitors of MDM2 (peptides, antibodies, antisense oligonucleotides) to target tumors expressing functional p53 [32]. However, these inhibitors have a high toxicity rate for the surrounding tissues. Although further studies are

clearly needed, our data suggest that alternative therapeutic strategies by targeting *H19* can be envisaged to increase the tumor suppression function of p53 in cancers expressing functional p53.

## **5. Conclusions**

In conclusion, this article emphasizes the role of *H19* lncRNA on breast cancer progression after p53 inhibition. *H19* binds p53 and MDM2 in a tripartite manner and leads to the down-regulation of p53 expression and activities. Indeed, after DNA damage, in presence of *H19*, p53 was unable to induce cell cycle arrest, apoptosis or senescence of breast cancer cells. Our data suggest that alternative therapeutic strategies by targeting *H19* can be envisaged to increase the tumor suppression function of p53 in cancers expressing functional p53.





**Figure 6. Graphical representation of proposed mechanism of *H19* effects on p53 activities.** In unstressed cells, p53 is constitutively repressed by MDM2. After cellular stress inducing DNA damage, the dissociation of p53/MDM2 complex allows the p53 accumulation and transcriptional effects leading to cell cycle arrest, apoptosis or senescence. In *H19* overexpressing cells, *H19* strengthens the p53/MDM2 interaction, impairs the p53 nuclear localization and p53 activities.

## 6. Patents

### Supplementary Materials:

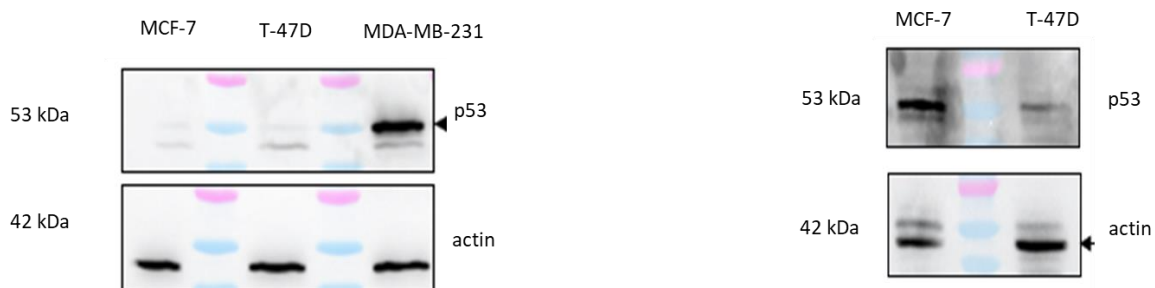
Cell growth assay (Supplemental Figure 3 A)

A total of  $20 \times 10^4$  cells/well of Calu-6 cell line was seeded in 6-well plates. Each twenty-four hours, cells were treated with DMSO (dimethylsulfoxide) for control or with DAP (2,6-Diaminopurine) for 4 days. The adherent cells were counted 24h after treatment by using Celigo.

PCR primer	Forward sequence	Reverse sequence
human TP53	GTGGAAGGAAATTTGCGTGT	CCAGTGTGATGATGGTGAGC
human P21	CACTCCAACGCCGGCTGATCC	TGTAGAGCGGGCCTTTGAGGCCCTC
human BAX	TTTGCTTCAGGGTTTCATCC	CAGTTGAAGTTGCCGTCAGA
human PUMA	AATGAGCCAACGTGACCAC	GCAGAGCACAGGATTCACAG
human RPLP0	GTGATGTGCAGCTGATCAAGACT	GATGACCAGCCCAAGGAGA
human H19	TACAACCACTGCACTACCTG	TGGCCATGAAGATGGAGTCG

siRNA	Sequence
P53 siRNA	CGACUCCAGUGGUAUUCUACU
MDM2 siRNA	AUCCAAGAUACCUUUGACU

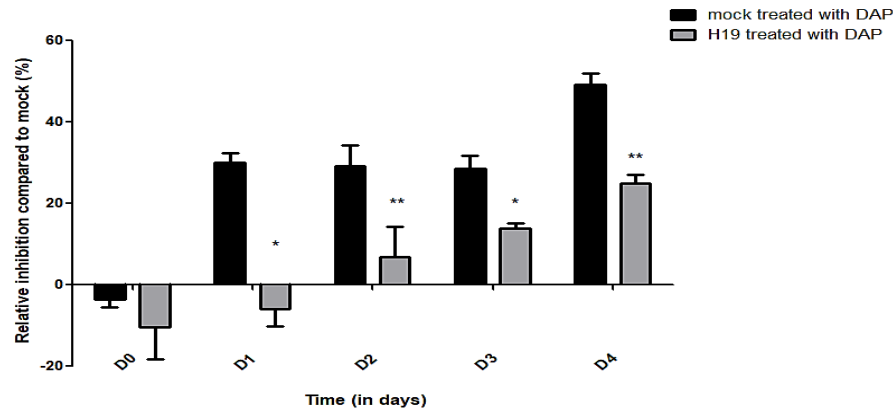
**Table S1: sequences of PCR primers and siRNAs.**



### Supplemental Figure 1:

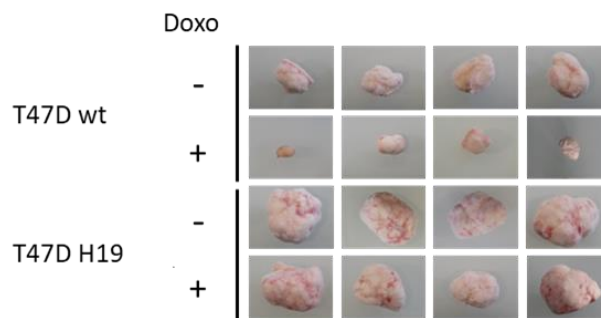
Left: p53 expression in MCF-7, T-47D or MDA-MB-231 wild-type with 15  $\mu$ g of proteins, determined by western blot analysis. Actin was used as equiloading control.

Right: p53 expression in MCF-7, T-47D wild-type with 30  $\mu$ g of proteins, determined by western blot analysis. Actin was used as equiloading control.



### Supplemental Figure 2:

Calu-6 control (mock) or stably overexpressing *H19* gene (H19) were treated with DAP for 4 days. The percentage of relative inhibition compared to mock treated with DMSO for control is given for each condition. Results shown in the graph were the mean of three independent experiments and error bar sem. Data indicate that *H19* expression impairs growth inhibition caused by p53 expression after DAP treatment.



### Supplemental Figure 3:

T-47D cells overexpressing H19 or not were injected subcutaneously (10 mice per group) and tumor volume was measured for 20 days after treatment or not with doxorubicin (6 mg/kg).

**Author Contributions:** Conceptualization, Corinne Abbadie, Bruno Lefebvre, Xuefen Le Bourhis and Eric Adriaenssens; Data curation, Clément Lecerf, Constance Vennin, Jordan Collette, Evodie Peperstraete, Mélissa Gilles, Nathalie Spruyt, Nathalie Martin, Fabrice Lejeune and Samuel Meignan; Funding acquisition, Eric Adriaenssens; Project administration, Eric Adriaenssens; Software, Mohamed Elati; Supervision, Eric Adriaenssens; Writing – original draft, Clément Lecerf; Writing – review & editing, Xuefen Le Bourhis and Eric Adriaenssens.

**Funding:** This work was supported by INSERM and grant from INCA (PLBio 2010-180) and “Ligue contre le cancer”. C.V. was supported by doctoral fellowships from the University of Lille 2 and by ARC Fondation fellowships. J.C. and C.L. were supported by doctoral fellowships from the University of Lille.

**Acknowledgments:** We thank all members of laboratory for helpful discussion.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

- [1] Bartolomei MS, Zemel S, Tilghman SM. Parental imprinting of the mouse H19 gene. *Nature* 1991;351:153–5. <https://doi.org/10.1038/351153a0>.
- [2] Brannan CI, Dees EC, Ingram RS, Tilghman SM. The product of the H19 gene may function as an RNA. *Molecular and Cellular Biology* 1990;10:28–36. <https://doi.org/10.1128/MCB.10.1.28>.
- [3] Adriaenssens E, Dumont L, Lottin S, Bolle D, Leprêtre A, Delobelle A, et al. H19 overexpression in breast adenocarcinoma stromal cells is associated with tumor values and steroid receptor status but independent of p53 and Ki-67 expression. *American Journal of Pathology* 1998;153:1597–607. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)65748-3](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)65748-3).
- [4] Adriaenssens E, Lottin S, Dugimont T, Fauquette W, Coll J, Dupouy JP, et al. Steroid hormones modulate H19 gene expression in both mammary gland and uterus. *Oncogene* 1999;18:4460–73. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1202819>.
- [5] Liu J, Kahri AI, Heikkilä P, Ilvesmäki V, Voutilainen R. H19 and insulin-like growth factor-II gene expression in adrenal tumors and cultured adrenal cells. *J Clin Endocrinol Metab* 1995;80:492–6. <https://doi.org/10.1210/jcem.80.2.7531713>.
- [6] Ariel I, Weinstein D, Voutilainen R, Schneider T, Lustig-Yariv O, de Groot N, et al. Genomic imprinting and the endometrial cycle. The expression of the imprinted gene H19 in the human female reproductive organs. *Diagn Mol Pathol* 1997;6:17–25. <https://doi.org/10.1097/00019606-199702000-00004>.
- [7] Ariel I, Lustig O, Schneider T, Pizov G, Sappir M, De-Groot N, et al. The imprinted H19 gene as a tumor marker in bladder carcinoma. *Urology* 1995;45:335–8. [https://doi.org/10.1016/0090-4295\(95\)80030-1](https://doi.org/10.1016/0090-4295(95)80030-1).

- [8] Tsang WP, Ng EKO, Ng SSM, Jin H, Yu J, Sung JJY, et al. Oncofetal H19-derived miR-675 regulates tumor suppressor RB in human colorectal cancer. *Carcinogenesis* 2010;31:350–8. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgp181>.
- [9] Lottin S, Adriaenssens E, Dupressoir T, Berteaux N, Montpellier C, Coll J, et al. Overexpression of an ectopic H19 gene enhances the tumorigenic properties of breast cancer cells. *Carcinogenesis* 2002;23:1885–95. <https://doi.org/10.1093/carcin/23.11.1885>.
- [10] Lecerf C, Le Bourhis X, Adriaenssens E. The long non-coding RNA H19: an active player with multiple facets to sustain the hallmarks of cancer. *Cell Mol Life Sci* 2019;76:4673–87. <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03240-z>.
- [11] DeLeo AB, Jay G, Appella E, Dubois GC, Law LW, Old LJ. Detection of a transformation-related antigen in chemically induced sarcomas and other transformed cells of the mouse. *Proc Natl Acad Sci USA* 1979;76:2420–4. <https://doi.org/10.1073/pnas.76.5.2420>.
- [12] Dippold WG, Jay G, DeLeo AB, Khoury G, Old LJ. p53 transformation-related protein: detection by monoclonal antibody in mouse and human cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1981;78:1695–9. <https://doi.org/10.1073/pnas.78.3.1695>.
- [13] Rotter V. p53, a transformation-related cellular-encoded protein, can be used as a biochemical marker for the detection of primary mouse tumor cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1983;80:2613–7. <https://doi.org/10.1073/pnas.80.9.2613>.
- [14] Chao CC-K. Mechanisms of p53 degradation. *Clin Chim Acta* 2015;438:139–47. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2014.08.015>.
- [15] Freeman JA, Espinosa JM. The impact of post-transcriptional regulation in the p53 network. *Brief Funct Genomics* 2013;12:46–57. <https://doi.org/10.1093/bfpg/els058>.
- [16] Aubrey BJ, Kelly GL, Janic A, Herold MJ, Strasser A. How does p53 induce apoptosis and how does this relate to p53-mediated tumour suppression? *Cell Death Differ* 2018;25:104–13. <https://doi.org/10.1038/cdd.2017.169>.
- [17] Dugimont T, Montpellier C, Adriaenssens E, Lottin S, Dumont L, Iotsova V, et al. The H19 TATA-less promoter is efficiently repressed by wild-type tumor suppressor gene product p53. *Oncogene* 1998;16:2395–401. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1201742>.
- [18] Yang F, Bi J, Xue X, Zheng L, Zhi K, Hua J, et al. Up-regulated long non-coding RNA H19 contributes to proliferation of gastric cancer cells. *The FEBS Journal* 2012;279:3159–65. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2012.08694.x>.

- [19] Berteaux N, Lottin S, Monté D, Pinte S, Quatannens B, Coll J, et al. H19 mRNA-like Noncoding RNA Promotes Breast Cancer Cell Proliferation through Positive Control by E2F1. *J Biol Chem* 2005;280:29625–36. <https://doi.org/10.1074/jbc.M504033200>.
- [20] Trzaska C, Amand S, Bailly C, Leroy C, Marchand V, Duvernois-Berthet E, et al. 2,6-Diaminopurine as a highly potent corrector of UGA nonsense mutations. *Nat Commun* 2020;11:1509. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15140-z>.
- [21] Liu C, Chen Z, Fang J, Xu A, Zhang W, Wang Z. H19-derived miR-675 contributes to bladder cancer cell proliferation by regulating p53 activation. *Tumor Biology* 2016;37:263–70. <https://doi.org/10.1007/s13277-015-3779-2>.
- [22] Zheng Z-H, Wu D-M, Fan S-H, Zhang Z-F, Chen G-Q, Lu J. Upregulation of miR-675-5p induced by lncRNA H19 was associated with tumor progression and development by targeting tumor suppressor p53 in non-small cell lung cancer. *J Cell Biochem* 2019;120:18724–35. <https://doi.org/10.1002/jcb.29182>.
- [23] Zhang A, Zhou N, Huang J, Liu Q, Fukuda K, Ma D, et al. The human long non-coding RNA-RoR is a p53 repressor in response to DNA damage. *Cell Research* 2012;23:340–50. <https://doi.org/10.1038/cr.2012.164>.
- [24] Shimizu H, Burch LR, Smith AJ, Dornan D, Wallace M, Ball KL, et al. The conformationally flexible S9-S10 linker region in the core domain of p53 contains a novel MDM2 binding site whose mutation increases ubiquitination of p53 in vivo. *J Biol Chem* 2002;277:28446–58. <https://doi.org/10.1074/jbc.M202296200>.
- [25] Elenbaas B, Dobbelstein M, Roth J, Shenk T, Levine AJ. The MDM2 oncoprotein binds specifically to RNA through its RING finger domain. *Mol Med* 1996;2:439–51.
- [26] Burch LR, Midgley CA, Currie RA, Lane DP, Hupp TR. Mdm2 binding to a conformationally sensitive domain on p53 can be modulated by RNA. *FEBS Letters* 2000;472:93–8. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(00\)01427-7](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(00)01427-7).
- [27] Wu G, Cai J, Han Y, Chen J, Huang Z-P, Chen C, et al. lincRNA-p21 Regulates Neointima Formation, Vascular Smooth Muscle Cell Proliferation, Apoptosis and Atherosclerosis by Enhancing p53 Activity. *Circulation* 2014;130:1452–65. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.114.011675>.
- [28] Eyfjörd JE, Thorlacius S, Steinarsdóttir M, Valgardsdóttir R, Ögmundsdóttir HM, Anamthawat-Jonsson K. p53 Abnormalities and Genomic Instability in Primary Human Breast Carcinomas. *Cancer Res* 1995;55:646–51.

- [29] Vennin C, Spruyt N, Robin YM, Chassat T, Le Bourhis X, Adriaenssens E. The long non-coding RNA 91H increases aggressive phenotype of breast cancer cells and up-regulates H19/IGF2 expression through epigenetic modifications. *Cancer Letters* 2017;385:198–206. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2016.10.023>.
- [30] Ungerleider NA, Rao SG, Shahbandi A, Yee D, Niu T, Frey WD, et al. Breast cancer survival predicted by TP53 mutation status differs markedly depending on treatment. *Breast Cancer Res* 2018;20:115. <https://doi.org/10.1186/s13058-018-1044-5>.
- [31] Bertheau P, Lehmann-che J, Varna M, Dumay A, Poirot B, Porcher R, et al. p53 in breast cancer subtypes and new insights into response to chemotherapy. *The Breast* 2013;22:S27–9. <https://doi.org/10.1016/j.breast.2013.07.005>.
- [32] Vassilev LT. MDM2 inhibitors for cancer therapy. *Trends in Molecular Medicine* 2007;13:23–31. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2006.11.002>.
- [33] Vennin C, Spruyt N, Dahmani F, Julien S, Bertucci F, Finetti P, et al. The long non coding RNA-derived miR-675 enhances tumorigenesis and metastasis of breast cancer cells by downregulating c-Cbl and Cbl-b. *Oncotarget* 2015;6:29209–23. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.4976>.
- [34] Berteaux N, Aptel N, Cathala G, Genton C, Coll J, Daccache A, et al. A Novel H19 Antisense RNA Overexpressed in Breast Cancer Contributes to Paternal IGF2 Expression. *Molecular and Cellular Biology* 2008;28:6731–45. <https://doi.org/10.1128/MCB.02103-07>.
- [35] Weinstein JN, Collisson EA, Mills GB, Shaw KM, Ozenberger BA, Ellrott K, et al. The Cancer Genome Atlas Pan-Cancer Analysis Project. *Nat Genet* 2013;45:1113–20. <https://doi.org/10.1038/ng.2764>.
- [36] Colaprico A, Silva TC, Olsen C, Garofano L, Cava C, Garolini D, et al. TCGAbiolinks: an R/Bioconductor package for integrative analysis of TCGA data. *Nucleic Acids Res* 2016;44:e71. <https://doi.org/10.1093/nar/gkv1507>.
- [37] Risso D, Schwartz K, Sherlock G, Dudoit S. GC-Content Normalization for RNA-Seq Data. *BMC Bioinformatics* 2011;12:480. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-12-480>.
- [38] Bauderlique-Le Roy H, Vennin C, Brocqueville G, Spruyt N, Adriaenssens E, Bourette RP. Enrichment of Human Stem-Like Prostate Cells with s-SHIP Promoter Activity Uncovers a Role in Stemness for the Long Noncoding RNA H19. *Stem Cells and Development* 2015;24:1252–62. <https://doi.org/10.1089/scd.2014.0386>.

[39] Lanz RB, McKenna NJ, Onate SA, Albrecht U, Wong J, Tsai SY, et al. A Steroid Receptor Coactivator, SRA, Functions as an RNA and Is Present in an SRC-1 Complex. *Cell* 1999;97:17–27. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)80711-4](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)80711-4).

[40] Goehe RW, Di X, Sharma K, Bristol ML, Henderson SC, Valerie K, et al. The autophagy-senescence connection in chemotherapy: must tumor cells (self) eat before they sleep? *J Pharmacol Exp Ther* 2012;343:763–78. <https://doi.org/10.1124/jpet.112.197590>.



Dans cette étude, nous avons mis en évidence que *H19* interagit non seulement avec p53 mais aussi avec MDM2 pour former un complexe ternaire dans le cancer du sein. Cette interaction favorise non seulement la dégradation de p53 mais empêche également la translocation nucléaire de p53. De plus, nous avons montré que *H19* réduit les activités transcriptionnelles de p53 et altère le blocage du cycle cellulaire, l'induction de l'apoptose et la sénescence des cellules après des dommages à l'ADN. Ensemble, nos données mettent en évidence un nouveau mécanisme d'action pro-tumoral de *H19* dans les cellules cancéreuses du sein par la répression de p53 et par conséquent l'induction d'une instabilité génétique.



## *DISCUSSION*



## I. Contribution et parts relatives de *H19* et du miR-675 lors de l'émergence des métastases du cancer du sein

Le lncRNA *H19* participe à de nombreuses étapes de la tumorigenèse telles que la prolifération, la migration, l'invasion, l'EMT et le développement de métastases du cancer du sein (Lecerf et al., 2019). De plus, *H19* est le précurseur du miR-675, également impliqué dans la progression tumorale (Tsang et al., 2010; Zhuang et al., 2014; Vennin et al., 2015). Pendant ma thèse, j'ai cherché à comprendre l'implication et la contribution relative du lncRNA *H19* et du miR-675 sur les phénotypes observés lors de l'émergence des métastases.

Nous avons évalué l'invasion des cellules cancéreuses mammaires *in vivo* par injection de cellules dans des embryons de poisson zèbre. Ce modèle a déjà été utilisé pour des expériences de xénotreffes avec des lignées cellulaires provenant de divers cancers humains, notamment le mélanome métastatique, les cellules cancéreuses pancréatiques, ovariennes, mammaires, colorectales et de gliomes puisque ces cellules sont capables de proliférer, d'envahir et de former des masses tumorales dans l'embryon de poisson zèbre (Grolez et al., 2019; Raby et al., 2020). Nous avons utilisé le modèle transgénique de poisson zèbre Tg(fli1 :GFP) nous permettant de visualiser les vaisseaux sanguins de l'animal et ainsi permettre l'analyse des cellules cancéreuses après leur intravasation dans les vaisseaux sanguins. Ces expériences ont mis en évidence l'implication de *H19* et du miR-675 dans l'invasion cellulaire *in vivo*. En effet, les cellules exprimant *H19* et le miR-675 ont des capacités invasives augmentées dans le poisson zèbre.

J'ai également démontré le rôle de *H19* et du miR-675, ensemble ou indépendamment, dans la migration et l'invasion cellulaire *in vitro*. De manière intéressante, lors des tests d'invasion, nous avons observé des différences en fonction des types cellulaires utilisés en présence de l'inhibiteur de miR-675, reflétant probablement le niveau endogène d'expression de *H19* ou le sous-type moléculaire des cellules. En effet, la lignée MCF-7 est de type luminal-like tandis que la lignée MDA-MB-231 est une triple négative. De plus, l'expression de *H19* est associée à un mauvais pronostic pour les patientes atteintes de cancer du sein triple négatif (Shima et al., 2018).

Mes travaux ont montré que *H19* et le miR-675 sont capables de moduler l'expression des marqueurs d'EMT, même si leur action diffère selon le type cellulaire. En effet, dans les cellules MCF-7, la surexpression de *H19* a peu d'effet sur l'EMT, il entraîne une diminution de l'expression des marqueurs épithéliaux mais ne permet pas l'expression de marqueurs mésenchymateux. En revanche, dans les cellules MDA-MB-231 surexprimant stablement *H19* et dans les cellules SUM159PT pH19-mCherry<sup>high</sup>, les hauts niveaux d'expression de *H19* sont associés à une

expression accrue des marqueurs mésenchymateux. De plus, une diminution de l'expression du marqueur épithélial ZO-1 est observée avec les cellules SUM159PT pH19-mCherry<sup>High</sup>. Nos résultats sont en accord avec les travaux de Liao *et al.*, qui ont mis en évidence que le lncRNA *H19* induit la prolifération et l'invasion des cellules cancéreuses pulmonaires *via* la surexpression de la N-cadhérine et la vimentine et la sous-expression de la E-cadhérine (S. Liao et al., 2019).

Dans la lignée MDA-MB-231, les cellules surexprimant stablement le miR-675 favorisent l'expression de ZO-1 et de la N-cadhérine et diminue l'expression de Snail. Ces données indiquent que le miR-675 n'exerce pas le même effet que *H19* lors de l'EMT. Dans la même lignée cellulaire, *H19* favorise l'expression des marqueurs de l'EMT alors que l'action du miR-675 semble induire à la fois l'expression de marqueurs mésenchymateux et épithéliaux. Ce qui suggère un rôle du miR-675 dans l'EMT et dans la MET (*mesenchymal-to-epithelial transition*). La MET est un processus essentiel pour coloniser et proliférer aux différents sites métastatiques (Matouk et al., 2016). *H19* et son miR-675 pourraient avoir des effets complémentaires et séquentiels lors de la dissémination métastatique. Ainsi, *H19* participerait à la migration des cellules de la tumeur primaire en favorisant l'EMT, alors que le miR-675 permettrait la colonisation métastatique et le développement de tumeurs secondaires en induisant la MET. La littérature décrit l'existence d'un état intermédiaire entre les phénotypes épithélial et mésenchymateux pouvant être impliqués dans la migration et l'invasion des cellules et donc au développement métastatique (Mayor & Etienne-Manneville, 2016). Ce statut intermédiaire est appelé phénotype hybride. Il confère aux cellules cancéreuses une plasticité cellulaire augmentée pour s'adapter à l'environnement stressant lors de la formation de métastases (P. He et al., 2018). Nos résultats indiquent que l'expression du miR-675 permettrait l'acquisition de ce phénotype hybride pour favoriser la métastase.

La transition épithélio-mésenchymateuse est un mécanisme cellulaire majeur impliquant de nombreuses voies moléculaires (Satoh et al., 2015). Elle correspond à la différenciation d'une cellule épithéliale à une cellule de type mésenchymateuse. L'EMT est essentielle pour le développement embryonnaire et la réparation tissulaire mais aussi pour la progression du cancer et des métastases (F. Liu, Gu, et al., 2016). Lors de ce processus, le rôle du miR-675 n'est pas bien décrit tandis que le rôle de *H19* semble contradictoire. De nombreuses données indiquent que *H19* favorise l'EMT dans divers tissus, dont le sein (M.-J. Chen et al., 2019; W.-Q. Liang et al., 2019; L. Liu et al., 2019; Xiong et al., 2020). Cependant, d'autres travaux démontent que *H19* est impliqué dans la suppression des métastases du carcinome hépatocellulaire (L. Zhang et al., 2013). Mes résultats ont permis de mettre en évidence l'implication de *H19* et de son miR-675 dans la

dissémination métastatique et montrent les effets contraires et complémentaires de *H19* et du miR-675 lors de l'EMT.

Dans le cancer du sein, le rôle oncogénique de *H19* est bien établi. En revanche les mécanismes moléculaires précis impliqués dans la tumorigenèse ne sont pas encore totalement compris. En effet, les modes d'action de *H19* semblent divers, agissant à différents niveaux de régulation, notamment en servant d'éponge à microRNA. En effet, la surexpression de *H19* favorise la migration et l'invasion dans le cancer de la vessie en séquestrant le miR-29b-3p. Cependant, l'inhibition de *H19* par knockdown permet au miR-29b-3p de favoriser la MET (Lv et al., 2017). Il est également connu que les microRNA de la famille miR-200 (miR-200a, miR-200b, miR-200c, miR-141 et miR-429) sont impliqués dans l'EMT *via* la voie ZEB1/E-cadhérine (S. J. O'Brien et al., 2018; Title et al., 2018). Ces microRNA régulent les protéines ZEB1 et ZEB2 en réprimant l'expression de la E-cadhérine. Les protéines ZEB1 et ZEB2 sont des facteurs transcriptionnels impliqués dans l'EMT et les métastases. Lorsque les miRNA de la famille miR-200 sont inhibés, l'EMT est induite et, à l'inverse, lorsque ces miRNA sont exprimés, cela induit la MET (Gregory et al., 2008). De nombreuses études montrent que *H19* inhibe les membres de la famille miR-200 (W. Yang et al., 2017). En effet, *H19* sert d'éponge au miR-200a ou miR-200b/c, ce qui induit les métastases *via* la surexpression de ZEB1 et ZEB2 (Y. Zhao et al., 2019; S. Zhou et al., 2018).

Afin de compléter ces résultats, nous avons exploré le rôle de *H19* et du miR-675 lors de la résistance à l'anoïkis. L'anoïkis est une mort cellulaire induite par le détachement d'une cellule de sa matrice extracellulaire, processus impliqué lors du développement métastatique. En effet, lors de l'invasion, les cellules doivent rompre leurs adhésions pour pouvoir atteindre le site tumoral secondaire. Pour évaluer le rôle de *H19* et du miR-675 dans ce phénotype, nous avons étudié la résistance à l'anoïkis dans des lignées cellulaires de cancer du sein surexprimant stablement *H19* ou le miR-675. Le test de résistance à l'anoïkis sur les cellules MCF-7 surexprimant ou non *H19* ne montre aucune différence statistique à long terme. De la même manière, la viabilité des cellules MDA-MB-231 surexprimant *H19* ou le miR-675 ne montre pas de variation significative par rapport au contrôle.

En lien avec les phénotypes liés à l'EMT, j'ai également approfondi l'implication de *H19* dans la régulation des cellules souches du cancer du sein. En effet, *H19* a déjà été montré comme étant associé au phénotype souche cancéreux mammaire, notamment en favorisant la division symétrique des cellules (Peng et al., 2017; Shima et al., 2018; M. Wang et al., 2019). Mes résultats de thèse mettent en évidence une corrélation entre l'expression du gène *H19* et la présence de marqueurs de cellules souches dans une cohorte de plus de 5000 échantillons de patientes

atteintes de cancer du sein. L'expression de *H19* est corrélée à la présence de marqueurs de phénotypes souches, CD44+/CD24- et ALDH1A1 (Al-Hajj et al., 2003; Tomita et al., 2016). De plus, nos résultats indiquent que la surexpression de *H19* et du miR-675 retrouvée dans les cellules cancéreuses mammaires s'accompagne globalement d'une surexpression de différents marqueurs de cellules souches tels que *Sox2*, *Oct3/4* et *Abcg2*. Nous avons également observé une augmentation de l'expression de *Nanog* uniquement dans les cellules cancéreuses du sein triple négatives MDA-MB-231 et SUM159PT et une augmentation de *Notch1*, *Aldh1a1* et *Aldh1a3* uniquement dans la lignée cellulaire SUM159PT. Dans les SUM159PT, l'activité de l'enzyme ALDH est diminuée en présence du siRNA dirigé contre *H19* ou d'un inhibiteur du miR-675, et augmentée par l'expression transitoire du miR-675. A notre connaissance, c'est la première fois que le rôle du miR-675 dans le phénotype souche cancéreux est décrit.

*Nanog*, *Sox2* et *Oct3/4* sont des facteurs de transcription largement décrits dans la littérature pour leur implication dans le maintien, l'auto-renouvellement et la pluripotence des cellules souches embryonnaires (J. Kim et al., 2008). Leur implication dans la régulation des cellules souches cancéreuses est largement démontrée (Hadjimichael et al., 2015). *Abcg2* code une pompe d'efflux associée à la chimiorésistance des cellules souches cancéreuses (Hadjimichael et al., 2015). De plus, un réseau de régulation transcriptionnelle impliquant *Sox2*, *Oct3/4* et *c-Myc* assure le maintien de la pluripotence des cellules souches (J. Kim et al., 2008). De façon intéressante, il est démontré que *c-Myc* peut se lier de façon allèle-spécifique en amont du promoteur du gène *H19* afin de favoriser sa transcription (Barsyte-Lovejoy et al., 2006). De même, *Sox2* et *Oct3/4* sont capables de se lier en amont du gène *H19*, empêchant la méthylation du promoteur sur l'allèle maternel. Cette fixation contribue donc à l'expression du gène *H19* (J. Kim et al., 2008). La régulation du gène *H19* par *Sox2*, *Oct3/4* et *c-Myc* suggère que *H19* pourrait être impliqué dans la régulation des cellules souches.

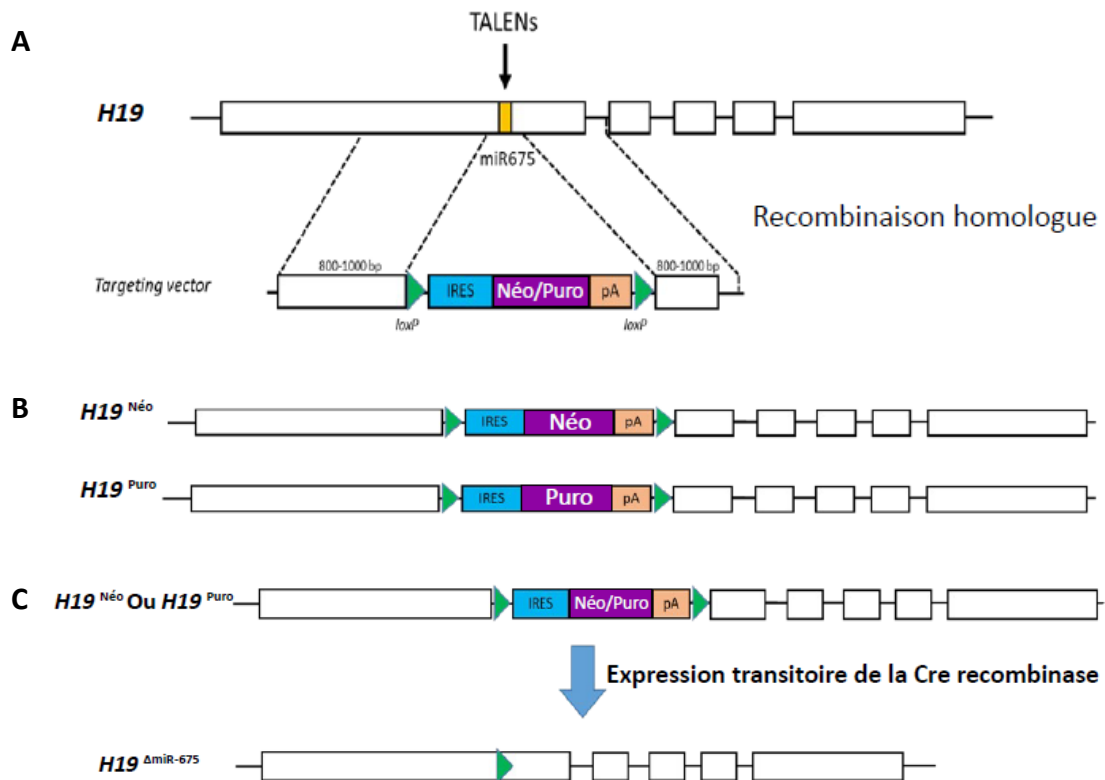
En complément, nous avons déterminé l'expression de *H19* et du miR-675 dans les cellules natives dans des conditions de culture favorisant la prolifération des cellules souches comparé à des cellules cultivées en monocouche. Nous avons observé une expression accrue de *H19* dans les cellules triple négatives, ayant déjà subi les modifications de l'EMT, MDA-MB-231 et SUM-159PT et une expression accrue de miR-675 dans les cellules épithéliales MCF-7 dans des conditions 3D par rapport à une culture en 2D. Ces résultats démontrent l'implication séquentielle de *H19* et du miR-675 dans la tumorigenèse.

