

UNIVERSITÉ DU DROIT ET DE LA SANTÉ – LILLE II

THÈSE DE DOCTORAT D'UNIVERSITÉ

pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DU DROIT ET DE LA SANTÉ – LILLE II

Discipline : Sciences de la Vie et de la Santé

Présentée par

Fatima Lahdaoui

**Régulation de l'expression de la mucine MUC4 par les miARN
et identification de nouveaux miARN dans le cancer du pancréas**

Thèse dirigée par le Docteur Isabelle Van Seuningen

Président : Professeur Pascal Pigny
Rapporteurs : Professeur Anne Couvelard
Docteur Laurent Bartholin
Examineurs : Professeur Emmanuelle Leteurtre
Docteur Isabelle Van Seuningen
Docteur Jérôme Torrisani

Je tiens à remercier Madame le Professeur Anne Couvelard et Monsieur le Docteur Laurent Bartholin d'avoir accepté d'être rapporteurs de cette thèse.

Je remercie également Madame le Professeur Emmanuelle Leteurtre, Monsieur le Professeur Pascal Pigny et Monsieur le Docteur Jérôme Torrisani, de me faire l'honneur de siéger dans ce jury.

J'exprime également toute ma reconnaissance à ma directrice de thèse Madame le Docteur Isabelle Van Seuningen.

Le travail présenté dans ce mémoire de thèse a été réalisé au sein du Centre de recherche Jean-Pierre Aubert, Unité de recherche UMR837 de l'Institut national de la santé et de la recherche médicale (Inserm), dirigé par Monsieur le Professeur Pierre Formstecher, plus particulièrement au sein de l'équipe 5, intitulée « Mucines, Différenciation et Cancérogenèse épithéliales », dirigée par Madame le Docteur Isabelle Van Seuningen, directrice de recherche.

Je remercie Monsieur le Pr Pierre Formstecher, directeur de l'U837 Inserm, pour m'avoir accueillie au sein du Centre de recherche Jean-Pierre Aubert et permis de réaliser ce travail de thèse.

Je remercie Madame le Dr Isabelle Van Seuningen, responsable de l'équipe 5 au sein du Centre de recherche, et tutrice de ce travail pour son accueil et son suivi de ce travail de thèse, la rigueur apportée, sa disponibilité et ses conseils qui m'ont beaucoup apportés.

Je remercie Mesdames les Docteurs Audrey Vincent et Florence Renaud de m'avoir fait bénéficier de leurs connaissances et guidé pour ce travail.

Je remercie Mesdames les Docteurs Marie-Pierre Buisine, responsable du secteur "Oncologie, Inflammation, Développement" du Centre de biologie et de pathologie de Lille, et Julie Leclerc pour leurs conseils en méthylation.

Je remercie Madame le Pr Emmanuelle Leteurtre pour avoir accepté de fournir les échantillons tissulaires issus de la tumorotheque.

Je remercie Monsieur le Pr Pascal Pigny, Messieurs les Docteurs Nicolas Jonckheere et Michaël Perrais pour leurs conseils et leurs remarques pertinentes.

Je remercie Madame Marie-Paule Ducourouble pour sa disponibilité et pour son aide précieuse.

Je remercie Mesdames Brigitte Hémon et Belinda Duchêne pour leurs conseils techniques et leur gentillesse.

J'adresse également mes remerciements à tous les membres de l'équipe 5, et plus particulièrement à Bélinda R., Audrey, Lucie, Flora, Catherine, Solange, Matthieu, François, Romain et les anciens ; Émilie, Johann et Nicolas S. pour leur gentillesse et leur bonne humeur.

Mes travaux de thèse ont fait l'objet de :

Article publié

miR-219-1-3p is a negative regulator of the mucin MUC4 expression and is a tumor suppressor in pancreatic cancer

Fatima Lahdaoui, Yannick Delpu, Audrey Vincent, Florence Renaud, Mathieu Messenger, Belinda Duchêne, Jérôme Torrisani, Emmanuelle Leteurtre, Christophe Mariette, Nicolas Jonckheere and Isabelle Van Seuningen

Oncogene, 2014, doi: 10.1038/onc.2014.11.

Article en soumission ou en rédaction

Galectin-3 regulates *MUC1* and *MUC4* expression: Evidence for a new role of galectin-3 in the control of mRNA stability

Lucie Coppin, Frédéric Frénois, Fatima Lahdaoui, Laurence Stechly, Evelyne Crème, Isabelle Van Seuningen, Nicole Porchet and Pascal Pigny

MUC4 membrane bound mucin mediates 5-fluoro-uracil and oxaliplatin resistance of human pancreatic cancer cells

Nicolas Skrypek, Fatima Lahdaoui, Romain Vasseur, Belinda Duchêne, Isabelle Van Seuningen and Nicolas Jonckheere

Communications orales

miR-219-1-3p is a negative regulator of the mucin MUC4 expression and is a tumor suppressor in pancreatic cancer cells

Fatima Lahdaoui, Yannick Delpu, Audrey Vincent, Florence Renaud, Mathieu Messenger, Belinda Duchêne, Jérôme Torrisani, Emmanuelle Leteurtre, Christophe Mariette, Nicolas Jonckheere and Isabelle Van Seuningen

5th PhD Student Day of the Research Center Jean-Pierre Aubert, Lille, France (Mars 2013)

miRNA negatively regulate MUC1 and MUC4 oncomucin expression and impact biological properties of pancreatic cancer cells

Nicolas Jonckheere, Fatima Lahdaoui, Solange Trehoux and Isabelle Van Seuningen

EuroCancer, Paris, France (Juin 2012)

miR-219-1-3p is a negative regulator of the mucin MUC4 expression and is a tumor suppressor in pancreatic cancer cells

Fatima Lahdaoui and Isabelle Van Seuningen

4th PhD Student Day of the Research Center Jean-Pierre Aubert, Lille, France (Avril 2012)

Regulation of mucine MUC4 expression by miR-219-1-3p

Fatima Lahdaoui, Nicolas Jonckheere and Isabelle Van Seuningen

Club d'Etude des Cellules Epithéliales Digestives (CECED), Grenoble, France (Mars 2012)

Regulation of mucine MUC4 expression by miR-219-1-3p. Identification of new miRNAs as therapeutic targets in pancreatic cancer

Fatima Lahdaoui and Isabelle Van Seuningen

Club Français du Pancréas (CFP), Strasbourg, France (Septembre 2011)

The MUC4 gene is regulated by miRNAs in pancreatic cancer cell lines

Fatima Lahdaoui and Isabelle Van Seuningen

Mucin meeting, Cambridge, United Kingdom (Juillet 2011)

The *MUC4* gene is regulated by miRNAs in pancreatic cancer cell lines

Fatima Lahdaoui and Isabelle Van Seuningen

3rd PhD Student Day of the Research Center Jean-Pierre Aubert, Lille, France (Avril 2011)

Regulation of mucine MUC4 expression by miR-219-1-3p. Identification of new miRNAs as therapeutic targets in pancreatic cancer

Fatima Lahdaoui and Isabelle Van Seuningen

Club d'Etude des Cellules Epithéliales Digestives (CECED), Nice, France (Mars 2011)

Communications par affiche

miR-219-1-3p is a negative regulator of the mucin MUC4 expression and is a tumor suppressor in pancreatic cancer

Fatima Lahdaoui, Yannick Delpu, Audrey Vincent, Florence Renaud, Mathieu Messenger, Belinda Duchêne, Jérôme Torrisani, Emmanuelle Leteurtre, Christophe Mariette, Nicolas Jonckheere and Isabelle Van Seuningen

Mucin meeting, Cambridge, United Kingdom (Juillet 2013)

miR-219-1-3p est un régulateur négatif de l'expression de MUC4 et un suppresseur de tumeur dans le cancer du pancréas

Fatima Lahdaoui, Yannick Delpu, Audrey Vincent, Florence Renaud, Mathieu Messenger, Belinda Duchêne, Jérôme Torrisani, Emmanuelle Leteurtre, Christophe Mariette, Nicolas Jonckheere and Isabelle Van Seuningen

6^{èmes} journées scientifiques du Cancéropôle Nord-Ouest (Mai 2013)

Galectin-3 regulates *MUC1* and *MUC4* expression: Evidence for a new role of galectin-3 in the control of mRNA stability

Lucie Coppin, Frédéric Frénois, Laurence Stechly, Fatima Lahdaoui, Evelyne Crème, Isabelle Van Seuningen, Nicole Porchet and Pascal Pigny

EMBO Meeting, Nice, France (Septembre 2012)

miR-219-1-3p is a negative regulator of the mucin MUC4 expression and is a tumor suppressor in pancreatic cancer cells

Fatima Lahdaoui, Yannick Delpu, Jérôme Torrisani, Nicolas Jonckheere and Isabelle Van Seuningen

12^{ème} Journée André VERBERT, Lille, France (Septembre 2012)

miR-219-1-3p is a negative regulator of the mucin MUC4 expression and is a tumor suppressor in pancreatic cancer cells

Fatima Lahdaoui, Nicolas Jonckheere and Isabelle Van Seuningen

Journée des Doctorants « Cancer », Lille, France (Juin 2012)

Résumé

La mucine MUC4 est un acteur important de la cancérogenèse pancréatique. Elle favorise la progression tumorale et son expression est associée à un mauvais pronostic. Il a également été montré l'implication de la mucine MUC4 dans la résistance aux chimiothérapies. L'ensemble de ces données souligne l'intérêt de la mucine MUC4 comme cible thérapeutique. De plus, sa néoexpression dès les stades précoces de la cancérogenèse pancréatique lui confère un rôle potentiel de marqueur précoce de la carcinogenèse. Les mécanismes moléculaires responsables de l'induction précoce de l'expression de MUC4 sont toutefois encore peu connus.

L'étude de la régulation de l'expression de la mucine MUC4 contribuerait donc mieux à comprendre son rôle dans la cancérogenèse. Ainsi, il a été montré que le gène *MUC4* est régulé *in vitro* par des mécanismes transcriptionnels et par des mécanismes épigénétiques de méthylation de l'ADN et des modifications post-traductionnelles des histones. En revanche, la régulation post-transcriptionnelle de l'expression de MUC4 notamment par les miARN est peu connue. Nos travaux ont pour but d'identifier les miARN dérégulés dans le cancer du pancréas et/ou ciblant potentiellement MUC4, de déterminer le(s) miARN inhibant l'expression de la protéine oncogénique MUC4 et l'impact de l'administration de ce(s) miARN dans la cancérogenèse pancréatique, et d'identifier les miARN impliqués dans la chimiorésistance médiée par MUC4 dans le cancer du pancréas.