Le plus souvent, un miRNA a un rôle semblable au gène hôte qui le produit. Cependant, dans un certain nombre de cas, le miRNA possède une action antagoniste de son gène hôte (Gao et al.,



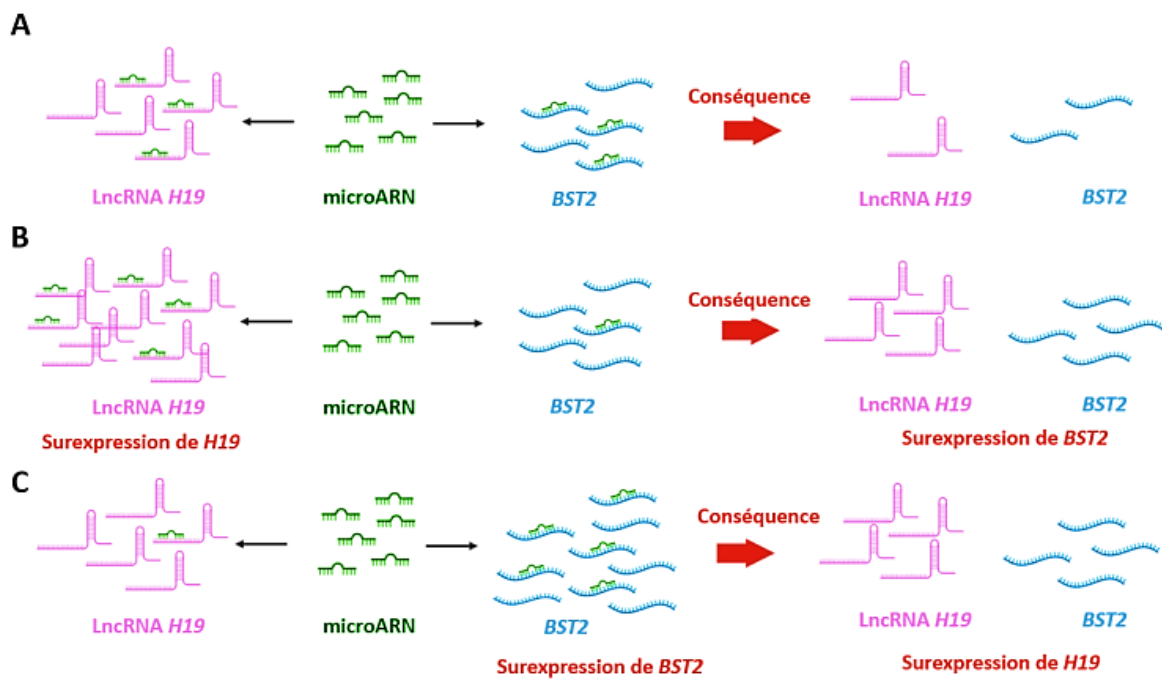
2012). Par exemple, dans le cancer du sein, le miR-301, dérivé du gène *SKA2* qui possède une action oncogénique, régule négativement un certain nombre de suppresseur de tumeur comme *PTEN* (W. Shi et al., 2011). A l'inverse, le miR-483-5p, dérivé du gène *IGF2* inhibe l'angiogenèse contrairement à son gène hôte (Qiao et al., 2011). Dans mon travail, nous montrons un rôle semblable et/ou antagoniste du miR-675 et de son gène hôte *H19* en fonction du phénotype étudié. En effet, *H19* et le miR-675 ont des actions similaires lors de la migration, de l'invasion et semblent réguler le phénotype souche de la même façon. En revanche, leur rôle serait antagoniste lors de l'EMT et de la formation de colonies.

Malgré la similarité des phénotypes observés, le lncRNA *H19* et son miR peuvent ne pas avoir les mêmes déterminants moléculaires et donc utiliser des voies de signalisation distinctes. Le long ARN non codant *H19* induit la migration et l'invasion cellulaire par des mécanismes différents selon les cancers. En effet, il promeut la migration et l'invasion des cellules cancéreuses du colon par la voie MAPK (W. Yang et al., 2018) et celles des cellules d'ostéosarcome par la voie de signalisation NF- $\kappa$ B (J. Zhao & Ma, 2018). Par la suite, ces voies de signalisation pourront être étudiées dans le cancer du sein. La connaissance des déterminants moléculaires associés aux phénotypes de *H19* dans l'apparition des métastases du cancer du sein suggérerait de nouvelles cibles thérapeutiques.



**Figure 32 : Génération de lignées cellulaires cancéreuses mammaires contenant des allèles *H19* déficients en miR-675.** **A.** Représentation schématique du locus *H19* et de la séquence de ciblage. La localisation de la séquence de reconnaissance de TALEN au miR-675 dans l'exon 1 est indiquée (jaune). La cassette de ciblage, flanquée de deux sites loxP (triangles verts) est composée d'un site d'entrée de ribosome interne (IRES), d'un gène de résistance aux antibiotiques (Néo ou Puro) et d'une séquence de polyadénylation (pA). **B.** L'insertion de la cassette entraîne l'insertion du gène de résistance dans l'allèle *H19* conduisant à un arrêt prématuré dans sa transcription. **C.** L'excision engendrée par la Cre recombinase du gène marqueur sélectionnable conduit à l'obtention d'un allèle *H19* déficient en miR-675.

Les données obtenues semblent révéler que le lncRNA *H19* et son miRNA n'ont pas les mêmes rôles lors des tests de clonogénicité et de l'EMT. Dans le but de confirmer les résultats, nous pourrions utiliser des lignées cellulaires délétées en miR-675 dans lesquelles *H19* n'est pas modulé artificiellement afin de pouvoir discriminer le rôle de l'ARN *H19* en tant que tel du rôle du miR-675 (Figure 32). La création de lignées cellulaires cancéreuses mammaires perdant l'expression du miR-675 au sein de l'unité transcriptionnelle *H19* serait basée sur une approche d'édition du génome basée sur la technologie TALEN. Cette technologie a déjà été utilisée avec succès au laboratoire et présente l'avantage par rapport à la technologie CRISP/Cas9 de ne pas générer de mutation non désirée (off-target). Suite à la cassure double brin par le TALEN (*transcription activator-like effector nucleases*), une cassette sans promoteur flanquée de deux sites loxP et composée du site « internal ribosome entry site » de l'EMCV, de gène de résistance aux antibiotiques (Néomycine ou Puromycine), de la séquence de polyadénylation de SV40 et de bras d'homologie avec le gène *H19* serait recombinaison de part et d'autre du miR-675 (Figure 32A). Par recombinaison homologue du gène *H19*, l'insertion de la cassette sélectionnable permettrait de cibler les deux allèles de *H19* (Figure 32B). Ensuite la cassette serait éliminée par l'expression transitoire du vecteur exprimant la Cre recombinase. Nous obtiendrions alors la génération de lignées cellulaires cancéreuses mammaires contenant des allèles déficients en miR-675 (Figure 32C). Les expériences pourraient être effectuées sur des cellules MDA-MB-231 et T47D qui possèdent deux allèles du locus *H19*. Grâce à cette approche originale, nous pourrions discriminer l'implication relative de *H19* ou du miR-675. Après l'obtention de ce modèle, nous pourrions discriminer les effets de *H19* indépendamment de son miR-675 lors de l'émergence des métastases du cancer du sein, et plus particulièrement les métastases cérébrales. Cette technologie s'intègre dans un nouveau projet qui discriminera les contributions relatives de *H19* et de son miR-675 lors de la survenue et du développement de métastases cérébrales issues de cellules cancéreuses mammaires. Cette étude sera réalisée par Kekely Klouyovo, actuellement en première année de thèse au sein du laboratoire CANTHER sous la direction du Pr Eric Adriaenssens.



**Figure 33 : Représentation schématique de l'hypothèse de régulation post-transcriptionnelle entre *H19* et *BST2*.** A. Représentation schématique du lncRNA *H19* (en rose), de l'ARNm de *BST2* (en bleu) et d'un microRNA (en vert). En condition normale, le miRNA serait capable d'interagir autant avec *H19* qu'avec *BST2* induisant leur dégradation. B. Lorsque *H19* est surexprimé, le miRNA serait davantage séquestré par *H19*, se fixant moins sur l'ARNm de *BST2*, entraînant la surexpression de *BST2*. C. Quand *BST2* est surexprimé, le miRNA ciblerait plus l'ARNm de *BST2*, interagissant moins avec *H19* conduisant à la surexpression du lncRNA.

## II. Implication de *BST2* dans les phénotypes associés au lncRNA *H19* lors de l'émergence des métastases du cancer du sein

Après avoir spécifié le rôle de *H19* et du miR-675, ensemble ou indépendamment, je me suis intéressée aux cibles moléculaires impliquées lors de l'émergence des métastases du cancer du sein. Mes résultats de travaux de thèse mettent en évidence une régulation croisée entre le lncRNA *H19* et la protéine transmembranaire *BST2* dans le cancer du sein. En effet, la modulation de l'expression de *H19* induit une modulation de l'expression de *BST2*. De la même manière, la modulation de l'expression de *BST2* induit une modulation de l'expression de *H19*. Cette régulation croisée pourrait s'expliquer par 3 hypothèses différentes : une régulation transcriptionnelle, une régulation post-transcriptionnelle ou une régulation post-traductionnelle. La première est celle d'une régulation transcriptionnelle où *H19* activerait, de manière directe ou indirecte, le promoteur de *BST2* et ainsi régulerait son expression. Cependant, cette hypothèse est peu probable car la surexpression de *BST2* et de *H19* est induite dans nos cellules cancéreuses mammaires par des vecteurs contenant des promoteurs « forts », peu régulables. De plus, la transfection transitoire des siRNA ne dure que 48h, un laps de temps trop court pour que la cellule mette en place une régulation transcriptionnelle. La seconde hypothèse est celle d'une régulation post-traductionnelle, vite réfutée puisque *H19* est un ARN non codant. Enfin, la dernière hypothèse plausible est celle d'une régulation post-transcriptionnelle.

La régulation croisée entre *H19* et *BST2* pourrait être le résultat de l'action d'une protéine cytosolique capable d'interagir avec *H19* mais également avec *BST2*. Néanmoins, très peu de travaux montrent l'implication de protéines capables d'interagir de manière directe avec *H19*. Cette régulation post-transcriptionnelle entre *H19* et *BST2* pourrait faire intervenir un ou des microRNA. En effet, nous savons que *H19* peut interagir avec des microRNA, notamment en servant d'éponge à microRNA. De ce fait, *H19* possède de nombreux sites cibles pour des microRNA sur sa séquence.

Notre hypothèse est la suivante : *H19* et *BST2* seraient co-régulés par un même microRNA qui se fixerait de manière équitable entre les deux (Figure 33A). Lors de la surexpression de *H19*, le miRNA serait séquestré par *H19* réduisant la quantité de miRNA pouvant se fixer sur *BST2* et entraînant ainsi sa surexpression (Figure 33B). De façon similaire, la surexpression de *BST2* augmenterait la quantité de miRNA se fixant sur sa séquence, diminuant le nombre de miRNA capable d'interagir avec *H19* et entraînant sa surexpression (Figure 33C). Les résultats obtenus lors des transfections transitoires de siRNA dirigés contre *H19* ou contre *BST2* confortent cette

hypothèse. En effet, la diminution de l'expression de *H19* ou de *BST2* entraîne une diminution de l'expression de *BST2* ou de *H19* respectivement.

Dans le cancer gastrique, *BST2* est régulé négativement par un microRNA, le miR-760. Le miR-760 inhibe la viabilité cellulaire et la migration des cellules cancéreuses gastriques en inhibant l'expression de *BST2* (W. Liu et al., 2020). La surexpression du miR-760 est retrouvée dans de nombreux cancers. En effet, le miR-760 participe à la prolifération cellulaire dans le cancer de l'ovaire (Y. Liao et al., 2016). Dans l'hépatocarcinome, le miR-760 régule NACC-1 restaurant ainsi la migration et l'invasion cellulaire (Yin et al., 2020). Dans le cancer du sein, le miR-760 participe à la chimiorésistance des cellules cancéreuses à travers l'induction de la transition épithélio-mésenchymateuse (Hu et al., 2016). De plus, le lncRNA *SNHG6* promeut la progression tumorale du cancer colorectal en séquestrant le miR-760 induisant l'expression de FOX1 (Y. Zhu et al., 2018). Selon la littérature, le miR-760 pourrait être un bon candidat de cette régulation post-transcriptionnelle. Afin de déterminer une possible interaction entre *H19* et le miR-760, j'ai réalisé un alignement de séquence entre *H19* et le miR-760. *In silico*, les résultats indiquent que le miR-760 pourrait se fixer sur la séquence de *H19*. La suite logique de ce travail sera de déterminer si la régulation post-transcriptionnelle entre *H19* et *BST2* est la conséquence d'un effet éponge (*competitive endogenous*) du miR-760.

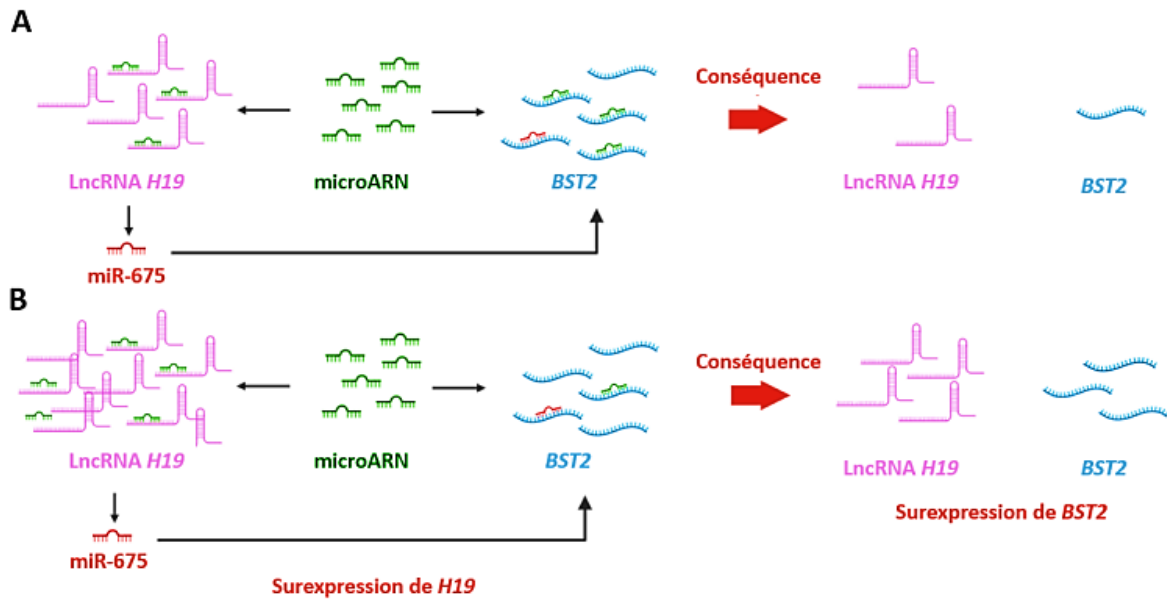
De plus, *BST2* est co-régulé avec un autre long ARN non codant, le lncRNA *FGD5-AS1*, via le miR-129-5p. Cette régulation est à l'origine de la polarisation M1 des macrophages, un mécanisme donnant lieu à l'inflammation pro-tumorale dans le cancer cervical (G. Liu et al., 2021). Ces données renforcent notre hypothèse puisqu'il semblerait que *BST2* soit régulé par d'autres microRNA.

Concernant l'expression protéique de *BST2*, nous visualisons par analyse western blot des bandes correspondants à *BST2* à des tailles différentes. En effet, nous distinguons parfois 3 bandes, notamment avec les cellules exprimant transitoirement ou stablement *BST2*. Dans la littérature, *BST2* est montré comme pouvant former deux formes glycosylées, une à 37 kDa et une à 27 kDa ainsi qu'une forme non glycosylée à 20 kDa (Lewinski et al., 2015; Lv et al., 2014; W. Wang et al., 2015). Ces données sont en accord avec nos résultats obtenus lors des analyses par western blot de l'expression protéique de *BST2*. Lorsque les cellules expriment stablement *H19*, nous ne visualisons que 2 bandes, semblant correspondre à la forme glycosylée à 27 kDa et à la forme non glycosylée à 20 kDa. Pour s'assurer d'une glycosylation différentielle présente dans nos modèles, l'équipe pourra utiliser un traitement à la peptide :N-glycosidase F (PNGaseF), enzyme capable de cliver la glycosylation protéique de *BST2* (Kühl et al., 2011; W. Wang et al., 2015).

De façon inattendue, nous observons, en présence des siRNA dirigés contre *H19* ou contre *BST2*, uniquement une seule bande à 27 kDa pouvant correspondre à la forme glycosylée de *BST2*. Ce résultat est également retrouvé dans les cellules de cancer du nasopharynx même si ce résultat semble contre intuitif (Kuang et al., 2017).

L'ensemble de mes résultats ne peut pas être expliqué uniquement par l'effet éponge d'un miRNA. Nous avons donc recherché d'autres miRNA candidats susceptibles d'intervenir dans cette régulation. En effet, le miR-675, précurseur du lncRNA *H19* pourrait être impliqué dans la régulation entre *H19* et *BST2*. Mes travaux de thèse ont démontré que la surexpression du miR-675 dans nos modèles cellulaires induit une diminution de l'expression de *BST2*. De plus, l'expression de *BST2* est augmentée lorsque le miR-675 est inhibé par l'intermédiaire d'un inhibiteur du miR-675. Ainsi, en plus de la co-régulation par un miRNA ciblant à la fois *BST2* et *H19*, le miR-675 pourrait réguler négativement *BST2* (Figure 34A). Ces nouvelles données peuvent donc expliquer la chute brutale de l'expression de *H19* lors des expériences avec des doses croissantes de *BST2* en présence ou non de *H19*. En effet, la surexpression de *BST2* augmenterait la quantité de miRNA se fixant sur sa séquence, diminuant le nombre de miRNA capable d'interagir avec *H19* entraînant sa surexpression. Ainsi, *H19* en grande quantité dans la cellule serait clivé par les complexes Drosha puis Dicer pour produire le miR-675 qui régulera alors négativement *BST2* (Figure 34B).

Mes résultats ont également montré que les cellules transfectées avec des doses croissantes de *H19* induisaient une augmentation de l'expression de *BST2* avant d'atteindre un plateau puis de diminuer. En effet, l'implication du miR-675 pourrait expliquer ces observations. A un certain seuil, il est possible que la quantité de miR-675 au sein de la cellule devienne trop élevée ce qui compenserait la diminution de la quantité de miRNA ciblant l'ARNm de *BST2*.



**Figure 34 : Représentation schématique de l'hypothèse de régulation post-transcriptionnelle entre *H19* et *BST2* faisant intervenir le miR-675. A.** Représentation schématique du lncRNA *H19* (en rose), du miR-675 (en rouge), de l'ARNm de *BST2* (en bleu) et d'un microRNA (en vert). En condition normale, le miR-675 serait capable d'interagir avec *BST2* induisant sa dégradation. **B.** Lorsque *H19* est surexprimé, le miRNA serait davantage séquestré par *H19*, se fixant moins sur l'ARNm de *BST2*, entraînant la surexpression de *BST2*. Cependant, le miR-675 régulerait négativement *BST2*.



Lors de ma thèse, nous voulions déterminer les cibles moléculaires impliquées dans les phénotypes associés au lncRNA *H19*. Nous avons mis en évidence que *BST2* participe à la progression tumorale du cancer du sein en induisant la prolifération, la migration et l'invasion cellulaire, comme ce qui est décrit dans la littérature (D. Cai et al., 2009; Sayeed et al., 2013; Yi et al., 2013). Néanmoins, nous ne pouvons pas conclure quant à l'implication de *BST2* comme effecteur de *H19*. En effet, il faudrait de nouveau réaliser ces expériences et inhiber l'expression de *BST2*, *via* des siRNA, dans les cellules cancéreuses mammaires surexprimant *H19* afin de déterminer l'implication de *BST2* dans les phénotypes associés au lncRNA *H19*. De plus, il serait intéressant d'utiliser un inhibiteur stérique empêchant la dimérisation de *BST2* développé par l'équipe de Mahauad-Fernandez. Le peptide B49 inhibe la croissance tumorale et l'adhésion des cellules cancéreuses mammaires (Mahauad-Fernandez & Okeoma, 2018). Enfin, nous pourrions créer des lignées cellulaires inductibles afin de contrôler l'expression de *H19* et/ou du miR-675 à un temps donné. Ce système permettrait de visualiser l'expression ectopique de *H19* à un moment donné sans modification artificielle et dans un second temps l'expression ectopique du miR-675 sur la régulation de l'expression de *BST2*. L'ensemble de ces expériences sont envisagées par l'équipe pour identifier la part relative de *BST2* lors du développement métastatique.

Néanmoins, *BST2* n'est probablement pas le seul effecteur du lncRNA *H19* dans le cancer du sein. En effet, *BST2* ne favorise pas la formation de colonies alors que mes résultats de thèse ont démontré le rôle de *H19* dans ce phénotype. De plus, les effets de la surexpression de *BST2* varient en fonction de la lignée cellulaire. Bien que l'expression de *BST2* et de *H19* soit cellule-dépendante, d'autres effecteurs moléculaires peuvent être responsables des modifications phénotypiques observées lors de la surexpression de *H19*. En revanche, *H19* et *BST2* induisent les mêmes voies de signalisation. En effet, dans l'ostéosarcome, *H19* induit la migration et l'invasion cellulaire en activant la voie NF- $\kappa$ B (J. Zhao & Ma, 2018) tandis que *BST2* induit la même voie de signalisation dans le cancer gastrique (W. Liu et al., 2018). De plus, notre équipe a démontré que le miR-675 en ciblant directement les ubiquitines ligases E3 c-Cbl et Cbl-b augmente la stabilité et l'activation de l'EGFR et de c-MET, entraînant l'activation d'AKT et de ERK ainsi que la prolifération et la migration cellulaire (Vennin et al., 2015). De manière intéressante, la surexpression de *BST2* induit la phosphorylation d'AKT et ERK dans le cancer de la vessie (Shigematsu et al., 2017).

L'identification de *BST2* en tant qu'effecteur de *H19* permettrait d'apporter une meilleure compréhension de la signalisation induite par la surexpression de ce lncRNA dans le cancer du sein et ainsi proposer de nouvelles cibles thérapeutiques.



### III. Rôle du lncRNA *H19* dans la régulation de la protéine p53 contribuant à la progression tumorale mammaire

La protéine p53 est sous le contrôle strict de plusieurs systèmes de régulation complexes. Parmi eux, la protéine MDM2 est le principal régulateur de l'expression de p53, connue pour induire l'ubiquitination et la dégradation de p53 par le protéasome. Cependant, d'autres mécanismes peuvent participer au contrôle de l'expression de p53. Par exemple, dans les cellules cancéreuses gastriques, l'ARN *H19* interagit avec la protéine p53 bien que les conséquences fonctionnelles de cette interaction restent à élucider (F. Yang et al., 2012). Il est également montré que le miR-675, dérivé de *H19*, réduit l'expression de la protéine p53 et favorise ainsi la prolifération cellulaire dans les cancers de la vessie et du poumon (C. Liu et al., 2016; Zheng et al., 2019). De plus, la surexpression de *H19* et du miR-675 favorise l'EMT et diminue l'expression de p53 conduisant à la progression tumorale (W. Zhang et al., 2021). Nous avons observé des résultats similaires dans nos modèles, bien que le miR-675 ait présenté moins d'effets que l'ARN *H19*.

Nous avons démontré pour la première fois que *H19* s'associe à la fois à p53 et à MDM2 dans les cellules cancéreuses du sein. Cette association favorise la dégradation de p53 et empêche l'activation de p53 en cas de dommages à l'ADN. De plus, nous avons démontré que les gènes cibles de p53 tels que *cdkn1a* ou *bax* sont réprimés, entraînant la progression du cycle cellulaire, une diminution de l'induction de l'apoptose et probablement l'accumulation de cellules porteuses de mutations génétiques. De cette manière, *H19* pourrait contribuer à la progression tumorale en renforçant les altérations génétiques et en maintenant la prolifération des cellules cancéreuses malgré les mutations de l'ADN. Ainsi, *H19* pourrait favoriser l'instabilité génomique chez les personnes non exposées aux génotoxines, par un mécanisme impliquant l'interaction p53/*H19*. D'autres expériences devront être réalisées pour montrer si cette régulation existe dans les cellules normales.

Précédemment, notre équipe a montré que la surexpression de *H19* permettait de faciliter la transition G1/S du cycle cellulaire. *H19* est activé par le facteur de transcription E2F1 (Berteaux et al., 2005) et réprimé par le suppresseur de tumeur RB (Tsang et al., 2010). De plus, nous avons mis en évidence que *H19* est réprimé par p53 (Dugimont et al., 1998). Nos données actuelles indiquent que *H19* et p53 sont régulés réciproquement et forment des boucles de rétrocontrôles. De manière intéressante, une autre boucle de rétrocontrôle existe entre le lncRNA *RoR* et p53 puisque p53 induit transcriptionnellement l'expression de *RoR* qui réprime, à son tour, les activités de p53 (A. Zhang et al., 2013). Nos résultats sont en accord avec les travaux précédents

puisque *H19* réprime les activités de p53 pour permettre la progression du cycle cellulaire. Ainsi, *H19* semble exercer un rôle central dans la progression du cycle cellulaire.

La protéine MDM2 est composée d'au moins quatre domaines fonctionnels indépendants (Shimizu et al., 2002) : un domaine N-terminal qui reconnaît le domaine BOX-1 de p53, un domaine central impliqué dans la liaison du gène suppresseur de tumeur *p14ARF*, un domaine de liaison au zinc et un domaine de liaison RING-finger (Elenbaas et al., 1996). La protéine p53 interagit avec MDM2 *via* son domaine BOX-1 situé dans la région N-terminale de p53. De plus, MDM2 peut également se lier aux ARN. Une fois liés à l'ARN, MDM2 change de conformation. Ce changement de conformation réduit l'affinité de MDM2 pour le site de liaison primaire dans le domaine N-terminal de p53 changeant sa spécificité pour un motif peptidique distinct dans le domaine central de p53 (Shimizu et al., 2002). En effet, les complexes MDM2-ARN peuvent se lier à la protéine p53 dépourvue du domaine BOX-1 (Burch et al., 2000). Ces données indiquent que les ARN peuvent favoriser l'interaction MDM2/p53 en utilisant des domaines de liaison différents de ceux connus pour être impliqués dans l'interaction directe entre p53 et MDM2.

Conformément à nos découvertes, d'autres lncRNA sont connus pour réguler les fonctions de p53. Par exemple, dans l'athérosclérose, l'association de *lincRNA-p21* et de MDM2, libère p53, lui permettant d'interagir avec p300 pour transactiver ses gènes cibles (Wu et al., 2014). De plus, le lncRNA *RoR* est décrit comme un puissant répresseur de p53 dans les cellules MCF-7. En effet, *RoR* supprime la traduction de p53 par interaction directe avec hnRNP I (A. Zhang et al., 2013).

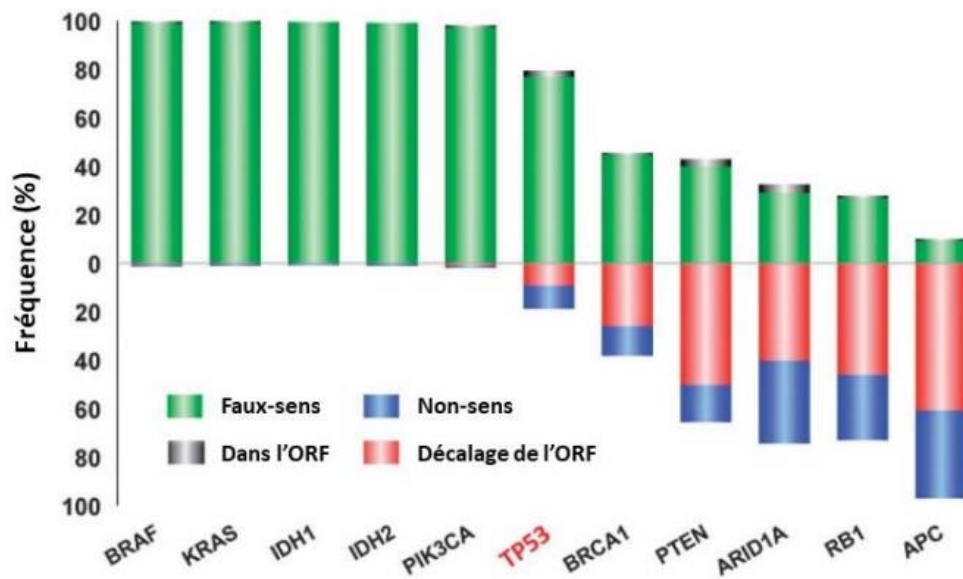
Nos données démontrent pour la première fois une interaction tripartite entre MDM2/*H19*/p53, conduisant à la dégradation de p53. A notre connaissance, nous montrons pour la première fois qu'un lncRNA altère les activités de p53 en favorisant sa dégradation. Nos résultats ainsi que les travaux antérieurs de Zhang *et al.* (A. Zhang et al., 2013), démontrent que les lncRNA tels que *H19* et *RoR* constituent un réseau de régulateurs supplémentaires dans la régulation de l'expression de p53. De plus, nos données démontrent que *H19* est capable d'empêcher la translocation de p53 vers le noyau. Après traitement à la doxorubicine, qui induit fortement l'expression de p53, les phénotypes associés à une activité transcriptionnelle de p53 restent plus faibles dans les cellules surexprimant stablement *H19*, probablement en raison de la rétention de p53 dans le cytoplasme.

Le suppresseur de tumeur p53 joue un rôle essentiel dans la préservation de l'ADN contre de nombreuses agressions grâce à la régulation des points de contrôle du cycle cellulaire, de la réparation de l'ADN, de la sénescence et de l'apoptose. Les défauts du gène suppresseur de tumeur *TP53* affectent le contrôle du cycle cellulaire et conduisent à une instabilité génétique

(comme l'amplification génique, la perte allélique, les anomalies du caryotype) dans les lignées cellulaires murines et humaines ainsi que dans les tumeurs primaires du cancer du sein humain (Eyfjörd et al., 1995). De plus, le gène *TP53* est altéré dans plus de la moitié des cancers humains (Chao, 2015). Cette altération résulte de l'apparition d'une mutation ponctuelle ou d'une perte d'hétérozygotie. D'autre part, *H19* est surexprimé dans les carcinomes mammaires, indépendamment des sous-types moléculaires (Adriaenssens et al., 1998; Vennin et al., 2017). Nos données montrent que *H19* inhibe l'activité de p53 dans les cellules cancéreuses mammaires et qu'un haut niveau d'expression de *H19* et de MDM2 semblent mutuellement exclusif dans le cancer du sein, suggérant que la perte d'activité de p53 devrait être un meilleur facteur pronostic que son expression.

Le gène suppresseur de tumeur *TP53* présente un mode d'inactivation particulier. En effet, la majorité des gènes suppresseurs de tumeur est inactivée par des mutations insertion/délétion (de type *indel*) ou non-sens qui remplace un nucléotide induisant un changement de codant pour un codon STOP. Alors que dans plus de 80% des mutations somatiques et germinales de *TP53* dans les cancers, les mutations du gène *TP53* sont de type faux sens qui consiste en un changement de nucléotide induisant un changement de codant qui ne sera pas un codon STOP. Les mutations faux sens conduisent à la production d'une protéine mutante stable s'accumulant dans le noyau des cellules cancéreuses (Soussi & Wiman, 2015).

Les gènes possédant un fort taux de mutation faux sens sont généralement considérés comme des oncogènes. D'après les travaux de Soussi et Wiman, il est possible de prédire la fonction oncogène ou suppresseur de tumeur d'un gène en fonction des taux de mutation de ce gène (Figure 35). En effet, *TP53* possède un profil de mutation plus proche des oncogènes que des gènes suppresseurs de tumeurs comme *PTEN* par exemple (Soussi & Wiman, 2015). Les mutations faux sens de *TP53* conduisent à l'expression d'une version mutée de la protéine p53 dans les tumeurs et donc à un rôle majeur de cette protéine dans la transformation oncogénique (Walerych et al., 2012; Milićević et al., 2014; Soussi & Wiman, 2015).



**Figure 35 : Spectre de mutation des gènes fréquemment mutés dans les cancers humains.** Les mutations faux sens sont représentées en vert. En gris sont représentées les mutations insertions/délétions. Les insertions/délétions entrainant un décalage du cadre de lecture sont représentées en rouge. En bleu, sont figurées les mutations non-sens. (Adapté de Soussi & Wiman, 2015).

Ainsi, de nombreux mutants p53 perdent leur fonction de suppresseur de tumeur et gagnent de nouvelles fonctions protumorales et deviennent donc des mutants « gain de fonction » considérés comme des oncogènes majeurs. Dans le cancer du sein, ces mutants de p53 entraînent la résistance des cellules cancéreuses à l'apoptose lorsqu'elles sont sans sérum (Hui et al., 2006). De plus, les mutants gains de fonction sont capables de reconnaître et d'interagir avec de nouveaux éléments de réponse sur l'ADN alors qu'aucune séquence consensus ne soit décrite (Bellazzo et al., 2018). D'autres mutants peuvent interagir avec des facteurs de transcription tels que E2F1 ou E2F4 pour activer l'expression d'oncogènes ou réprimer l'expression de gènes impliqués dans la réparation de l'ADN, afin de favoriser la tumorigenèse. Enfin, les mutants de p53 peuvent s'associer avec d'autres membres de la même famille protéique, p63 et p73, pour inhiber leur fonction suppresseur de tumeur (Bellazzo et al., 2018).

Bien que le statut mutationnel de p53 modifie la survie des patientes atteintes d'un cancer du sein (Ungerleider et al., 2018), ce statut n'est pas encore utilisé pour la prise en charge des patientes atteintes d'un cancer du sein. Les altérations génétiques de *TP53* sont courantes dans le cancer du sein et sont associées aux sous-types moléculaires : 26% des tumeurs lumineales, 50% des tumeurs HER2+ et 88% des carcinomes basal-like présentent des mutations de p53 (Bertheau et al., 2013). Néanmoins, plusieurs études cliniques testent l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques de MDM2 (peptides, anticorps, oligonucléotides antisens) pour cibler des tumeurs exprimant des versions fonctionnelles de p53. Cependant, ces inhibiteurs ont un taux de toxicité élevé pour les tissus environnants (Vassilev, 2007). Nos données suggèrent que des stratégies thérapeutiques alternatives ciblant *H19* pourraient être envisagées pour augmenter la fonction de suppression tumorale de p53 dans les cancers exprimant une version fonctionnelle de p53.





## *CONCLUSION*



En conclusion, mon travail de thèse met en évidence de nouveaux modes de régulation du lncRNA *H19* et de son miR-675 dans l'apparition et le développement des métastases du cancer du sein. Dans un premier temps, leurs actions semblent être complémentaires et séquentielles contribuant au développement des métastases. Dans le but d'identifier des déterminants moléculaires régulés par *H19* lors de l'émergence métastatique, j'ai mis en évidence l'existence d'une régulation post-transcriptionnelle entre *H19* et *BST2* qui participe au développement des métastases du cancer du sein. De plus, *BST2* pourrait être une cible du miR-675. L'identification de *BST2* en tant qu'effecteur de *H19* permettrait d'apporter une meilleure compréhension de la signalisation induite par la surexpression de ce lncRNA dans le cancer du sein et ainsi proposer de nouvelles cibles thérapeutiques. Enfin, mes travaux soulignent le rôle du lncRNA *H19* lors de la progression du cancer du sein après l'inhibition de p53. *H19* se lie à p53 et à MDM2 de manière tripartite et conduit à la régulation négative de l'expression et des activités transcriptionnelles de p53. Mes résultats illustrent les interactions entre lncRNA et miRNA, une régulation fine et complexe, pour influencer l'émergence et le développement des métastases et, après une validation plus approfondie, pourraient être pris en compte dans les thérapies du cancer du sein. En effet, nos données suggèrent que des stratégies thérapeutiques alternatives ciblant *H19* peuvent être envisagées. Néanmoins, déterminer les gènes cibles de *H19* et du miR-675 permettra à long terme de proposer de meilleures pistes thérapeutiques afin d'inhiber le développement des métastases du cancer du sein.