Dans un premier temps, nous avons dressé le profil d'expression des miARN dans des lignées cellulaires pancréatiques humaines normales et cancéreuses par puces miARN. Nous avons pu mettre en évidence une signature d'expression de miARN qui a permis de valider nos modèles cellulaires. Puis, à l'aide des bases de données *TargetScan*, *Microcosm* et *MiRanda*, nous avons identifié les miARN ciblant potentiellement *MUC4*. L'analyse par PCR quantitative a permis de montrer que seuls le miR-145 et miR-219-1-3p étaient sous-exprimés dans l'ensemble des lignées cancéreuses étudiées. Finalement, uniquement miR-219-1-3p est capable d'inhiber l'expression protéique de MUC4 ; c'est pourquoi nous nous sommes intéressés à son rôle dans le cancer du pancréas.

Nous avons observé une perte d'expression du miR-219-1-3p dans des tissus de patients atteints d'adénocarcinome pancréatique. Par deux approches complémentaires de surexpression (transitoire ou stable) ou d'inhibition de miR-219-1-3p, nous avons montré qu'il était capable de réprimer l'expression de MUC4 au niveau protéique en se fixant

directement sur son 3'-UTR. Nous avons observé une inhibition de la migration et de la prolifération cellulaires associées à une diminution de l'expression de la cycline D1 et de l'activation des voies de signalisation Akt et Erk. *In vivo*, la croissance tumorale est fortement ralentie après l'injection intratumorale de miR-219-1-3p. Grâce au modèle murin *Pdx1-Cre;LSL-Kras^{G12D}* de lésions PanIN, nous avons pu mettre en évidence que la perte d'expression du miR-219-1-3p intervient précocement dès les stades PanIN-1/2 de la cancérogenèse pancréatique et qu'il existait une corrélation inverse entre l'expression de miR-219-1-3p et celle de la mucine Muc4.

Par ailleurs, nous avons observé que le traitement des cellules cancéreuses pancréatiques humaines par la gemcitabine induit une forte surexpression du miR-219-1-3p qui laisse penser à un rôle potentiel de ce miARN dans la sensibilité des cellules à la chimiothérapie. Cependant, cette surexpression n'a montré aucun effet sur la survie cellulaire après traitement. Nous avons par la suite mis en évidence un profil d'expression différentiel des miARN entre les cellules invalidées pour MUC4 et les cellules contrôles.

Pour conclure, nos résultats montrent que le miR-219-1-3p, sous exprimé dans le cancer du pancréas, régule négativement l'expression de la mucine MUC4, inhibe les propriétés biologiques des cellules cancéreuses et possède un pouvoir antitumoral *in vivo* ce qui nous permet de proposer le miR-219-1-3p comme suppresseur de tumeur dans le cancer du pancréas. La modification de l'expression des miARN suite à la perte d'expression de MUC4 suggère un rôle potentiel de ces miARN comme marqueurs de chimiorésistance pour le cancer du pancréas.

Summary

The MUC4 mucin is an important actor of pancreatic tumorigenesis as it contributes to tumor progression and its expression correlates with a poor prognosis. It has also been shown that MUC4 is involved in resistance of cells to chemotherapies. In this context, MUC4 is a potential therapeutic target in pancreatic cancer. MUC4 neoexpression at early stages of carcinogenesis confers to this mucin a potential interest as an early marker. Molecular mechanisms responsible for MUC4 induction of expression are not well defined. Thus, studying *MUC4* gene expression regulation would contribute to better understand its role in tumorigenesis. *MUC4* gene is regulated at the transcriptional level and epigenetically by DNA methylation and histone modifications mechanisms. However, MUC4 post-transcriptional regulation notably by miRNA is largely unknown. Our work aimed at (i) identifying miRNA dysregulated in pancreatic cancer and/or potentially targeting MUC4, (ii) determining miRNA(s) inhibiting MUC4 expression and its (their) impact on pancreatic carcinogenesis and finally (iii) identifying miRNAs involved in chemoresistance mediated by MUC4 in pancreatic cancer.

First, using miRNA microarrays we established the miRNA expression profile of normal and cancerous pancreatic cell lines. We showed a cancer-specific miRNA signature which allows us to validate our cellular models. Then, performing *in silico* studies with *TargetScan*, *Microcosm* and *MiRanda* databases led us to identify miRNA potentially targeting MUC4. Analysis by qRT-PCR showed that miR-145 and miR-219-1-3p were downregulated in human pancreatic cancer cell lines. Finally, only miR-219-1-3p inhibited MUC4 expression thus we focused on its role in pancreatic cancer.

We observed a loss of miR-219-1-3p expression in pancreatic cancer tissues. Complementary approaches overexpressing (transiently or stably) and inhibiting miR-219-1-3p expression, led us to show that miR-219-1-3p represses MUC4 protein expression by interacting directly with its 3'-UTR. We observed a decrease of cell migration and cell proliferation which was associated with an inhibition of cyclin D1 expression and an inhibition of Akt and Erk activation. Tumor growth in scid mice was strongly slowed down following miR-219-1-3p intratumoral injection. In the *Pdx1-Cre;LSL-Kras^{G12D}* mouse model of PanIN, loss of miR-219-1-3p expression was an early event as soon as PanIN1/2 and miR-219-1-3p expression was conversely correlated to Muc4 expression.

While the strong induction of miR-219-1-3p following gemcitabine treatment of pancreatic cancer cells suggests a potential role of this miRNA in sensitivity of cells,

miR-219-1-3p has no effect on survival rate of cells treated with gemcitabine. We then established the miRNA expression profile of MUC4 knocked-down (MUC4-KD) cells and control cells (Mock) and showed a dysregulation of miRNA expression in MUC4-KD compared to Mock cells.

To conclude, our results indicate that miR-219-1-3p, downregulated in pancreatic cancer, negatively regulates MUC4 expression, alters cancer cell biological properties and has an antimetastatic effect *in vivo*. Altogether, these results propose miR-219-1-3p as tumor suppressor in pancreatic cancer. Loss of MUC4 leads to an aberrant miRNA expression profile suggesting a potential role of miRNA as markers of chemoresistance in pancreatic cancer.

Tables des matières

ABREVIATIONS	1
INTRODUCTION	5
<u>A. LES MUCINES</u>	6
<u>A. I. GENERALITES</u>	6
<u>A. II. STRUCTURE DES MUCINES</u>	6
<u>A. II. 1. APOMUCINE</u>	6
<u>A. II. 2. LES CHAINES GLYCANNIQUES</u>	7
<u>A. III. LA MUCINE MEMBRANAIRE MUC4</u>	8
<u>A. III. 1. LE GENE <i>MUC4</i></u>	8
<u>A. III. 2. LA STRUCTURE PROTEIQUE DE MUC4</u>	8
<u>A. III. 3. LE PROMOTEUR DU GENE <i>MUC4</i></u>	8
<u>A. III. 4. LA REGULATION DE L'EXPRESSION DE MUC4</u>	9
<u>A. III. 5. TERRITOIRE D'EXPRESSION DE LA MUCINE MUC4</u>	10
<u>A. IV. MUCINES ET CANCER</u>	11
<u>A. IV. 1. GENERALITES</u>	11
<u>A. IV. 2. MODIFICATIONS DES MUCINES DANS LE CANCER</u>	12
<u>A. V. MUC4 ET CANCER DU PANCREAS</u>	13
<u>A. V. 1. EXPRESSION</u>	13
<u>A. V. 2. DELOCALISATION</u>	14
<u>A. V. 3. MUC4 ET IMMUNITE</u>	14
<u>A. V. 4. MUC4 ET PROGRESSION TUMORALE</u>	14

<u>B. L'ADENOCARCINOME CANALAIRE PANCREATIQUE</u>	16
<u>B. I. LE PANCREAS</u>	16
<u>B. I. 1. ANATOMIE</u>	16
<u>B. I. 2. FONCTIONS</u>	16
<u>B. II. LE CANCER DU PANCREAS</u>	17
<u>B.II. 1. EPIDEMIOLOGIE</u>	17
<u>B. II. 2. FACTEURS DE RISQUE</u>	18
<u>B. II. 3. ANATOMOPATHOLOGIE</u>	19
<u>B.II. 4. LES LESIONS PRECURSEURS DE L'ADENOCARCINOME CANALAIRE PANCREATIQUE</u>	19
<u>B. II. 5. ANOMALIES GENETIQUES</u>	20
<u>B. II. 6. DIAGNOSTIC</u>	23
<u>B. II. 7. TRAITEMENT</u>	25
<u>C. LES MICRO-ARN</u>	30
<u>C. I. DECOUVERTE</u>	30
<u>C. II. ORGANISATION GENOMIQUE</u>	30
<u>C. III. BIOGENESE</u>	31
<u>C. IV. NOMENCLATURE</u>	31
<u>C.V. INTERACTION MIARN / ARNM CIBLE</u>	32
<u>C. V. 1 PRINCIPES D'INTERACTION</u>	32
<u>C. V. 2. IDENTIFICATION DES CIBLES</u>	33
<u>C. VI. MODES D'ACTION</u>	34
<u>C. VI. 1. LE COMPLEXE RISC</u>	34
<u>C. VI. 2. MECANISMES DE REGULATION PAR LES MIARN</u>	35
<u>C. VII. MIARN ET CANCER DU PANCREAS</u>	37
<u>C. VIII. LES MIARN VERS LA CLINIQUE ?</u>	40

OBJECTIFS.....	44
RESULTATS	46
<u>PARTIE I SELECTION DES MIARN</u>	<u>47</u>
<u>PARTIE II miR-219-1-3P EST UN REGULATEUR NEGATIF DE L'EXPRESSION DE LA MUCINE MUC4</u>	<u>54</u>
<u>PARTIE III MIARN ET CHIMIORESISTANCE.....</u>	<u>99</u>
DISCUSSION	107
PERSPECTIVES.....	116
APPENDICE TECHNIQUE	120
BIBLIOGRAPHIE	146

ABBREVIATIONS

5-FU : 5-Fluorouracile

aa : acide aminé

ADN : Acide désoxyribonucléique

ADNc : ADN complémentaire

AGO : Argonaute

Akt : *v-akt murine thymoma viral oncogene*

AMOP : *Adhesion-associated domain present in MUC4 and other proteins*

AP-1 : *Activator Protein-1*

ARE : *AU-rich element*

ARN : Acide ribonucléique

ARNm : ARN messenger

BCA : Acide bicinchoninique

BRAF : *V-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1*

BSA : Sérumalbumine bovine

CDK : *cyclin-dependent kinase*

CFTR : *Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*

ChIP : immunoprécipitation de la chromatine

CLIP-seq : *ultraviolet crosslinking and immunoprecipitation coupled to deep sequencing*

CLOCK : *Circadian Locomotor Output Cycles Kaput*

CMYC : *v-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog*

CO₂ : Dioxyde de carbone

Ct : Carboxy-terminal

DMSO : Diméthylsulfoxyde

D-PBS : *Dubelcco-Phosphate-buffered saline*

DPC : duodéno-pancréatectomie céphalique

DTT : Dithiothréitol

EDTA : acide éthylène diamine tétraacétique

EGF/EGFR : *Epidermal Growth Factor / EGF receptor*

ErbB2 : *Erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2*

Erk : *Extracellular signal-regulated kinase*

FADD : *FAs-Associated via Death Domain protein*

Fuc : Fucose
FXR1 : *Fragile X mental retardation-related protein 1*
Gal : Galactose
GalNAc : N-acétylgalactosamine
GAPDH : Glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénase
GDPH : Glycine/Aspartate/Proline/Histidine
GlcNAc : N-acétylglucosamine
GTP : Guanosine triphosphate
GTPase : Hydrolase de GTP
hCNT1 : human Concentrative Nucleoside Transporter 1
HCV : Virus de l'hépatite C
HDAC : Histones désacétylase
HIF : *Hypoxia Inducible Factor*
HITS-CLIP : *high-throughput sequencing coupled with ultraviolet crosslinking and immunoprecipitation*
HIS : Hybridation *in situ*
HNF α : *Hepatocyte Nuclear Factor-1 α*
hTERT : *Human telomerase reverse transcriptase*
IC₅₀ : *Inhibitory Concentration 50*
IHC : Immunohistochimie
IPMN : *Intraductal Papillary Mucinous Neoplasm*
IRES : *Internal ribosome entry site*
IRM : Imagerie par Résonance Magnétique
JAK : *Janus Kinase*
JNK : *Jun N-terminal Kinase*
KD : *Knock-down*
KRAS: *V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog*
KSF : *Keratinocyte Serum Free*
Lin14 : *Abnormal cell LINEage*
LNA : *Locked Nucleic Acid*
m7G : 7-méthylguanosine
Man : Mannose
MAPK : *Mitogen-Activated Protein Kinase*
MCN : *Mucinous Cystic Neoplasm*

MEC : Matrice extracellulaire
Mg²⁺ : Ions magnésium
miARN, : micro-ARN
MID : *Middle domain*
miRNP : *miRNA-associated ribonucleoprotein complex*
MRE : *miRNA response element*
MTT : sel de tétrazolium
NeuAc : acide neuraminique
NF-κB : *Nuclear Factor Kappa B*
NIDO : Nidogène
NMDA : acide N-méthyl-D-aspartique
Nt : Amino-terminal
nt : nucléotide
OMS : Organisation Mondiale de la Santé
PABP : *Poly(A) binding protein*
PanIN : *Pancreatic Intraepithelial Neoplasm*
PAZ : *PIWI-Argonaute-Zwille*
pb : paires de base
P-bodies : *Processing bodies*
PDAC : *Pancreatic Ductal Adenocarcinoma*
PEA3 : *polyomavirus Enhancer Activator-3*
pH : Potentiel hydrogène
PI3K : Phosphoinositide-3-kinase
PIWI : *P-element induced wimpy testis*
PKA : Protein kinase A
PKC : Protéine Kinase C
Pré-miARN, pré-miR : Précurseur de miARN
Pri-miRNA, pri-miR : Transcrit primaire de miARN
PTEN : *Phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10*
PTS : Proline/Thréonine/Sérine
PUF : *Pumilio and FBF homology protein*
PVDF : Fluorure de polyvinylidène
qRT-PCR : *quantitative Reverse Transcriptase-Polymerase Chain Reaction*
RBP : *RNA Binding Protein*

RECK : *Reversion-inducing-cysteine-rich protein with kazal motifs*

RISC : *RNA-induced silencing complex*

RNase : Ribonucléase

ROCK : *Rho-associated protein kinase*

RPMI : *Roswell Park Memorial Institute*

RRM : *RNA recognition motif*

RTK : Récepteur à activité tyrosine kinase

RT-PCR : *Reverse transcriptase-Polymerase chain reaction*

S.E.M. : Erreur standard à la moyenne

SDS : Dodécylsulfate de sodium

Ser : Sérine

SMAD : *Mothers against decapentaplegic*

STAT : *Signal Transduction and Activator of Transcription*

SVF : Sérum de veau fœtal

TEM : transition-épithélio-mésenchymateuse

TIPMP : Tumeurs intracanalaires papillaires et mucineuses du pancréas

TGF- β : *Transforming Growth Factor beta*

TNF- α : *Tumor necrosis factor alpha*

TNRC : *Trinucleotide Repeat-Containing Protein*

TOP : *Terminal Oligopyrimidine Tract*

TP53INP1 : *Tumor protein p53 inducible nuclear protein 1*

TR : *Tandem Repeat*

TSA : Trichostatine A

Tyr : Tyrosine

UBA : *Ubiquitin-associated domain*

UTR : *Untranslated Region*

VNTR : *Variable Number of Tandem Repeat*

vWF : *von Willebrand Factor*

Introduction

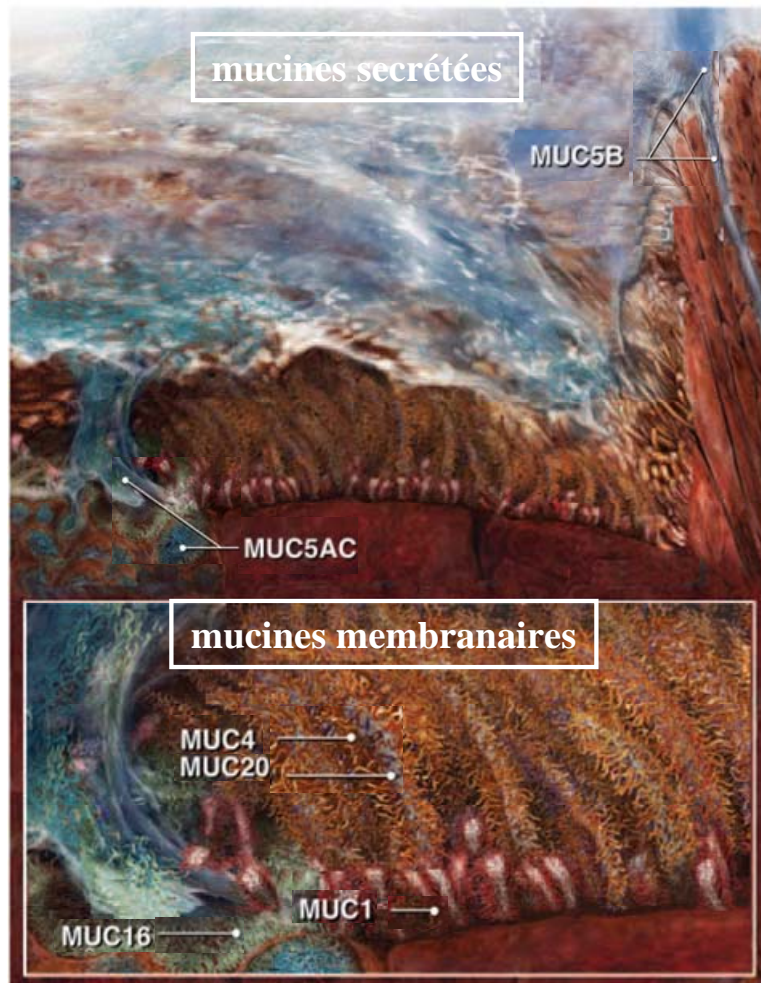


Figure 1. Représentation schématique du mucus présent à la surface des voies aériennes.

Haut : appareil mucociliaire, l'épithélium cilié respiratoire est recouvert d'une couche de mucus. Bas : grossissement d'une cellule caliciforme (à gauche), de cellules ciliées et du liquide périciliaire montrant l'organisation moléculaire des différentes mucines (MUC1, MUC4, MUC16 et MUC20). D'après Kesimer *et al.*, 2012.

A. Les mucines

A. I. Généralités

Les mucines sont des glycoprotéines de masse moléculaire élevée composées d'une longue chaîne peptidique appelée apomucine sur laquelle sont greffées de nombreuses chaînes oligosaccharidiques représentant jusque 80% du poids sec de la molécule (Desseyn *et al.*, 2008) ; (Jonckheere and Van Seuningen, 2008b). Les mucines sont le composant majeur du gel de mucus (figure 1). Elles lui confèrent ses propriétés viscoélastiques et rhéologiques importantes pour la protection et la lubrification des surfaces épithéliales. Néanmoins, les travaux de biologie moléculaire des années 1990 ont permis d'identifier deux classes de mucines selon leur localisation subcellulaire : les mucines sécrétées comprenant les mucines MUC2, MUC5AC, MUC5B, MUC6, MUC7, MUC9 et MUC19 et les mucines membranaires MUC1, MUC3A/B, MUC4, MUC12, MUC13, MUC15, MUC16, MUC17, MUC20, MUC21 et MUC22 (Jonckheere and Van Seuningen, 2008a) ; Hijikata, 2011). Les mucines membranaires sont localisées au pôle apical des cellules épithéliales ce qui leur permet d'être impliquées dans les interactions cellule-cellule et dans la signalisation cellulaire (Jonckheere and Van Seuningen, 2008b).

A. II. Structure des mucines

A. II. 1. Apomucine

Les mucines ont la caractéristique de posséder des séquences répétitives riches en résidus sérine (S, Ser), thréonine (T, Thr) et proline (P, Pro) appelées séquences PTS. Ces séquences peuvent être répétées en tandem une centaine de fois pour constituer le domaine *Tandem Repeat* (TR). La séquence et la longueur de ces domaines TR varient pour chaque mucine (8 acides aminés (aa) pour la mucine MUC5AC et 16 pour MUC4) et pour chaque espèce. Cette région est donc aussi appelée *Variable Number of Tandem Repeat* (VNTR). Cette région riche en résidus sérine et thréonine est le site d'ancrage des chaînes oligosaccharidiques.

A. II. 2. Les chaînes glycaniques

Les chaînes O-glycaniques

Les chaînes glycaniques sont fixées à l'apomucine à 80% par une liaison de type O-glycosidique *via* un résidu de *N*-acétylgalactosamine (GalNAc) sur la séquence Asn-X-Ser/Thr. Elles sont composées des monosaccharides suivants : le L-fucose (Fuc), le D-galactose (Gal), la *N*-acétyl-D-galactosamine (GalNAc), la *N*-acétyl-D-glucosamine (GlcNAc) et l'acide *N*-acétylneuraminique, ou acide sialique, (NeuAc).