## *BIBLIOGRAPHIE*

Abu Samaan, T. M., Samec, M., Liskova, A., Kubatka, P., & Büsselberg, D. (2019). Paclitaxel's Mechanistic and Clinical Effects on Breast Cancer. *Biomolecules*, 9(12), E789. <https://doi.org/10.3390/biom9120789>

- Adriaenssens, E., Dumont, L., Lottin, S., Bolle, D., Leprêtre, A., Delobelle, A., Bouali, F., Dugimont, T., Coll, J., & Cury, J. J. (1998). H19 overexpression in breast adenocarcinoma stromal cells is associated with tumor values and steroid receptor status but independent of p53 and Ki-67 expression. *The American Journal of Pathology*, *153*(5), 1597-1607. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)65748-3](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)65748-3)
- Adriaenssens, E., Lottin, S., Berteaux, N., Hornez, L., Fauquette, W., Fafeur, V., Peyrat, J.-P., Le Bourhis, X., Hondermarck, H., Coll, J., Dugimont, T., & Cury, J.-J. (2002). Cross-talk between mesenchyme and epithelium increases H19 gene expression during scattering and morphogenesis of epithelial cells. *Experimental Cell Research*, *275*(2), 215-229. <https://doi.org/10.1006/excr.2002.5500>
- Adriaenssens, E., Lottin, S., Dugimont, T., Fauquette, W., Coll, J., Dupouy, J. P., Boilly, B., & Cury, J. J. (1999). Steroid hormones modulate H19 gene expression in both mammary gland and uterus. *Oncogene*, *18*(31), 4460-4473. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1202819>
- Adriaenssens, E., Vanhecke, E., Saule, P., Mougél, A., Page, A., Romon, R., Nurcombe, V., Le Bourhis, X., & Hondermarck, H. (2008). Nerve growth factor is a potential therapeutic target in breast cancer. *Cancer Research*, *68*(2), 346-351. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-07-1183>
- Al-Hajj, M., Wicha, M. S., Benito-Hernandez, A., Morrison, S. J., & Clarke, M. F. (2003). Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *100*(7), 3983-3988. <https://doi.org/10.1073/pnas.0530291100>
- Andrew, A. J., Miyagi, E., Kao, S., & Strebel, K. (2009). The formation of cysteine-linked dimers of BST-2/tetherin is important for inhibition of HIV-1 virus release but not for sensitivity to Vpu. *Retrovirology*, *6*(1), 80. <https://doi.org/10.1186/1742-4690-6-80>
- Angrand, P.-O., Vennin, C., Le Bourhis, X., & Adriaenssens, E. (2015). The role of long non-coding RNAs in genome formatting and expression. *Frontiers in Genetics*, *6*, 165. <https://doi.org/10.3389/fgene.2015.00165>
- Apostolou, P., & Fostira, F. (2013). Hereditary breast cancer : The era of new susceptibility genes. *BioMed Research International*, *2013*, 747318. <https://doi.org/10.1155/2013/747318>
- Ariel, I., Miao, H. Q., Ji, X. R., Schneider, T., Roll, D., de Groot, N., Hochberg, A., & Ayesh, S. (1998). Imprinted H19 oncofetal RNA is a candidate tumour marker for hepatocellular carcinoma. *Molecular Pathology: MP*, *51*(1), 21-25. <https://doi.org/10.1136/mp.51.1.21>
- Ariel, I., Weinstein, D., Voutilainen, R., Schneider, T., Lustig-Yariv, O., de Groot, N., & Hochberg, A. (1997). Genomic imprinting and the endometrial cycle. The expression of the imprinted gene H19 in the human female reproductive organs. *Diagnostic Molecular Pathology: The American Journal of Surgical Pathology, Part B*, *6*(1), 17-25. <https://doi.org/10.1097/00019606-199702000-00004>
- Arnold, A., & Papanikolaou, A. (2005). Cyclin D1 in breast cancer pathogenesis. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, *23*(18), 4215-4224. <https://doi.org/10.1200/JCO.2005.05.064>
- Arun, G., Diermeier, S., Akerman, M., Chang, K.-C., Wilkinson, J. E., Hearn, S., Kim, Y., MacLeod, A. R., Krainer, A. R., Norton, L., Brogi, E., Egeblad, M., & Spector, D. L. (2016). Differentiation of mammary tumors and reduction in metastasis upon Malat1 lncRNA loss. *Genes & Development*, *30*(1), 34-51. <https://doi.org/10.1101/gad.270959.115>
- Aubert, L., Guilbert, M., Corbet, C., Génot, E., Adriaenssens, E., Chassat, T., Bertucci, F., Daubon, T., Magné, N., Le Bourhis, X., & Toillon, R.-A. (2015). NGF-induced TrkA/CD44 association is

- involved in tumor aggressiveness and resistance to lestaurtinib. *Oncotarget*, 6(12), 9807-9819. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.3227>
- Babiarz, J. E., Ruby, J. G., Wang, Y., Bartel, D. P., & Blelloch, R. (2008). Mouse ES cells express endogenous shRNAs, siRNAs, and other Microprocessor-independent, Dicer-dependent small RNAs. *Genes & Development*, 22(20), 2773-2785. <https://doi.org/10.1101/gad.1705308>
- Bai, X., Ni, J., Beretov, J., Graham, P., & Li, Y. (2018). Cancer stem cell in breast cancer therapeutic resistance. *Cancer Treatment Reviews*, 69, 152-163. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2018.07.004>
- Balzeau, J., Menezes, M. R., Cao, S., & Hagan, J. P. (2017). The LIN28/let-7 Pathway in Cancer. *Frontiers in Genetics*, 8, 31. <https://doi.org/10.3389/fgene.2017.00031>
- Bardia, A., Hurvitz, S. A., Rugo, H. S., Brufsky, A., Cortes, J., Loibl, S., Piccart, M., Cowden, J., Spears, P., & Carey, L. A. (2021). A plain language summary of the ASCENT study : Sacituzumab Govitecan for metastatic triple-negative breast cancer. *Future Oncology (London, England)*, 17(30), 3911-3924. <https://doi.org/10.2217/fon-2021-0868>
- Bardia, A., Hurvitz, S. A., Tolaney, S. M., Loirat, D., Punie, K., Oliveira, M., Brufsky, A., Sardesai, S. D., Kalinsky, K., Zelnak, A. B., Weaver, R., Traina, T., Dalenc, F., Aftimos, P., Lynce, F., Diab, S., Cortés, J., O'Shaughnessy, J., Diéras, V., ... ASCENT Clinical Trial Investigators. (2021). Sacituzumab Govitecan in Metastatic Triple-Negative Breast Cancer. *The New England Journal of Medicine*, 384(16), 1529-1541. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa2028485>
- Barlow, D. P., & Bartolomei, M. S. (2014). Genomic imprinting in mammals. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 6(2), a018382. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a018382>
- Barlow, D. P., Stöger, R., Herrmann, B. G., Saito, K., & Schweifer, N. (1991). The mouse insulin-like growth factor type-2 receptor is imprinted and closely linked to the Tme locus. *Nature*, 349(6304), 84-87. <https://doi.org/10.1038/349084a0>
- Barsyte-Lovejoy, D., Lau, S. K., Boutros, P. C., Khosravi, F., Jurisica, I., Andrulis, I. L., Tsao, M. S., & Penn, L. Z. (2006). The c-Myc oncogene directly induces the H19 noncoding RNA by allele-specific binding to potentiate tumorigenesis. *Cancer Research*, 66(10), 5330-5337. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-06-0037>
- Bartolomei, M. S., Zemel, S., & Tilghman, S. M. (1991). Parental imprinting of the mouse H19 gene. *Nature*, 351(6322), 153-155. <https://doi.org/10.1038/351153a0>
- Behm-Ansmant, I., Rehwinkel, J., & Izaurralde, E. (2006). MicroRNAs silence gene expression by repressing protein expression and/or by promoting mRNA decay. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology*, 71, 523-530. <https://doi.org/10.1101/sqb.2006.71.013>
- Bekpen, C., Marques-Bonet, T., Alkan, C., Antonacci, F., Leogrande, M. B., Ventura, M., Kidd, J. M., Siswara, P., Howard, J. C., & Eichler, E. E. (2009). Death and resurrection of the human IRGM gene. *PLoS Genetics*, 5(3), e1000403. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000403>
- Bellazzo, A., Sicari, D., Valentino, E., Del Sal, G., & Collavin, L. (2018). Complexes formed by mutant p53 and their roles in breast cancer. *Breast Cancer (Dove Medical Press)*, 10, 101-112. <https://doi.org/10.2147/BCTT.S145826>
- Bergerat, J.-P. (2007). [Aromatase inhibitors in the adjuvant treatment of early breast cancer. Is there still a place for tamoxifen?]. *Presse Medicale (Paris, France: 1983)*, 36(2 Pt 2), 333-340. <https://doi.org/10.1016/j.lpm.2006.12.019>
- Berteaux, N., Aptel, N., Cathala, G., Genton, C., Coll, J., Daccache, A., Spruyt, N., Hondermarck, H., Dugimont, T., Curgy, J.-J., Forné, T., & Adriaenssens, E. (2008). A novel H19 antisense RNA



- overexpressed in breast cancer contributes to paternal IGF2 expression. *Molecular and Cellular Biology*, 28(22), 6731-6745. <https://doi.org/10.1128/MCB.02103-07>
- Berteaux, N., Lottin, S., Adriaenssens, E., Van Coppenolle, F., Van Coppennolle, F., Leroy, X., Coll, J., Dugimont, T., & Cury, J.-J. (2004). Hormonal regulation of H19 gene expression in prostate epithelial cells. *The Journal of Endocrinology*, 183(1), 69-78. <https://doi.org/10.1677/joe.1.05696>
- Berteaux, N., Lottin, S., Monté, D., Pinte, S., Quatannens, B., Coll, J., Hondermarck, H., Cury, J.-J., Dugimont, T., & Adriaenssens, E. (2005). H19 mRNA-like noncoding RNA promotes breast cancer cell proliferation through positive control by E2F1. *The Journal of Biological Chemistry*, 280(33), 29625-29636. <https://doi.org/10.1074/jbc.M504033200>
- Berteaux, N., Spruyt, N., & Adriaenssens, E. (2010). Noncoding RNAs at H19/IGF2 Locus: Role in Imprinting, Gene Expression, and Associated Pathologies. In V. A. Erdmann & J. Barciszewski (Éds.), *RNA Technologies and Their Applications* (p. 419-443). Springer. [https://doi.org/10.1007/978-3-642-12168-5\\_19](https://doi.org/10.1007/978-3-642-12168-5_19)
- Bertelli, G., & Paridaens, R. (2006). Optimal sequence of hormonotherapy in advanced breast cancer. *Current Opinion in Oncology*, 18(6), 572-577. <https://doi.org/10.1097/01.cco.0000245313.97638.1d>
- Bertheau, P., Lehmann-Che, J., Varna, M., Dumay, A., Poirot, B., Porcher, R., Turpin, E., Plassa, L.-F., de Roquancourt, A., Bourstyn, E., de Cremoux, P., Janin, A., Giacchetti, S., Espié, M., & de Thé, H. (2013). P53 in breast cancer subtypes and new insights into response to chemotherapy. *Breast (Edinburgh, Scotland)*, 22 Suppl 2, S27-29. <https://doi.org/10.1016/j.breast.2013.07.005>
- Bestor, T. H. (1988). Cloning of a mammalian DNA methyltransferase. *Gene*, 74(1), 9-12. [https://doi.org/10.1016/0378-1119\(88\)90238-7](https://doi.org/10.1016/0378-1119(88)90238-7)
- Bhattacharyya, S. N., Habermacher, R., Martine, U., Closs, E. I., & Filipowicz, W. (2006). Relief of microRNA-mediated translational repression in human cells subjected to stress. *Cell*, 125(6), 1111-1124. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.04.031>
- Bissell, M. J., & Hines, W. C. (2011). Why don't we get more cancer? A proposed role of the microenvironment in restraining cancer progression. *Nature Medicine*, 17(3), 320-329. <https://doi.org/10.1038/nm.2328>
- Boiko, A. D., Razorenova, O. V., van de Rijn, M., Swetter, S. M., Johnson, D. L., Ly, D. P., Butler, P. D., Yang, G. P., Joshua, B., Kaplan, M. J., Longaker, M. T., & Weissman, I. L. (2010). Human melanoma-initiating cells express neural crest nerve growth factor receptor CD271. *Nature*, 466(7302), 133-137. <https://doi.org/10.1038/nature09161>
- Boldin, M. P., Taganov, K. D., Rao, D. S., Yang, L., Zhao, J. L., Kalwani, M., Garcia-Flores, Y., Luong, M., Devrekanli, A., Xu, J., Sun, G., Tay, J., Linsley, P. S., & Baltimore, D. (2011). MiR-146a is a significant brake on autoimmunity, myeloproliferation, and cancer in mice. *The Journal of Experimental Medicine*, 208(6), 1189-1201. <https://doi.org/10.1084/jem.20101823>
- Bonnet, D., & Dick, J. E. (1997). Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nature Medicine*, 3(7), 730-737. <https://doi.org/10.1038/nm0797-730>
- Bosco, E. E., & Knudsen, E. S. (2007). RB in breast cancer: At the crossroads of tumorigenesis and treatment. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)*, 6(6), 667-671. <https://doi.org/10.4161/cc.6.6.3988>

- Bourhis, X. L., Toillon, R. A., Boilly, B., & Hondermarck, H. (2000). Autocrine and paracrine growth inhibitors of breast cancer cells. *Breast Cancer Research and Treatment*, *60*(3), 251-258. <https://doi.org/10.1023/a:1006461621905>
- Boyer, L. A., Lee, T. I., Cole, M. F., Johnstone, S. E., Levine, S. S., Zucker, J. P., Guenther, M. G., Kumar, R. M., Murray, H. L., Jenner, R. G., Gifford, D. K., Melton, D. A., Jaenisch, R., & Young, R. A. (2005). Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell*, *122*(6), 947-956. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.08.020>
- Brannan, C. I., Dees, E. C., Ingram, R. S., & Tilghman, S. M. (1990). The product of the H19 gene may function as an RNA. *Molecular and Cellular Biology*, *10*(1), 28-36. <https://doi.org/10.1128/mcb.10.1.28>
- Brockdorff, N., Ashworth, A., Kay, G. F., McCabe, V. M., Norris, D. P., Cooper, P. J., Swift, S., & 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*(3), 515-526. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90519-i](https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90519-i)
- Brown, C. J., Hendrich, B. D., Rupert, J. L., Lafrenière, R. G., Xing, Y., Lawrence, J., & 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*(3), 527-542. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90520-m](https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90520-m)
- Burch, L. r., Midgley, C. a., Currie, R. a., Lane, D. p., & Hupp, T. r. (2000). Mdm2 binding to a conformationally sensitive domain on p53 can be modulated by RNA. *FEBS Letters*, *472*(1), 93-98. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(00\)01427-7](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(00)01427-7)
- Cai, D., Cao, J., Li, Z., Zheng, X., Yao, Y., Li, W., & Yuan, Z. (2009). Up-regulation of bone marrow stromal protein 2 (BST2) in breast cancer with bone metastasis. *BMC Cancer*, *9*, 102. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-9-102>
- Cai, X., & Cullen, B. R. (2007). The imprinted H19 noncoding RNA is a primary microRNA precursor. *RNA (New York, N.Y.)*, *13*(3), 313-316. <https://doi.org/10.1261/rna.351707>
- Calin, G. A., Dumitru, C. D., Shimizu, M., Bichi, R., Zupo, S., Noch, E., Aldler, H., Rattan, S., Keating, M., Rai, K., Rassenti, L., Kipps, T., Negrini, M., Bullrich, F., & Croce, C. M. (2002). Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *99*(24), 15524-15529. <https://doi.org/10.1073/pnas.242606799>
- Campbell, L. L., & Polyak, K. (2007). Breast tumor heterogeneity : Cancer stem cells or clonal evolution? *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)*, *6*(19), 2332-2338. <https://doi.org/10.4161/cc.6.19.4914>
- Carmeliet, P. (2003). Angiogenesis in health and disease. *Nature Medicine*, *9*(6), 653-660. <https://doi.org/10.1038/nm0603-653>
- Chaffer, C. L., Brueckmann, I., Scheel, C., Kaestli, A. J., Wiggins, P. A., Rodrigues, L. O., Brooks, M., Reinhardt, F., Su, Y., Polyak, K., Arendt, L. M., Kuperwasser, C., Bierie, B., & Weinberg, R. A. (2011). Normal and neoplastic nonstem cells can spontaneously convert to a stem-like state. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *108*(19), 7950-7955. <https://doi.org/10.1073/pnas.1102454108>
- Chang, S., & Bartolomei, M. S. (2020). Modeling human epigenetic disorders in mice : Beckwith-Wiedemann syndrome and Silver-Russell syndrome. *Disease Models & Mechanisms*, *13*(5), dmm044123. <https://doi.org/10.1242/dmm.044123>
- Chao, C. C.-K. (2015). Mechanisms of p53 degradation. *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*, *438*, 139-147. <https://doi.org/10.1016/j.cca.2014.08.015>

- Cheloufi, S., Dos Santos, C. O., Chong, M. M. W., & Hannon, G. J. (2010). A dicer-independent miRNA biogenesis pathway that requires Ago catalysis. *Nature*, *465*(7298), 584-589. <https://doi.org/10.1038/nature09092>
- Chen, M.-J., Deng, J., Chen, C., Hu, W., Yuan, Y.-C., & Xia, Z.-K. (2019). LncRNA H19 promotes epithelial mesenchymal transition and metastasis of esophageal cancer via STAT3/EZH2 axis. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, *113*, 27-36. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2019.05.011>
- Chen, Y., & Olopade, O. I. (2008). MYC in breast tumor progression. *Expert Review of Anticancer Therapy*, *8*(10), 1689-1698. <https://doi.org/10.1586/14737140.8.10.1689>
- Cifuentes, D., Xue, H., Taylor, D. W., Patnode, H., Mishima, Y., Cheloufi, S., Ma, E., Mane, S., Hannon, G. J., Lawson, N. D., Wolfe, S. A., & Giraldez, A. J. (2010). A novel miRNA processing pathway independent of Dicer requires Argonaute2 catalytic activity. *Science (New York, N.Y.)*, *328*(5986), 1694-1698. <https://doi.org/10.1126/science.1190809>
- Collette, J., Le Bourhis, X., & Adriaenssens, E. (2017). Regulation of Human Breast Cancer by the Long Non-Coding RNA H19. *International Journal of Molecular Sciences*, *18*(11), Article 11. <https://doi.org/10.3390/ijms18112319>
- Collins, A. T., Berry, P. A., Hyde, C., Stower, M. J., & Maitland, N. J. (2005). Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells. *Cancer Research*, *65*(23), 10946-10951. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-2018>
- Constância, M., Dean, W., Lopes, S., Moore, T., Kelsey, G., & Reik, W. (2000). Deletion of a silencer element in Igf2 results in loss of imprinting independent of H19. *Nature Genetics*, *26*(2), 203-206. <https://doi.org/10.1038/79930>
- Conte, P. F., Gennari, A., Landucci, E., & Orlandini, C. (2000). Role of Epirubicin in Advanced Breast Cancer. *Clinical Breast Cancer*, *1*, S46-S51. <https://doi.org/10.3816/CBC.2000.s.009>
- Cooper, D. W., VandeBerg, J. L., Sharman, G. B., & Poole, W. E. (1971). Phosphoglycerate kinase polymorphism in kangaroos provides further evidence for paternal X inactivation. *Nature: New Biology*, *230*(13), 155-157. <https://doi.org/10.1038/newbio230155a0>
- Cordina-Duverger, E., Menegaux, F., Popa, A., Rabstein, S., Harth, V., Pesch, B., Brüning, T., Fritschi, L., Glass, D. C., Heyworth, J. S., Erren, T. C., Castaño-Vinyals, G., Papantoniou, K., Espinosa, A., Kogevinas, M., Grundy, A., Spinelli, J. J., Aronson, K. J., & Guénel, P. (2018). Night shift work and breast cancer : A pooled analysis of population-based case–control studies with complete work history. *European Journal of Epidemiology*, *33*(4), 369-379. <https://doi.org/10.1007/s10654-018-0368-x>
- Costa, V., Lo Dico, A., Rizzo, A., Rajata, F., Tripodi, M., Alessandro, R., & Conigliaro, A. (2017). MiR-675-5p supports hypoxia induced epithelial to mesenchymal transition in colon cancer cells. *Oncotarget*, *8*(15), 24292-24302. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.14464>
- Court, F., Baniol, M., Hagege, H., Petit, J. S., Lelay-Taha, M.-N., Carbonell, F., Weber, M., Cathala, G., & Forne, T. (2011). Long-range chromatin interactions at the mouse Igf2/H19 locus reveal a novel paternally expressed long non-coding RNA. *Nucleic Acids Research*, *39*(14), 5893-5906. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr209>
- Crouse, H. V., Brown, A., & Mumford, B. C. (1971). —Chromosome inheritance and the problem of chromosome « imprinting » in *Sciara* (Sciariidae, Diptera). *Chromosoma*, *34*(3), 324-339. <https://doi.org/10.1007/BF00286156>

- Dahiya, N., Sherman-Baust, C. A., Wang, T.-L., Davidson, B., Shih, I.-M., Zhang, Y., Wood, W., Becker, K. G., & Morin, P. J. (2008). MicroRNA expression and identification of putative miRNA targets in ovarian cancer. *PLoS One*, 3(6), e2436. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002436>
- DeChiara, T. M., Efstratiadis, A., & Robertson, E. J. (1990). A growth-deficiency phenotype in heterozygous mice carrying an insulin-like growth factor II gene disrupted by targeting. *Nature*, 345(6270), 78-80. <https://doi.org/10.1038/345078a0>
- DeChiara, T. M., Robertson, E. J., & Efstratiadis, A. (1991). Parental imprinting of the mouse insulin-like growth factor II gene. *Cell*, 64(4), 849-859. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(91\)90513-x](https://doi.org/10.1016/0092-8674(91)90513-x)
- Della Donna, L., Lagadec, C., & Pajonk, F. (2012). Radioresistance of prostate cancer cells with low proteasome activity. *The Prostate*, 72(8), 868-874. <https://doi.org/10.1002/pros.21489>
- Demont, Y., Corbet, C., Page, A., Ataman-Önal, Y., Choquet-Kastylevsky, G., Fliniaux, I., Le Bourhis, X., Toillon, R.-A., Bradshaw, R. A., & Hondermarck, H. (2012). Pro-nerve growth factor induces autocrine stimulation of breast cancer cell invasion through tropomyosin-related kinase A (TrkA) and sortilin protein. *The Journal of Biological Chemistry*, 287(3), 1923-1931. <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.211714>
- Deplus, R., Brenner, C., Burgers, W. A., Putmans, P., Kouzarides, T., de Launoit, Y., & Fuks, F. (2002). Dnmt3L is a transcriptional repressor that recruits histone deacetylase. *Nucleic Acids Research*, 30(17), 3831-3838. <https://doi.org/10.1093/nar/gkf509>
- Derakhshani, A., Rezaei, Z., Safarpour, H., Sabri, M., Mir, A., Sanati, M. A., Vahidian, F., Gholamiyan Moghadam, A., Aghadokht, A., Hajiasgharzadeh, K., & Baradaran, B. (2020). Overcoming trastuzumab resistance in HER2-positive breast cancer using combination therapy. *Journal of Cellular Physiology*, 235(4), 3142-3156. <https://doi.org/10.1002/jcp.29216>
- Derrien, T., Johnson, R., Bussotti, G., Tanzer, A., Djebali, S., Tilgner, H., Guernec, G., Martin, D., Merkel, A., Knowles, D. G., Lagarde, J., Veeravalli, L., Ruan, X., Ruan, Y., Lassmann, T., Carninci, P., Brown, J. B., Lipovich, L., Gonzalez, J. M., ... Guigó, R. (2012). The GENCODE v7 catalog of human long noncoding RNAs : Analysis of their gene structure, evolution, and expression. *Genome Research*, 22(9), 1775-1789. <https://doi.org/10.1101/gr.132159.111>
- Descamps, S., Toillon, R. A., Adriaenssens, E., Pawlowski, V., Cool, S. M., Nurcombe, V., Le Bourhis, X., Boilly, B., Peyrat, J. P., & Hondermarck, H. (2001). Nerve growth factor stimulates proliferation and survival of human breast cancer cells through two distinct signaling pathways. *The Journal of Biological Chemistry*, 276(21), 17864-17870. <https://doi.org/10.1074/jbc.M010499200>
- Di Fiore, R., D'Anneo, A., Tesoriere, G., & Vento, R. (2013). RB1 in cancer : Different mechanisms of RB1 inactivation and alterations of pRb pathway in tumorigenesis. *Journal of Cellular Physiology*, 228(8), 1676-1687. <https://doi.org/10.1002/jcp.24329>
- Dick, J. E. (2008). Stem cell concepts renew cancer research. *Blood*, 112(13), 4793-4807. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-08-077941>
- Dirat, B., Bochet, L., Dabek, M., Daviaud, D., Dauvillier, S., Majed, B., Wang, Y. Y., Meulle, A., Salles, B., Le Gonidec, S., Garrido, I., Escourrou, G., Valet, P., & Muller, C. (2011). Cancer-associated adipocytes exhibit an activated phenotype and contribute to breast cancer invasion. *Cancer Research*, 71(7), 2455-2465. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-3323>
- Dollé, L., El Yazidi-Belkoura, I., Adriaenssens, E., Nurcombe, V., & Hondermarck, H. (2003). Nerve growth factor overexpression and autocrine loop in breast cancer cells. *Oncogene*, 22(36), 5592-5601. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206805>
- Drewell, R. A., Arney, K. L., Arima, T., Barton, S. C., Brenton, J. D., & Surani, M. A. (2002). Novel conserved elements upstream of the H19 gene are transcribed and act as mesodermal

- enhancers. *Development (Cambridge, England)*, 129(5), 1205-1213. <https://doi.org/10.1242/dev.129.5.1205>
- Drewell, R. A., Brenton, J. D., Ainscough, J. F., Barton, S. C., Hilton, K. J., Arney, K. L., Dandolo, L., & Surani, M. A. (2000). Deletion of a silencer element disrupts H19 imprinting independently of a DNA methylation epigenetic switch. *Development (Cambridge, England)*, 127(16), 3419-3428. <https://doi.org/10.1242/dev.127.16.3419>
- Drewell, R. A., Goddard, C. J., Thomas, J. O., & Surani, M. A. (2002). Methylation-dependent silencing at the H19 imprinting control region by MeCP2. *Nucleic Acids Research*, 30(5), 1139-1144. <https://doi.org/10.1093/nar/30.5.1139>
- Du, L., Li, X., Zhen, L., Chen, W., Mu, L., Zhang, Y., & Song, A. (2018). Everolimus inhibits breast cancer cell growth through PI3K/AKT/mTOR signaling pathway. *Molecular Medicine Reports*, 17(5), 7163-7169. <https://doi.org/10.3892/mmr.2018.8769>
- Duart-Garcia, C., & Braunschweig, M. H. (2013). The Igf2as transcript is exported into cytoplasm and associated with polysomes. *Biochemical Genetics*, 51(1-2), 119-130. <https://doi.org/10.1007/s10528-012-9547-8>
- Dugimont, T., Curgy, J. J., Wernert, N., Delobelle, A., Raes, M. B., Joubel, A., Stehelin, D., & Coll, J. (1995). The H19 gene is expressed within both epithelial and stromal components of human invasive adenocarcinomas. *Biology of the Cell*, 85(2-3), 117-124. [https://doi.org/10.1016/0248-4900\(96\)85272-5](https://doi.org/10.1016/0248-4900(96)85272-5)
- Dugimont, T., Montpellier, C., Adriaenssens, E., Lottin, S., Dumont, L., Iotsova, V., Lagrou, C., Stéhelin, D., Coll, J., & Curgy, J. J. (1998). The H19 TATA-less promoter is efficiently repressed by wild-type tumor suppressor gene product p53. *Oncogene*, 16(18), 2395-2401. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1201742>
- Dworkin, A. M., Huang, T. H.-M., & Toland, A. E. (2009). Epigenetic alterations in the breast: Implications for breast cancer detection, prognosis and treatment. *Seminars in Cancer Biology*, 19(3), 165-171. <https://doi.org/10.1016/j.semcan.2009.02.007>
- Ekizceli, G., Uluer, E. T., & Inan, S. (2020). Investigation of the effects of rapamycin on the mTOR pathway and apoptosis in metastatic and non-metastatic human breast cancer cell lines. *Bratislava Medical Journal*, 121(04), 308-315. [https://doi.org/10.4149/BLL\\_2020\\_049](https://doi.org/10.4149/BLL_2020_049)
- El Hajj, J., Nguyen, E., Liu, Q., Bouyer, C., Adriaenssens, E., Hilal, G., & Ségal-Bendirdjian, E. (2018). Telomerase regulation by the long non-coding RNA H19 in human acute promyelocytic leukemia cells. *Molecular Cancer*, 17(1), 85. <https://doi.org/10.1186/s12943-018-0835-8>
- Elenbaas, B., Dobbelstein, M., Roth, J., Shenk, T., & Levine, A. J. (1996). The MDM2 oncoprotein binds specifically to RNA through its RING finger domain. *Molecular Medicine (Cambridge, Mass.)*, 2(4), 439-451.
- Elenbaas, B., & Weinberg, R. A. (2001). Heterotypic signaling between epithelial tumor cells and fibroblasts in carcinoma formation. *Experimental Cell Research*, 264(1), 169-184. <https://doi.org/10.1006/excr.2000.5133>
- ENCODE Project Consortium. (2012). An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. *Nature*, 489(7414), 57-74. <https://doi.org/10.1038/nature11247>
- ENCODE Project Consortium, Birney, E., Stamatoyannopoulos, J. A., Dutta, A., Guigó, R., Gingeras, T. R., Margulies, E. H., Weng, Z., Snyder, M., Dermitzakis, E. T., Thurman, R. E., Kuehn, M. S., Taylor, C. M., Neph, S., Koch, C. M., Asthana, S., Malhotra, A., Adzhubei, I., Greenbaum, J. A., ... de Jong, P. J. (2007). Identification and analysis of functional elements in 1% of the human



- genome by the ENCODE pilot project. *Nature*, 447(7146), 799-816. <https://doi.org/10.1038/nature05874>
- Eramo, A., Lotti, F., Sette, G., Pilozzi, E., Biffoni, M., Di Virgilio, A., Conticello, C., Ruco, L., Peschle, C., & De Maria, R. (2008). Identification and expansion of the tumorigenic lung cancer stem cell population. *Cell Death and Differentiation*, 15(3), 504-514. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4402283>
- Eroles, P., Bosch, A., Pérez-Fidalgo, J. A., & Lluch, A. (2012). Molecular biology in breast cancer : Intrinsic subtypes and signaling pathways. *Cancer Treatment Reviews*, 38(6), 698-707. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2011.11.005>
- Eun, K., Ham, S. W., & Kim, H. (2017). Cancer stem cell heterogeneity : Origin and new perspectives on CSC targeting. *BMB Reports*, 50(3), 117-125. <https://doi.org/10.5483/BMBRep.2017.50.3.222>
- Eyfeldt, J. E., Thorlacius, S., Steinarsdottir, M., Valgardsdottir, R., Ögmundsdottir, H. M., & Anamthawat-Jonsson, K. (1995). P53 Abnormalities and Genomic Instability in Primary Human Breast Carcinomas. *Cancer Research*, 55(3), 646-651.
- Fabbri, M., Garzon, R., Cimmino, A., Liu, Z., Zanesi, N., Callegari, E., Liu, S., Alder, H., Costinean, S., Fernandez-Cymering, C., Volinia, S., Guler, G., Morrison, C. D., Chan, K. K., Marcucci, G., Calin, G. A., Huebner, K., & Croce, C. M. (2007). MicroRNA-29 family reverts aberrant methylation in lung cancer by targeting DNA methyltransferases 3A and 3B. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 104(40), 15805-15810. <https://doi.org/10.1073/pnas.0707628104>
- Fang, D., Nguyen, T. K., Leishear, K., Finko, R., Kulp, A. N., Hotz, S., Van Belle, P. A., Xu, X., Elder, D. E., & Herlyn, M. (2005). A tumorigenic subpopulation with stem cell properties in melanomas. *Cancer Research*, 65(20), 9328-9337. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-1343>
- Feil, R., Walter, J., Allen, N. D., & Reik, W. (1994). Developmental control of allelic methylation in the imprinted mouse Igf2 and H19 genes. *Development (Cambridge, England)*, 120(10), 2933-2943. <https://doi.org/10.1242/dev.120.10.2933>
- Ferguson-Smith, A. C., Cattanach, B. M., Barton, S. C., Beechey, C. V., & Surani, M. A. (1991). Embryological and molecular investigations of parental imprinting on mouse chromosome 7. *Nature*, 351(6328), 667-670. <https://doi.org/10.1038/351667a0>
- Fillmore, C. M., & Kuperwasser, C. (2008). Human breast cancer cell lines contain stem-like cells that self-renew, give rise to phenotypically diverse progeny and survive chemotherapy. *Breast Cancer Research: BCR*, 10(2), R25. <https://doi.org/10.1186/bcr1982>
- Foulkes, W. D., & Shuen, A. Y. (2013). In brief : BRCA1 and BRCA2. *The Journal of Pathology*, 230(4), 347-349. <https://doi.org/10.1002/path.4205>
- Fuchs, E., & Chen, T. (2013). A matter of life and death : Self-renewal in stem cells. *EMBO Reports*, 14(1), 39-48. <https://doi.org/10.1038/embor.2012.197>
- Fuks, F. (2003). [DNA methyltransferases : From chromatin remodeling to cancer]. *Medecine Sciences: M/S*, 19(4), 477-480. <https://doi.org/10.1051/medsci/2003194477>
- Fuks, F., Burgers, W. A., Brehm, A., Hughes-Davies, L., & Kouzarides, T. (2000). DNA methyltransferase Dnmt1 associates with histone deacetylase activity. *Nature Genetics*, 24(1), 88-91. <https://doi.org/10.1038/71750>
- Fuks, F., Burgers, W. A., Godin, N., Kasai, M., & Kouzarides, T. (2001). Dnmt3a binds deacetylases and is recruited by a sequence-specific repressor to silence transcription. *The EMBO Journal*, 20(10), 2536-2544. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.10.2536>