Les chaînes oligosaccharidiques sont construites par addition, étape par étape, des différents monosaccharides. Les enzymes qui catalysent ces réactions sont les glycosyltransférases. L'étape d'initiation correspond à la fixation d'un GalNAc sur un résidu sérine ou thréonine de l'axe peptidique puis on distingue trois étapes délimitant les trois parties de la chaîne :

- La formation du **noyau**, qui est la région la plus proche du corps peptidique. Elle contient le résidu GalNAc sur lequel viennent s'attacher un ou deux résidus Gal ou GlcNAc de manière linéaire ou ramifiée.
- L'**élongation** : elle nécessite la participation de nombreuses Gal et GlcNAc transférases qui vont permettre la formation d'un squelette saccharidique.
- La **terminaison** au cours de laquelle on aura l'ajout de résidus NeuAc, Fuc ou encore la sulfatation des résidus Gal ou GlcNAc situés à l'extrémité distale du squelette.

Les chaînes N-glycaniques

Beaucoup moins abondantes et plus linéaires que les chaînes de type O-glycosidiques, les chaînes N-glycaniques sont réparties au niveau des extrémités N- (Nt) et C-terminales (Ct) de l'axe peptidique. Ces chaînes sont composées de trois monosaccharides : GlcNAc, Gal et mannose (M) (ce dernier résidu n'est pas retrouvé dans les chaînes O-glycosylées). L'initiation du squelette osidique s'effectue grâce à une liaison d'un GlcNAc sur un résidu asparagine de l'apomucine.

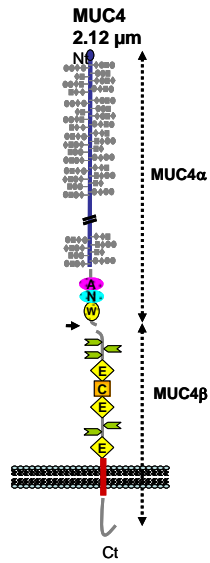


Figure 2. Structure protéique de la mucine MUC4.

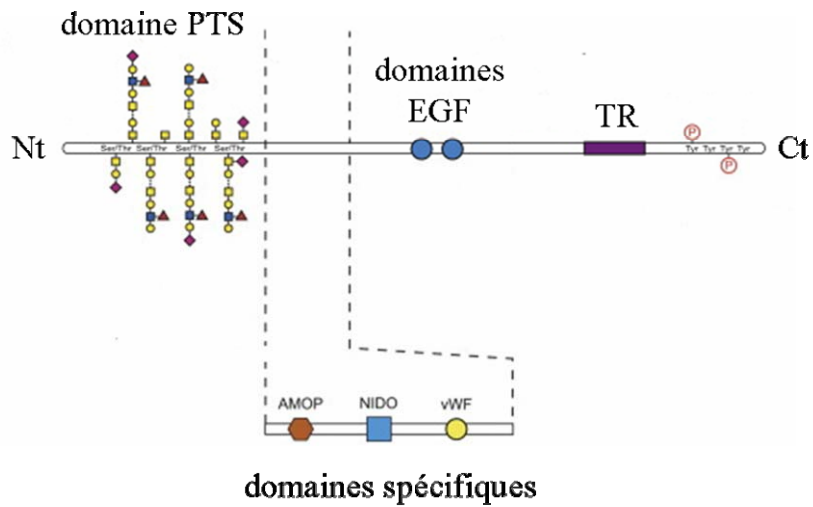


Figure 3. Domaines structuraux de la mucine MUC4.

TR : *Tandem Repeat* ; PTS : *Pro/Thr/Ser* ; EGF : *Epidermal Growth Factor* ; AMOP : *Associated domain in MUC4 and Other Proteins* ; NIDO : *Nidogen* ; vWF : *von Willebrand factor*. D'après Jonckheere *et al.*, 2012.

A. III. La mucine membranaire MUC4

A. III. 1. Le gène *MUC4*

Le gène *MUC4* a été découvert en 1991 au laboratoire à partir d'une banque d'ADNc issue de muqueuse broncho-trachéale humaine (Crepin *et al.*, 1990 ; Porchet *et al.*, 1991). Il est localisé sur le chromosome 3 en position 3q29 (Gross *et al.*, 1992). Le gène a une taille de 62,24 kilobases et contient 26 exons (Escande *et al.*, 2002 ; Moniaux *et al.*, 1999 ; Nollet *et al.*, 1998). Il donne lieu à 24 transcrits différents appelés *sv0* à *sv21-MUC4*, *MUC4/X* et *MUC4/Y* regroupés en 7 familles (Moniaux *et al.*, 2001). Ces variants sont obtenus par un épissage alternatif complexe. La forme complète *sv0-MUC4* est l'isoforme principalement exprimée chez l'Homme.

A. III. 2. La structure protéique de MUC4

La mucine MUC4 est constituée en Nt d'un long domaine extracellulaire de 2,12 μm , d'un domaine transmembranaire hydrophobe et d'une courte queue cytoplasmique en Ct (figure 2). Cette mucine est représentée à la surface cellulaire sous la forme d'une structure hétérodimérique comportant un domaine MUC4 α et un domaine MUC4 β associé à la membrane. Ces deux domaines sont liés de façon non covalente (Jonckheere and Van Seuningen, 2008a). Il existe un site de clivage potentiel de type GDPH (Glycine-Acide aspartique-Proline-Histidine) pour la séparation des deux sous-unités.

La sous-unité MUC4 α contient le domaine de type VNTR qui constitue le domaine extracellulaire hyperglycosylé, un peptide signal de 27 aa et trois domaines qui lui sont spécifiques : *Nidogen Domain* (NIDO), *Adhesion-associated domain present in MUC4 and other proteins* (AMOP) et le domaine *von Willebrand Factor* (vWVF) (Figure 3).

La sous-unité transmembranaire MUC4 β renferme trois domaines de type *Epidermal Growth Factor* (EGF), un domaine transmembranaire et une courte queue cytoplasmique de 22 aa (figure 3).

A. III. 3. Le promoteur du gène *MUC4*

La région 5'-UTR flanquante du gène *MUC4* a été caractérisée au laboratoire et contient deux promoteurs (Perrais *et al.*, 2001). Un promoteur dépourvu de boîte TATA possédant des domaines riches en résidus GC qui permettent la fixation de facteurs de transcription comme Sp1 et de nombreux sites de fixation pour des facteurs initiant la transcription comme AP-1

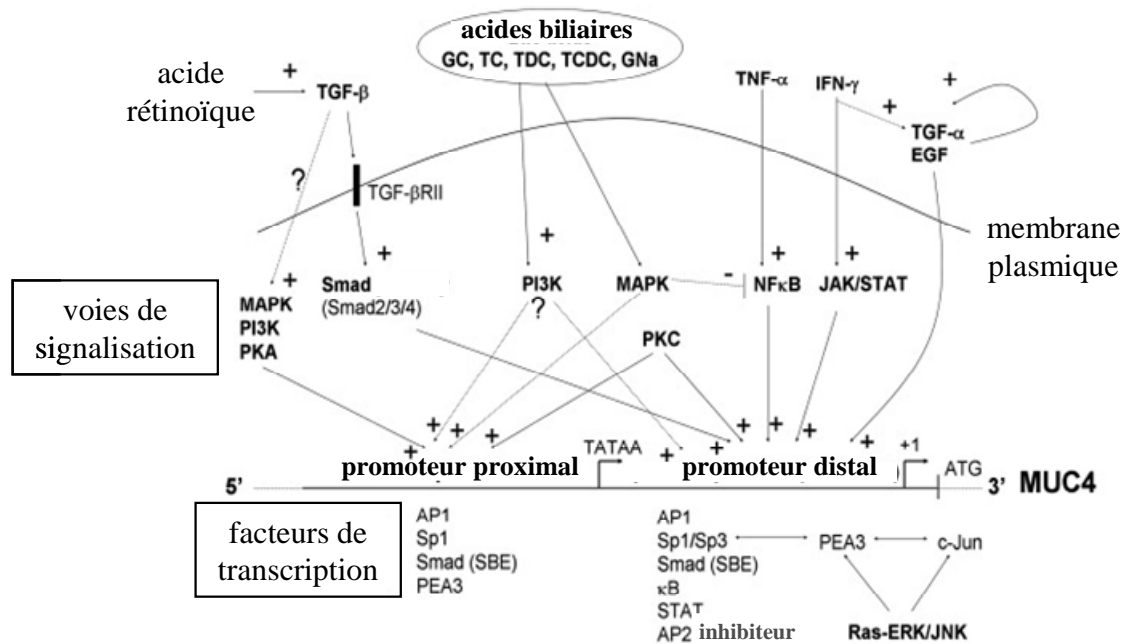


Figure 4. Régulation transcriptionnelle de MUC4.

Représentation schématique de la régulation des promoteurs de MUC4 par les différents facteurs de transcription et voies de signalisation indiqués. « ? » signifie que les mécanismes impliqués dans l'activation des voies MAPK, PI3K et PKA par le TGF-β ne sont pas connus. GC : acide glycocholique, TC : acide taurocholique, TDC : acide taurodésoxycholique, TCDC : acide taurochénodésoxycholique, GNa : glycocholate de sodium, TGF : *Transforming Growth Factor*, EGF : *Epidermal Growth Factor*, TNF : *Tumour Necrosis Factor*, IL : interleukine, IFN : interféron, PI3K : phosphatidylinositol 3-kinase, MAPK : *Mitogen-Activated Protein Kinase*, MEK : *MAPK-extracellular signal regulated kinase*, PKA : protéine kinase A, NFκB : *Nuclear Factor-kappa B*, STAT : *signal transducers and activators of transcription*, JAK : *Janus kinase*, Sp : *specificity protein*, AP : *activator protein*, SBE : *Smad binding element*, PEA3 : *polyomavirus Enhancer Activator-3*, JNK : *Jun N-terminal kinase*. D'après Jonckheere and Van Seuning, 2010.

ou PEA3 (*Polyomavirus Enhancer Activator-3*). la transcription comme AP-1 ou PEA3 (*Polyomavirus Enhancer Activator-3*). Le promoteur distal possède une boîte TATA et contient des sites potentiels de fixation pour les facteurs Sp1, AP-1, AP-4, GATA entre autres (Jonckheere and Van Seuning, 2008a ; Perrais *et al.*, 2001).

A. III. 4. La régulation de l'expression de MUC4

A. III. 4. 1. La régulation transcriptionnelle

De nombreux travaux au sein du laboratoire ont porté sur la régulation transcriptionnelle et épigénétique du gène *MUC4*. La transcription du gène *MUC4* est complexe et sa régulation dépend de nombreuses voies de signalisation (figure 4). Il a été mis en évidence que l'expression de *MUC4* pouvait être induite par l'EGF, par le *Transforming Growth Factor β* (TGF- β), par l'interféron- γ et par l'acide rétinoïque. La régulation de *MUC4* par le TGF- β implique la coopération des facteurs de transcription Smad2 et Smad4 et la fixation de Smad4 au niveau de sept éléments de réponse Smad situés le long du promoteur proximal et distal. La régulation par le TGF- β peut être « smad indépendante » auquel cas l'activation se fait *via* les voies de signalisation de la *mitogen-activated protein kinase* (MAPK), de la phosphoinositide-3 kinase (PI3K) et de la protéine kinase A (PKA) (Jonckheere *et al.*, 2004). La régulation de l'expression de *MUC4* par l'interféron- γ se fait par la surexpression de STAT-1 (Perrais *et al.*, 2001); (Andrianifahanana *et al.*, 2007). L'interféron- γ et l'acide rétinoïque activent la transcription de *MUC4* en synergie dans les cellules cancéreuses pancréatiques (Andrianifahanana *et al.*, 2005). Le facteur de transcription PEA3 est également capable d'activer la transcription de *MUC4* en synergie avec les facteurs c-Jun et Sp1 (Fauquette *et al.*, 2005). Dans la lignée cancéreuse œsophagienne humaine OE33, il a été montré que les acides biliaires étaient des activateurs de l'expression de *MUC4* *via* le facteur de transcription *Hepatocyte Nuclear Factor-1 α* (HNF-1 α) (Mariette *et al.*, 2004 ; Piessen *et al.*, 2007).

L'inhibition de l'expression de *MUC4* au niveau transcriptionnel et protéique par AP-2 se fait *via* deux éléments AP-2 situés au niveau du promoteur proximal (Fauquette *et al.*, 2007). La protéine CFTR (*Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*), retrouvée sous-exprimée dans le cancer du pancréas, régule négativement l'expression de *MUC4* (Singh *et al.*, 2007).

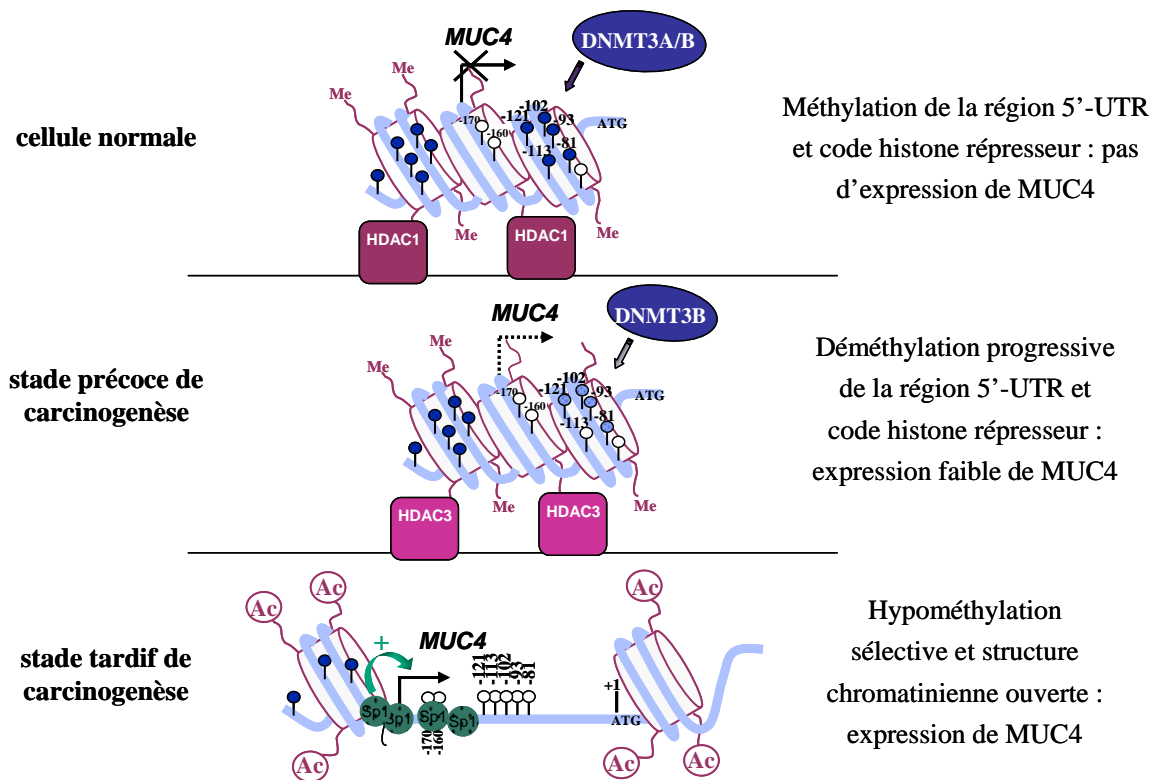


Figure 5. Modèle de régulation épigénétique du gène MUC4 dans les cellules épithéliales normales et cancéreuses.

Me : cytosine méthylée ; Ac : histone acétylée ; DNMT : *DNA Methyl Transferase* ; HDAC : Histone Désacetylase. D'après Vincent and Van Seuning, 2008.

Un mécanisme de régulation post-transcriptionnelle de *MUC4* a également été mis en évidence. Dans les cellules épithéliales bronchiques, le transcrite de *MUC4* est stabilisé par l'élastase produite par les neutrophiles lors de la réponse immunitaire (Fischer *et al.*, 2003).

L'étude de la régulation épigénétique de *MUC4* dans diverses lignées cellulaires cancéreuses humaines a permis de montrer que la méthylation de l'ADN et les modifications des histones étaient impliquées dans cette régulation (Vincent and Van Seuning, 2008).

A. III. 4. 2. La régulation épigénétique

La région 5'-flanquante de *MUC4* est caractérisée par une forte concentration en dinucléotides CpG répartis sur le promoteur proximal et la région 5'-UTR (Perrais *et al.*, 2001). Deux îlots CpG localisés dans le promoteur proximal ont été cartographiés au sein du laboratoire (Vincent and Van Seuning, 2008).

L'étude du gène *MUC4* a montré que sa région 5'-UTR est hyperméthylée dans la lignée cancéreuse pancréatique humaine Panc-1 n'exprimant pas MUC4 alors que cette région est retrouvée hypométhylée dans la lignée cancéreuse pancréatique Capan-1 qui exprime MUC4 (Vincent *et al.*, 2008). De plus, l'utilisation de la trichostatine A (TSA), agent inhibiteur des histones désacétyltransférases (HDAC), et de l'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) ont permis de mettre en évidence l'influence de la désacétylation des histones sur la répression du gène *MUC4* dans les cellules Panc-1 (Jonckheere *et al.*, 2004 ; Vincent *et al.*, 2008). Ainsi, Vincent et Van Seuning (2008) ont proposé un modèle de régulation épigénétique de *MUC4* dans les cellules normales et cancéreuses illustré en figure 5. Dans les cellules n'exprimant pas MUC4, la méthylation et la désacétylation de la région 5'-UTR de *MUC4* entraîneraient la répression de l'expression de MUC4. Dans les cellules au stade précoce de la carcinogenèse, la région 5'-UTR de *MUC4* serait déméthylée progressivement permettant ainsi une faible expression de la mucine MUC4. Enfin, dans les cellules cancéreuses exprimant fortement MUC4, l'hypométhylation sélective et le passage de la chromatine à un état « ouvert » permettraient la fixation de facteurs de transcription comme Sp1 et ainsi la transcription maximale du gène *MUC4*.

A. III. 5. Territoires d'expression de la mucine MUC4

L'expression de la mucine MUC4 est cellule- et tissu-spécifique. Chez l'adulte sain, elle est exprimée à la surface épithéliale des glandes lacrymales et salivaire, de l'œil, de la

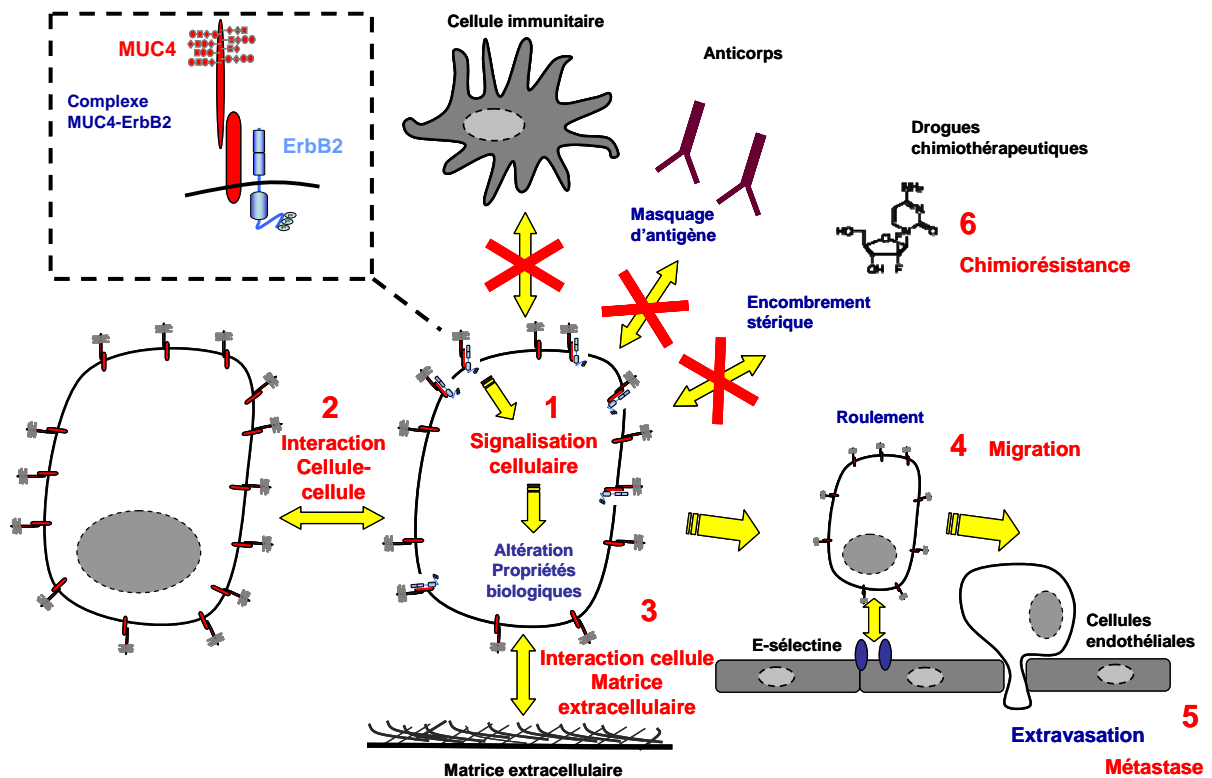


Figure 6. Rôles de la mucine MUC4 dans le cancer.