- Fuks, F., Hurd, P. J., Wolf, D., Nan, X., Bird, A. P., & Kouzarides, T. (2003). The methyl-CpG-binding protein MeCP2 links DNA methylation to histone methylation. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(6), 4035-4040. <https://doi.org/10.1074/jbc.M210256200>
- Gao, X., Qiao, Y., Han, D., Zhang, Y., & Ma, N. (2012). Enemy or partner : Relationship between intronic micrnas and their host genes. *IUBMB Life*, 64(10), 835-840. <https://doi.org/10.1002/iub.1079>
- Garcia, A. I., Buisson, M., Bertrand, P., Rimokh, R., Rouleau, E., Lopez, B. S., Lidereau, R., Mikaélian, I., & Mazoyer, S. (2011). Down-regulation of BRCA1 expression by miR-146a and miR-146b-5p in triple negative sporadic breast cancers. *EMBO Molecular Medicine*, 3(5), 279-290. <https://doi.org/10.1002/emmm.201100136>
- Garzon, R., Fabbri, M., Cimmino, A., Calin, G. A., & Croce, C. M. (2006). MicroRNA expression and function in cancer. *Trends in Molecular Medicine*, 12(12), 580-587. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2006.10.006>
- Garzon, R., Heaphy, C. E. A., Havelange, V., Fabbri, M., Volinia, S., Tsao, T., Zanesi, N., Kornblau, S. M., Marcucci, G., Calin, G. A., Andreeff, M., & Croce, C. M. (2009). MicroRNA 29b functions in acute myeloid leukemia. *Blood*, 114(26), 5331-5341. <https://doi.org/10.1182/blood-2009-03-211938>
- Ginestier, C., Hur, M. H., Charafe-Jauffret, E., Monville, F., Dutcher, J., Brown, M., Jacquemier, J., Viens, P., Kleer, C. G., Liu, S., Schott, A., Hayes, D., Birnbaum, D., Wicha, M. S., & Dontu, G. (2007). ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome. *Cell Stem Cell*, 1(5), 555-567. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2007.08.014>
- Gong, L., Bao, Q., Hu, C., Wang, J., Zhou, Q., Wei, L., Tong, L., Zhang, W., & Shen, Y. (2018). Exosomal miR-675 from metastatic osteosarcoma promotes cell migration and invasion by targeting CALN1. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 500(2), 170-176. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2018.04.016>
- Goswami, S., Sahai, E., Wyckoff, J. B., Cammer, M., Cox, D., Pixley, F. J., Stanley, E. R., Segall, J. E., & Condeelis, J. S. (2005). Macrophages promote the invasion of breast carcinoma cells via a colony-stimulating factor-1/epidermal growth factor paracrine loop. *Cancer Research*, 65(12), 5278-5283. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-1853>
- Grandjean, V., O'Neill, L., Sado, T., Turner, B., & Ferguson-Smith, A. (2001). Relationship between DNA methylation, histone H4 acetylation and gene expression in the mouse imprinted Igf2-H19 domain. *FEBS Letters*, 488(3), 165-169. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(00\)02349-8](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(00)02349-8)
- Gregory, P. A., Bert, A. G., Paterson, E. L., Barry, S. C., Tsykin, A., Farshid, G., Vadas, M. A., Khew-Goodall, Y., & Goodall, G. J. (2008). The miR-200 family and miR-205 regulate epithelial to mesenchymal transition by targeting ZEB1 and SIP1. *Nature Cell Biology*, 10(5), 593-601. <https://doi.org/10.1038/ncb1722>
- Grolez, G. P., Hammadi, M., Barras, A., Gordienko, D., Slomianny, C., Völkel, P., Angrand, P. O., Pinault, M., Guimaraes, C., Potier-Cartereau, M., Prevarskaya, N., Boukherroub, R., & Gkika, D. (2019). Encapsulation of a TRPM8 Agonist, WS12, in Lipid Nanocapsules Potentiates PC3 Prostate Cancer Cell Migration Inhibition through Channel Activation. *Scientific Reports*, 9(1), 7926. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-44452-4>
- Gyórfy, B., Bottai, G., Fleischer, T., Munkácsy, G., Budczies, J., Paladini, L., Børresen-Dale, A.-L., Kristensen, V. N., & Santarpia, L. (2016). Aberrant DNA methylation impacts gene expression

- and prognosis in breast cancer subtypes. *International Journal of Cancer*, 138(1), 87-97. <https://doi.org/10.1002/ijc.29684>
- Ha, M., & Kim, V. N. (2014). Regulation of microRNA biogenesis. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 15(8), 509-524. <https://doi.org/10.1038/nrm3838>
- Hadjimichael, C., Chanoumidou, K., Papadopoulou, N., Arampatzi, P., Papamatheakis, J., & Kretsovali, A. (2015). Common stemness regulators of embryonic and cancer stem cells. *World Journal of Stem Cells*, 7(9), 1150-1184. <https://doi.org/10.4252/wjsc.v7.i9.1150>
- Hagège, H., Klous, P., Braem, C., Splinter, E., Dekker, J., Cathala, G., de Laat, W., & Forné, T. (2007). Quantitative analysis of chromosome conformation capture assays (3C-qPCR). *Nature Protocols*, 2(7), 1722-1733. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.243>
- Hanahan, D. (2022). Hallmarks of Cancer : New Dimensions. *Cancer Discovery*, 12(1), 31-46. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-21-1059>
- Hanahan, D., & Coussens, L. M. (2012). Accessories to the crime : Functions of cells recruited to the tumor microenvironment. *Cancer Cell*, 21(3), 309-322. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2012.02.022>
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2000). The hallmarks of cancer. *Cell*, 100(1), 57-70. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81683-9](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81683-9)
- Hanahan, D., & Weinberg, R. A. (2011). Hallmarks of Cancer : The Next Generation. *Cell*, 144(5), 646-674. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>
- Hao, Y., Crenshaw, T., Moulton, T., Newcomb, E., & Tycko, B. (1993). Tumour-suppressor activity of H19 RNA. *Nature*, 365(6448), 764-767. <https://doi.org/10.1038/365764a0>
- Hark, A. T., Schoenherr, C. J., Katz, D. J., Ingram, R. S., Levorse, J. M., & Tilghman, S. M. (2000). CTCF mediates methylation-sensitive enhancer-blocking activity at the H19/Igf2 locus. *Nature*, 405(6785), 486-489. <https://doi.org/10.1038/35013106>
- Hark, A. T., & Tilghman, S. M. (1998). Chromatin conformation of the H19 epigenetic mark. *Human Molecular Genetics*, 7(12), 1979-1985. <https://doi.org/10.1093/hmg/7.12.1979>
- He, D., Wang, J., Zhang, C., Shan, B., Deng, X., Li, B., Zhou, Y., Chen, W., Hong, J., Gao, Y., Chen, Z., & Duan, C. (2015). Down-regulation of miR-675-5p contributes to tumor progression and development by targeting pro-tumorigenic GPR55 in non-small cell lung cancer. *Molecular Cancer*, 14, 73. <https://doi.org/10.1186/s12943-015-0342-0>
- He, P., Qiu, K., & Jia, Y. (2018). Modeling of mesenchymal hybrid epithelial state and phenotypic transitions in EMT and MET processes of cancer cells. *Scientific Reports*, 8(1), 14323. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-32737-z>
- Heintzman, N. D., Hon, G. C., Hawkins, R. D., Kheradpour, P., Stark, A., Harp, L. F., Ye, Z., Lee, L. K., Stuart, R. K., Ching, C. W., Ching, K. A., Antosiewicz-Bourget, J. E., Liu, H., Zhang, X., Green, R. D., Lobanenkov, V. V., Stewart, R., Thomson, J. A., Crawford, G. E., ... Ren, B. (2009). Histone modifications at human enhancers reflect global cell-type-specific gene expression. *Nature*, 459(7243), 108-112. <https://doi.org/10.1038/nature07829>
- Heintzman, N. D., Stuart, R. K., Hon, G., Fu, Y., Ching, C. W., Hawkins, R. D., Barrera, L. O., Van Calcar, S., Qu, C., Ching, K. A., Wang, W., Weng, Z., Green, R. D., Crawford, G. E., & Ren, B. (2007). Distinct and predictive chromatin signatures of transcriptional promoters and enhancers in the human genome. *Nature Genetics*, 39(3), 311-318. <https://doi.org/10.1038/ng1966>
- Hemberger, M., Redies, C., Krause, R., Oswald, J., Walter, J., & Fundele, R. H. (1998). H19 and Igf2 are expressed and differentially imprinted in neuroectoderm-derived cells in the mouse brain. *Development Genes and Evolution*, 208(7), 393-402. <https://doi.org/10.1007/s004270050195>



- Heo, J. B., & Sung, S. (2011). Vernalization-mediated epigenetic silencing by a long intronic noncoding RNA. *Science (New York, N.Y.)*, *331*(6013), 76-79. <https://doi.org/10.1126/science.1197349>
- Hermann, P. C., Huber, S. L., Herrler, T., Aicher, A., Ellwart, J. W., Guba, M., Bruns, C. J., & Heeschen, C. (2007). Distinct populations of cancer stem cells determine tumor growth and metastatic activity in human pancreatic cancer. *Cell Stem Cell*, *1*(3), 313-323. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2007.06.002>
- Hernandez, J. M., Elahi, A., Clark, C. W., Wang, J., Humphries, L. A., Centeno, B., Bloom, G., Fuchs, B. C., Yeatman, T., & Shibata, D. (2013). MiR-675 Mediates Downregulation of Twist1 and Rb in AFP-Secreting Hepatocellular Carcinoma. *Annals of Surgical Oncology*, *20*(3), 625-635. <https://doi.org/10.1245/s10434-013-3106-3>
- Hibi, K., Nakamura, H., Hirai, A., Fujikake, Y., Kasai, Y., Akiyama, S., Ito, K., & Takagi, H. (1996). Loss of H19 imprinting in esophageal cancer. *Cancer Research*, *56*(3), 480-482.
- Hu, S.-H., Wang, C.-H., Huang, Z.-J., Liu, F., Xu, C.-W., Li, X.-L., & Chen, G.-Q. (2016). MiR-760 mediates chemoresistance through inhibition of epithelial mesenchymal transition in breast cancer cells. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, *20*(23), 5002-5008.
- Huang, P., Yan, R., Zhang, X., Wang, L., Ke, X., & Qu, Y. (2019). Activating Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway for disease therapy : Challenges and opportunities. *Pharmacology & Therapeutics*, *196*, 79-90. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2018.11.008>
- Hui, L., Zheng, Y., Yan, Y., Bargonetti, J., & Foster, D. A. (2006). Mutant p53 in MDA-MB-231 breast cancer cells is stabilized by elevated phospholipase D activity and contributes to survival signals generated by phospholipase D. *Oncogene*, *25*(55), 7305-7310. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1209735>
- Humphreys, D. T., Westman, B. J., Martin, D. I. K., & Preiss, T. (2005). MicroRNAs control translation initiation by inhibiting eukaryotic initiation factor 4E/cap and poly(A) tail function. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *102*(47), 16961-16966. <https://doi.org/10.1073/pnas.0506482102>
- Hutvagner, G., & Zamore, P. D. (2002). A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. *Science (New York, N.Y.)*, *297*(5589), 2056-2060. <https://doi.org/10.1126/science.1073827>
- Iliopoulos, D., Hirsch, H. A., Wang, G., & Struhl, K. (2011). Inducible formation of breast cancer stem cells and their dynamic equilibrium with non-stem cancer cells via IL6 secretion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *108*(4), 1397-1402. <https://doi.org/10.1073/pnas.1018898108>
- Imig, J., Brunschweiler, A., Brümmer, A., Guenewig, B., Mittal, N., Kishore, S., Tsikrika, P., Gerber, A. P., Zavolan, M., & Hall, J. (2015). MiR-CLIP capture of a miRNA targetome uncovers a lincRNA H19-miR-106a interaction. *Nature Chemical Biology*, *11*(2), 107-114. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1713>
- Iorio, M. V., Ferracin, M., Liu, C.-G., Veronese, A., Spizzo, R., Sabbioni, S., Magri, E., Pedriali, M., Fabbri, M., Campiglio, M., Ménard, S., Palazzo, J. P., Rosenberg, A., Musiani, P., Volinia, S., Nenci, I., Calin, G. A., Querzoli, P., Negrini, M., & Croce, C. M. (2005). MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. *Cancer Research*, *65*(16), 7065-7070. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-1783>
- Ishihara, K., & Sasaki, H. (2002). An evolutionarily conserved putative insulator element near the 3' boundary of the imprinted Igf2/H19 domain. *Human Molecular Genetics*, *11*(14), 1627-1636. <https://doi.org/10.1093/hmg/11.14.1627>

- Iyengar, P., Espina, V., Williams, T. W., Lin, Y., Berry, D., Jelicks, L. A., Lee, H., Temple, K., Graves, R., Pollard, J., Chopra, N., Russell, R. G., Sasisekharan, R., Trock, B. J., Lippman, M., Calvert, V. S., Petricoin, E. F., Liotta, L., Dadachova, E., ... Scherer, P. E. (2005). Adipocyte-derived collagen VI affects early mammary tumor progression in vivo, demonstrating a critical interaction in the tumor/stroma microenvironment. *The Journal of Clinical Investigation*, *115*(5), 1163-1176. <https://doi.org/10.1172/JCI23424>
- Ji, P., Diederichs, S., Wang, W., Böing, S., Metzger, R., Schneider, P. M., Tidow, N., Brandt, B., Buerger, H., Bulk, E., Thomas, M., Berdel, W. E., Serve, H., & Müller-Tidow, C. (2003). MALAT-1, a novel noncoding RNA, and thymosin beta4 predict metastasis and survival in early-stage non-small cell lung cancer. *Oncogene*, *22*(39), 8031-8041. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206928>
- Jones, P. H., Mahauad-Fernandez, W. D., Madison, M. N., & Okeoma, C. M. (2013). BST-2/tetherin is overexpressed in mammary gland and tumor tissues in MMTV-induced mammary cancer. *Virology*, *444*(0), 124-139. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2013.05.042>
- Joubel, A., Cury, J. J., Pelczar, H., Begue, A., Lagrou, C., Stehelin, D., & Coll, J. (1996). The 5' part of the human H19 RNA contains cis-acting elements hampering its translatability. *Cellular and Molecular Biology (Noisy-Le-Grand, France)*, *42*(8), 1159-1172.
- Jouvenot, Y., Poirier, F., Jami, J., & Paldi, A. (1999). Biallelic transcription of Igf2 and H19 in individual cells suggests a post-transcriptional contribution to genomic imprinting. *Current Biology: CB*, *9*(20), 1199-1202. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(00\)80026-3](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(00)80026-3)
- Jovanovic, J., Rønneberg, J. A., Tost, J., & Kristensen, V. (2010). The epigenetics of breast cancer. *Molecular Oncology*, *4*(3), 242-254. <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2010.04.002>
- Juan, V., Crain, C., & Wilson, C. (2000). Evidence for evolutionarily conserved secondary structure in the H19 tumor suppressor RNA. *Nucleic Acids Research*, *28*(5), 1221-1227. <https://doi.org/10.1093/nar/28.5.1221>
- Kallen, A. N., Zhou, X.-B., Xu, J., Qiao, C., Ma, J., Yan, L., Lu, L., Liu, C., Yi, J.-S., Zhang, H., Min, W., Bennett, A. M., Gregory, R. I., Ding, Y., & Huang, Y. (2013). The imprinted H19 lncRNA antagonizes let-7 microRNAs. *Molecular Cell*, *52*(1), 101-112. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2013.08.027>
- Kalluri, R., & Zeisberg, M. (2006). Fibroblasts in cancer. *Nature Reviews. Cancer*, *6*(5), 392-401. <https://doi.org/10.1038/nrc1877>
- Kanduri, C., Thakur, N., & Pandey, R. R. (2006). The length of the transcript encoded from the Kcnq1ot1 antisense promoter determines the degree of silencing. *The EMBO Journal*, *25*(10), 2096-2106. <https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601090>
- Kedde, M., Strasser, M. J., Boldajipour, B., Oude Vrielink, J. A. F., Slanchev, K., le Sage, C., Nagel, R., Voorhoeve, P. M., van Duijse, J., Ørom, U. A., Lund, A. H., Perrakis, A., Raz, E., & Agami, R. (2007). RNA-binding protein Dnd1 inhibits microRNA access to target mRNA. *Cell*, *131*(7), 1273-1286. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.11.034>
- Keniry, A., Oxley, D., Monnier, P., Kyba, M., Dandolo, L., Smits, G., & Reik, W. (2012). The H19 lincRNA is a developmental reservoir of miR-675 that suppresses growth and Igf1r. *Nature Cell Biology*, *14*(7), 659-665. <https://doi.org/10.1038/ncb2521>
- Khasraw, M., Bell, R., & Dang, C. (2012). Epirubicin : Is it like doxorubicin in breast cancer? A clinical review. *The Breast*, *21*(2), 142-149. <https://doi.org/10.1016/j.breast.2011.12.012>
- Kim, H. H., Kuwano, Y., Srikantan, S., Lee, E. K., Martindale, J. L., & Gorospe, M. (2009). HuR recruits let-7/RISC to repress c-Myc expression. *Genes & Development*, *23*(15), 1743-1748. <https://doi.org/10.1101/gad.1812509>

- Kim, J., Chu, J., Shen, X., Wang, J., & Orkin, S. H. (2008). An extended transcriptional network for pluripotency of embryonic stem cells. *Cell*, *132*(6), 1049-1061. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.02.039>
- Kim, M. O., Kim, S.-H., Cho, Y.-Y., Nadas, J., Jeong, C.-H., Yao, K., Kim, D. J., Yu, D.-H., Keum, Y.-S., Lee, K.-Y., Huang, Z., Bode, A. M., & Dong, Z. (2012). ERK1 and ERK2 regulate embryonic stem cell self-renewal through phosphorylation of Klf4. *Nature Structural & Molecular Biology*, *19*(3), 283-290. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2217>
- Kim, T.-K., Hemberg, M., Gray, J. M., Costa, A. M., Bear, D. M., Wu, J., Harmin, D. A., Laptewicz, M., Barbara-Haley, K., Kuersten, S., Markenscoff-Papadimitriou, E., Kuhl, D., Bito, H., Worley, P. F., Kreiman, G., & Greenberg, M. E. (2010). Widespread transcription at neuronal activity-regulated enhancers. *Nature*, *465*(7295), 182-187. <https://doi.org/10.1038/nature09033>
- Knudson, A. G. (1993). Antioncogenes and human cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *90*(23), 10914-10921. <https://doi.org/10.1073/pnas.90.23.10914>
- Knudson, A. G. (2001). Two genetic hits (more or less) to cancer. *Nature Reviews. Cancer*, *1*(2), 157-162. <https://doi.org/10.1038/35101031>
- Kondo, M., Suzuki, H., Ueda, R., Osada, H., Takagi, K., Takahashi, T., & Takahashi, T. (1995). Frequent loss of imprinting of the H19 gene is often associated with its overexpression in human lung cancers. *Oncogene*, *10*(6), 1193-1198.
- Kopf, E., Bibi, O., Ayesh, S., Tykocinski, M., Vitner, K., Looijenga, L. H., de Groot, N., & Hochberg, A. (1998). The effect of retinoic acid on the activation of the human H19 promoter by a 3' downstream region. *FEBS Letters*, *432*(3), 123-127. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(98\)00841-2](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(98)00841-2)
- Kouzarides, T. (2007). Chromatin modifications and their function. *Cell*, *128*(4), 693-705. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.02.005>
- Kozomara, A., Birgaoanu, M., & Griffiths-Jones, S. (2019). miRBase : From microRNA sequences to function. *Nucleic Acids Research*, *47*(D1), D155-D162. <https://doi.org/10.1093/nar/gky1141>
- Kreso, A., & Dick, J. E. (2014). Evolution of the cancer stem cell model. *Cell Stem Cell*, *14*(3), 275-291. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2014.02.006>
- Kuang, C., Fu, X., Hua, Y., Shuai, W., Ye, Z., Li, Y., Peng, Q., Li, Y., Chen, S., Qian, C., Huang, W., & Liu, R. (2017). BST2 confers cisplatin resistance via NF- $\kappa$ B signaling in nasopharyngeal cancer. *Cell Death & Disease*, *8*(6), e2874. <https://doi.org/10.1038/cddis.2017.271>
- Kühl, A., Banning, C., Marzi, A., Votteler, J., Steffen, I., Bertram, S., Glowacka, I., Konrad, A., Stürzl, M., Guo, J.-T., Schubert, U., Feldmann, H., Behrens, G., Schindler, M., & Pöhlmann, S. (2011). The Ebola Virus Glycoprotein and HIV-1 Vpu Employ Different Strategies to Counteract the Antiviral Factor Tetherin. *The Journal of Infectious Diseases*, *204*(suppl\_3), S850-S860. <https://doi.org/10.1093/infdis/jir378>
- Kung, J. T. Y., Colognori, D., & Lee, J. T. (2013). Long noncoding RNAs : Past, present, and future. *Genetics*, *193*(3), 651-669. <https://doi.org/10.1534/genetics.112.146704>
- Kupzig, S., Korolchuk, V., Rollason, R., Sugden, A., Wilde, A., & Banting, G. (2003). Bst-2/HM1.24 is a raft-associated apical membrane protein with an unusual topology. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, *4*(10), 694-709. <https://doi.org/10.1034/j.1600-0854.2003.00129.x>
- Lacroix, M., Toillon, R.-A., & Leclercq, G. (2006). P53 and breast cancer, an update. *Endocrine-Related Cancer*, *13*(2), 293-325. <https://doi.org/10.1677/erc.1.01172>

- Lecerf, C., Le Bourhis, X., & Adriaenssens, E. (2019). The long non-coding RNA H19 : An active player with multiple facets to sustain the hallmarks of cancer. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 76(23), 4673-4687. <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03240-z>
- Lee, J. T., Davidow, L. S., & Warshawsky, D. (1999). Tsix, a gene antisense to Xist at the X-inactivation centre. *Nature Genetics*, 21(4), 400-404. <https://doi.org/10.1038/7734>
- Lee, R. C., Feinbaum, R. L., & Ambros, V. (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, 75(5), 843-854. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90529-y](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90529-y)
- Leibovitch, M. P., Solhonne, B., Guillier, M., Verrelle, P., Leibovitch, S. A., & Verelle P [corrected to Verrelle, P. (1995). Direct relationship between the expression of tumor suppressor H19 mRNA and *c-mos* proto-oncogene during myogenesis. *Oncogene*, 10(2), 251-260.
- Leighton, P. A., Ingram, R. S., Eggenschwiler, J., Efstratiadis, A., & Tilghman, S. M. (1995). Disruption of imprinting caused by deletion of the H19 gene region in mice. *Nature*, 375(6526), 34-39. <https://doi.org/10.1038/375034a0>
- Lemaire, J., Larrue, R., Perrais, M., Cauffiez, C., & Pottier, N. (2020). Aspects fondamentaux du développement tumoral. *Bulletin du Cancer*, 107(11), 1148-1160. <https://doi.org/10.1016/j.bulcan.2020.08.004>
- Lengauer, C., Kinzler, K. W., & Vogelstein, B. (1998). Genetic instabilities in human cancers. *Nature*, 396(6712), 643-649. <https://doi.org/10.1038/25292>
- Lenos, K. J., & Vermeulen, L. (2016). Cancer stem cells don't waste their time cleaning-low proteasome activity, a marker for cancer stem cell function. *Annals of Translational Medicine*, 4(24), 519. <https://doi.org/10.21037/atm.2016.11.81>
- Leonhardt, H., Page, A. W., Weier, H. U., & Bestor, T. H. (1992). A targeting sequence directs DNA methyltransferase to sites of DNA replication in mammalian nuclei. *Cell*, 71(5), 865-873. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90561-p](https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90561-p)
- Lewinski, M. K., Jafari, M., Zhang, H., Opella, S. J., & Guatelli, J. (2015). Membrane Anchoring by a C-terminal Tryptophan Enables HIV-1 Vpu to Displace Bone Marrow Stromal Antigen 2 (BST2) from Sites of Viral Assembly \*. *Journal of Biological Chemistry*, 290(17), 10919-10933. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.630095>
- Lewis, C. E., & Pollard, J. W. (2006). Distinct role of macrophages in different tumor microenvironments. *Cancer Research*, 66(2), 605-612. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-05-4005>
- Li, E., Bestor, T. H., & Jaenisch, R. (1992). Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell*, 69(6), 915-926. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90611-f](https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90611-f)
- Li, H., Li, J., Jia, S., Wu, M., An, J., Zheng, Q., Zhang, W., & Lu, D. (2015). MiR675 upregulates long noncoding RNA H19 through activating EGR1 in human liver cancer. *Oncotarget*, 6(31), 31958-31984.
- Li, H., Yu, B., Li, J., Su, L., Yan, M., Zhu, Z., & Liu, B. (2014). Overexpression of lncRNA H19 enhances carcinogenesis and metastasis of gastric cancer. *Oncotarget*, 5(8), 2318-2329. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.1913>
- Li, S., Yu, Z., Chen, S.-S., Li, F., Lei, C.-Y., Chen, X.-X., Bao, J.-M., Luo, Y., Lin, G.-Z., Pang, S.-Y., & Tan, W.-L. (2015). The YAP1 oncogene contributes to bladder cancer cell proliferation and migration by regulating the H19 long noncoding RNA. *Urologic Oncology*, 33(10), 427.e1-10. <https://doi.org/10.1016/j.urolonc.2015.06.003>

- Li, T., Hu, J.-F., Qiu, X., Ling, J., Chen, H., Wang, S., Hou, A., Vu, T. H., & Hoffman, A. R. (2008). CTCF regulates allelic expression of *Igf2* by orchestrating a promoter-polycomb repressive complex 2 intrachromosomal loop. *Molecular and Cellular Biology*, *28*(20), 6473-6482. <https://doi.org/10.1128/MCB.00204-08>
- Li, Y. M., Franklin, G., Cui, H. M., Svensson, K., He, X. B., Adam, G., Ohlsson, R., & Pfeifer, S. (1998). The H19 transcript is associated with polysomes and may regulate IGF2 expression in trans. *The Journal of Biological Chemistry*, *273*(43), 28247-28252. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.43.28247>
- Li, Z., Li, Y., Li, Y., Ren, K., Li, X., Han, X., & Wang, J. (2017). Long non-coding RNA H19 promotes the proliferation and invasion of breast cancer through upregulating DNMT1 expression by sponging miR-152. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, *31*(9), Article 9. <https://doi.org/10.1002/jbt.21933>
- Liang, W.-C., Fu, W.-M., Wong, C.-W., Wang, Y., Wang, W.-M., Hu, G.-X., Zhang, L., Xiao, L.-J., Wan, D. C.-C., Zhang, J.-F., & Waye, M. M.-Y. (2015). The lncRNA H19 promotes epithelial to mesenchymal transition by functioning as miRNA sponges in colorectal cancer. *Oncotarget*, *6*(26), 22513-22525. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.4154>
- Liang, W.-Q., Zeng, D., Chen, C.-F., Sun, S.-M., Lu, X.-F., Peng, C., & Lin, H.-Y. (2019). Long noncoding RNA H19 is a critical oncogenic driver and contributes to epithelial-mesenchymal transition in papillary thyroid carcinoma. *Cancer Management and Research*, *11*, 2059-2072. <https://doi.org/10.2147/CMAR.S195906>
- Liao, B., Hu, Y., Herrick, D. J., & Brewer, G. (2005). The RNA-binding protein IMP-3 is a translational activator of insulin-like growth factor II leader-3 mRNA during proliferation of human K562 leukemia cells. *The Journal of Biological Chemistry*, *280*(18), 18517-18524. <https://doi.org/10.1074/jbc.M500270200>
- Liao, S., Yu, C., Liu, H., Zhang, C., Li, Y., & Zhong, X. (2019). Long non-coding RNA H19 promotes the proliferation and invasion of lung cancer cells and regulates the expression of E-cadherin, N-cadherin, and vimentin. *OncoTargets and Therapy*, *Volume 12*, 4099-4107. <https://doi.org/10.2147/OTT.S185156>
- Liao, Y., Deng, Y., Liu, J., Ye, Z., You, Z., Yao, S., & He, S. (2016). MiR-760 overexpression promotes proliferation in ovarian cancer by downregulation of PHLPP2 expression. *Gynecologic Oncology*, *143*(3), 655-663. <https://doi.org/10.1016/j.ygyno.2016.09.010>
- Lim, S., Janzer, A., Becker, A., Zimmer, A., Schüle, R., Buettner, R., & Kirfel, J. (2010). Lysine-specific demethylase 1 (LSD1) is highly expressed in ER-negative breast cancers and a biomarker predicting aggressive biology. *Carcinogenesis*, *31*(3), 512-520. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgp324>
- Liu, C., Chen, Z., Fang, J., Xu, A., Zhang, W., & Wang, Z. (2016). H19-derived miR-675 contributes to bladder cancer cell proliferation by regulating p53 activation. *Tumor Biology*, *37*(1), 263-270. <https://doi.org/10.1007/s13277-015-3779-2>
- Liu, F., Gu, L.-N., Shan, B.-E., Geng, C.-Z., & Sang, M.-X. (2016). Biomarkers for EMT and MET in breast cancer : An update. *Oncology Letters*, *12*(6), 4869-4876. <https://doi.org/10.3892/ol.2016.5369>
- Liu, F., Pan, H., Xia, G., Qiu, C., & Zhu, Z. (2016). Prognostic and clinicopathological significance of long noncoding RNA H19 overexpression in human solid tumors : Evidence from a meta-analysis. *Oncotarget*, *7*(50), 83177-83186. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.13076>



- Liu, G., Du, X., Xiao, L., Zeng, Q., & Liu, Q. (2021). Activation of FGD5-AS1 Promotes Progression of Cervical Cancer through Regulating BST2 to Inhibit Macrophage M1 Polarization. *Journal of Immunology Research*, 2021, 5857214. <https://doi.org/10.1155/2021/5857214>
- Liu, G., Xiang, T., Wu, Q.-F., & Wang, W.-X. (2016). Long Noncoding RNA H19-Derived miR-675 Enhances Proliferation and Invasion via RUNX1 in Gastric Cancer Cells. *Oncology Research Featuring Preclinical and Clinical Cancer Therapeutics*, 23(3), 99-107. <https://doi.org/10.3727/096504015X14496932933575>
- Liu, J., Kahri, A. I., Heikkilä, P., Ilvesmäki, V., & Voutilainen, R. (1995). H19 and insulin-like growth factor-II gene expression in adrenal tumors and cultured adrenal cells. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 80(2), 492-496. <https://doi.org/10.1210/jcem.80.2.7531713>
- Liu, L., Liu, L., & Lu, S. (2019). LncRNA H19 promotes viability and epithelial-mesenchymal transition of lung adenocarcinoma cells by targeting miR-29b-3p and modifying STAT3. *International Journal of Oncology*, 54(3), 929-941. <https://doi.org/10.3892/ijo.2019.4695>
- Liu, M.-Q., Zhou, D.-J., Wang, X., Zhou, W., Ye, L., Li, J.-L., Wang, Y.-Z., & Ho, W.-Z. (2012). IFN- $\lambda$ 3 inhibits HIV infection of macrophages through the JAK-STAT pathway. *PLoS One*, 7(4), e35902. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035902>
- Liu, W., Cao, Y., Guan, Y., & Zheng, C. (2018). BST2 promotes cell proliferation, migration and induces NF- $\kappa$ B activation in gastric cancer. *Biotechnology Letters*, 40(7), 1015-1027. <https://doi.org/10.1007/s10529-018-2562-z>
- Liu, W., Li, Y., Feng, S., Guan, Y., & Cao, Y. (2020). MicroRNA-760 inhibits cell viability and migration through down-regulating BST2 in gastric cancer. *Journal of Biochemistry*, 168(2), 159-170. <https://doi.org/10.1093/jb/mvaa031>
- Liu, Y., Oakeley, E. J., Sun, L., & Jost, J. P. (1998). Multiple domains are involved in the targeting of the mouse DNA methyltransferase to the DNA replication foci. *Nucleic Acids Research*, 26(4), 1038-1045. <https://doi.org/10.1093/nar/26.4.1038>
- Lombardo, Y., de Giorgio, A., Coombes, C. R., Stebbing, J., & Castellano, L. (2015). Mammosphere formation assay from human breast cancer tissues and cell lines. *Journal of Visualized Experiments: JoVE*, 97. <https://doi.org/10.3791/52671>
- Lottin, S., Adriaenssens, E., Berteaux, N., Leprêtre, A., Vilain, M.-O., Denhez, E., Coll, J., Dugimont, T., & Curgy, J.-J. (2005). The human H19 gene is frequently overexpressed in myometrium and stroma during pathological endometrial proliferative events. *European Journal of Cancer (Oxford, England: 1990)*, 41(1), 168-177. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2004.09.025>
- Lottin, S., Adriaenssens, E., Dupressoir, T., Berteaux, N., Montpellier, C., Coll, J., Dugimont, T., & Curgy, J. J. (2002). Overexpression of an ectopic H19 gene enhances the tumorigenic properties of breast cancer cells. *Carcinogenesis*, 23(11), 1885-1895. <https://doi.org/10.1093/carcin/23.11.1885>
- Luo, J., Li, Q., Pan, J., Li, L., Fang, L., & Zhang, Y. (2018). Expression level of long noncoding RNA H19 in plasma of patients with nonsmall cell lung cancer and its clinical significance. *Journal of Cancer Research and Therapeutics*, 14(4), 860-863. [https://doi.org/10.4103/jcrt.JCRT\\_733\\_17](https://doi.org/10.4103/jcrt.JCRT_733_17)
- Luo, M., Li, Z., Wang, W., Zeng, Y., Liu, Z., & Qiu, J. (2013). Long non-coding RNA H19 increases bladder cancer metastasis by associating with EZH2 and inhibiting E-cadherin expression. *Cancer Letters*, 333(2), 213-221. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2013.01.033>
- Lustig, O., Ariel, I., Ilan, J., Lev-Lehman, E., De-Groot, N., & Hochberg, A. (1994). Expression of the imprinted gene H19 in the human fetus. *Molecular Reproduction and Development*, 38(3), 239-246. <https://doi.org/10.1002/mrd.1080380302>