La mucine MUC4 est impliquée dans interactions cellule-cellule et cellule-matrice extracellulaire. MUC4 interagit avec le récepteur ErbB2 et affecte ses voies de signalisation altérant ainsi les propriétés biologiques des cellules. De par son encombrement stérique, MUC4 empêche la reconnaissance des cellules cancéreuses par le système immunitaire et par les anticorps. La mucine MUC4 jouerait également un rôle dans le processus de métastase par son interaction avec la E-sélectine qui permet le roulement et l'extravasation de la cellule cancéreuse. D'après Jonckheere and Van Seuning, 2008.

prostate, de l'estomac, de la trachée, des poumons, du côlon et de la glande mammaire (Bafna *et al.*, 2010).

Le profil d'expression de MUC4 est altéré dans un grand nombre de cancers. On observe souvent une surexpression de MUC4 dans le cancer du sein, de l'œsophage ou de l'ovaire par exemple. MUC4 est néo-exprimée dès les stades précoces de la cancérogenèse pancréatique. Son expression augmente progressivement et atteint son maximum dans l'adénocarcinome (Swartz *et al.*, 2002).

Le modèle de cancer du pancréas constitue donc un modèle de choix pour l'étude de la régulation de l'expression de la mucine MUC4.

A. IV. Mucines et cancer

A. IV. 1. Généralités

Si les mucines sont connues pour leur rôle de protection de lubrification et d'hydratation des épithéliums, elles sont également impliquées dans différents processus biologiques comme l'adhérence cellulaire, la signalisation cellulaire (survie, prolifération, apoptose) et le renouvellement et la différenciation cellulaires jouant ainsi un rôle dans le maintien de l'homéostasie tissulaire. A la vue de ces multiples rôles, on peut facilement concevoir qu'une altération de l'expression des glycoprotéines ou de leurs caractéristiques biochimiques (glycosylation, localisation cellulaire) aura un fort impact sur les propriétés des cellules. Leur structure et leur composition biochimique procurent à la cellule épithéliale une protection mais elles permettent également la transmission de l'information du milieu extracellulaire vers la cellule. Les mucines sont décrites dans la littérature comme de véritables marqueurs phénotypiques de la cancérogenèse épithéliale puisque le profil d'expression des mucines est altéré lors de la carcinogenèse. C'est le cas par exemple des mucines membranaires MUC1 et MUC4 dont l'expression et/ou la localisation sont modifiées lors de la cancérogenèse.

La cellule cancéreuse profite de la surexpression, la modification de la glycosylation et de la localisation des mucines pour interagir avec le microenvironnement et pour pouvoir proliférer, migrer et métastaser (figure 6).

Nous allons nous intéresser aux caractéristiques des mucines et notamment de la mucine MUC4 dans le cancer et plus particulièrement dans le cancer du pancréas.

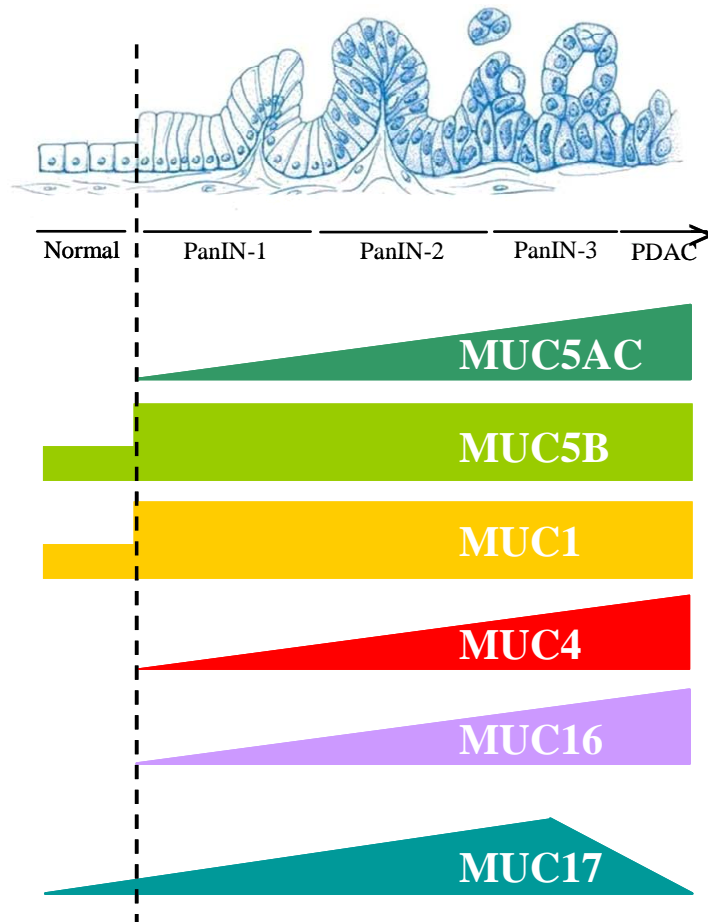


Figure 7. Profil d'expression des mucines au cours de la cancérogenèse pancréatique.

D'après Hruban *et al.*, 2000 ; Jonckheere and Van Seuning, 2010.

A. IV. 2. Modifications des mucines dans le cancer

A. IV. 2. 1. Expression altérée

Le profil d'expression des mucines est modifié dans de nombreux cancers (Jonckheere and Van Seuning, 2010). Le cancer du pancréas est associé à une néoexpression des mucines MUC4, MUC5AC, MUC5B, MUC13, MUC15, MUC16, et MUC17 dans les lésions précurseurs néoplasiques intra-épithéliales (PanINs, cf. § B. II.) et leur expression augmente progressivement au cours de la cancérogenèse pancréatique (Moniaux *et al.*, 2006 ; Saitou *et al.*, 2005 ; Swartz *et al.*, 2002 ; Takikita *et al.*, 2009 ; Yamasaki *et al.*, 2004); (Chauhan *et al.*, 2012 ; Haridas *et al.*, 2011). La mucine membranaire MUC1 est surexprimée dès les stades précoces de la cancérogenèse pancréatique et son expression est corrélée à la progression de la maladie (Nagata *et al.*, 2007) (figure 7).

A. IV. 2. 2. Délocalisation

La cellule cancéreuse se caractérise par une perte de sa polarité cellulaire. Lors du développement tumoral, les mucines localisées au pôle apical des cellules épithéliales normales se retrouvent délocalisées de manière circonférentielle sur toute la surface cellulaire, ce qui permet l'interaction des mucines avec de nouveaux partenaires comme les récepteurs à activité tyrosine kinase (RTK) et ainsi l'activation des voies de prolifération et de survie cellulaires. L'interaction des mucines avec les RTK est également associée à une modification du trafic cellulaire et de la réponse aux thérapies ciblant les RTK. L'interaction de MUC1 et de l'EGFR entraîne une augmentation de l'internalisation du récepteur (Merlin *et al.*, 2011 ; Pochampalli *et al.*, 2007).

Les localisation cytoplasmique et nucléaire des mucines sont corrélées à un mauvais pronostic et à un phénotype métastatique de la tumeur (Chaturvedi *et al.*, 2007 ; Gupta *et al.*, 2012 ; Singh *et al.*, 2008 ; Xu *et al.*, 2011). La translocation de la queue cytoplasmique de MUC1 associée à la β -caténine et l'EGFR active la transcription de gènes impliqués dans la transition-épithélio-mésenchymateuse (TEM) de la cellule cancéreuse (Bitler *et al.*, 2010).

A. IV. 2. 3. Glycosylation aberrante

Dans la cellule tumorale, la glycosylation modifiée s'explique par une expression et une localisation altérées des glycosyltransférases (Colley, 1997 ; Dennis *et al.*, 1999 ; Tu and Banfield, 2010). Les chaînes glycaniques sont plus courtes, moins ramifiées et la

composition en monosaccharides est différente. L'activité des sialyltransférases et fucosyltransférases est augmentée ce qui entraîne une surexpression des glycanes terminaux NeuAc et Fuc. La sialylation précoce conduit à des motifs glycaniques plus courts. Chez le sujet sain, le motif le plus fréquent est GlcNAc β 1-3GalNAc alors que dans le cancer les motifs les plus fréquents sont les antigènes Tn (GalNAc-Ser/Thr) et T (Gal β 1-3GalNAc) et leur forme sialilées sialyl-Tn et sialyl-T. Les nombreux motifs sialylés des mucines sont associés à un faible taux de survie (Yu *et al.*, 2005). Les motifs glycaniques modifiés des mucines servent de ligands aux sélectines présentes à la surface des cellules endothéliales. Ces motifs sont impliqués dans l'adhérence des cellules cancéreuses ce qui favorise la migration, l'invasion, l'intravasation et l'extravasation des cellules cancéreuses (Glinsky *et al.*, 2001 ; Takada *et al.*, 1993 ; Yu, 2007).

A. IV. 2. 4. Adhérence cellulaire

Les mucines sont impliquées dans le détachement des cellules du site primaire de la tumeur vers le site métastatique en favorisant l'invasion des vaisseaux lymphatiques et veineux, l'adhérence aux cellules endothéliales (Geng *et al.*, 2012 ; Sanders *et al.*, 1996 ; Zhao *et al.*, 2010a). L'encombrement stérique des mucines empêche les interactions cellule-cellule et cellule-matrice extracellulaire (MEC) et les charges négatives des résidus NeuAc créent des forces de répulsion autour de la cellule.

A. V. MUC4 et cancer du pancréas

A. V. 1. Expression

L'augmentation d'expression de MUC4 au cours de la cancérogenèse pancréatique (en fonction du grade de PanIN, cf. § B. II. 4) a été montrée par immunohistochimie (IHC) avec une expression de 17% dans les PanIN-1A, 36% dans les PanIN-2, 85% dans les PanIN-3. L'expression peut atteindre 89% dans l'adénocarcinome (Fauquette *et al.*, 2007 ; Swartz *et al.*, 2002). Il existe également une modification de l'expression des variants d'épissage de MUC4. Dans les cellules cancéreuses pancréatiques la forme *sv10-MUC4* est retrouvée dans 37% des cas alors qu'elle n'est pas détectée dans le tissu sain (Chaturvedi *et al.*, 2008a).

A. V. 2. Délocalisation

Les cellules cancéreuses ont perdu leur polarité. La mucine MUC4 ne présente plus une localisation apicale mais est retrouvée délocalisée de manière circonférentielle sur toute la surface cellulaire. Cette délocalisation permet l'interaction de MUC4 avec de nouveaux partenaires membranaires comme les récepteurs de type tyrosine kinase et notamment le récepteur ErbB2, ce qui entraîne l'activation des voies de prolifération et de survie cellulaires.