- Lv, M., Wang, J., Zhang, J., Zhang, B., Wang, X., Zhu, Y., Zuo, T., Liu, D., Li, X., Wu, J., Zhang, H., Yu, B., Wu, H., Zhao, X., Kong, W., & Yu, X. (2014). Epitope tags beside the N-terminal cytoplasmic tail of human BST-2 alter its intracellular trafficking and HIV-1 restriction. *PLoS One*, *9*(10), e111422. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0111422>
- Lv, M., Zhong, Z., Huang, M., Tian, Q., Jiang, R., & Chen, J. (2017). LncRNA H19 regulates epithelial–mesenchymal transition and metastasis of bladder cancer by miR-29b-3p as competing endogenous RNA. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, *1864*(10), 1887-1899. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2017.08.001>
- Lyko, F. (2018). The DNA methyltransferase family : A versatile toolkit for epigenetic regulation. *Nature Reviews. Genetics*, *19*(2), 81-92. <https://doi.org/10.1038/nrg.2017.80>
- Lyle, R., Watanabe, D., te Vruchte, D., Lerchner, W., Smrzka, O. W., Wutz, A., Schageman, J., Hahner, L., Davies, C., & Barlow, D. P. (2000). The imprinted antisense RNA at the Igf2r locus overlaps but does not imprint Mas1. *Nature Genetics*, *25*(1), 19-21. <https://doi.org/10.1038/75546>
- Magee, J. A., Piskounova, E., & Morrison, S. J. (2012). Cancer stem cells : Impact, heterogeneity, and uncertainty. *Cancer cell*, *21*(3), 283-296. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2012.03.003>
- Mahauad-Fernandez, W. D., DeMali, K. A., Olivier, A. K., & Okeoma, C. M. (2014). Bone marrow stromal antigen 2 expressed in cancer cells promotes mammary tumor growth and metastasis. *Breast Cancer Research : BCR*, *16*. <https://doi.org/10.1186/s13058-014-0493-8>
- Mahauad-Fernandez, W. D., & Okeoma, C. M. (2016). The role of BST-2/Tetherin in host protection and disease manifestation. *Immunity, Inflammation and Disease*, *4*(1), 4-23. <https://doi.org/10.1002/iid3.92>
- Mahauad-Fernandez, W. D., & Okeoma, C. M. (2017). Cysteine-linked dimerization of BST-2 confers anoikis resistance to breast cancer cells by negating proapoptotic activities to promote tumor cell survival and growth. *Cell Death & Disease*, *8*(3), e2687. <https://doi.org/10.1038/cddis.2017.68>
- Mahauad-Fernandez, W. D., & Okeoma, C. M. (2018). B49, a BST-2-based peptide, inhibits adhesion and growth of breast cancer cells. *Scientific Reports*, *8*. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-22364-z>
- Mangeat, B., Gers-Huber, G., Lehmann, M., Zufferey, M., Luban, J., & Piguet, V. (2009). HIV-1 Vpu Neutralizes the Antiviral Factor Tetherin/BST-2 by Binding It and Directing Its Beta-TrCP2-Dependent Degradation. *PLoS Pathogens*, *5*(9), e1000574. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000574>
- Mani, S. A., Guo, W., Liao, M.-J., Eaton, E. N., Ayyanan, A., Zhou, A. Y., Brooks, M., Reinhard, F., Zhang, C. C., Shipitsin, M., Campbell, L. L., Polyak, K., Brisken, C., Yang, J., & Weinberg, R. A. (2008). The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell*, *133*(4), 704-715. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2008.03.027>
- Marcato, P., Dean, C. A., Giacomantonio, C. A., & Lee, P. W. K. (2011). Aldehyde dehydrogenase : Its role as a cancer stem cell marker comes down to the specific isoform. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)*, *10*(9), 1378-1384. <https://doi.org/10.4161/cc.10.9.15486>
- Marcato, P., Dean, C. A., Pan, D., Araslanova, R., Gillis, M., Joshi, M., Helyer, L., Pan, L., Leidal, A., Gujar, S., Giacomantonio, C. A., & Lee, P. W. K. (2011). Aldehyde dehydrogenase activity of breast cancer stem cells is primarily due to isoform ALDH1A3 and its expression is predictive of metastasis. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, *29*(1), 32-45. <https://doi.org/10.1002/stem.563>
- Marjanovic, N. D., Weinberg, R. A., & Chaffer, C. L. (2013). Cell plasticity and heterogeneity in cancer. *Clinical Chemistry*, *59*(1), 168-179. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2012.184655>

- Maroney, P. A., Yu, Y., Fisher, J., & Nilsen, T. W. (2006). Evidence that microRNAs are associated with translating messenger RNAs in human cells. *Nature Structural & Molecular Biology*, *13*(12), 1102-1107. <https://doi.org/10.1038/nsmb1174>
- Martinez, J., & Tuschl, T. (2004). RISC is a 5' phosphomonoester-producing RNA endonuclease. *Genes & Development*, *18*(9), 975-980. <https://doi.org/10.1101/gad.1187904>
- Masuyama, N., Kuronita, T., Tanaka, R., Muto, T., Hirota, Y., Takigawa, A., Fujita, H., Aso, Y., Amano, J., & Tanaka, Y. (2009). HM1.24 is internalized from lipid rafts by clathrin-mediated endocytosis through interaction with alpha-adaptin. *The Journal of Biological Chemistry*, *284*(23), 15927-15941. <https://doi.org/10.1074/jbc.M109.005124>
- Mathonnet, G., Fabian, M. R., Svitkin, Y. V., Parsyan, A., Huck, L., Murata, T., Biffo, S., Merrick, W. C., Darzynkiewicz, E., Pillai, R. S., Filipowicz, W., Duchaine, T. F., & Sonenberg, N. (2007). MicroRNA inhibition of translation initiation in vitro by targeting the cap-binding complex eIF4F. *Science (New York, N.Y.)*, *317*(5845), 1764-1767. <https://doi.org/10.1126/science.1146067>
- Matouk, I. J., Halle, D., Raveh, E., Gilon, M., Sorin, V., & Hochberg, A. (2016). The role of the oncofetal H19 lncRNA in tumor metastasis : Orchestrating the EMT-MET decision. *Oncotarget*, *7*(4), 3748-3765. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.6387>
- Matouk, I. J., Mezan, S., Mizrahi, A., Ohana, P., Abu-Lail, R., Fellig, Y., Degroot, N., Galun, E., & Hochberg, A. (2010). The oncofetal H19 RNA connection : Hypoxia, p53 and cancer. *Biochimica Et Biophysica Acta*, *1803*(4), 443-451. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2010.01.010>
- Matouk, I. J., Raveh, E., Abu-lail, R., Mezan, S., Gilon, M., Gershtain, E., Birman, T., Gallula, J., Schneider, T., Barkali, M., Richler, C., Fellig, Y., Sorin, V., Hubert, A., Hochberg, A., & Czerniak, A. (2014). Oncofetal H19 RNA promotes tumor metastasis. *Biochimica Et Biophysica Acta*, *1843*(7), 1414-1426. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2014.03.023>
- Matsuda, A., Suzuki, Y., Honda, G., Muramatsu, S., Matsuzaki, O., Nagano, Y., Doi, T., Shimotohno, K., Harada, T., Nishida, E., Hayashi, H., & Sugano, S. (2003). Large-scale identification and characterization of human genes that activate NF-kappaB and MAPK signaling pathways. *Oncogene*, *22*(21), 3307-3318. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206406>
- Mavaddat, N., Antoniou, A. C., Easton, D. F., & Garcia-Closas, M. (2010). Genetic susceptibility to breast cancer. *Molecular Oncology*, *4*(3), 174-191. <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2010.04.011>
- Maximiano, S., Magalhães, P., Guerreiro, M. P., & Morgado, M. (2016). Trastuzumab in the Treatment of Breast Cancer. *BioDrugs: Clinical Immunotherapeutics, Biopharmaceuticals and Gene Therapy*, *30*(2), 75-86. <https://doi.org/10.1007/s40259-016-0162-9>
- Mayor, R., & Etienne-Manneville, S. (2016). The front and rear of collective cell migration. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, *17*(2), 97-109. <https://doi.org/10.1038/nrm.2015.14>
- McGrath, J., & Solter, D. (1984a). Maternal Thp lethality in the mouse is a nuclear, not cytoplasmic, defect. *Nature*, *308*(5959), 550-551. <https://doi.org/10.1038/308550a0>
- McGrath, J., & Solter, D. (1984b). Completion of mouse embryogenesis requires both the maternal and paternal genomes. *Cell*, *37*(1), 179-183. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(84\)90313-1](https://doi.org/10.1016/0092-8674(84)90313-1)
- Messier, T. L., Gordon, J. A. R., Boyd, J. R., Tye, C. E., Browne, G., Stein, J. L., Lian, J. B., & Stein, G. S. (2016). Histone H3 lysine 4 acetylation and methylation dynamics define breast cancer subtypes. *Oncotarget*, *7*(5), 5094-5109. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.6922>
- Milićević, Z., Bajić, V., Živković, L., Kasapović, J., Andjelković, U., & Spremo-Potparević, B. (2014). Identification of p53 and its isoforms in human breast carcinoma cells. *TheScientificWorldJournal*, *2014*, 618698. <https://doi.org/10.1155/2014/618698>



- Milligan, L., Antoine, E., Bisbal, C., Weber, M., Brunel, C., Forné, T., & Cathala, G. (2000). H19 gene expression is up-regulated exclusively by stabilization of the RNA during muscle cell differentiation. *Oncogene*, *19*(50), 5810-5816. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1203965>
- Mishima, Y., Giraldez, A. J., Takeda, Y., Fujiwara, T., Sakamoto, H., Schier, A. F., & Inoue, K. (2006). Differential regulation of germline mRNAs in soma and germ cells by zebrafish miR-430. *Current Biology: CB*, *16*(21), 2135-2142. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2006.08.086>
- Moasser, M. M. (2007). The oncogene HER2 : Its signaling and transforming functions and its role in human cancer pathogenesis. *Oncogene*, *26*(45), 6469-6487. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210477>
- Monnier, P., Martinet, C., Pontis, J., Stancheva, I., Ait-Si-Ali, S., & Dandolo, L. (2013). H19 lncRNA controls gene expression of the Imprinted Gene Network by recruiting MBD1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *110*(51), 20693-20698. <https://doi.org/10.1073/pnas.1310201110>
- Morel, A.-P., Ginestier, C., Pommier, R. M., Cabaud, O., Ruiz, E., Wicinski, J., Devouassoux-Shisheboran, M., Combaret, V., Finetti, P., Chassot, C., Pinatel, C., Fauvet, F., Saintigny, P., Thomas, E., Moyret-Lalle, C., Lachuer, J., Despras, E., Jauffret, J.-L., Bertucci, F., ... Puisieux, A. (2017). A stemness-related ZEB1-MSRB3 axis governs cellular pliancy and breast cancer genome stability. *Nature Medicine*, *23*(5), 568-578. <https://doi.org/10.1038/nm.4323>
- Morel, A.-P., Lièvre, M., Thomas, C., Hinkal, G., Ansieau, S., & Puisieux, A. (2008). Generation of breast cancer stem cells through epithelial-mesenchymal transition. *PloS One*, *3*(8), e2888. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002888>
- Müller, B. M., Jana, L., Kasajima, A., Lehmann, A., Prinzler, J., Budczies, J., Winzer, K.-J., Dietel, M., Weichert, W., & Denkert, C. (2013). Differential expression of histone deacetylases HDAC1, 2 and 3 in human breast cancer—Overexpression of HDAC2 and HDAC3 is associated with clinicopathological indicators of disease progression. *BMC Cancer*, *13*, 215. <https://doi.org/10.1186/1471-2407-13-215>
- Munakata, K., Uemura, M., Tanaka, S., Kawai, K., Kitahara, T., Miyo, M., Kano, Y., Nishikawa, S., Fukusumi, T., Takahashi, Y., Hata, T., Nishimura, J., Takemasa, I., Mizushima, T., Ikenaga, M., Kato, T., Murata, K., Carethers, J. M., Yamamoto, H., ... Mori, M. (2016). Cancer Stem-like Properties in Colorectal Cancer Cells with Low Proteasome Activity. *Clinical Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, *22*(21), 5277-5286. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-15-1945>
- Murrell, A., Heeson, S., Bowden, L., Constância, M., Dean, W., Kelsey, G., & Reik, W. (2001). An intragenic methylated region in the imprinted Igf2 gene augments transcription. *EMBO Reports*, *2*(12), 1101-1106. <https://doi.org/10.1093/embo-reports/kve248>
- Murrell, A., Heeson, S., & Reik, W. (2004). Interaction between differentially methylated regions partitions the imprinted genes Igf2 and H19 into parent-specific chromatin loops. *Nature Genetics*, *36*(8), 889-893. <https://doi.org/10.1038/ng1402>
- Nabholtz, J.-M., & Gligorov, J. (2005). The role of taxanes in the treatment of breast cancer. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, *6*(7), 1073-1094. <https://doi.org/10.1517/14656566.6.7.1073>
- Nakada, H., Nakagomi, H., Hirotsu, Y., Amemiya, K., Mochizuki, H., Inoue, M., Oyama, T., & Omata, M. (2017). A study of tumor heterogeneity in a case with breast cancer. *Breast Cancer (Tokyo, Japan)*, *24*(3), 483-489. <https://doi.org/10.1007/s12282-016-0733-0>

- Nassar, F. J., Nasr, R., & Talhouk, R. (2017). MicroRNAs as biomarkers for early breast cancer diagnosis, prognosis and therapy prediction. *Pharmacology & Therapeutics*, *172*, 34-49. <https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2016.11.012>
- Nielsen, F. C., Nielsen, J., & Christiansen, J. (2001). A family of IGF-II mRNA binding proteins (IMP) involved in RNA trafficking. *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation. Supplementum*, *234*, 93-99.
- Nottrott, S., Simard, M. J., & Richter, J. D. (2006). Human let-7a miRNA blocks protein production on actively translating polyribosomes. *Nature Structural & Molecular Biology*, *13*(12), 1108-1114. <https://doi.org/10.1038/nsmb1173>
- Novak, P., Jensen, T., Oshiro, M. M., Watts, G. S., Kim, C. J., & Futscher, B. W. (2008). Agglomerative epigenetic aberrations are a common event in human breast cancer. *Cancer Research*, *68*(20), 8616-8625. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-1419>
- Nusse, R., & Clevers, H. (2017). Wnt/ $\beta$ -Catenin Signaling, Disease, and Emerging Therapeutic Modalities. *Cell*, *169*(6), 985-999. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.05.016>
- O'Brien, C. A., Pollett, A., Gallinger, S., & Dick, J. E. (2007). A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature*, *445*(7123), 106-110. <https://doi.org/10.1038/nature05372>
- O'Brien, S. J., Carter, J. V., Burton, J. F., Oxford, B. G., Schmidt, M. N., Hallion, J. C., & Galandiuk, S. (2018). The role of the miR-200 family in epithelial–mesenchymal transition in colorectal cancer: A systematic review. *International Journal of Cancer*, *142*(12), 2501-2511. <https://doi.org/10.1002/ijc.31282>
- Ohlsson, R., Hedborg, F., Holmgren, L., Walsh, C., & Ekström, T. J. (1994). Overlapping patterns of IGF2 and H19 expression during human development: Biallelic IGF2 expression correlates with a lack of H19 expression. *Development (Cambridge, England)*, *120*(2), 361-368. <https://doi.org/10.1242/dev.120.2.361>
- Ohno, S. (1972). So much « junk » DNA in our genome. *Brookhaven Symposia in Biology*, *23*, 366-370.
- Okano, M., Xie, S., & Li, E. (1998). Cloning and characterization of a family of novel mammalian DNA (cytosine-5) methyltransferases. *Nature Genetics*, *19*(3), 219-220. <https://doi.org/10.1038/890>
- Okutsu, T., Kuroiwa, Y., Kagitani, F., Kai, M., Aisaka, K., Tsutsumi, O., Kaneko, Y., Yokomori, K., Surani, M. A., Kohda, T., Kaneko-Ishino, T., & Ishino, F. (2000). Expression and imprinting status of human PEG8/IGF2AS, a paternally expressed antisense transcript from the IGF2 locus, in Wilms' tumors. *Journal of Biochemistry*, *127*(3), 475-483. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a022630>
- Olsen, P. H., & Ambros, V. (1999). The lin-4 Regulatory RNA Controls Developmental Timing in *Caenorhabditis elegans* by Blocking LIN-14 Protein Synthesis after the Initiation of Translation. *Developmental Biology*, *216*(2), 671-680. <https://doi.org/10.1006/dbio.1999.9523>
- Onyango, P., & Feinberg, A. P. (2011). A nucleolar protein, H19 opposite tumor suppressor (HOTS), is a tumor growth inhibitor encoded by a human imprinted H19 antisense transcript. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *108*(40), 16759-16764. <https://doi.org/10.1073/pnas.1110904108>
- Ørom, U. A., Nielsen, F. C., & Lund, A. H. (2008). MicroRNA-10a binds the 5'UTR of ribosomal protein mRNAs and enhances their translation. *Molecular Cell*, *30*(4), 460-471. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2008.05.001>

- Osborne, C., Wilson, P., & Tripathy, D. (2004). Oncogenes and tumor suppressor genes in breast cancer : Potential diagnostic and therapeutic applications. *The Oncologist*, *9*(4), 361-377. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.9-4-361>
- O'Shaughnessy, J., Schwartzberg, L., Danso, M. A., Miller, K. D., Rugo, H. S., Neubauer, M., Robert, N., Hellerstedt, B., Saleh, M., Richards, P., Specht, J. M., Yardley, D. A., Carlson, R. W., Finn, R. S., Charpentier, E., Garcia-Ribas, I., & Winer, E. P. (2014). Phase III study of iniparib plus gemcitabine and carboplatin versus gemcitabine and carboplatin in patients with metastatic triple-negative breast cancer. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, *32*(34), 3840-3847. <https://doi.org/10.1200/JCO.2014.55.2984>
- O'Shaughnessy, J., Thaddeus Beck, J., & Royce, M. (2018). Everolimus-based combination therapies for HR+, HER2- metastatic breast cancer. *Cancer Treatment Reviews*, *69*, 204-214. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2018.07.013>
- Pachnis, V., Belayew, A., & Tilghman, S. M. (1984). Locus unlinked to alpha-fetoprotein under the control of the murine raf and Rif genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *81*(17), 5523-5527. <https://doi.org/10.1073/pnas.81.17.5523>
- Pachnis, V., Brannan, C. I., & Tilghman, S. M. (1988). The structure and expression of a novel gene activated in early mouse embryogenesis. *The EMBO Journal*, *7*(3), 673-681.
- Palazzo, A. F., & Koonin, E. V. (2020). Functional Long Non-coding RNAs Evolve from Junk Transcripts. *Cell*, *183*(5), 1151-1161. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.09.047>
- Pan, J., Zhang, Q., Wang, Y., & You, M. (2010). 26S proteasome activity is down-regulated in lung cancer stem-like cells propagated in vitro. *PloS One*, *5*(10), e13298. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0013298>
- Pasculli, B., Barbano, R., & Parrella, P. (2018). Epigenetics of breast cancer : Biology and clinical implication in the era of precision medicine. *Seminars in Cancer Biology*, *51*, 22-35. <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2018.01.007>
- Peng, F., Li, T.-T., Wang, K.-L., Xiao, G.-Q., Wang, J.-H., Zhao, H.-D., Kang, Z.-J., Fan, W.-J., Zhu, L.-L., Li, M., Cui, B., Zheng, F.-M., Wang, H.-J., Lam, E. W.-F., Wang, B., Xu, J., & Liu, Q. (2017). H19/let-7/LIN28 reciprocal negative regulatory circuit promotes breast cancer stem cell maintenance. *Cell Death & Disease*, *8*(1), e2569. <https://doi.org/10.1038/cddis.2016.438>
- Peperstraete, E., Lecerf, C., Collette, J., Vennin, C., Raby, L., Völkel, P., Angrand, P.-O., Winter, M., Bertucci, F., Finetti, P., Lagadec, C., Meignan, S., Bourette, R. P., Bourhis, X. L., & Adriaenssens, E. (2020). Enhancement of Breast Cancer Cell Aggressiveness by lncRNA H19 and its Mir-675 Derivative : Insight into Shared and Different Actions. *Cancers*, *12*(7), Article 7. <https://doi.org/10.3390/cancers12071730>
- Perincheri, S., Dingle, R. W. C., Peterson, M. L., & Spear, B. T. (2005). Hereditary persistence of alpha-fetoprotein and H19 expression in liver of BALB/cJ mice is due to a retrovirus insertion in the *Zhx2* gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *102*(2), 396-401. <https://doi.org/10.1073/pnas.0408555102>
- Perou, C. M., Sørli, T., Eisen, M. B., van de Rijn, M., Jeffrey, S. S., Rees, C. A., Pollack, J. R., Ross, D. T., Johnsen, H., Akslen, L. A., Fluge, O., Pergamenschikov, A., Williams, C., Zhu, S. X., Lønning, P. E., Børresen-Dale, A. L., Brown, P. O., & Botstein, D. (2000). Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, *406*(6797), 747-752. <https://doi.org/10.1038/35021093>
- Poirier, F., Chan, C. T., Timmons, P. M., Robertson, E. J., Evans, M. J., & Rigby, P. W. (1991). The murine H19 gene is activated during embryonic stem cell differentiation in vitro and at the time of

- implantation in the developing embryo. *Development (Cambridge, England)*, 113(4), 1105-1114. <https://doi.org/10.1242/dev.113.4.1105>
- Polyak, K. (2007). Breast cancer : Origins and evolution. *The Journal of Clinical Investigation*, 117(11), 3155-3163. <https://doi.org/10.1172/JCI33295>
- Pu, H., Zheng, Q., Li, H., Wu, M., An, J., Gui, X., Li, T., & Lu, D. (2015). CUDR promotes liver cancer stem cell growth through upregulating TERT and C-Myc. *Oncotarget*, 6(38), 40775-40798. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.5805>
- Qiao, Y., Ma, N., Wang, X., Hui, Y., Li, F., Xiang, Y., Zhou, J., Zou, C., Jin, J., Lv, G., Jin, H., & Gao, X. (2011). MiR-483-5p controls angiogenesis in vitro and targets serum response factor. *FEBS Letters*, 585(19), 3095-3100. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2011.08.039>
- Qu, H., & Fang, X. (2013). A brief review on the Human Encyclopedia of DNA Elements (ENCODE) project. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics*, 11(3), 135-141. <https://doi.org/10.1016/j.gpb.2013.05.001>
- Raby, L., Völkel, P., Le Bourhis, X., & Angrand, P.-O. (2020). La transplantation de cellules tumorales chez le poisson zèbre : De la recherche translationnelle à la médecine personnalisée. *Bulletin du Cancer*, 107(1), 30-40. <https://doi.org/10.1016/j.bulcan.2019.06.005>
- Rainier, S., Johnson, L. A., Dobry, C. J., Ping, A. J., Grundy, P. E., & Feinberg, A. P. (1993). Relaxation of imprinted genes in human cancer. *Nature*, 362(6422), 747-749. <https://doi.org/10.1038/362747a0>
- Raveh, E., Matouk, I. J., Gilon, M., & Hochberg, A. (2015). The H19 Long non-coding RNA in cancer initiation, progression and metastasis—A proposed unifying theory. *Molecular Cancer*, 14, 184. <https://doi.org/10.1186/s12943-015-0458-2>
- Reik, W., Brown, K. W., Schneid, H., Le Bouc, Y., Bickmore, W., & Maher, E. R. (1995). Imprinting mutations in the Beckwith-Wiedemann syndrome suggested by altered imprinting pattern in the IGF2-H19 domain. *Human Molecular Genetics*, 4(12), 2379-2385. <https://doi.org/10.1093/hmg/4.12.2379>
- Rich, J. N. (2016). Cancer stem cells : Understanding tumor hierarchy and heterogeneity. *Medicine*, 95(1 Suppl 1), S2-S7. <https://doi.org/10.1097/MD.0000000000004764>
- Rinn, J. L., Kertesz, M., Wang, J. K., Squazzo, S. L., Xu, X., Bruggmann, S. A., Goodnough, L. H., Helms, J. A., Farnham, P. J., Segal, E., & Chang, H. Y. (2007). Functional demarcation of active and silent chromatin domains in human HOX loci by noncoding RNAs. *Cell*, 129(7), 1311-1323. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.05.022>
- Ripoche, M. A., Kress, C., Poirier, F., & Dandolo, L. (1997). Deletion of the H19 transcription unit reveals the existence of a putative imprinting control element. *Genes & Development*, 11(12), 1596-1604. <https://doi.org/10.1101/gad.11.12.1596>
- Roy, P. G., & Thompson, A. M. (2006). Cyclin D1 and breast cancer. *Breast (Edinburgh, Scotland)*, 15(6), 718-727. <https://doi.org/10.1016/j.breast.2006.02.005>
- Runge, S., Nielsen, F. C., Nielsen, J., Lykke-Andersen, J., Wewer, U. M., & Christiansen, J. (2000). H19 RNA binds four molecules of insulin-like growth factor II mRNA-binding protein. *The Journal of Biological Chemistry*, 275(38), 29562-29569. <https://doi.org/10.1074/jbc.M001156200>
- Sandhu, S. K., Volinia, S., Costinean, S., Galasso, M., Neinast, R., Santhanam, R., Parthun, M. R., Perrotti, D., Marcucci, G., Garzon, R., & Croce, C. M. (2012). MiR-155 targets histone deacetylase 4 (HDAC4) and impairs transcriptional activity of B-cell lymphoma 6 (BCL6) in the Eμ-miR-155 transgenic mouse model. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 109(49), 20047-20052. <https://doi.org/10.1073/pnas.1213764109>

- Santanam, U., Zanesi, N., Efanov, A., Costinean, S., Palamarchuk, A., Hagan, J. P., Volinia, S., Alder, H., Rassenti, L., Kipps, T., Croce, C. M., & Pekarsky, Y. (2010). Chronic lymphocytic leukemia modeled in mouse by targeted miR-29 expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *107*(27), 12210-12215. <https://doi.org/10.1073/pnas.1007186107>
- Satoh, K., Hamada, S., & Shimosegawa, T. (2015). Involvement of epithelial to mesenchymal transition in the development of pancreatic ductal adenocarcinoma. *Journal of Gastroenterology*, *50*(2), 140-146. <https://doi.org/10.1007/s00535-014-0997-0>
- Sayeed, A., Luciani-Torres, G., Meng, Z., Bennington, J. L., Moore, D. H., & Dairkee, S. H. (2013). Aberrant Regulation of the BST2 (Tetherin) Promoter Enhances Cell Proliferation and Apoptosis Evasion in High Grade Breast Cancer Cells. *PLoS ONE*, *8*(6), Article 6. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0067191>
- Searle, A. G., & Beechey, C. V. (1978). Complementation studies with mouse translocations. *Cytogenetics and Cell Genetics*, *20*(1-6), 282-303. <https://doi.org/10.1159/000130859>
- Seto, E., & Yoshida, M. (2014). Erasers of histone acetylation : The histone deacetylase enzymes. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *6*(4), a018713. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a018713>
- Shah, A. N., & Gradishar, W. J. (2018). Adjuvant Anthracyclines in Breast Cancer : What Is Their Role? *The Oncologist*, *23*(10), 1153-1161. <https://doi.org/10.1634/theoncologist.2017-0672>
- Shi, W., Gerster, K., Alajez, N. M., Tsang, J., Waldron, L., Pintilie, M., Hui, A. B., Sykes, J., P'ng, C., Miller, N., McCreedy, D., Fyles, A., & Liu, F.-F. (2011). MicroRNA-301 mediates proliferation and invasion in human breast cancer. *Cancer Research*, *71*(8), 2926-2937. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-3369>
- Shi, X., Sun, M., Liu, H., Yao, Y., & Song, Y. (2013). Long non-coding RNAs : A new frontier in the study of human diseases. *Cancer Letters*, *339*(2), 159-166. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2013.06.013>
- Shi, Y., Wang, Y., Luan, W., Wang, P., Tao, T., Zhang, J., Qian, J., Liu, N., & You, Y. (2014). Long Non-Coding RNA H19 Promotes Glioma Cell Invasion by Deriving miR-675. *PLOS ONE*, *9*(1), e86295. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0086295>
- Shigematsu, Y., Oue, N., Nishioka, Y., Sakamoto, N., Sentani, K., Sekino, Y., Mukai, S., Teishima, J., Matsubara, A., & Yasui, W. (2017). Overexpression of the transmembrane protein BST-2 induces Akt and Erk phosphorylation in bladder cancer. *Oncology Letters*, *14*(1), 999-1004. <https://doi.org/10.3892/ol.2017.6230>
- Shima, H., Kida, K., Adachi, S., Yamada, A., Sugae, S., Narui, K., Miyagi, Y., Nishi, M., Ryo, A., Murata, S., Taniguchi, H., Ichikawa, Y., Ishikawa, T., & Endo, I. (2018). Lnc RNA H19 is associated with poor prognosis in breast cancer patients and promotes cancer stemness. *Breast Cancer Research and Treatment*, *170*(3), 507-516. <https://doi.org/10.1007/s10549-018-4793-z>
- Shimizu, H., Burch, L. R., Smith, A. J., Dornan, D., Wallace, M., Ball, K. L., & Hupp, T. R. (2002). The conformationally flexible S9-S10 linker region in the core domain of p53 contains a novel MDM2 binding site whose mutation increases ubiquitination of p53 in vivo. *The Journal of Biological Chemistry*, *277*(32), 28446-28458. <https://doi.org/10.1074/jbc.M202296200>
- Shimomura, A., Shiino, S., Kawauchi, J., Takizawa, S., Sakamoto, H., Matsuzaki, J., Ono, M., Takeshita, F., Niida, S., Shimizu, C., Fujiwara, Y., Kinoshita, T., Tamura, K., & Ochiya, T. (2016). Novel combination of serum microRNA for detecting breast cancer in the early stage. *Cancer Science*, *107*(3), 326-334. <https://doi.org/10.1111/cas.12880>



- Shiovitz, S., & Korde, L. A. (2015). Genetics of breast cancer : A topic in evolution. *Annals of Oncology: Official Journal of the European Society for Medical Oncology*, 26(7), 1291-1299. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdv022>
- Shore, A. N., & Rosen, J. M. (2014). Regulation of mammary epithelial cell homeostasis by lncRNAs. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 54, 318-330. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2014.03.012>
- Si, X., Zang, R., Zhang, E., Liu, Y., Shi, X., Zhang, E., Shao, L., Li, A., Yang, N., Han, X., Pan, B., Zhang, Z., Sun, L., & Sun, Y. (2016). LncRNA H19 confers chemoresistance in ER $\alpha$ -positive breast cancer through epigenetic silencing of the pro-apoptotic gene BIK. *Oncotarget*, 7(49), 81452-81462. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.13263>
- Singh, S. K., Clarke, I. D., Terasaki, M., Bonn, V. E., Hawkins, C., Squire, J., & Dirks, P. B. (2003). Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Research*, 63(18), 5821-5828.
- Sini, V., Cassano, A., Corsi, D., De Laurentiis, M., Gamucci, T., Mauri, M., Naso, G., Roselli, M., Ruggeri, E. M., Tonini, G., Vici, P., Zampa, G., & Marchetti, P. (2016). Bevacizumab as first-line treatment in HER2-negative advanced breast cancer : Pros and cons. *Tumori*, 102(5), 472-480. <https://doi.org/10.5301/tj.5000555>
- Sørlie, T., Perou, C. M., Tibshirani, R., Aas, T., Geisler, S., Johnsen, H., Hastie, T., Eisen, M. B., van de Rijn, M., Jeffrey, S. S., Thorsen, T., Quist, H., Matese, J. C., Brown, P. O., Botstein, D., Lønning, P. E., & Børresen-Dale, A. L. (2001). Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(19), 10869-10874. <https://doi.org/10.1073/pnas.191367098>
- Sorlie, T., Tibshirani, R., Parker, J., Hastie, T., Marron, J. S., Nobel, A., Deng, S., Johnsen, H., Pesich, R., Geisler, S., Demeter, J., Perou, C. M., Lønning, P. E., Brown, P. O., Børresen-Dale, A.-L., & Botstein, D. (2003). Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(14), 8418-8423. <https://doi.org/10.1073/pnas.0932692100>
- Soussi, T., & Wiman, K. G. (2015). TP53 : An oncogene in disguise. *Cell Death and Differentiation*, 22(8), 1239-1249. <https://doi.org/10.1038/cdd.2015.53>
- Srivastava, M., Hsieh, S., Grinberg, A., Williams-Simons, L., Huang, S. P., & Pfeifer, K. (2000). H19 and Igf2 monoallelic expression is regulated in two distinct ways by a shared cis acting regulatory region upstream of H19. *Genes & Development*, 14(10), 1186-1195.
- St Laurent, G., Wahlestedt, C., & Kapranov, P. (2015). The Landscape of long noncoding RNA classification. *Trends in Genetics: TIG*, 31(5), 239-251. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2015.03.007>
- Standart, N., & Jackson, R. J. (2007). MicroRNAs repress translation of m7Gppp-capped target mRNAs in vitro by inhibiting initiation and promoting deadenylation. *Genes & Development*, 21(16), 1975-1982. <https://doi.org/10.1101/gad.1591507>
- Stefani, G., & Slack, F. J. (2008). Small non-coding RNAs in animal development. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 9(3), 219-230. <https://doi.org/10.1038/nrm2347>
- Stefansson, O. A., Jonasson, J. G., Olafsdottir, K., Hilmarsdottir, H., Olafsdottir, G., Esteller, M., Johannsson, O. T., & Eyfjord, J. E. (2011). CpG island hypermethylation of BRCA1 and loss of pRb as co-occurring events in basal/triple-negative breast cancer. *Epigenetics*, 6(5), 638-649. <https://doi.org/10.4161/epi.6.5.15667>

- Stefansson, O. A., Moran, S., Gomez, A., Sayols, S., Arribas-Jorba, C., Sandoval, J., Hilmarisdottir, H., Olafsdottir, E., Tryggvadottir, L., Jonasson, J. G., Eyfjord, J., & Esteller, M. (2015). A DNA methylation-based definition of biologically distinct breast cancer subtypes. *Molecular Oncology*, *9*(3), 555-568. <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2014.10.012>
- Stendahl, M., Kronblad, Å., Rydén, L., Emdin, S., Bengtsson, N. O., & Landberg, G. (2004). Cyclin D1 overexpression is a negative predictive factor for tamoxifen response in postmenopausal breast cancer patients. *British Journal of Cancer*, *90*(10), 1942-1948. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6601831>
- Suetsugu, A., Nagaki, M., Aoki, H., Motohashi, T., Kunisada, T., & Moriwaki, H. (2006). Characterization of CD133+ hepatocellular carcinoma cells as cancer stem/progenitor cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *351*(4), 820-824. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.10.128>
- Sugihara, E., & Saya, H. (2013). Complexity of cancer stem cells. *International Journal of Cancer*, *132*(6), 1249-1259. <https://doi.org/10.1002/ijc.27961>
- Surani, M. A., Barton, S. C., & Norris, M. L. (1984). Development of reconstituted mouse eggs suggests imprinting of the genome during gametogenesis. *Nature*, *308*(5959), 548-550. <https://doi.org/10.1038/308548a0>
- Syed, Y. Y. (2020). Sacituzumab Govitecan: First Approval. *Drugs*, *80*(10), 1019-1025. <https://doi.org/10.1007/s40265-020-01337-5>
- Szabó, P., Tang, S. H., Rentsendorj, A., Pfeifer, G. P., & Mann, J. R. (2000). Maternal-specific footprints at putative CTCF sites in the H19 imprinting control region give evidence for insulator function. *Current Biology: CB*, *10*(10), 607-610. [https://doi.org/10.1016/s0960-9822\(00\)00489-9](https://doi.org/10.1016/s0960-9822(00)00489-9)
- Taganov, K. D., Boldin, M. P., Chang, K.-J., & Baltimore, D. (2006). NF-kappaB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *103*(33), 12481-12486. <https://doi.org/10.1073/pnas.0605298103>
- Takahashi, K., & Yamanaka, S. (2006). Induction of pluripotent stem cells from mouse embryonic and adult fibroblast cultures by defined factors. *Cell*, *126*(4), 663-676. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.07.024>
- Takahashi, R.-U., Takeshita, F., Fujiwara, T., Ono, M., & Ochiya, T. (2011). Cancer stem cells in breast cancer. *Cancers*, *3*(1), 1311-1328. <https://doi.org/10.3390/cancers3011311>
- Takai, D., Gonzales, F. A., Tsai, Y. C., Thayer, M. J., & Jones, P. A. (2001). Large scale mapping of methylcytosines in CTCF-binding sites in the human H19 promoter and aberrant hypomethylation in human bladder cancer. *Human Molecular Genetics*, *10*(23), 2619-2626. <https://doi.org/10.1093/hmg/10.23.2619>
- Takaishi, S., Okumura, T., Tu, S., Wang, S. S. W., Shibata, W., Vigneshwaran, R., Gordon, S. A. K., Shimada, Y., & Wang, T. C. (2009). Identification of gastric cancer stem cells using the cell surface marker CD44. *Stem Cells (Dayton, Ohio)*, *27*(5), 1006-1020. <https://doi.org/10.1002/stem.30>
- Tessier, C. R., Doyle, G. A., Clark, B. A., Pitot, H. C., & Ross, J. (2004). Mammary tumor induction in transgenic mice expressing an RNA-binding protein. *Cancer Research*, *64*(1), 209-214. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-03-2927>
- Tétreault, N., & De Guire, V. (2013). miRNAs: Their discovery, biogenesis and mechanism of action. *Clinical Biochemistry*, *46*(10-11), 842-845. <https://doi.org/10.1016/j.clinbiochem.2013.02.009>

- Thomas, C. A. (1971). The genetic organization of chromosomes. *Annual Review of Genetics*, 5, 237-256. <https://doi.org/10.1146/annurev.ge.05.120171.001321>
- Thompson, D., Easton, D., & Breast Cancer Linkage Consortium. (2001). Variation in cancer risks, by mutation position, in BRCA2 mutation carriers. *American Journal of Human Genetics*, 68(2), 410-419. <https://doi.org/10.1086/318181>
- Title, A. C., Hong, S.-J., Pires, N. D., Hasenöhrl, L., Godbersen, S., Stokar-Regenscheit, N., Bartel, D. P., & Stoffel, M. (2018). Genetic dissection of the miR-200-Zeb1 axis reveals its importance in tumor differentiation and invasion. *Nature Communications*, 9(1), 4671. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07130-z>
- Toillon, R.-A., Lagadec, C., Page, A., Chopin, V., Sautière, P.-E., Ricort, J.-M., Lemoine, J., Zhang, M., Hondermarck, H., & Le Bourhis, X. (2007). Proteomics demonstration that normal breast epithelial cells can induce apoptosis of breast cancer cells through insulin-like growth factor-binding protein-3 and maspin. *Molecular & Cellular Proteomics: MCP*, 6(7), 1239-1247. <https://doi.org/10.1074/mcp.M600477-MCP200>
- Tomita, H., Tanaka, K., Tanaka, T., & Hara, A. (2016). Aldehyde dehydrogenase 1A1 in stem cells and cancer. *Oncotarget*, 7(10), 11018-11032. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.6920>
- Torres, L., Ribeiro, F. R., Pandis, N., Andersen, J. A., Heim, S., & Teixeira, M. R. (2007). Intratumor genomic heterogeneity in breast cancer with clonal divergence between primary carcinomas and lymph node metastases. *Breast Cancer Research and Treatment*, 102(2), 143-155. <https://doi.org/10.1007/s10549-006-9317-6>
- Treiber, T., Treiber, N., & Meister, G. (2019). Regulation of microRNA biogenesis and its crosstalk with other cellular pathways. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 20(1), 5-20. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0059-1>
- Tremblay, K. D., Duran, K. L., & Bartolomei, M. S. (1997). A 5' 2-kilobase-pair region of the imprinted mouse H19 gene exhibits exclusive paternal methylation throughout development. *Molecular and Cellular Biology*, 17(8), 4322-4329. <https://doi.org/10.1128/MCB.17.8.4322>
- Tropberger, P., & Schneider, R. (2013). Scratching the (lateral) surface of chromatin regulation by histone modifications. *Nature Structural & Molecular Biology*, 20(6), 657-661. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2581>
- Tsang, W. P., Ng, E. K. O., Ng, S. S. M., Jin, H., Yu, J., Sung, J. J. Y., & Kwok, T. T. (2010). Oncofetal H19-derived miR-675 regulates tumor suppressor RB in human colorectal cancer. *Carcinogenesis*, 31(3), 350-358. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgp181>
- Tung, N. M., Robson, M. E., Venz, S., Santa-Maria, C. A., Nanda, R., Marcom, P. K., Shah, P. D., Ballinger, T. J., Yang, E. S., Vinayak, S., Melisko, M., Brufsky, A., DeMeo, M., Jenkins, C., Domchek, S., D'Andrea, A., Lin, N. U., Hughes, M. E., Carey, L. A., ... Garber, J. E. (2020). TBCRC 048 : Phase II Study of Olaparib for Metastatic Breast Cancer and Mutations in Homologous Recombination-Related Genes. *Journal of Clinical Oncology: Official Journal of the American Society of Clinical Oncology*, 38(36), 4274-4282. <https://doi.org/10.1200/JCO.20.02151>
- Ungerleider, N. A., Rao, S. G., Shahbandi, A., Yee, D., Niu, T., Frey, W. D., & Jackson, J. G. (2018). Breast cancer survival predicted by TP53 mutation status differs markedly depending on treatment. *Breast Cancer Research: BCR*, 20(1), 115. <https://doi.org/10.1186/s13058-018-1044-5>
- Vanhecke, E., Adriaenssens, E., Verbeke, S., Meignan, S., Germain, E., Berteaux, N., Nurcombe, V., Le Bourhis, X., & Hondermarck, H. (2011). Brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-4/5 are expressed in breast cancer and can be targeted to inhibit tumor cell survival. *Clinical*



- Cancer Research: An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 17(7), 1741-1752. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-10-1890>
- Varlakhanova, N. V., Cotterman, R. F., deVries, W. N., Morgan, J., Donahue, L. R., Murray, S., Knowles, B. B., & Knoepfler, P. S. (2010). Myc maintains embryonic stem cell pluripotency and self-renewal. *Differentiation; Research in Biological Diversity*, 80(1), 9-19. <https://doi.org/10.1016/j.diff.2010.05.001>
- Vassilev, L. T. (2007). MDM2 inhibitors for cancer therapy. *Trends in Molecular Medicine*, 13(1), 23-31. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2006.11.002>
- Vasudevan, S., Tong, Y., & Steitz, J. A. (2007). Switching from repression to activation : MicroRNAs can up-regulate translation. *Science (New York, N.Y.)*, 318(5858), 1931-1934. <https://doi.org/10.1126/science.1149460>
- Venkitaraman, A. R. (2002). Cancer susceptibility and the functions of BRCA1 and BRCA2. *Cell*, 108(2), 171-182. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(02\)00615-3](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(02)00615-3)
- Vennin, C., Spruyt, N., Dahmani, F., Julien, S., Bertucci, F., Finetti, P., Chassat, T., Bourette, R. P., Le Bourhis, X., & Adriaenssens, E. (2015). H19 non coding RNA-derived miR-675 enhances tumorigenesis and metastasis of breast cancer cells by downregulating c-Cbl and Cbl-b. *Oncotarget*, 6(30), 29209-29223. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.4976>
- Vennin, C., Spruyt, N., Robin, Y.-M., Chassat, T., Le Bourhis, X., & Adriaenssens, E. (2017). The long non-coding RNA 91H increases aggressive phenotype of breast cancer cells and up-regulates H19/IGF2 expression through epigenetic modifications. *Cancer Letters*, 385, 198-206. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2016.10.023>
- Verma, S., Miles, D., Gianni, L., Krop, I. E., Welslau, M., Baselga, J., Pegram, M., Oh, D.-Y., Diéras, V., Guardino, E., Fang, L., Lu, M. W., Olsen, S., Blackwell, K., & EMILIA Study Group. (2012). Trastuzumab emtansine for HER2-positive advanced breast cancer. *The New England Journal of Medicine*, 367(19), 1783-1791. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1209124>
- Vietri, M. T., D'Elia, G., Benincasa, G., Ferraro, G., Caliendo, G., Nicoletti, G. F., & Napoli, C. (2021). DNA methylation and breast cancer : A way forward (Review). *International Journal of Oncology*, 59(5), 98. <https://doi.org/10.3892/ijo.2021.5278>
- Viré, E., Brenner, C., Deplus, R., Blanchon, L., Fraga, M., Didelot, C., Morey, L., Van Eynde, A., Bernard, D., Vanderwinden, J.-M., Bollen, M., Esteller, M., Di Croce, L., de Launoit, Y., & Fuks, F. (2006). The Polycomb group protein EZH2 directly controls DNA methylation. *Nature*, 439(7078), 871-874. <https://doi.org/10.1038/nature04431>
- Visvader, J. E. (2009). Keeping abreast of the mammary epithelial hierarchy and breast tumorigenesis. *Genes & Development*, 23(22), 2563-2577. <https://doi.org/10.1101/gad.1849509>
- Visvader, J. E., & Lindeman, G. J. (2008). Cancer stem cells in solid tumours : Accumulating evidence and unresolved questions. *Nature Reviews Cancer*, 8(10), 755-768. <https://doi.org/10.1038/nrc2499>
- Vlashi, E., Kim, K., Lagadec, C., Donna, L. D., McDonald, J. T., Eghbali, M., Sayre, J. W., Stefani, E., McBride, W., & Pajonk, F. (2009). In vivo imaging, tracking, and targeting of cancer stem cells. *Journal of the National Cancer Institute*, 101(5), 350-359. <https://doi.org/10.1093/jnci/djn509>
- Volinia, S., Calin, G. A., Liu, C.-G., Ambs, S., Cimmino, A., Petrocca, F., Visone, R., Iorio, M., Roldo, C., Ferracin, M., Prueitt, R. L., Yanaihara, N., Lanza, G., Scarpa, A., Vecchione, A., Negrini, M., Harris, C. C., & Croce, C. M. (2006). A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(7), 2257-2261. <https://doi.org/10.1073/pnas.0510565103>

- Völkel, P., & Angrand, P.-O. (2007). The control of histone lysine methylation in epigenetic regulation. *Biochimie*, *89*(1), 1-20. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2006.07.009>
- Vona-Davis, L., & Rose, D. P. (2007). Adipokines as endocrine, paracrine, and autocrine factors in breast cancer risk and progression. *Endocrine-Related Cancer*, *14*(2), 189-206. <https://doi.org/10.1677/ERC-06-0068>
- von Minckwitz, G., Huang, C.-S., Mano, M. S., Loibl, S., Mamounas, E. P., Untch, M., Wolmark, N., Rastogi, P., Schneeweiss, A., Redondo, A., Fischer, H. H., Jacot, W., Conlin, A. K., Arce-Salinas, C., Wapnir, I. L., Jackisch, C., DiGiovanna, M. P., Fasching, P. A., Crown, J. P., ... KATHERINE Investigators. (2019). Trastuzumab Emtansine for Residual Invasive HER2-Positive Breast Cancer. *The New England Journal of Medicine*, *380*(7), 617-628. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa1814017>
- Voutilainen, R., Ilvesmäki, V., Ariel, I., Rachmilewitz, J., de Groot, N., & Hochberg, A. (1994). Parallel regulation of parentally imprinted H19 and insulin-like growth factor-II genes in cultured human fetal adrenal cells. *Endocrinology*, *134*(5), 2051-2056. <https://doi.org/10.1210/endo.134.5.7512497>
- Walerych, D., Napoli, M., Collavin, L., & Del Sal, G. (2012). The rebel angel : Mutant p53 as the driving oncogene in breast cancer. *Carcinogenesis*, *33*(11), 2007-2017. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgs232>
- Walter, M., Liang, S., Ghosh, S., Hornsby, P. J., & Li, R. (2009). Interleukin 6 secreted from adipose stromal cells promotes migration and invasion of breast cancer cells. *Oncogene*, *28*(30), 2745-2755. <https://doi.org/10.1038/onc.2009.130>
- Wang, J., Wang, X., Chen, T., Jiang, L., & Yang, Q. (2017). Huaier Extract Inhibits Breast Cancer Progression Through a LncRNA-H19/MiR-675-5p Pathway. *Cellular Physiology and Biochemistry: International Journal of Experimental Cellular Physiology, Biochemistry, and Pharmacology*, *44*(2), 581-593. <https://doi.org/10.1159/000485093>
- Wang, K. H., Kupa, J., Duffy, K. A., & Kalish, J. M. (2019). Diagnosis and Management of Beckwith-Wiedemann Syndrome. *Frontiers in Pediatrics*, *7*, 562. <https://doi.org/10.3389/fped.2019.00562>
- Wang, M., Li, Y., Xiao, G.-D., Zheng, X.-Q., Wang, J.-C., Xu, C.-W., Qin, S., Ren, H., Tang, S.-C., & Sun, X. (2019). H19 regulation of oestrogen induction of symmetric division is achieved by antagonizing Let-7c in breast cancer stem-like cells. *Cell Proliferation*, *52*(1), e12534. <https://doi.org/10.1111/cpr.12534>
- Wang, W., Wang, J., Qu, M., Li, X., Zhang, J., Zhang, H., Wu, J., Yu, B., Wu, H., Kong, W., & Yu, X. (2015). Viral Restriction Activity of Feline BST2 Is Independent of Its N-Glycosylation and Induction of NF-κB Activation. *PloS One*, *10*(9), e0138190. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0138190>
- Wang, X., Tang, S., Le, S.-Y., Lu, R., Rader, J. S., Meyers, C., & Zheng, Z.-M. (2008). Aberrant expression of oncogenic and tumor-suppressive microRNAs in cervical cancer is required for cancer cell growth. *PloS One*, *3*(7), e2557. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0002557>
- Weigelt, B., Geyer, F. C., & Reis-Filho, J. S. (2010). Histological types of breast cancer : How special are they? *Molecular Oncology*, *4*(3), 192-208. <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2010.04.004>
- Wendt, C., & Margolin, S. (2019). Identifying breast cancer susceptibility genes—A review of the genetic background in familial breast cancer. *Acta Oncologica (Stockholm, Sweden)*, *58*(2), 135-146. <https://doi.org/10.1080/0284186X.2018.1529428>

- Wightman, B., Ha, I., & Ruvkun, G. (1993). Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell*, *75*(5), 855-862. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90530-4](https://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90530-4)
- Wilkin, F., Paquette, J., Ledru, E., Hamelin, C., Pollak, M., Deal, C. L., & Mamelin, C. (2000). H19 sense and antisense transgenes modify insulin-like growth factor-II mRNA levels. *European Journal of Biochemistry*, *267*(13), 4020-4027. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2000.01438.x>
- Woodman, N., Pinder, S. E., Tajadura, V., Le Bourhis, X., Gillett, C., Delannoy, P., Burchell, J. M., & Julien, S. (2016). Two E-selectin ligands, BST-2 and LGALS3BP, predict metastasis and poor survival of ER-negative breast cancer. *International Journal of Oncology*, *49*(1), 265-275. <https://doi.org/10.3892/ijo.2016.3521>
- Wu, G., Cai, J., Han, Y., Chen, J., Huang, Z.-P., Chen, C., Cai, Y., Huang, H., Yang, Y., Liu, Y., Xu, Z., He, D., Zhang, X., Hu, X., Pinello, L., Zhong, D., He, F., Yuan, G.-C., Wang, D.-Z., & Zeng, C. (2014). LincRNA-p21 regulates neointima formation, vascular smooth muscle cell proliferation, apoptosis, and atherosclerosis by enhancing p53 activity. *Circulation*, *130*(17), 1452-1465. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.114.011675>
- Wyckoff, J., Wang, W., Lin, E. Y., Wang, Y., Pixley, F., Stanley, E. R., Graf, T., Pollard, J. W., Segall, J., & Condeelis, J. (2004). A paracrine loop between tumor cells and macrophages is required for tumor cell migration in mammary tumors. *Cancer Research*, *64*(19), 7022-7029. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-04-1449>
- Xiong, H., Shen, J., Chen, Z., Yang, J., Xie, B., Jia, Y., Jayasinghe, U., Wang, J., Zhao, W., Xie, S., Wang, L., & Zhou, J. (2020). H19/let-7/Lin28 ceRNA network mediates autophagy inhibiting epithelial-mesenchymal transition in breast cancer. *International Journal of Oncology*, *56*(3), 794-806. <https://doi.org/10.3892/ijo.2020.4967>
- Xu, J., Chen, Y., & Olopade, O. I. (2010). MYC and Breast Cancer. *Genes & Cancer*, *1*(6), 629-640. <https://doi.org/10.1177/1947601910378691>
- Xu, X., Wang, Y., Xue, F., Guan, E., Tian, F., Xu, J., & Zhang, H. (2020). BST2 Promotes Tumor Growth via Multiple Pathways in Hepatocellular Carcinoma. *Cancer Investigation*, *38*(5), 329-337. <https://doi.org/10.1080/07357907.2020.1769125>
- Yamashita, T., Honda, M., Nio, K., Nakamoto, Y., Yamashita, T., Takamura, H., Tani, T., Zen, Y., & Kaneko, S. (2010). Oncostatin m renders epithelial cell adhesion molecule-positive liver cancer stem cells sensitive to 5-Fluorouracil by inducing hepatocytic differentiation. *Cancer Research*, *70*(11), 4687-4697. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-4210>
- Yan, J., Zhang, Y., She, Q., Li, X., Peng, L., Wang, X., Liu, S., Shen, X., Zhang, W., Dong, Y., Lu, J., & Zhang, G. (2017). Long Noncoding RNA H19/miR-675 Axis Promotes Gastric Cancer via FADD/Caspase 8/Caspase 3 Signaling Pathway. *Cellular Physiology and Biochemistry: International Journal of Experimental Cellular Physiology, Biochemistry, and Pharmacology*, *42*(6), 2364-2376. <https://doi.org/10.1159/000480028>
- Yang, F., Bi, J., Xue, X., Zheng, L., Zhi, K., Hua, J., & Fang, G. (2012). Up-regulated long non-coding RNA H19 contributes to proliferation of gastric cancer cells. *The FEBS Journal*, *279*(17), 3159-3165. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2012.08694.x>
- Yang, J.-S., & Lai, E. C. (2011). Alternative miRNA biogenesis pathways and the interpretation of core miRNA pathway mutants. *Molecular Cell*, *43*(6), 892-903. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.07.024>
- Yang, J.-S., Maurin, T., Robine, N., Rasmussen, K. D., Jeffrey, K. L., Chandwani, R., Papapetrou, E. P., Sadelain, M., O'Carroll, D., & Lai, E. C. (2010). Conserved vertebrate mir-451 provides a

- platform for Dicer-independent, Ago2-mediated microRNA biogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(34), 15163-15168. <https://doi.org/10.1073/pnas.1006432107>
- Yang, P., Du, C. W., Kwan, M., Liang, S. X., & Zhang, G. J. (2013). The impact of p53 in predicting clinical outcome of breast cancer patients with visceral metastasis. *Scientific Reports*, 3, 2246. <https://doi.org/10.1038/srep02246>
- Yang, W., Ning, N., & Jin, X. (2017). The lncRNA H19 Promotes Cell Proliferation by Competitively Binding to miR-200a and Derepressing  $\beta$ -Catenin Expression in Colorectal Cancer. *BioMed Research International*, 2017, 2767484. <https://doi.org/10.1155/2017/2767484>
- Yang, W., Redpath, R. E., Zhang, C., & Ning, N. (2018). Long non-coding RNA H19 promotes the migration and invasion of colon cancer cells via MAPK signaling pathway. *Oncology Letters*, 16(3), 3365-3372. <https://doi.org/10.3892/ol.2018.9052>
- Yi, E. H., Yoo, H., Noh, K. H., Han, S., Lee, H., Lee, J.-K., Won, C., Kim, B.-H., Kim, M.-H., Cho, C.-H., & Ye, S. (2013). BST-2 is a potential activator of invasion and migration in tamoxifen-resistant breast cancer cells. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 435(4), 685-690. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.05.043>
- Yin, L., Sun, T., & Liu, R. (2020). NACC-1 regulates hepatocellular carcinoma cell malignancy and is targeted by miR-760. *Acta Biochimica Et Biophysica Sinica*, 52(3), 302-309. <https://doi.org/10.1093/abbs/gmz167>
- Yoda, M., Cifuentes, D., Izumi, N., Sakaguchi, Y., Suzuki, T., Giraldez, A. J., & Tomari, Y. (2013). Poly(A)-specific ribonuclease mediates 3'-end trimming of Argonaute2-cleaved precursor microRNAs. *Cell Reports*, 5(3), 715-726. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2013.09.029>
- Yoo, S.-H., Kim, J. G., Kim, B.-S., Lee, J., Pi, S.-H., Lim, H.-D., Shin, H.-I., Cho, E.-S., & You, H.-K. (2016). BST2 Mediates Osteoblast Differentiation via the BMP2 Signaling Pathway in Human Alveolar-Derived Bone Marrow Stromal Cells. *PLoS ONE*, 11(6), e0158481. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0158481>
- Yörüker, E. E., Keskin, M., Kulle, C. B., Holdenrieder, S., & Gezer, U. (2018). Diagnostic and prognostic value of circulating lncRNA H19 in gastric cancer. *Biomedical Reports*, 9(2), 181-186. <https://doi.org/10.3892/br.2018.1116>
- Yoshimizu, T., Miroglio, A., Ripoche, M.-A., Gabory, A., Vernucci, M., Riccio, A., Colnot, S., Godard, C., Terris, B., Jammes, H., & Dandolo, L. (2008). The H19 locus acts in vivo as a tumor suppressor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(34), 12417-12422. <https://doi.org/10.1073/pnas.0801540105>
- Yu, H., Li, S., Wu, S.-X., Huang, S., Li, S., & Ye, L. (2020). The prognostic value of long non-coding RNA H19 in various cancers : A meta-analysis based on 15 studies with 1584 patients and the Cancer Genome Atlas data. *Medicine*, 99(2), e18533. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000018533>
- Zhang, A., Zhou, N., Huang, J., Liu, Q., Fukuda, K., Ma, D., & Lu, Z. (2012). The human long non-coding RNA-RoR is a p53 repressor in response to DNA damage. *Cell Research*, 23(3), 340-350. <https://doi.org/10.1038/cr.2012.164>
- Zhang, A., Zhou, N., Huang, J., Liu, Q., Fukuda, K., Ma, D., Lu, Z., Bai, C., Watabe, K., & Mo, Y.-Y. (2013). The human long non-coding RNA-RoR is a p53 repressor in response to DNA damage. *Cell Research*, 23(3), 340-350. <https://doi.org/10.1038/cr.2012.164>

- Zhang, E., Li, W., Yin, D., De, W., Zhu, L., Sun, S., & Han, L. (2016). C-Myc-regulated long non-coding RNA H19 indicates a poor prognosis and affects cell proliferation in non-small-cell lung cancer. *Tumor Biology*, *37*(3), 4007-4015. <https://doi.org/10.1007/s13277-015-4185-5>
- Zhang, H., Niu, B., Hu, J.-F., Ge, S., Wang, H., Li, T., Ling, J., Steelman, B. N., Qian, G., & Hoffman, A. R. (2011). Interruption of intrachromosomal looping by CCCTC binding factor decoy proteins abrogates genomic imprinting of human insulin-like growth factor II. *The Journal of Cell Biology*, *193*(3), 475-487. <https://doi.org/10.1083/jcb.201101021>
- Zhang, K., Luo, Z., Zhang, Y., Zhang, L., Wu, L., Liu, L., Yang, J., Song, X., & Liu, J. (2016). Circulating lncRNA H19 in plasma as a novel biomarker for breast cancer. *Cancer Biomarkers: Section A of Disease Markers*, *17*(2), 187-194. <https://doi.org/10.3233/CBM-160630>
- Zhang, L., Yang, F., Yuan, J., Yuan, S., Zhou, W., Huo, X., Xu, D., Bi, H., Wang, F., & Sun, S. (2013). Epigenetic activation of the MiR-200 family contributes to H19-mediated metastasis suppression in hepatocellular carcinoma. *Carcinogenesis*, *34*(3), 577-586. <https://doi.org/10.1093/carcin/bgs381>
- Zhang, S., Balch, C., Chan, M. W., Lai, H.-C., Matei, D., Schilder, J. M., Yan, P. S., Huang, T. H.-M., & Nephew, K. P. (2008). Identification and characterization of ovarian cancer-initiating cells from primary human tumors. *Cancer Research*, *68*(11), 4311-4320. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-08-0364>
- Zhang, W., Zhou, K., Zhang, X., Wu, C., Deng, D., & Yao, Z. (2021). Roles of the H19/microRNA-675 axis in the proliferation and epithelial-mesenchymal transition of human cutaneous squamous cell carcinoma cells. *Oncology Reports*, *45*(4), Article 4. <https://doi.org/10.3892/or.2021.7990>
- Zhang, Y., & Tycko, B. (1992). Monoallelic expression of the human H19 gene. *Nature Genetics*, *1*(1), 40-44. <https://doi.org/10.1038/ng0492-40>
- Zhao, J., & Ma, S.-T. (2018). Downregulation of lncRNA H19 inhibits migration and invasion of human osteosarcoma through the NF- $\kappa$ B pathway. *Molecular Medicine Reports*, *17*(5), 7388-7394. <https://doi.org/10.3892/mmr.2018.8746>
- Zhao, Q.-Y., Lei, P.-J., Zhang, X., Zheng, J.-Y., Wang, H.-Y., Zhao, J., Li, Y.-M., Ye, M., Li, L., Wei, G., & Wu, M. (2016). Global histone modification profiling reveals the epigenomic dynamics during malignant transformation in a four-stage breast cancer model. *Clinical Epigenetics*, *8*, 34. <https://doi.org/10.1186/s13148-016-0201-x>
- Zhao, Y., Feng, C., Li, Y., Ma, Y., & Cai, R. (2019). lncRNA H19 promotes lung cancer proliferation and metastasis by inhibiting miR-200a function. *Molecular and Cellular Biochemistry*, *460*(1-2), 1-8. <https://doi.org/10.1007/s11010-019-03564-1>
- Zheng, Z.-H., Wu, D.-M., Fan, S.-H., Zhang, Z.-F., Chen, G.-Q., & Lu, J. (2019). Upregulation of miR-675-5p induced by lncRNA H19 was associated with tumor progression and development by targeting tumor suppressor p53 in non-small cell lung cancer. *Journal of Cellular Biochemistry*, *120*(11), 18724-18735. <https://doi.org/10.1002/jcb.29182>
- Zhou, S., He, Y., Yang, S., Hu, J., Zhang, Q., Chen, W., Xu, H., Zhang, H., Zhong, S., Zhao, J., & Tang, J. (2018). The regulatory roles of lncRNAs in the process of breast cancer invasion and metastasis. *Bioscience Reports*, *38*(5), Article 5. <https://doi.org/10.1042/BSR20180772>
- Zhou, X., Ye, F., Yin, C., Zhuang, Y., Yue, G., & Zhang, G. (2015). The Interaction Between MiR-141 and lncRNA-H19 in Regulating Cell Proliferation and Migration in Gastric Cancer. *Cellular Physiology and Biochemistry: International Journal of Experimental Cellular Physiology, Biochemistry, and Pharmacology*, *36*(4), 1440-1452. <https://doi.org/10.1159/000430309>

- Zhou, X., Yin, C., Dang, Y., Ye, F., & Zhang, G. (2015). Identification of the long non-coding RNA H19 in plasma as a novel biomarker for diagnosis of gastric cancer. *Scientific Reports*, *5*, 11516. <https://doi.org/10.1038/srep11516>
- Zhou, Y.-W., Zhang, H., Duan, C.-J., Gao, Y., Cheng, Y.-D., He, D., Li, R., & Zhang, C.-F. (2016). MiR-675-5p enhances tumorigenesis and metastasis of esophageal squamous cell carcinoma by targeting REPS2. *Oncotarget*, *7*(21), 30730-30747. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.8950>
- Zhu, M., Chen, Q., Liu, X., Sun, Q., Zhao, X., Deng, R., Wang, Y., Huang, J., Xu, M., Yan, J., & Yu, J. (2014). LncRNA H19/miR-675 axis represses prostate cancer metastasis by targeting TGFBI. *The FEBS Journal*, *281*(16), 3766-3775. <https://doi.org/10.1111/febs.12902>
- Zhu, Y., Xing, Y., Chi, F., Sun, W., Zhang, Z., & Piao, D. (2018). Long noncoding RNA SNHG6 promotes the progression of colorectal cancer through sponging miR-760 and activation of FOXC1. *OncoTargets and Therapy*, *11*, 5743-5752. <https://doi.org/10.2147/OTT.S170246>
- Zhu, Z., Song, L., He, J., Sun, Y., Liu, X., & Zou, X. (2015). Ectopic expressed long non-coding RNA H19 contributes to malignant cell behavior of ovarian cancer. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology*, *8*(9), 10082-10091.
- Zhuang, M., Gao, W., Xu, J., Wang, P., & Shu, Y. (2014). The long non-coding RNA H19-derived miR-675 modulates human gastric cancer cell proliferation by targeting tumor suppressor RUNX1. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *448*(3), 315-322. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.12.126>



## *ANNEXES*





## Annexe 1

Clément Lecerf, **Evodie Peperstraete**, Xuefen Le Bourhis, Eric Adriaenssens. (2020). Propagation and Maintenance of Cancer Stem Cells : A major Influence of the Long Non-Coding RNA *H19*. *Cells*, 9,2613.



## Propagation and Maintenance of Cancer Stem Cells: A Major Influence of the Long Non-Coding RNA *H19*

Clément Lecerf<sup>1</sup>, Evodie Peperstraete<sup>1</sup>, Xuefen Le Bourhis<sup>1</sup>, Eric Adriaenssens<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Univ. Lille, CNRS, INSERM, CHU Lille, UMR 9020 – UMR 1277 – Canther – Cancer Heterogeneity, Plasticity and Resistance to Therapies, F-59000 Lille, France

\* Author to whom correspondence should be addressed.

*Cells* **2020**, *9*(12), 2613; <https://doi.org/10.3390/cells9122613>

**Keywords** : lncRNA, *H19*, non-coding RNA, cancer stem cells, tumorigenicity, reprogramming factors, exosomes

## **Abstract**

Cancer stem cells (CSCs) represent a rare population of tumor cells that exhibit stem cell properties with the abilities of self-renewal and differentiation. These cells are now widely accepted to be responsible for tumor initiation, development, resistance to conventional therapies, and recurrence. Thus, a better understanding of the molecular mechanisms involved in the control of CSCs is essential to improve patient management in terms of diagnostics and therapies. CSCs are regulated by signals of the tumor microenvironment as well as intrinsic genetic and epigenetic modulators. *H19*, the first identified lncRNA is involved in the development and progression of many different cancer types. Recently, *H19* has been demonstrated to be implicated in the regulation of CSCs in different types of cancers. The aim of this review is to provide an overview of the role and mechanisms of action of *H19* in the regulation of CSCs. We summarize how *H19* may regulate CSC division and cancer cell reprogramming, thus affecting metastasis and drug resistance. We also discuss the potential clinical implications of *H19*.

## 1. Introduction

Despite recent progress in early detection and therapeutics outcomes, cancer remains a major medical issue. Increasing data highlight the implication of cancer stem cells (CSCs) in tumorigenicity and cancer progression. CSC concept states that tumor growth, analogous to the renewal of healthy tissues, is fueled by a small number of dedicated stem cells according to a hierarchic model. At the top of the model, CSCs, through symmetric or asymmetric divisions, will give rise to self-renewal daughter CSCs and more differentiated transient amplifying cells to regenerate a heterogeneous tumor population. CSCs can be derived from adult normal stem/progenitor cells after (epi)genetic alterations. The mutated CSCs exhibit enhanced immune evasion capacity and reduced apoptosis, resulting in tumor initiation. Due to their unlimited division potential, CSCs will accumulate additional (epi)genetic alterations, leading to the appearance of diverse phenotypes of CSCs, tumor progression, and metastasis formation [1].

The evolving phenotype of CSCs is found to be tightly associated to the epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) in cancers of epithelial origin [2,3,4]. EMT is a developmental process wherein epithelial cells transdifferentiate into mesenchymal cells. This process is characterized by molecular reprogramming, leading to cytoskeleton reorganization, cellular junction disruption, and increased abilities of cells to migrate and invade adjacent tissue. It was shown that tumor cells expressing high levels of the EMT master transcription factor SNAI1 display enhanced tumor-initiating capacity and metastatic potential in mouse and human models [4]. Similarly, another EMT inducer, ZEB1, was described to regulate the transit of basal breast cancer cells between non-CSC and CSC states [5]. In addition, the genetic reprogramming orchestrated by EMT affects intracellular mechanisms such as glucose, lipid, glutamine, and nucleotide metabolisms [6], sustaining the acquisition and maintenance of CSC characteristics.

Apart from EMT, differentiated cancer cells have been largely reported to be directly reprogrammed to CSCs by extracellular cues from the tumor microenvironment including hypoxia, ROS, and cytokines [7,8], as well as by ectopic expression of pluripotent transcriptional factors OCT3/4, SOX2, KLF4, and cMYC [9]. Moreover, radio- and chemotherapies are also able to increase CSCs by reprogramming mechanisms [10,11,12]. From a clinical point of view, this is of major importance, as CSCs present endogenous resistance mechanisms against radiation and chemotherapy, which confers CSCs as a survival advantage over differentiated counterparts. In addition, CSCs can generate various subclones, increasing the risk of a more resistant fraction after anti-cancer therapy [11].

Whatever the origins, CSCs are controlled by both extracellular stimuli common to normal stem cells (Wnt, hedgehog, Notch, and TGF- $\beta$ ) and specific to tumor microenvironment (cytokines, ROS,

hypoxia). Intrinsic regulations including core stemness transcriptional factors, epigenetic alterations such as telomerase reactivation [13,14] and deregulated dynamics of chromatin (de)compaction lead to stemness-related gene expression and differentiation-related gene repression. To complexify the aforementioned interconnected extracellular and intracellular networks, it is increasingly described that non-coding RNAs including long non-coding RNAs and microRNAs contribute to the regulation of CSCs by various mechanisms [15,16,17].

In this review, we will first describe *H19* and its action in cancer development in a general way, and then overview how *H19* may regulate CSC division and cancer cell reprogramming. We will also discuss the potential clinical implications of *H19*.

## **2. The Long Non-Coding RNA *H19* and Its Pleiotropic Oncogenic Actions in Different Cancers**

At the beginning of the 2000s, the Encyclopedia of DNA Elements (ENCODE) consortium showed that about 80% of the genome is transcribed into functional RNAs, but only 2% are translated into proteins [18,19,20]. From the results of this project, a “transcriptional background noise” therefore would exist, but also transcribed but not translated genes that produce non-coding RNAs (ncRNAs). These ncRNAs are classified according to their length in small ncRNAs (less than 200 nt) and long ncRNAs (more than 200 nt). Nowadays, about 20,000 lncRNAs have been identified and characterized [21]. They show classical features of mRNAs like transcription by RNA polymerase II, 5' capping, 3' polyadenylation, and splicing [22,23]. lncRNAs are described to be involved in both normal and pathological development, including cancer [24,25,26,27].