Dans les cellules normales, ces interactions ont lieu de manière transitoire lors d'un stress provoquant une perte de polarité cellulaire. En revanche, dans les cellules cancéreuses qui ont perdu leur polarité cellulaire et qui en plus sur-expriment MUC4 et ErbB2 cette interaction est constitutive.

A. V. 3. MUC4 et immunité

La mucine MUC4 présente une conformation rigide et étirée qui peut aller jusque 2 μm . Elle dépasse ainsi toutes les molécules du glycocalyx. Sa taille importante, sa conformation et sa charge négative font que MUC4 peut bloquer l'accès à la surface cellulaire. La mucine MUC4 permet ainsi à la cellule d'échapper à la surveillance du système immunitaire et masque les épitopes antigéniques pouvant être reconnus par des anticorps thérapeutiques. Dans le cancer du sein, la surexpression de la mucine MUC4 est corrélée à la résistance au trastuzumab (Herceptin[®], Anticorps dirigée contre ErbB2).

A. V. 4. MUC4 et progression tumorale

Il a été montré chez des patients atteints de cancer du pancréas, que l'expression de MUC4 était associée à un mauvais pronostic (Saitou *et al.*, 2005). De plus, l'expression ectopique de MUC4 dans les fibroblastes embryonnaires murins induit une transformation (Bafna *et al.*, 2008).

L'utilisation de deux approches différentes de surexpression et d'inactivation de MUC4 dans des modèles cellulaires d'adénocarcinome pancréatique a permis de démontrer le rôle exercé par MUC4 dans les processus de tumorigenèse et de métastase en altérant les propriétés biologiques des cellules (Chaturvedi *et al.*, 2007 ; Moniaux *et al.*, 2007 ; Singh *et al.*, 2004).

Dans la cellule tumorale, la sous-unité MUC4 α est impliquée dans les interactions cellule-cellule et cellule-MEC. L'expression ectopique de l'orthologue de MUC4 chez le rat (rMUC4) est associée à une perte des interactions cellule-cellule et cellule-MEC (Komatsu *et*

al., 1997). Les cellules cancéreuses profiteraient des propriétés d'adhérence de MUC4 afin de s'échapper du site tumoral primaire et faciliter leur dissémination dans la circulation sanguine lors du processus de métastase.

Dans le laboratoire, il a été montré que l'interaction entre MUC4 et ErbB2 se faisait *via* les domaines de type EGF de MUC4 et que l'inactivation de MUC4 dans des cellules cancéreuses pancréatiques humaines Capan-2 est associée à une diminution d'expression du récepteur oncogénique ErbB2 et à une inhibition de la prolifération et de la migration cellulaires (Jonckheere *et al.*, 2012). MUC4 ralentit la prolifération cellulaire en inhibant l'activation de la voie de signalisation JNK et en réprimant l'expression de la cycline D1 entraînant un arrêt du cycle cellulaire (Jonckheere *et al.*, 2012). La mucine MUC4 procure également une résistance à l'apoptose (Chaturvedi *et al.*, 2007 ; Komatsu *et al.*, 2001) ce qui confère une résistance à la gemcitabine des cellules cancéreuses pancréatiques.

L'étude de Bafna et collaborateurs a montré que la diminution d'expression de MUC4 rend les cellules plus sensibles à la gemcitabine en activant la protéine pro-apoptotique Bad induisant ainsi l'apoptose (Bafna *et al.*, 2009). Néanmoins les mécanismes responsables n'étaient pas élucidés. Récemment dans le laboratoire, il a été montré que les mécanismes de résistance des cellules cancéreuses pancréatiques à la gemcitabine exercée par MUC4 étaient médiés par la voie NF- κ B qui régule l'apoptose et l'expression du transporteur hCNT1 (Skrypek *et al.*, 2013).

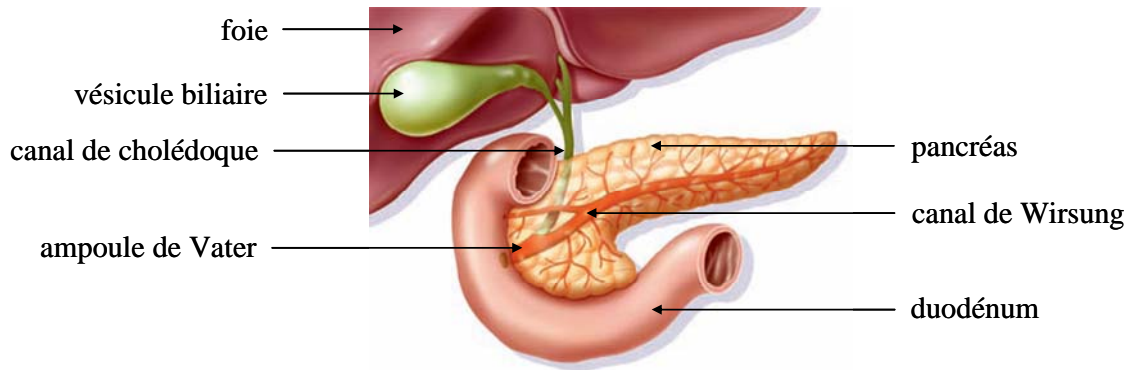


Figure 8. Anatomie du pancréas.

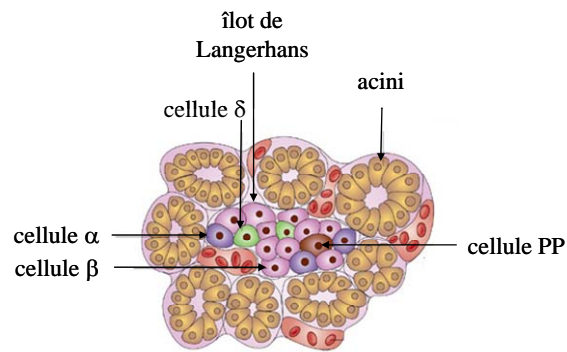


Figure 9. Pancréas endocrine.

D'après Bardeesy and DePinho, 2002.

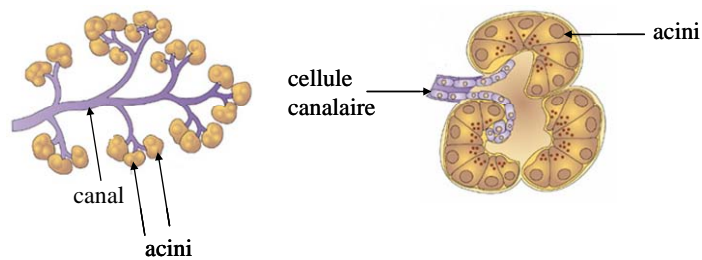


Figure 10. Pancréas exocrine.

D'après Bardeesy & DePinho, 2002.

B. L'adénocarcinome canalaire pancréatique

B. I. Le pancréas

B. I. 1. Anatomie

Le pancréas est un organe mou et fragile situé profondément dans l'abdomen. Il est composé de trois parties (figure 8) :

- la tête : qui est au contact du foie
- le corps : partie médiane du pancréas
- la queue : qui se prolonge jusque la rate

Le pancréas est traversé sur son grand axe (de la tête à la queue) par un canal excréteur principal appelé canal de Wirsung et par le canal cholédoque qui constitue la voie biliaire principale. Ces deux canaux s'unissent pour former l'ampoule de Vater et s'ouvrir sur le duodénum (figure 8).

B. I. 2. Fonctions

Le pancréas est une glande amphicrine puisqu'elle possède une fonction endocrine et une fonction exocrine. On distingue ainsi deux unités fonctionnelles dans le pancréas dépendantes du type cellulaire les composant.

B. I. 2.1. Pancréas endocrine

Les cellules endocrines, dispersées à travers les acini, sont regroupées sous forme d'amas appelés îlots de Langerhans. Elles sont responsables de la production d'hormones qui jouent un rôle important dans le métabolisme des glucides. Les hormones sont libérées dans la circulation sanguine *via* les capillaires se trouvant à proximité des îlots (figure 9).

Il existe un type de cellule endocrine pour chaque type d'hormone.

- les cellules α sont à la périphérie des îlots et secrètent le glucagon (hormone hyperglycémiant) ;

- les cellules β sont majoritaires et sécrètent l'insuline (hormone hypoglycémisante) ;
- les cellules δ sécrètent la somatostatine qui inhibe la sécrétion de glucagon et d'insuline ;
- les cellules PP sécrètent le polypeptide pancréatique.

B. I. 2. 2. Pancréas exocrine

Le pancréas exocrine est la partie la plus volumineuse puisqu'elle représente 80% de la masse du pancréas. Il est formé d'acini et de canaux excréteurs (figure 10).

Les acini sont des cellules glandulaires qui se regroupent pour former des lobules pancréatiques. Les acini sont responsables de la production et libération dans le duodénum des enzymes digestifs comme la trypsine, la chymotrypsine, l'amylase ou encore la lipase. Ces cellules sont riches en vésicules de sécrétion contenant les enzymes digestifs qui seront déversés dans la lumière acinaire par exocytose.

Les canaux excréteurs forment un système ramifié. Ils commencent à l'intérieur des acini puis se poursuivent par des canaux intra- puis inter-lobulaires pour enfin donner les canaux excréteurs. Les cellules canalaire produisent et sécrètent dans leur lumière une solution hydrolytique riche en bicarbonates. Le mélange formé entre les sécrétions enzymatiques des acini et la solution hydrolytique produite par les cellules canalaire donne le suc pancréatique. Il sera ensuite drainé par le canal de Wirsung vers le duodénum.

B. II. Le cancer du pancréas

Les tumeurs pancréatiques malignes sont les plus fréquentes et se développent le plus souvent à partir des cellules exocrines. Il s'agit dans 90% des cas d'adénocarcinome pancréatique canalaire (PDAC).

B.II. 1. Épidémiologie

Le cancer du pancréas représente 2,5% de l'ensemble des cancers avec une incidence annuelle estimée en 2011 à plus de 9 000 nouveaux cas en France tous sexes confondus

(données INCa). L'incidence et la mortalité sont quasi identiques plaçant ce cancer au 4^{ème} rang de décès liés au cancer. Le cancer du pancréas possède un pronostic redoutable puisque la médiane de survie est de 6 mois et le taux de survie à 5 ans est inférieur à 5%.

Le cancer du pancréas est rare avant 50 ans ; l'âge moyen de survenue est situé entre 70 et 80 ans. L'incidence est légèrement plus élevée chez l'homme que chez la femme puisque le sexe ratio est autour de 1,5.