The long non-coding RNA *H19* is the first discovered lncRNA. The *H19* RNA is transcribed from the *H19* gene, which is subject to genomic imprinting and is maternally expressed [28]. The *H19* gene is located on the human 11p15.5 locus, near the *IGF2* (Insulin-like growth factor 2) gene. This gene is composed of 5 exons and codes for a mature RNA of 2.3 kb transcribed by the RNA polymerase II. The transcript is normally spliced, polyadenylated, capped, and exported to the cytosol. Brannan et al. showed that no protein is associated to this transcript, and proposed that *H19* could act as a non-coding RNA [29].

*H19* is highly expressed during embryogenesis and sharply downregulated after birth for the majority of adult tissues [30]. *H19* is found to play important roles during embryogenesis and normal tissue homeostasis. For instance, it has been described that loss of *H19* lncRNA in embryonic endothelial precursors and pre-hematopoietic stem cells (HSCs) results in failed HSC generation, indicating a pivotal role of *H19* in HSC formation from embryonic SCs [31]. Furthermore, *H19* is found to be preferentially expressed in long-term HSCs compared to short-term HSCs or multipotent progenitors in the adult blood system where *H19* is found to maintain HSCs quiescence [32].

Similarly, *H19* contributes to maintain the SC phenotype of normal prostate cells [33] and prevents adipogenesis of bone marrow SCs [34].

*H19* is widely described to be involved in tumorigenesis and cancer progression [35]. *H19* is overexpressed in both leukemia and different types of solid cancers including glioma, melanoma, lung adenocarcinoma, breast, ovarian, and prostate cancers, as well as cancers of digestive (tongue, stomach, colon, liver, pancreas) and urinary systems (kidney, bladder) [35]. *H19* favors tumorigenesis by promoting genomic stability [36], enabling replicative immortality [37] and sustaining cell growth [38,39], migration, and invasion, as well as increased resistance to chemotherapies [40,41,42]. Furthermore, *H19* is also reported to be able to promote angiogenesis and tumor inflammation as well as avoid immune suppression [43,44,45]. *H19* has been demonstrated to exert its oncogenic actions at transcriptional, post-transcriptional, and post-translational levels. At the transcriptional regulation level, *H19* can activate transcription factors like E2F1 in pancreatic ductal adenocarcinoma, leading to increased cell proliferation [46]; *H19* can also interact with the PRC2 complex to recruit it to its target genes promoters, leading to the modulation of chromatin condensation and the inaccessibility of gene promoters to transcription factors [47]. The post-transcriptional regulation by *H19* involves the contribution of microRNAs (miRNAs). Interestingly, the interaction of *H19* with miRNAs pathways is dual: on one hand, *H19* is able to act as a “sponge” to sequester miRNAs and impede their action [48]. On the other hand, *H19* is itself the precursor of the miR-675 [49], which will in turn regulate several targets, including the growth suppressors RB and RUNX1 [50,51,52]. Concerning the post-translational regulation, the action of *H19* has been spotted out outside the nucleus. Indeed, *H19* can physically interact with proteins like p53 to impair its activity in gastric cancer cells and promote cell proliferation [39].

During the past years, along with the fundamental and clinical data highlighting the implication of CSCs in tumorigenicity and cancer progression, more and more studies show that *H19* is able to regulate CSCs. In breast cancer, our team showed that both *H19* and its miR-675 are involved in CSC enrichment [53]. In the following sections, we will discuss how *H19* interconnects to the maze of CSCs.

### **3. The Long Non-Coding RNA *H19* Promotes Symmetric Renewal of CSCs**

As aforementioned, CSCs in a bulk tumor cell population may undergo asymmetric or symmetric divisions. Asymmetric division gives rise to a stem cell (SC) and a progenitor or committed cell (also called transient amplifying cell), while symmetric division leads to the generation of two identical daughter cells which are either CSCs (symmetric renewal) or committed cells [1]. Upon deregulated extrinsic and/or intrinsic cues, CSCs may preferentially undergo symmetric renewal to enlarge the pool of CSCs and sustain cancer progression [54]. In this way, *H19* is found to promote the symmetric

renewal of CSCs through the regulation of several intrinsic intermediates including let-7, LIN28, or p53 [55]. Moreover, CSC symmetric renewal activity of *H19* is further amplified by the existence of positive regulatory loops between *H19* and extrinsic actors such as estrogen receptor  $\beta$ . For instance, estradiol (E2) treatment enhances *H19* expression in breast cancer cells [55,56]. *H19* will in turn promote the upregulation of estrogen receptor  $\beta$  (ER $\beta$ ) expression in these cells [55]. Similar data have been shown in papillary thyroid carcinoma cells in which estradiol (E2) significantly promotes *H19* transcription via ER $\beta$  and elevates *H19* expression. On the other hand, *H19* acts as a competitive RNA to sequester miR-3126-5p, leading to enhanced ER $\beta$  expression. Depletion of *H19* reverses E2-induced stem-like properties, indicating the importance of the positive feedback loop in the enrichment of papillary thyroid carcinoma stem cells [57] (**Figure 1A**). In these models, the enhanced ER $\beta$  activity will thus promote symmetric division of CSCs and perpetuate the CSC pool within the tumor.

To go further, the mechanisms underlying this process showed an involvement of the let-7 miRNAs family. Let-7c inhibits the symmetric division and therefore stem-like phenotypes such as sphere-forming capacities of breast CSCs. Because of its overexpression due to enhanced Wnt signaling in this model, *H19* is able to sponge let-7c, thus allowing to counter its negative regulation and promote symmetric division of CSCs [55] (**Figure 1B**). Still in breast cancer, a similar mechanism has been highlighted: miR-146a expression indirectly upregulates let-7c to promote asymmetric division of breast CSCs. This goes through the post-translational targeting and degradation of LIN28. LIN28 is a transcription factor that can regulate gene expression either by binding to mRNAs or by blocking miRNA biogenesis, especially for the let-7 family [58]. Here, the degradation of LIN28 by miR-146a decreases Wnt signaling activation, and represses *H19* expression. Let-7c upregulation will thus block the symmetric division of breast CSCs that will in turn impact the CSCs pool [59] (**Figure 1B**).

One other thing concerning the symmetrical division of CSCs is the implication of p53 protein. The *TP53* gene codes for a protein involved in many cellular processes, hence its name of “cellular regulation platform”. Indeed, p53 is found to act in response to several stresses such as DNA damage to regulate cell cycle, senescence, apoptosis, or genetic stability. Linked to this, it has been shown that SCs are resistant to DNA damage-induced apoptosis or senescence. This is notably due to the inactivation of p53 protein and activation of DNA repairing mechanisms [60]. The inactivation of p53 leads to cell cycle entry and symmetric division of SCs [61], and in the longer term might favor accumulation of SCs harboring DNA mutations, which can reduce their functional efficiency (aging) [62], and even favor transformation of normal SCs into CSCs.

In addition, it has been shown that *H19* is able to inhibit p53 activity, leading to the upregulation of gastric cancer cells proliferation [39]. Moreover, CSC treatment with a p53 pathway activator



stimulates the asymmetric division [55]. It is thus possible that *H19* could promote symmetric divisions of CSCs by inhibiting p53 (Figure 1C).

#### 4. *H19* Contributes to the Enrichment and Maintenance of CSCs

The origin of SCs has been studied as part of the cell reprogramming mechanism. Indeed, it has been shown that the transfection of transcription factors like *Oct4*, *Sox2*, *Klf4*, and *c-Myc* is sufficient to induce de-differentiation of murine fibroblasts. These fibroblasts are then reprogrammed to a pluripotent state that express a stem cell-like phenotype [63]. The phenotypic characterization of these induced-pluripotent stem (IPS) cells showed similar morphologic and growth properties when compared to embryonic SCs, and confirmed the expression of SC marker genes. In addition, authors showed that these IPS cells transplanted into nude mice are able to give rise to heterogeneous tumors. The reprogramming process starts with a set of cellular divisions, followed by epigenetic alterations: this is favored by little or no activity of caretakers genes such as *TP53* [64]. Among those epigenetic alterations, the influence of microenvironment through radiotherapy-induced reactive oxygen species (ROS) has been established [12,65]. Indeed, ROS activity leads to variations in the concentration of metabolic intermediates that are essential for histones post-translational modification, thus modulating the chromatin compaction level and so, gene expression.

It is well known in the literature that *H19* is functionally involved in the regulation of both SCs and CSCs. For instance, *H19* is found to maintain hematopoietic SCs quiescence, a mechanism in favor of the SC state. Indeed, the differentially methylated region (DMR) upstream of *H19* regulates the reciprocal expression of *H19* from the maternal allele and *Igf2* from the paternal allele. Deletion of the maternal but not the paternal *H19*-DMR alters hematopoietic SC quiescence and function [32]. Furthermore, *H19* expression is negatively correlated with adipocyte differentiation; conversely, overexpression of *H19* in bone marrow SCs prevents adipogenesis through post-translational inhibition of histone deacetylases (HDACs) 4-6 [34]. In prostate cancer, *H19* overexpression has been positively correlated with the expression of the well-known stemness-related factors *Oct4* and *Sox2*, and with cellular sphere-forming capacity [33]. Furthermore, *H19* expression has been shown to be higher in papillary thyroid CSCs enriched by sphere formation than in monolayer cells. Moreover, these spheroid cells are characterized by both enhanced expression of *Nanog* and *Sox2* and reduced expression of differentiation markers. This suggests that *H19* is able to promote the reprogramming process, leading to the increase of cellular stemness [57].

The long non-coding RNA *H19* also participates to the maintenance of the CSC pool. For instance, microarray analysis showed an increased expression of *H19* and the pluripotent transcriptional factors *Sox2*, *Oct4*, and *Nanog* in the bulk acute lymphoblastic leukemia cells compared to early progenitors

[66]. In addition, our team recently highlighted a stem cell gene signature (Aldh1a1+; CD44+/CD24-) in breast tumors expressing higher *H19*. Moreover, these gene signatures were also associated with enhanced *H19*-derived miR-675 expression, suggesting a role for both *H19* and miR-675 in the enrichment of breast CSCs [53].

However, many studies describe the involvement of *H19* in reprogramming mainly through its role of miRNA sponge. Of interest, the above-described loop regulation between *H19* and LIN28 in the promotion of CSCs symmetric division is also involved in reprogramming: indeed, in patient lung cancer samples, there exists a positive correlation between *H19* and LIN28 expressions, and further analysis showed an increase of LIN28 expression by *H19*. This is due to the sponging of miR-196b by *H19*, that normally suppresses LIN28 mRNA translation. LIN28 expression allowed by *H19* leads to the promotion of lung cancer cell proliferation [67]. Similarly, *H19* has been found to sponge miR-3126-5p to allow the expression of ER $\beta$  receptor in papillary thyroid carcinoma, but also to sponge miR-193b in hepatocellular carcinoma, leading to the activation of MAPK1 and other oncogenes [57,68]. Furthermore, the complex regulation of miR-let-7 by *H19* can be also found involved in breast CSC reprogramming, echoing the regulation loop involved in CSC (a)symmetric division (**Figure 2**). Under hypoxic condition (which reflects intra-tumoral conditions), the expression of both HIF-1 $\alpha$  and *H19* is enhanced. One of the downstream targets of HIF-1 $\alpha$  is the *PDK1* gene, that codes for a glycolytic enzyme. PDK1 protein promotes glycolysis in breast CSCs, which is demonstrated to maintain cellular stemness with enhanced expression of reprogramming factors (*Oct4*, *Lin28*), enhanced ALDH1 activity and sphere-forming capacity (**Figure 2A**). However, in this model, HIF-1 $\alpha$  expression was repressed. Further analysis showed that *HIF-1 $\alpha$*  mRNA possesses in its 3' UTR sequence a miR-let-7 response element: let-7 was thus responsible for HIF-1 $\alpha$  degradation and low stem-like phenotypes in breast cancer cells. The authors showed that *H19* is able to sponge let-7 in order to overcome these effects, leading to the upregulation of HIF-1 $\alpha$  and PDK1, contributing to breast CSC maintenance [69] (**Figure 2A**).

Still, in breast CSCs subpopulation, *H19* enhances ALDH1 activity, clone-forming, and sphere-forming capacities. These phenomena involve once again the enhancing of reprogramming factor LIN28 expression. To induce LIN28 expression, *H19* has to act as a competing endogenous RNA and sponge miR-let-7 (**Figure 2B**). However, it has been shown that LIN28 also suppresses let-7 production, and that *H19* can be downregulated by its own target let-7 in breast cancer cells. The authors therefore hypothesized that a cellular accumulation of LIN28 can indirectly enhance *H19* expression through inhibiting let-7 production. This highlights an interesting negative feedback loop involved in breast CSC maintenance. To reinforce this idea, this loop exhibits strong correlations in primary breast carcinomas [70]. In breast CSCs, the Wnt signaling pathway is strongly activated, leading to the enhanced

expression of *H19*. Treatment of cells with Axitinib, a tyrosine kinase inhibitor used in clinical trials, revealed that the inhibition of Wnt activity was associated with both inhibition of *H19* expression and increase of asymmetric division rate [55]. However, in this model, Wnt signaling has been reported to be “naturally” activated, as is *H19* expression. Further analysis has uncovered a positive feedback loop between *H19* expression and LIN28/let-7c axis. Indeed, Snail, a transcription factor involved in EMT, is able to indirectly promote miR-146a maturation through Wnt activity. In turn, miR-146a represses Wnt signaling activation through participating in the let-7c/Wnt/*H19* feedback loop (**Figure 2C**). Thus, the mechanisms involving miR-146a/Wnt and let-7c/Wnt contribute to form a complex and precise feedback loop of the miR-146a/let-7c/Wnt cascade. This feedback loop regulates the downstream expression of both let-7c and *H19*: the balance between these actors will thus determine the functional status of breast CSCs [59].

As described above (**Figure 1B**), increased let-7 production by miR-146a leads to the degradation of LIN28, and the downstream inhibition of the Wnt pathway, which in turn regulates *H19* expression [55,59] (**Figure 2C**). Thus, depending of the functional status of *H19*, this double regulation loop influences the CSC expansion. Sponging of let-7 by *H19* has also been described in glioblastoma. In this model, the inhibition of let-7 leads to the enhanced expression of its target HMGA2, which acts as an oncogene in several cancers. Re-expression of HMGA2 enhances mesenchymal transition of glioblastoma and self-renewal of glioblastoma SCs. For further investigations, the authors used phenformin, a mitochondrial complex I inhibitor used to inhibit cell growth and induce apoptosis of glioblastoma SCs. They showed that phenformin increases let-7 expression and thus represses *H19*-mediated stem-like phenotypes due to HMGA2 inhibition [71].

In other models such as hepatocellular carcinoma, *H19* has been demonstrated to induce both stemness and EMT to accelerate invasion of hepatocellular carcinoma cells in vitro. Indeed, as described above, it is known that EMT plays an important role in both inducing CSC characteristics and promoting cellular resistance to treatment [72,73]. In this model, *H19* sponges miR-193b, which will promote MAPK1 expression and de-repress several oncogenes like EGFR, KRAS, PTEN, and IGF1R. This is associated with enhanced expression of stemness genes such as *Lin28*, *Sox2*, *Notch1*, *Nanog*, and *Oct4*. All these events will thus trigger hepatocellular carcinoma progression and initiate the metastatic development [68]. The role of *H19* in the balance between both epithelial and mesenchymal phenotypes has also been shown by our team in the breast cancer model: thus, the mechanisms described in hepatocellular carcinoma could be transposed in the regulation of breast CSCs [74].

## 5. *H19* Enhances Drug Resistance of CSCs

Drug resistance is a major cause of low recurrence-free survival in various cancers. Cancer cells chemoresistance is multifactorial: it involves key factors such as cell behavior and growth kinetics, tumor heterogeneity, physical obstacles, and tumor microenvironment. Applying these therapeutic pressures to cancer cells can also lead to tumor functional and adaptive reorganization, in order to persist despite the treatment. Particularly, within the tumor, CSCs are inherently more resistant to chemotherapy treatments, and have been proven to contribute to cancer relapse. Indeed, both chemotherapy and radiotherapy may promote CSC self-renewal through cytokine production and DNA repair mechanisms [75,76,77]. This is mainly due to the responsibility of CSCs in tumor heterogeneity. Thus, a high cellular proportion expressing CSC markers is correlated to poor prognosis and low response to treatments [78,79].

In addition, much evidence shows that *H19* is involved in drug resistance. Overexpression of *H19* in many cancers is associated with acquired chemoresistance and cancer cell survival, involving various mechanisms of action such as oncogene expression, epigenetic gene silencing, enhanced cell proliferation, apoptosis inhibition, and metastasis [80,81,82,83]. Furthermore, links between *H19*, CSCs, and drug resistance have also been established. In prostate CSCs, *H19* expression has been shown to promote both resistance to the androgen deprivation therapy (ADT) and the induction of highly metastatic form of prostate cancer [66]. In glioblastoma, knockdown of *H19* expression leads to decreased cellular proliferation and a higher apoptotic rate after induction by chemotherapy (temozolomide). This is accompanied by a downregulation of the CSC markers CD133, *Nanog*, *Oct4*, and *Sox2*, and thus the loss of glioblastoma cellular stemness. This is the proof that *H19* expression reinforces both stemness and chemoresistance of glioblastoma cells [84]. Moreover, *H19* is also associated with the stemness of colorectal cancer cells. High *H19* expression rates are found in patient samples at different tumor node metastasis (TNM) stages, and correlated with chemoresistance of colorectal cancer cells in vitro and in vivo after treatment with oxaliplatin. Indeed, *H19* expression enhances the populations of ALDH1<sup>high</sup> cancer cells, the sphere-forming capacity of colorectal cancer cells, and the expression of pluripotency transcription factors *Nanog*, *Oct4*, and *Sox2*. In addition, resistance to oxaliplatin in *H19* overexpressing cells has been reported to be further enhanced [85]. In hepatocellular carcinoma, MDR1 (multidrug resistance 1) and GST- $\pi$  (glutathione S-transferase- $\pi$ ) high protein expression levels were detected in CD133+ CSCs, in association with an overexpression of *H19*. In these cell lines, *H19* has been shown to affect the degree of oxidative stress by reducing the reactive oxygen species (ROS) production. In this model, inhibition of *H19* expression reduces CD133+ CSC chemoresistance through the enhancement of ROS production, the promotion of cell apoptosis and the blocking of the MAPK/ERK signaling pathway [86]. In liver CSCs, another non-coding RNA

named *CUDR* (cancer up-regulated drug resistant) has been reported to confer cellular resistance to doxorubicin treatment [87]. Consequently, to its expression and activation after doxorubicin treatment, *CUDR* is able to increase both proliferation and malignant transformation of liver CSCs. This goes through the association of both cyclin D1 and PTEN in an inactive trimeric complex. PTEN knockdown leads to increase in the binding capacity of *CUDR* to cyclin D1, thus forming an active *CUDR*/cyclin D1 dimer that demethylates *H19* promoter and the downstream increase of telomerase activity. However, *H19* has been reported to regulate telomerase activity according to cell context, as *H19* would rather function as a molecular chaperone promoting either the association or the dissociation of telomerase subunits (TERT and TERC) [88]. In any cases, the expression of *H19* due to the demethylation of its promoter leads to the enhancement of liver CSC activity, and thus the tumor resistance to doxorubicine treatment. *H19* expression will also influence the telomerase activity and thus the long-term self-renewal capacity of liver CSCs [37].

## **6. *H19* Expression Is Propagated in the Tumor Micro-Environment to Promote Stemness**

In addition to the maintenance of CSCs population, *H19* is found to promote and spread cellular stemness within a tissue or an organism. To do so, a transport means is needed to propagate *H19* within the extracellular environment. One of the possible options is the use of intercellular communication through extracellular vesicles, particularly the production of exosomes. Exosomes are a specific type of microvesicles produced in the endosomal compartment. They are characterized by their fusion with the cell surface to directly release their content (including proteins, lipids, and RNAs) in the extracellular medium [89]. Exosomes are present in many tissues and can also be found in blood. Moreover, they are also released in vitro by cultured cells into their growth medium [90].

Recently, exosomes released from cancer cells have been proposed to play a role in cancer progression. For example, exosomes are able to promote metastasis in initiating pre-metastatic niches in various cancers [91,92,93]. Furthermore, it has been shown that cancer cells and cancer associated fibroblasts (CAFs) can secrete exosomes [94,95]. According to their tumoral or stromal origin, those exosomes contribute to the crosstalk between cancer cells and the tumor microenvironment. In that manner, exosomes can be considered as critical intermediaries in tumor progression and metastasis.

Among the markers expressed by those exosomes, several molecules have been identified, including long non-coding RNAs like *H19* (Figure 3). Indeed, *H19* can act not only as an intrinsic factor, but can also act on neighboring cells. For instance, the involvement of the exosomes-derived expression of *H19* has been demonstrated in specific phenomena and pathologies such as trophoblast cell invasion, diabetic foot ulcers, and chronic cholestatic liver diseases, supporting our idea that

exosomal *H19* can extend its action to surrounding cells [96,97,98]. In cancer models, it has been demonstrated that *H19* expression is upregulated in non-small cells lung cancer, particularly in gefitinib-resistant cells. Moreover, in these cells, *H19* is packaged into exosomes and secreted in the extracellular medium, to be then taken up by recipient cells and promote their gefitinib resistance [41].

Concerning the regulation of CSCs, it has been shown that colorectal cancer cells treated with conditioned medium derived from CAFs present an increase of sphere propagating capacity, cell viability, and activation of the Wnt/ $\beta$ -catenin pathway. More importantly, *H19* expression was found in CAFs-derived exosomes: this demonstrates the transport of *H19* from cells to others through exosomes [85]. In other models such as liver cancer, exosomes isolated from CD90+ cells promoted angiogenic phenotype and cell adhesion. CD90+ liver cancer cells are described as cancer stem cell-like, characterized with aggressive and metastatic phenotype. Further analysis of exosomes content showed an enrichment in *H19*, and that *H19* plays a major role in exosome-mediated phenotype of endothelial cells [99].

More importantly, it has been shown for bladder cancer diagnosis and prognosis that the concentration of circulating *H19* was significantly higher in serum exosomes than in exosomes-depleted supernatants in serum or tissue samples. Moreover, exosomes *H19* level was significantly increased in serum of bladder cancer patients when compared to healthy people or benign disease patients. Exosomes *H19* level was also correlated with poor survival. The detection of serum exosomal *H19* could thus be used as a new non-invasive diagnostic and prognostic biomarker for bladder cancer patients [100]. Combined with the proof of CSC regulation by *H19*, this highlights the importance of exosomal transportation of *H19* within the tumor.

## 7. Discussion

Both *H19* and *H19*-derived miR-675 are overexpressed in human bone marrow mesenchymal SCs. In this model, the downregulation of *H19* and miR-675 is correlated with the upregulation of IGFR1 (insulin-like growth factor receptor type 1) during neural differentiation [101]. miR-675 action in SCs is transposable in cancer as our team showed that miR-675 expression is associated with that of stem cell marker genes and that this miR is able to enhance stem-like phenotypes such as sphere-forming capacity [53]. From a clinical point of view, plasma levels of *H19* have been highlighted as predictive markers for breast, stomach, and lung cancers, but also as a way to follow the evolution of cancers [102,103,104]. Interestingly, the clinically approved medicine aspirin (acetylsalicylic acid) is able to inhibit *H19* expression and so repress expression of Oct4 and c-Myc in breast CSCs [69]. Similarly, *H19* is overexpressed in papillary thyroid carcinoma cells through estradiol (E2); *H19* overexpression is associated with increased stemness-related factors expression, increased

ADLH+ population, and sphere forming capacity as well as enhanced tumor growth. In this model, aspirin attenuates E2-induced CSCs-like characteristics through decreasing both *H19* and ER $\beta$  expression.

The accumulated data demonstrating the role of *H19* and more recent findings of the involvement of miR-675 in CSC regulation complexify the regulatory network of CSCs (**Figure 4**). Further studies are warranted to verify if *H19* and miR-675 could be used as new markers of CSCs and therapeutic targets in the medical care of patients.

### Funding

This work was supported by INSERM and grants from “Cancéropôle Nord-Ouest (2017)” and “Ligue contre le cancer (2018)”. CL and EP were supported by doctoral fellowships from the University of Lille.

### Acknowledgments

The authors thank the members of laboratory for helpful discussion.

### Conflicts of Interest

The authors declare no conflict of interests.

### Abbreviations

ADT	Androgen deprivation therapy
ALDH	Aldehyde dehydrogenase
BMP	Bone morphogenetic protein
CAF	Cancer-associated fibroblasts
CSC	Cancer stem cell
CUDR	Cancer up-regulated drug resistant
DMR	Differentially methylated region
EGFR	Epidermal growth factor receptor
EMT	Epidermal-to-mesenchymal transition
ER $\beta$	Estrogen receptor $\beta$
GST- $\pi$	Glutathione S-transferase- $\pi$
HDAC	Histone deacetylase
HIF-1 $\alpha$	Hypoxia-inducible factor 1 alpha
HMGA2	High mobility group AT-hook 2
HSC	Hematopoietic stem cells

IGF1R	Insulin-like growth factor 1 receptor
IGF2	Insulin-like growth factor 2
IPS	Induced-pluripotent cells
KRAS	V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
LncRNA	Long non-coding RNA
MDR1	Multidrug resistance 1
miRNA	MicroRNA
PDK1	Pyruvate dehydrogenase kinase 1
PRC2	Polycomb repressive complex 2
PTEN	Phosphatase and tensin homolog
RB	Retinoblastoma protein
ROS	Reactive oxygen species
RUNX1	Runt-related transcription factor 1
SC	Stem cell
TNM	Tumor node metastasis

## References

1. Sugihara, E.; Saya, H. Complexity of cancer stem cells. *Int. J. Cancer* **2013**, *132*, 1249–1259.
2. Liu, X.; Fan, D. The epithelial-mesenchymal transition and cancer stem cells: Functional and mechanistic links. *Curr. Pharm. Des.* **2015**, *21*, 1279–1291.
3. Mani, S.A.; Guo, W.; Liao, M.-J.; Eaton, E.N.; Ayyanan, A.; Zhou, A.Y.; Brooks, M.; Reinhard, F.; Zhang, C.C.; Shipitsin, M.; et al. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell* **2008**, *133*, 704–715.
4. Ye, X.; Tam, W.L.; Shibue, T.; Kaygusuz, Y.; Reinhardt, F.; Ng Eaton, E.; Weinberg, R.A. Distinct EMT programs control normal mammary stem cells and tumour-initiating cells. *Nature* **2015**, *525*, 256–260.
5. Chaffer, C.L.; Marjanovic, N.D.; Lee, T.; Bell, G.; Kleer, C.G.; Reinhardt, F.; D'Alessio, A.C.; Young, R.A.; Weinberg, R.A. Poised chromatin at the ZEB1 promoter enables breast cancer cell plasticity and enhances tumorigenicity. *Cell* **2013**, *154*, 61–74.
6. Sciacovelli, M.; Frezza, C. Metabolic reprogramming and epithelial-to-mesenchymal transition in cancer. *FEBS J.* **2017**, *284*, 3132–3144.
7. Kreso, A.; Dick, J.E. Evolution of the cancer stem cell model. *Cell Stem Cell* **2014**, *14*, 275–291.



8. Eun, K.; Ham, S.W.; Kim, H. Cancer stem cell heterogeneity: Origin and new perspectives on CSC targeting. *BMB Rep.* **2017**, *50*, 117–125.
9. Hwang, J.W.; Desterke, C.; Féraud, O.; Richard, S.; Ferlicot, S.; Verkarre, V.; Patard, J.J.; Loisel-Duwattez, J.; Foudi, A.; Griscelli, F.; et al. iPSC-Derived Embryoid Bodies as Models of c-Met-Mutated Hereditary Papillary Renal Cell Carcinoma. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*.
10. Chen, X.; Liao, R.; Li, D.; Sun, J. Induced cancer stem cells generated by radiochemotherapy and their therapeutic implications. *Oncotarget* **2017**, *8*, 17301–17312.
11. Mukherjee, P.; Gupta, A.; Chattopadhyay, D.; Chatterji, U. Modulation of SOX2 expression delineates an end-point for paclitaxel-effectiveness in breast cancer stem cells. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 9170.
12. Lagadec, C.; Vlashi, E.; Donna, L.D.; Dekmezian, C.; Pajonk, F. Radiation-induced reprogramming of breast cancer cells. *Stem Cells* **2012**, *30*, 833–844.
13. Counter, C.M.; Avilion, A.A.; LeFeuvre, C.E.; Stewart, N.G.; Greider, C.W.; Harley, C.B.; Bacchetti, S. Telomere shortening associated with chromosome instability is arrested in immortal cells which express telomerase activity. *EMBO J.* **1992**, *11*, 1921–1929.
14. Kim, N.; Piatyszek, M.; Prowse, K.; Harley, C.; West, M.; Ho, P.; Coviello, G.; Wright, W.; Weinrich, S.; Shay, J. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* **1994**, *266*, 2011–2015.
15. Chen, S.; Zhu, J.; Wang, F.; Guan, Z.; Ge, Y.; Yang, X.; Cai, J. LncRNAs and their role in cancer stem cells. *Oncotarget* **2017**, *8*, 110685–110692.
16. Rasmussen, T.P. Parallels between artificial reprogramming and the biogenesis of cancer stem cells: Involvement of lncRNAs. *Semin. Cancer Biol.* **2019**, *57*, 36–44.
17. Khan, A.Q.; Ahmed, E.I.; Elareer, N.R.; Junejo, K.; Steinhoff, M.; Uddin, S. Role of miRNA-Regulated Cancer Stem Cells in the Pathogenesis of Human Malignancies. *Cells* **2019**, *8*.
18. Kapranov, P.; Cheng, J.; Dike, S.; Nix, D.A.; Dutttagupta, R.; Willingham, A.T.; Stadler, P.F.; Hertel, J.; Hackermüller, J.; Hofacker, I.L.; et al. RNA Maps Reveal New RNA Classes and a Possible Function for Pervasive Transcription. *Science* **2007**, *316*, 1484–1488.
19. Qu, H.; Fang, X. A Brief Review on the Human Encyclopedia of DNA Elements (ENCODE) Project. *Genom. Proteom. Bioinform.* **2013**, *11*, 135–141.
20. The ENCODE Project Consortium Identification and analysis of functional elements in 1% of the human genome by the ENCODE pilot project. *Nature* **2007**, *447*, 799–816.
21. Hon, C.-C.; Ramilowski, J.A.; Harshbarger, J.; Bertin, N.; Rackham, O.J.L.; Gough, J.; Denisenko, E.; Schmeier, S.; Poulsen, T.M.; Severin, J.; et al. An atlas of human long non-coding RNAs with accurate 5' ends. *Nature* **2017**, *543*, 199–204.

22. Wu, H.; Yang, L.; Chen, L.-L. The Diversity of Long Noncoding RNAs and Their Generation. *Trends Genet.* **2017**, *33*, 540–552.
23. Quinn, J.J.; Chang, H.Y. Unique features of long non-coding RNA biogenesis and function. *Nat. Rev. Genet.* **2016**, *17*, 47–62.
24. Luo, Q.; Chen, Y. Long noncoding RNAs and Alzheimer's disease. *Clin. Investig. Aging* **2016**, *11*, 867–872.
25. Huang, X.; Luo, Y.; Mao, Y.; Ji, J. The link between long noncoding RNAs and depression. *Prog. Neuro-Psychopharmacol. Biol. Psychiatry* **2017**, *73*, 73–78.
26. Mirza, A.H.; Kaur, S.; Pociot, F. Long non-coding RNAs as novel players in  $\beta$  cell function and type 1 diabetes. *Hum. Genom.* **2017**, *11*.
27. Bhan, A.; Soleimani, M.; Mandal, S.S. Long Noncoding RNA and Cancer: A New Paradigm. *Cancer Res.* **2017**, *77*, 3965–3981.
28. Bartolomei, M.S.; Zemel, S.; Tilghman, S.M. Parental imprinting of the mouse H19 gene. *Nature* **1991**, *351*, 153.
29. Brannan, C.I.; Dees, E.C.; Ingram, R.S.; Tilghman, S.M. The product of the H19 gene may function as an RNA. *Mol. Cell. Biol.* **1990**, *10*, 28–36.
30. Gabory, A.; Ripoché, M.-A.; Digarcher, A.L.; Watrin, F.; Ziyat, A.; Forné, T.; Jammes, H.; Ainscough, J.F.X.; Surani, M.A.; Journot, L.; et al. H19 acts as a trans regulator of the imprinted gene network controlling growth in mice. *Development* **2009**, *136*, 3413–3421.
31. Zhou, J.; Xu, J.; Zhang, L.; Liu, S.; Ma, Y.; Wen, X.; Hao, J.; Li, Z.; Ni, Y.; Li, X.; et al. Combined Single-Cell Profiling of lncRNAs and Functional Screening Reveals that H19 Is Pivotal for Embryonic Hematopoietic Stem Cell Development. *Cell Stem Cell* **2019**, *24*, 285–298.e5.
32. Venkatraman, A.; He, X.C.; Thorvaldsen, J.L.; Sugimura, R.; Perry, J.M.; Tao, F.; Zhao, M.; Christenson, M.K.; Sanchez, R.; Yu, J.Y.; et al. Maternal-imprinting at H19-Igf2 locus maintains adult hematopoietic stem cell quiescence. *Nature* **2013**, *500*, 345–349.
33. Bauderlique-Le Roy, H.; Vennin, C.; Brocqueville, G.; Spruyt, N.; Adriaenssens, E.; Bourette, R.P. Enrichment of Human Stem-Like Prostate Cells with s-SHIP Promoter Activity Uncovers a Role in Stemness for the Long Noncoding RNA H19. *Stem Cells Dev.* **2015**, *24*, 1252–1262.
34. Huang, Y.; Zheng, Y.; Jin, C.; Li, X.; Jia, L.; Li, W. Long Non-coding RNA H19 Inhibits Adipocyte Differentiation of Bone Marrow Mesenchymal Stem Cells through Epigenetic Modulation of Histone Deacetylases. *Sci. Rep.* **2016**, *6*.
35. Lecerf, C.; Le Bourhis, X.; Adriaenssens, E. The long non-coding RNA H19: An active player with multiple facets to sustain the hallmarks of cancer. *Cell. Mol. Life Sci.* **2019**, *76*, 4673–4687.

36. Saito, K.; Kawakami, K.; Matsumoto, I.; Oda, M.; Watanabe, G.; Minamoto, T. Long Interspersed Nuclear Element 1 Hypomethylation Is a Marker of Poor Prognosis in Stage IA Non-Small Cell Lung Cancer. *Clin. Cancer Res.* **2010**, *16*, 2418–2426.
37. Pu, H.; Zheng, Q.; Li, H.; Wu, M.; An, J.; Gui, X.; Li, T.; Lu, D. CUDR promotes liver cancer stem cell growth through upregulating TERT and C-Myc. *Oncotarget* **2015**, *6*, 40775–40798.
38. Berteaux, N.; Lottin, S.; Monté, D.; Pinte, S.; Quatannens, B.; Coll, J.; Hondermarck, H.; Curgy, J.-J.; Dugimont, T.; Adriaenssens, E. H19 mRNA-like Noncoding RNA Promotes Breast Cancer Cell Proliferation through Positive Control by E2F1. *J. Biol. Chem.* **2005**, *280*, 29625–29636.
39. Yang, F.; Bi, J.; Xue, X.; Zheng, L.; Zhi, K.; Hua, J.; Fang, G. Up-regulated long non-coding RNA H19 contributes to proliferation of gastric cancer cells. *FEBS J.* **2012**, *279*, 3159–3165.
40. Sun, Z.; Zhang, C.; Wang, T.; Shi, P.; Tian, X.; Guo, Y. Correlation between long non-coding RNAs (lncRNAs) H19 expression and trastuzumab resistance in breast cancer. *J. Cancer Res.* **2019**, *15*, 933–940.
41. Lei, Y.; Guo, W.; Chen, B.; Chen, L.; Gong, J.; Li, W. Tumor-released lncRNA H19 promotes gefitinib resistance via packaging into exosomes in non-small cell lung cancer. *Oncol. Rep.* **2018**, *40*, 3438–3446.
42. Pan, Y.; Zhang, Y.; Liu, W.; Huang, Y.; Shen, X.; Jing, R.; Pu, J.; Wang, X.; Ju, S.; Cong, H.; et al. lncRNA H19 overexpression induces bortezomib resistance in multiple myeloma by targeting MCL-1 via miR-29b-3p. *Cell Death Dis.* **2019**, *10*.
43. Jia, P.; Cai, H.; Liu, X.; Chen, J.; Ma, J.; Wang, P.; Liu, Y.; Zheng, J.; Xue, Y. Long non-coding RNA H19 regulates glioma angiogenesis and the biological behavior of glioma-associated endothelial cells by inhibiting microRNA-29a. *Cancer Lett.* **2016**, *381*, 359–369.
44. Wang, W.-T.; Ye, H.; Wei, P.-P.; Han, B.-W.; He, B.; Chen, Z.-H.; Chen, Y.-Q. lncRNAs H19 and HULC, activated by oxidative stress, promote cell migration and invasion in cholangiocarcinoma through a ceRNA manner. *J. Hematol. Oncol.* **2016**, *9*.
45. Sun, J.; Lian, M.; Ma, H.; Wang, R.; Ma, Z.; Wang, H.; Zhai, J.; Meng, L.; Feng, L.; Bai, Y.; et al. Competing endogenous RNA network analysis of CD274, IL-10 and FOXP3 co-expression in laryngeal squamous cell carcinoma. *Mol. Med. Rep.* **2018**, *17*, 3859–3869.
46. Ma, L.; Tian, X.; Wang, F.; Zhang, Z.; Du, C.; Xie, X.; Kornmann, M.; Yang, Y. The long noncoding RNA H19 promotes cell proliferation via E2F-1 in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Biol. Ther.* **2016**, *17*, 1051–1061.
47. Luo, M.; Li, Z.; Wang, W.; Zeng, Y.; Liu, Z.; Qiu, J. Long non-coding RNA H19 increases bladder cancer metastasis by associating with EZH2 and inhibiting E-cadherin expression. *Cancer Lett.* **2013**, *333*, 213–221.

48. Kallen, A.N.; Zhou, X.-B.; Xu, J.; Qiao, C.; Ma, J.; Yan, L.; Lu, L.; Liu, C.; Yi, J.-S.; Zhang, H.; et al. The Imprinted H19 lncRNA Antagonizes Let-7 MicroRNAs. *Mol. Cell* **2013**, *52*.
49. Cai, X.; Cullen, B.R. The imprinted H19 noncoding RNA is a primary microRNA precursor. *RNA* **2007**, *13*, 313–316.
50. Liu, G.; Xiang, T.; Wu, Q.-F.; Wang, W.-X. Long Noncoding RNA H19-Derived miR-675 Enhances Proliferation and Invasion via RUNX1 in Gastric Cancer Cells. *Oncol. Res. Featur. Preclin. Clin. Cancer Ther.* **2016**, *23*, 99–107.
51. Tsang, W.P.; Ng, E.K.O.; Ng, S.S.M.; Jin, H.; Yu, J.; Sung, J.J.Y.; Kwok, T.T. Oncofetal H19-derived miR-675 regulates tumor suppressor RB in human colorectal cancer. *Carcinogenesis* **2010**, *31*, 350–358.
52. Hernandez, J.M.; Elahi, A.; Clark, C.W.; Wang, J.; Humphries, L.A.; Centeno, B.; Bloom, G.; Fuchs, B.C.; Yeatman, T.; Shibata, D. miR-675 Mediates Downregulation of Twist1 and Rb in AFP-Secreting Hepatocellular Carcinoma. *Ann. Surg. Oncol.* **2013**, *20*, 625–635.
53. Peperstraete, E.; Lecerf, C.; Collette, J.; Vennin, C.; Raby, L.; Völkel, P.; Angrand, P.-O.; Winter, M.; Bertucci, F.; Finetti, P.; et al. Enhancement of Breast Cancer Cell Aggressiveness by lncRNA H19 and its Mir-675 Derivative: Insight into Shared and Different Actions. *Cancers* **2020**, *12*, 1730.
54. Morrison, S.J.; Kimble, J. Asymmetric and symmetric stem-cell divisions in development and cancer. *Nature* **2006**, *441*, 1068–1074.
55. Wang, M.; Li, Y.; Xiao, G.-D.; Zheng, X.-Q.; Wang, J.-C.; Xu, C.-W.; Qin, S.; Ren, H.; Tang, S.-C.; Sun, X. H19 regulation of oestrogen induction of symmetric division is achieved by antagonizing Let-7c in breast cancer stem-like cells. *Cell Prolif.* **2019**, *52*, e12534.
56. Adriaenssens, E.; Lottin, S.; Dugimont, T.; Fauquette, W.; Coll, J.; Dupouy, J.P.; Boilly, B.; Curgy, J.J. Steroid hormones modulate H19 gene expression in both mammary gland and uterus. *Oncogene* **1999**, *18*, 4460–4473.
57. Li, M.; Chai, H.-F.; Peng, F.; Meng, Y.-T.; Zhang, L.-Z.; Zhang, L.; Zou, H.; Liang, Q.-L.; Li, M.-M.; Mao, K.-G.; et al. Estrogen receptor  $\beta$  upregulated by lncRNA-H19 to promote cancer stem-like properties in papillary thyroid carcinoma. *Cell Death Dis.* **2018**, *9*.
58. Balzeau, J.; Menezes, M.R.; Cao, S.; Hagan, J.P. The LIN28/let-7 Pathway in Cancer. *Front. Genet.* **2017**, *8*, 31.
59. Liang, R.; Li, Y.; Wang, M.; Tang, S.-C.; Xiao, G.; Sun, X.; Li, G.; Du, N.; Liu, D.; Ren, H. MiR-146a promotes the asymmetric division and inhibits the self-renewal ability of breast cancer stem-like cells via indirect upregulation of Let-7. *Cell Cycle* **2018**, *17*, 1445–1456.

60. Insinga, A.; Cicalese, A.; Faretta, M.; Gallo, B.; Albano, L.; Ronzoni, S.; Furia, L.; Viale, A.; Pelicci, P.G. DNA damage in stem cells activates p21, inhibits p53, and induces symmetric self-renewing divisions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2013**, *110*, 3931–3936.
61. Cicalese, A.; Bonizzi, G.; Pasi, C.E.; Faretta, M.; Ronzoni, S.; Giulini, B.; Brisken, C.; Minucci, S.; Di Fiore, P.P.; Pelicci, P.G. The Tumor Suppressor p53 Regulates Polarity of Self-Renewing Divisions in Mammary Stem Cells. *Cell* **2009**, *138*, 1083–1095.
62. Rube, C.E.; Fricke, A.; Widmann, T.A.; Fürst, T.; Madry, H.; Pfreundschuh, M.; Rube, C. Accumulation of DNA Damage in Hematopoietic Stem and Progenitor Cells during Human Aging. *PLoS ONE* **2011**, *6*, e17487.
63. Takahashi, K.; Yamanaka, S. Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell* **2006**, *126*, 663–676.
64. Yi, L.; Lu, C.; Hu, W.; Sun, Y.; Levine, A.J. Multiple roles of p53-related pathways in somatic cell reprogramming and stem cell differentiation. *Cancer Res.* **2012**, *72*, 5635–5645.
65. Bigarella, C.L.; Liang, R.; Ghaffari, S. Stem cells and the impact of ROS signaling. *Development* **2014**, *141*, 4206–4218.
66. Singh, N.; Padi, S.K.R.; Bearss, J.J.; Pandey, R.; Okumura, K.; Beltran, H.; Song, J.H.; Kraft, A.S.; Olive, V. PIM protein kinases regulate the level of the long noncoding RNA H19 to control stem cell gene transcription and modulate tumor growth. *Mol. Oncol.* **2020**.
67. Ren, J.; Fu, J.; Ma, T.; Yan, B.; Gao, R.; An, Z.; Wang, D. LncRNA H19-elevated LIN28B promotes lung cancer progression through sequestering miR-196b. *Cell Cycle* **2018**, *17*, 1372–1380.
68. Ye, Y.; Guo, J.; Xiao, P.; Ning, J.; Zhang, R.; Liu, P.; Yu, W.; Xu, L.; Zhao, Y.; Yu, J. Macrophages-induced long noncoding RNA H19 up-regulation triggers and activates the miR-193b/MAPK1 axis and promotes cell aggressiveness in hepatocellular carcinoma. *Cancer Lett.* **2020**, *469*, 310–322.
69. Peng, F.; Wang, J.-H.; Fan, W.-J.; Meng, Y.-T.; Li, M.-M.; Li, T.-T.; Cui, B.; Wang, H.-F.; Zhao, Y.; An, F.; et al. Glycolysis gatekeeper PDK1 reprograms breast cancer stem cells under hypoxia. *Oncogene* **2018**, *37*, 1062–1074.
70. Peng, F.; Li, T.-T.; Wang, K.-L.; Xiao, G.-Q.; Wang, J.-H.; Zhao, H.-D.; Kang, Z.-J.; Fan, W.-J.; Zhu, L.-L.; Li, M.; et al. H19/let-7/LIN28 reciprocal negative regulatory circuit promotes breast cancer stem cell maintenance. *Cell Death Dis.* **2017**, *8*, e2569.
71. Jiang, W.; Finniss, S.; Cazacu, S.; Xiang, C.; Brodie, Z.; Mikkelsen, T.; Poisson, L.; Shackelford, D.B.; Brodie, C. Repurposing phenformin for the targeting of glioma stem cells and the treatment of glioblastoma. *Oncotarget* **2016**, *7*, 56456–56470.

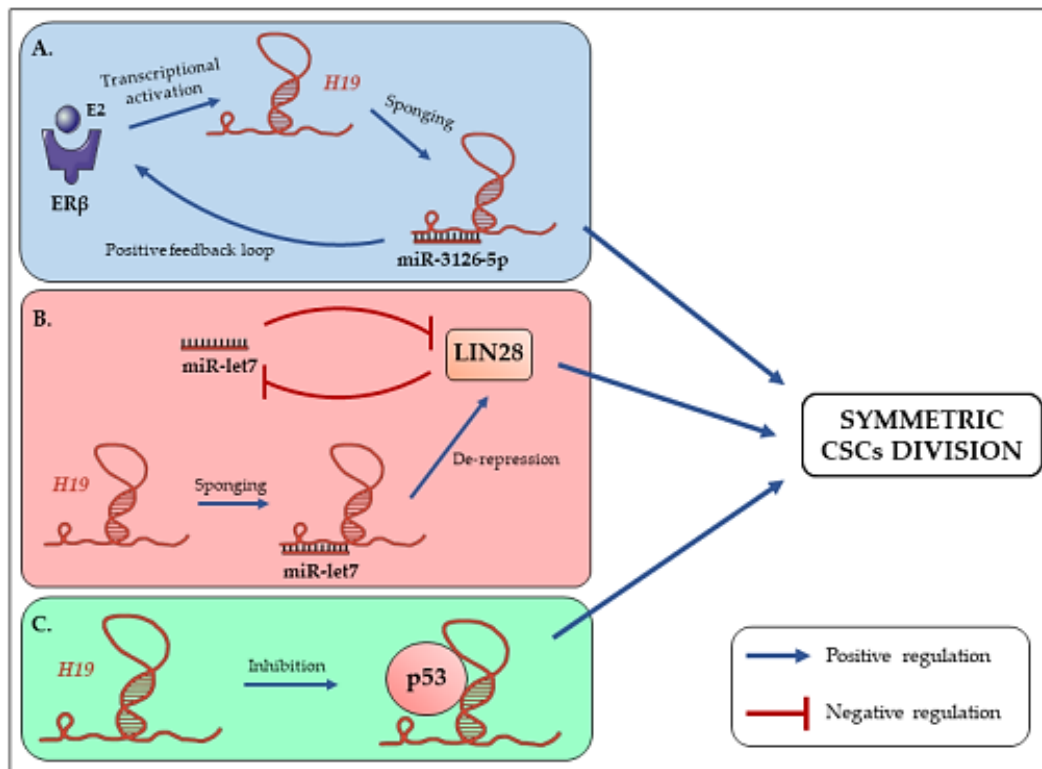
72. La Fleur, L.; Johansson, A.-C.; Roberg, K. A CD44<sup>high</sup>/EGFR<sup>low</sup> Subpopulation within Head and Neck Cancer Cell Lines Shows an Epithelial-Mesenchymal Transition Phenotype and Resistance to Treatment. *PLoS ONE* **2012**, e44071.
73. Morel, A.-P.; Lièvre, M.; Thomas, C.; Hinkal, G.; Ansieau, S.; Puisieux, A. Generation of breast cancer stem cells through epithelial-mesenchymal transition. *PLoS ONE* **2008**, *3*, e2888.
74. Adriaenssens, E.; Lottin, S.; Berteaux, N.; Hornez, L.; Fauquette, W.; Fafeur, V.; Peyrat, J.-P.; Le Bourhis, X.; Hondermarck, H.; Coll, J.; et al. Cross-Talk between Mesenchyme and Epithelium Increases H19 Gene Expression during Scattering and Morphogenesis of Epithelial Cells. *Exp. Cell Res.* **2002**, *275*, 215–229.
75. Phillips, T.M.; McBride, W.H.; Pajonk, F. The Response of CD24<sup>-</sup>/low /CD44<sup>+</sup> Breast Cancer–Initiating Cells to Radiation. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* **2006**, *98*, 1777–1785.
76. Li, X.; Lewis, M.T.; Huang, J.; Gutierrez, C.; Osborne, C.K.; Wu, M.-F.; Hilsenbeck, S.G.; Pavlick, A.; Zhang, X.; Chamness, G.C.; et al. Intrinsic Resistance of Tumorigenic Breast Cancer Cells to Chemotherapy. *JNCI J. Natl. Cancer Inst.* **2008**, *100*, 672–679.
77. Maugeri-Sacca, M.; Bartucci, M.; De Maria, R. DNA Damage Repair Pathways in Cancer Stem Cells. *Mol. Cancer Ther.* **2012**, *11*, 1627–1636.
78. Ginestier, C.; Hur, M.H.; Charafe-Jauffret, E.; Monville, F.; Dutcher, J.; Brown, M.; Jacquemier, J.; Viens, P.; Kleer, C.G.; Liu, S.; et al. ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome. *Cell Stem Cell* **2007**, *1*, 555–567.
79. Lagadec, C.; Vlashi, E.; Bhuta, S.; Lai, C.; Mischel, P.; Werner, M.; Henke, M.; Pajonk, F. Tumor cells with low proteasome subunit expression predict overall survival in head and neck cancer patients. *BMC Cancer* **2014**, *14*, 152.
80. Guo, G.; Kang, Q.; Chen, Q.; Chen, Z.; Wang, J.; Tan, L.; Chen, J.-L. High expression of long non-coding RNA H19 is required for efficient tumorigenesis induced by Bcr-Abl oncogene. *FEBS Lett.* **2014**, *588*, 1780–1786.
81. Zhu, Z.; Song, L.; He, J.; Sun, Y.; Liu, X.; Zou, X. Ectopic expressed long non-coding RNA H19 contributes to malignant cell behavior of ovarian cancer. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **2015**, *8*, 10082–10091.
82. Wang, Q.; Cheng, N.; Li, X.; Pan, H.; Li, C.; Ren, S.; Su, C.; Cai, W.; Zhao, C.; Zhang, L.; et al. Correlation of long non-coding RNA H19 expression with cisplatin-resistance and clinical outcome in lung adenocarcinoma. *Oncotarget* **2016**, *8*, 2558–2567.
83. Si, X.; Zang, R.; Zhang, E.; Liu, Y.; Shi, X.; Zhang, E.; Shao, L.; Li, A.; Yang, N.; Han, X.; et al. LncRNA H19 confers chemoresistance in ER $\alpha$ -positive breast cancer through epigenetic silencing of the pro-apoptotic gene BIK. *Oncotarget* **2016**, *7*, 81452–81462.

84. Li, W.; Jiang, P.; Sun, X.; Xu, S.; Ma, X.; Zhan, R. Suppressing H19 Modulates Tumorigenicity and Stemness in U251 and U87MG Glioma Cells. *Cell Mol. Neurobiol.* **2016**, *36*, 1219–1227.
85. Ren, J.; Ding, L.; Zhang, D.; Shi, G.; Xu, Q.; Shen, S.; Wang, Y.; Wang, T.; Hou, Y. Carcinoma-associated fibroblasts promote the stemness and chemoresistance of colorectal cancer by transferring exosomal lncRNA H19. *Theranostics* **2018**, *8*, 3932–3948.
86. Ding, K.; Liao, Y.; Gong, D.; Zhao, X.; Ji, W. Effect of long non-coding RNA H19 on oxidative stress and chemotherapy resistance of CD133+ cancer stem cells via the MAPK/ERK signaling pathway in hepatocellular carcinoma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2018**, *502*, 194–201.
87. Tsang, W.P.; Wong, T.W.L.; Cheung, A.H.H.; Co, C.N.N.; Kwok, T.T. Induction of drug resistance and transformation in human cancer cells by the noncoding RNA CUDR. *RNA* **2007**, *13*, 890–898.
88. El Hajj, J.; Nguyen, E.; Liu, Q.; Bouyer, C.; Adriaenssens, E.; Hilal, G.; Ségal-Bendirdjian, E. Telomerase regulation by the long non-coding RNA H19 in human acute promyelocytic leukemia cells. *Mol. Cancer* **2018**, *17*.
89. Skog, J.; Wurdinger, T.; van Rijn, S.; Meijer, D.; Gainche, L.; Sena-Esteves, M.; Curry, W.T.; Carter, R.S.; Krichevsky, A.M.; Breakefield, X.O. Glioblastoma microvesicles transport RNA and protein that promote tumor growth and provide diagnostic biomarkers. *Nat. Cell Biol.* **2008**, *10*, 1470–1476.
90. Hessvik, N.P.; Llorente, A. Current knowledge on exosome biogenesis and release. *Cell. Mol. Life Sci.* **2018**, *75*, 193–208.
91. Peinado, H.; Alečković, M.; Lavotshkin, S.; Matei, I.; Costa-Silva, B.; Moreno-Bueno, G.; Hergueta-Redondo, M.; Williams, C.; García-Santos, G.; Nitadori-Hoshino, A.; et al. Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET. *Nat. Med.* **2012**, *18*, 883–891.
92. Costa-Silva, B.; Aiello, N.M.; Ocean, A.J.; Singh, S.; Zhang, H.; Thakur, B.K.; Becker, A.; Hoshino, A.; Mark, M.T.; Molina, H.; et al. Pancreatic cancer exosomes initiate pre-metastatic niche formation in the liver. *Nat. Cell Biol.* **2015**, *17*, 816–826.
93. Hoshino, A.; Costa-Silva, B.; Shen, T.-L.; Rodrigues, G.; Hashimoto, A.; Tesic Mark, M.; Molina, H.; Kohsaka, S.; Di Giannatale, A.; Ceder, S.; et al. Tumour exosome integrins determine organotropic metastasis. *Nature* **2015**, *527*, 329–335.
94. Melo, S.A.; Sugimoto, H.; O’Connell, J.T.; Kato, N.; Villanueva, A.; Vidal, A.; Qiu, L.; Vitkin, E.; Perelman, L.T.; Melo, C.A.; et al. Cancer Exosomes Perform Cell-Independent MicroRNA Biogenesis and Promote Tumorigenesis. *Cancer Cell* **2014**, *26*, 707–721.

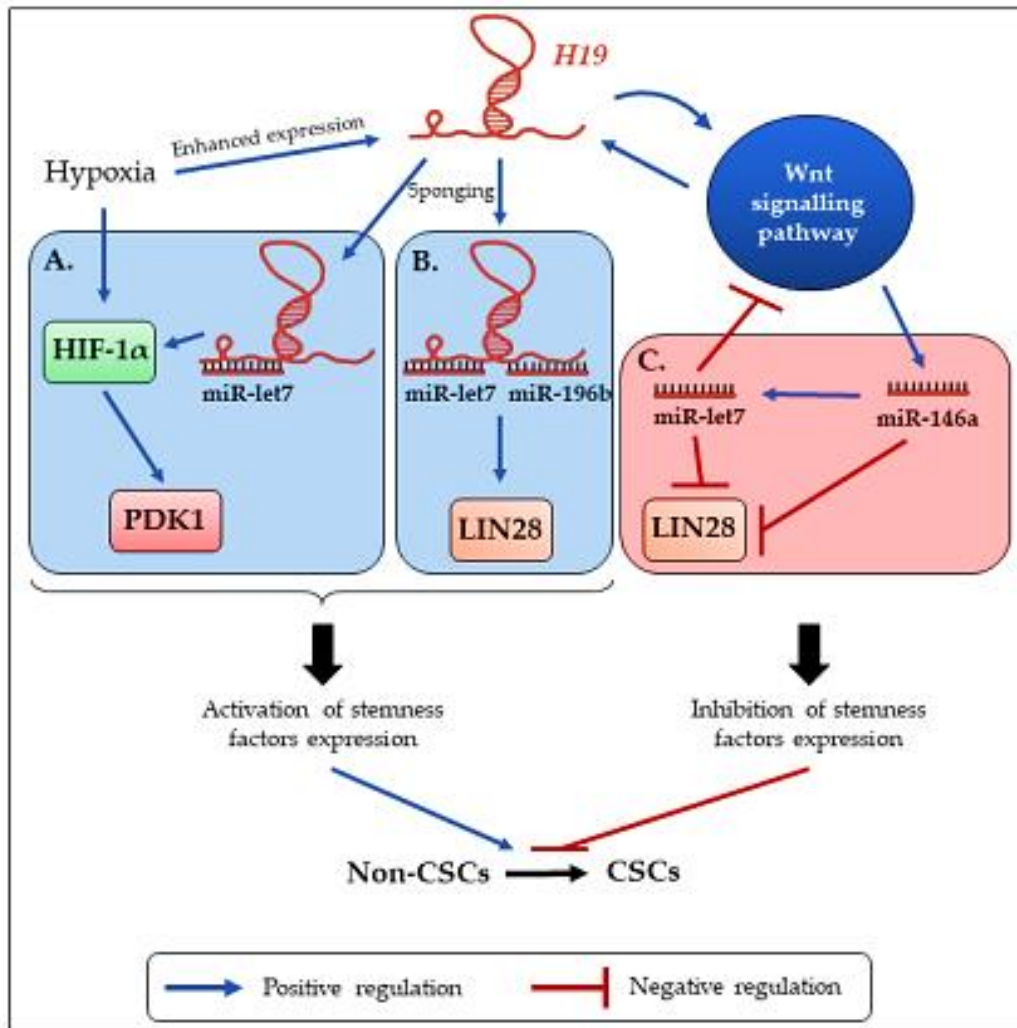


95. Sun, Z.; Yang, S.; Zhou, Q.; Wang, G.; Song, J.; Li, Z.; Zhang, Z.; Xu, J.; Xia, K.; Chang, Y.; et al. Emerging role of exosome-derived long non-coding RNAs in tumor microenvironment. *Mol. Cancer* **2018**, *17*.
96. Chen, Y.; Ding, H.; Wei, M.; Zha, W.; Guan, S.; Liu, N.; Li, Y.; Tan, Y.; Wang, Y.; Wu, F. MSC-Secreted Exosomal H19 Promotes Trophoblast Cell Invasion and Migration by Downregulating let-7b and Upregulating FOXO1. *Mol. Nucleic Acids* **2019**, *19*, 1237–1249.
97. Li, B.; Luan, S.; Chen, J.; Zhou, Y.; Wang, T.; Li, Z.; Fu, Y.; Zhai, A.; Bi, C. The MSC-Derived Exosomal lncRNA H19 Promotes Wound Healing in Diabetic Foot Ulcers by Upregulating PTEN via MicroRNA-152-3p. *Mol. Nucleic Acids* **2019**, *19*, 814–826.
98. Liu, R.; Li, X.; Zhu, W.; Wang, Y.; Zhao, D.; Wang, X.; Gurley, E.C.; Liang, G.; Chen, W.; Lai, G.; et al. Cholangiocyte-Derived Exosomal Long Noncoding RNA H19 Promotes Hepatic Stellate Cell Activation and Cholestatic Liver Fibrosis. *Hepatology* **2019**, *70*, 1317–1335.
99. Conigliaro, A.; Costa, V.; Lo Dico, A.; Saieva, L.; Buccheri, S.; Dieli, F.; Manno, M.; Raccosta, S.; Mancone, C.; Tripodi, M.; et al. CD90+ liver cancer cells modulate endothelial cell phenotype through the release of exosomes containing H19 lncRNA. *Mol. Cancer* **2015**, *14*.
100. Wang, J.; Yang, K.; Yuan, W.; Gao, Z. Determination of Serum Exosomal H19 as a Noninvasive Biomarker for Bladder Cancer Diagnosis and Prognosis. *Med. Sci. Monit.* **2018**, *24*, 9307–9316.
101. Farzi-Molan, A.; Babashah, S.; Bakhshinejad, B.; Atashi, A.; Taha, M.F. Down-regulation of the non-coding RNA H19 and its derived miR-675 is concomitant with up-regulation of insulin-like growth factor receptor type 1 during neural-like differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Cell Biol. Int.* **2018**, *42*, 940–948.
102. Zhang, K.; Luo, Z.; Zhang, Y.; Zhang, L.; Wu, L.; Liu, L.; Yang, J.; Song, X.; Liu, J. Circulating lncRNA H19 in plasma as a novel biomarker for breast cancer. *Cancer Biomark.* **2016**, *17*, 187–194.
103. Zhou, X.; Yin, C.; Dang, Y.; Ye, F.; Zhang, G. Identification of the long non-coding RNA H19 in plasma as a novel biomarker for diagnosis of gastric cancer. *Sci. Rep.* **2015**, *5*, 11516.
104. Luo, J.; Li, Q.; Pan, J.; Li, L.; Fang, L.; Zhang, Y. Expression level of long noncoding RNA H19 in plasma of patients with nonsmall cell lung cancer and its clinical significance. *J. Cancer Res.* **2018**, *14*, 860–863.

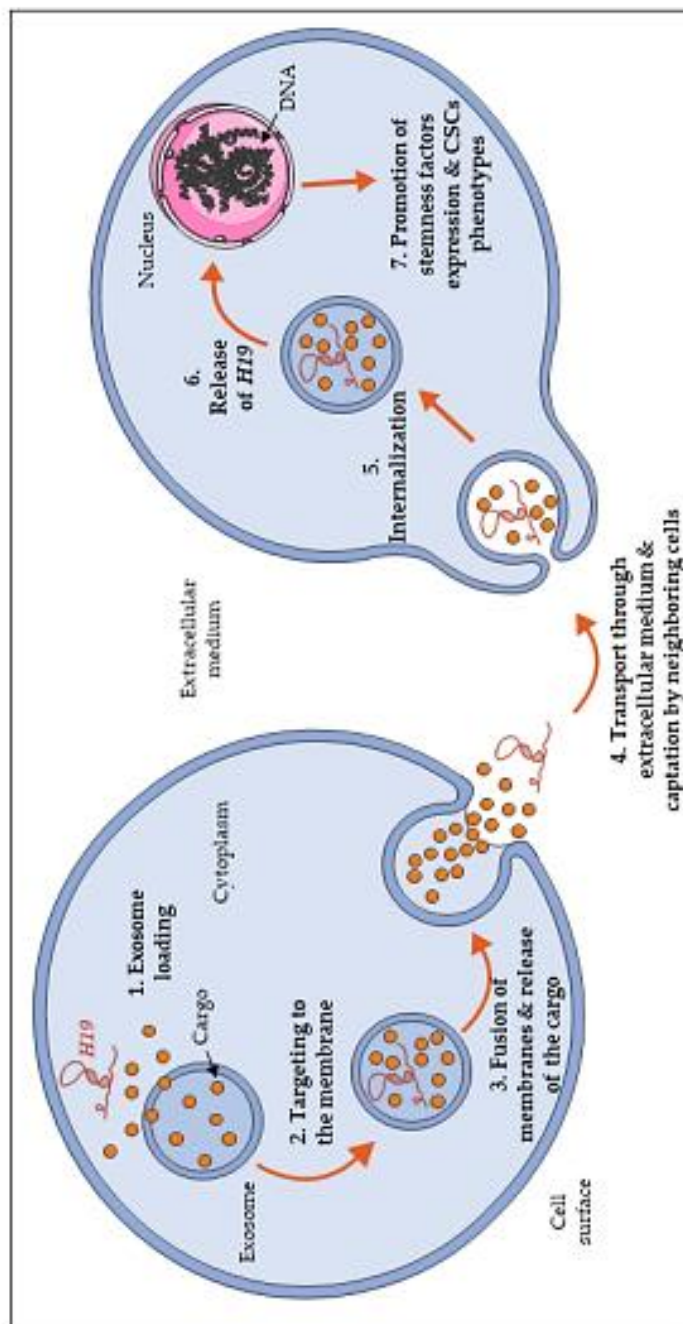




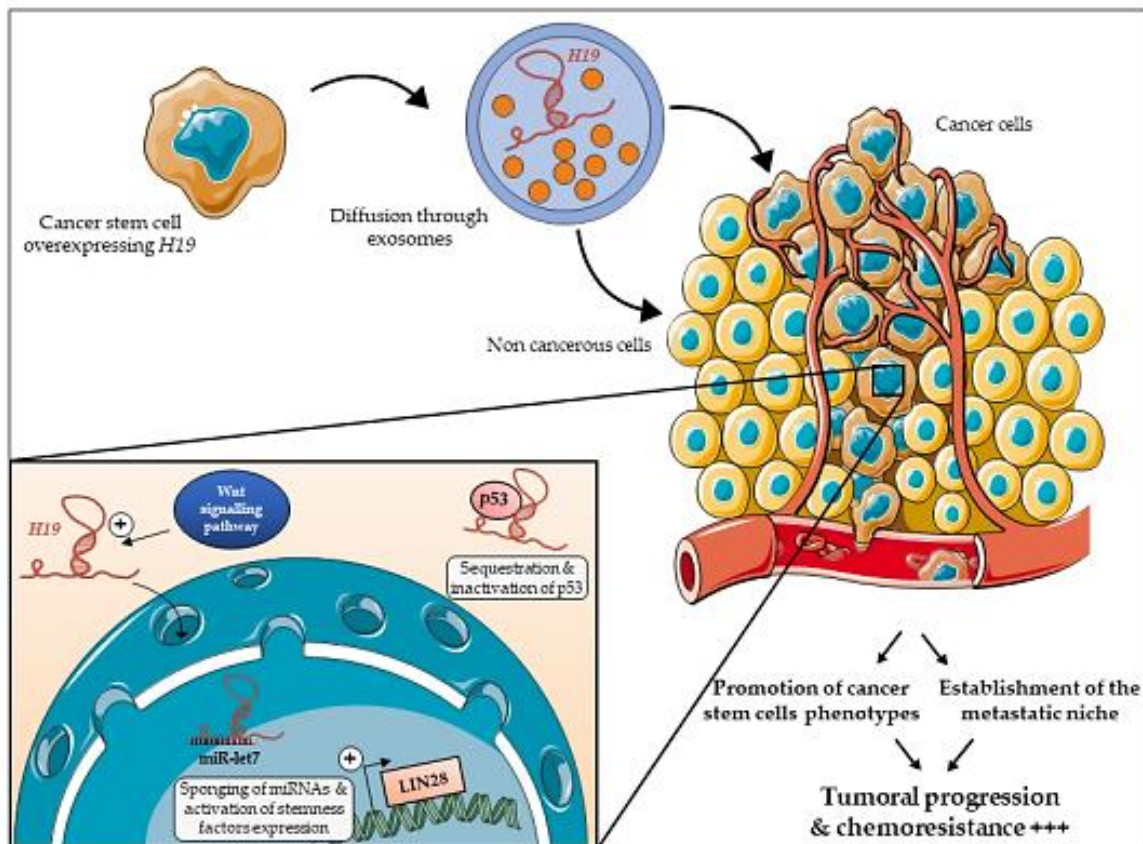
**Figure 1.** The long non-coding RNA *H19* promotes symmetric division of cancer stem cells (CSCs). (A) The activation of ERβ by the binding of its ligand (estradiol; E2) enhances *H19* expression, thus favoring miR-3126-5p sponging. *H19* can in turn promote ERβ to generate an activation loop [55,57]. (B) In breast CSCs, *H19* sponges let-7c and allows the de-repression of LIN28. The functional status and symmetric/asymmetric division of CSCs will thus be determined by the balance between *H19* and let-7 expressions [55,59]. (C) It has been shown that *H19* sequesters p53 to inhibit its activity and enhance gastric cancer cells proliferation [39]. Moreover, inactivation of p53 is associated with symmetric division of SCs [61]. We can thus hypothesize that *H19* could inactivate p53 to promote CSCs symmetric division.



**Figure 2.** The balance between *H19* and let-7 expression controls the reprogramming of non-CSCs into CSCs. (A) Under hypoxic conditions HIF-1 $\alpha$  expression is enhanced. Combined with the sponging of let-7 by *H19*, this leads to the enhanced expression of PDK1, which will in turn promote glycogenesis and expression of stemness phenotype [69]. (B) In breast and lung cancers, *H19* enhances the expression of the reprogramming factor LIN28 through the sponging of let-7 and miR-196b respectively [67,69]. (C) In breast cancer, the activation of the Wnt signaling pathway increases miR-146a production, which in turn promotes let-7 expression and so, the inhibition of reprogramming factors [55,59].



**Figure 3.** The long non-coding RNA *H19* disseminates into extracellular environment through exosomes, propagating its action in both normal and cancer cells.



**Figure 4.** The long non-coding RNA *H19* promotes cancer stem cells phenotypes. *H19* is expressed by cancer stem cells and is exported to the extracellular medium through exosomes [85]. *H19* is then captured and internalized by surrounding cells. Within those cells, *H19* can act in different ways: *H19* can be translocated into the nucleus where it sponges miRNAs such as let-7. This allows the expression of reprogramming factors and promotes stemness phenotypes [70]. In addition, *H19* can regulate the activity of factors such as p53 in order to promote symmetric division of CSCs [39,61]. Downstream, all these mechanisms will lead to the promotion of stem cells phenotype (symmetric division, reprogramming) in order to progress in the tumoral development and to reinforce CSCs' resistance to therapies. Illustrations of this figure are from Servier Medical Art (<https://smart.servier.com/>).