B. II. 2. Facteurs de risque

B. II. 2. 1. Facteurs environnementaux

Peu de facteurs de risque ont clairement été associés à la survenue de cancers pancréatiques, le seul pour lequel les preuves sont suffisantes, est le tabagisme. Le tabac constitue la principale cause de décès par cancer en France, il est à l'origine de 25 % des décès liés au cancer du pancréas (OMS 2008). On considère que la consommation de tabac multiplie par deux le risque de développer un cancer du pancréas (Lowenfels and Maisonneuve, 2006). Il existe une relation dose-effet (le risque est multiplié par cinq chez les personnes fumants plus de 30 cigarettes par jour).

D'autres facteurs seraient incriminés comme la surconsommation de produits riches en graisses, la consommation chronique d'alcool ou encore l'obésité. L'exposition à certaines substances chimiques (hydrocarbures aromatiques polycycliques, insecticides...) pourrait être responsable de 5% des cancers pancréatiques.

B. II. 2. 2. Facteurs médicaux

La pancréatite chronique est un facteur étiologique important puisque sa survenue multiplie par 26 le risque de développer un cancer du pancréas (Klein *et al.*, 2004). Chez les sujets atteints de diabète, le risque serait également augmenté.

B. II. 2. 3. Formes héréditaires et familiales

On estime qu'environ 10% des cancers du pancréas auraient une origine héréditaire. Certaines maladies rares comme le syndrome de Peutz-Jeghers (Su *et al.*, 1999), le cancer du sein avec mutation du gène *BRCA2* (Lal *et al.*, 2000) ou encore le mélanome familial avec mutation du gène *INK4A* (Vasen *et al.*, 2000) prédisposent les sujets qui en sont atteints aux cancers du pancréas.

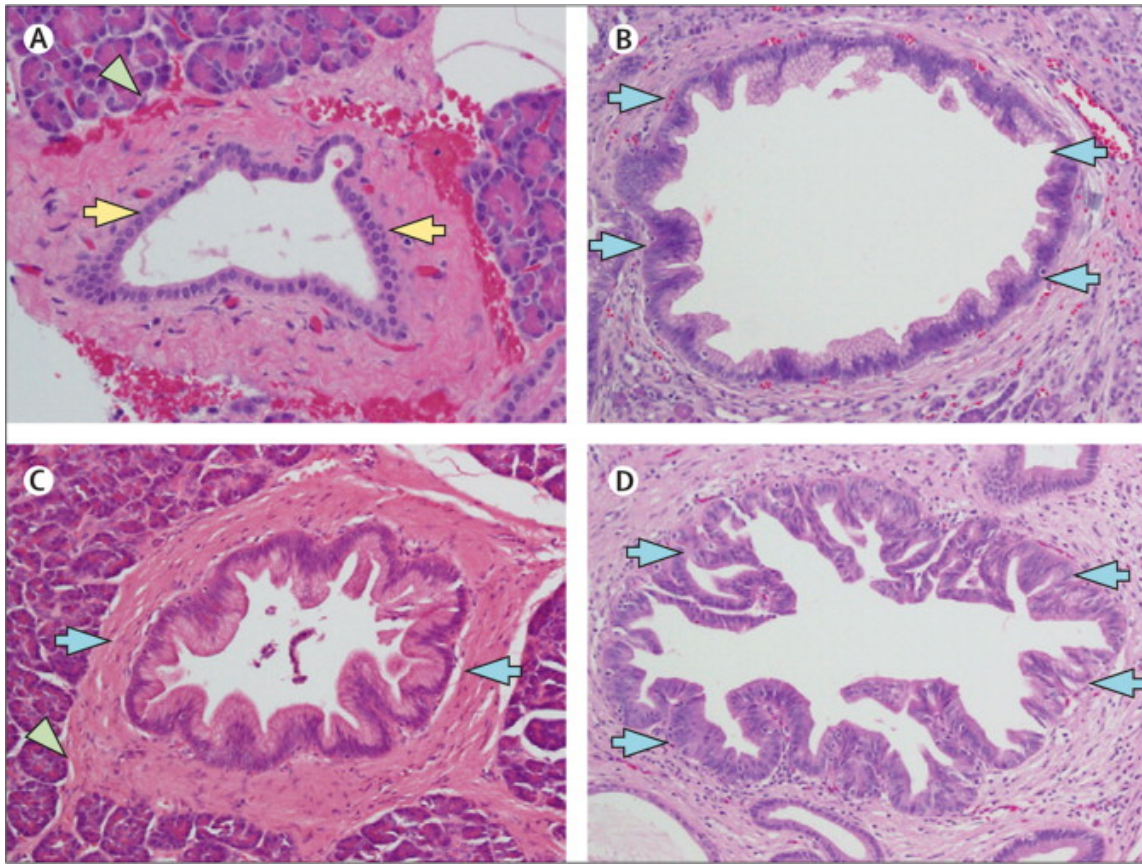


Figure 11. Lésions précurseurs PanIN

(A) cellules canalaire normales ; (B) stade PanIN-1 ; (C) PanIN-2 ; (D) PanIN-3. Flèches jaunes : canal pancréatique normal ; flèches vertes : cellules acinaires normales ; flèches bleues : PanIN. PanIN : Pancreatic Intraepithelial Neoplasia. D'après Vincent *et al.*, 2011.

B. II. 3. Anatomopathologie

Le cancer du pancréas siège dans 70% des cas dans la tête du pancréas. L'extension loco-régionale puis métastatique est très rapide. La moitié des malades diagnostiqués sont d'emblée métastatiques.

L'examen macroscopique met en évidence une tumeur ferme, mal limitée, d'aspect blanchâtre et mesurant de 1,5 à 5 cm.

Sur le plan histologique, la tumeur est caractérisée par une architecture tubulée constituée par des cellules arrondies aux noyaux élargis et hyperchromatiques. Ces cellules formant des structures glandulaires sont entourées d'un abondant stroma fibreux et desmoplasique.

B. II. 4. Les lésions précurseurs de l'adénocarcinome canalaire pancréatique

Le PDAC peut évoluer à partir de trois types de lésions pancréatiques différentes : les cystadénomes mucineux (MCN), les tumeurs intracanales papillaires et mucineuses du pancréas (TIPMP) et les lésions néoplasiques intra-épithéliales appelées PanINs. Elles répondent à cinq critères, établis en 2006, définissant une lésion précancéreuse : (1) lésion associée à un risque augmenté de cancer ; (2) cellules cancéreuses issues de cellules précancéreuses ; (3) lésion différente du tissu pancréatique normal ; (4) lésion différente du cancer qui va se développer ; (5) peut être mise en évidence (Berman *et al.*, 2006). Dans le laboratoire, nous nous intéresserons uniquement aux lésions PanIN (figure 11) qui sont les plus souvent à l'origine du PDAC et qui sont connues pour exprimer la mucine MUC4 (voir § A. V. I).

Les PanIN sont des lésions intraépithéliales dysplasiques des petits canaux pancréatiques (< 5 mm) non invasives et ne dépassant pas la membrane basale. Elles ont la particularité de se développer selon un processus séquentiel : hyperplasie puis dysplasie de bas, moyen et haut grade. Elles sont caractérisées par des anomalies cytologiques et architecturales qui permettent de les classer en trois grades différents PanIN-1A/PanIN-1B, PanIN-2 et PanIN-3 (figure 11) (Hruban *et al.*, 2001 ; Hruban *et al.*, 2007 ; Hruban *et al.*, 2004).

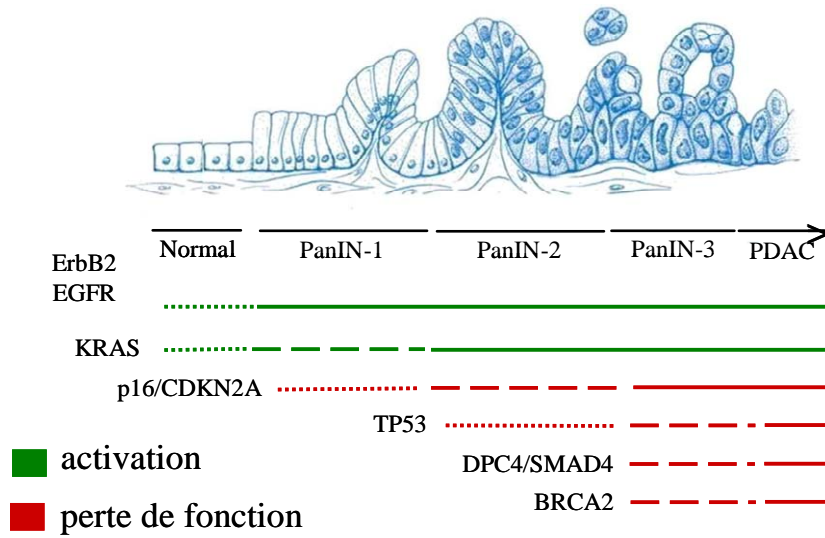


Figure 12. Mutations génétiques lors de la séquence carcinogénétique du PDAC.

D'après (Bardeesy and DePinho, 2002).

- PanIN-1 : il s'agit d'un épithélium canalaire à cellules cylindriques hautes avec conservation de la polarité cellulaire. Le noyau basal comporte un petit nucléole. La lésion peut être plane (PanIN-1A) ou papillaire (PanIN-1B).

- PanIN-2 : les lésions papillaires présentent différentes anomalies cytologiques comme la perte de la polarité cellulaire, une pseudostratification avec un empilement des noyaux et les nucléoles sont de taille plus importante.

- PanIN-3 : les lésions papillaires présentent des atypies cytologiques marquées comme des mitoses anormales, une perte de polarité cellulaire et un bourgeonnement intraluminal.

Les PanIN sont des lésions microscopiques, cliniquement silencieuses non détectables par les examens morphologiques conventionnels. Leur découverte par histologie sur pièce chirurgicale se fait de manière fortuite et après le diagnostic puisqu'elles sont localisées de manière fréquente à la périphérie de l'adénocarcinome. Ces lésions voient leur fréquence augmenter avec l'âge et comportent les mêmes anomalies génétiques et épigénétiques que l'adénocarcinome.

B. II. 5. Anomalies génétiques

Le PDAC est une des pathologies tumorales les mieux caractérisées sur le plan génétique (figure 12).

Trois grandes catégories de gènes sont associées aux pathologies cancéreuses : les oncogènes, les gènes suppresseurs de tumeurs et les gènes de réparation de l'ADN.

B. II. 5. 1. Les proto-oncogènes

Les proto-oncogènes sont des régulateurs positifs de la prolifération cellulaire. Des mutations activatrices (la mutation d'une seule des deux copies du gène est suffisante) leur confèrent une activité constitutive qui procure un avantage de croissance à la cellule qui peut devenir cancéreuse.

Les oncogènes les plus fréquemment mutés dans le PDAC sont les gènes *KRAS*, *AKT2* et *BRAF*.

KRAS

Le gène *KRAS* est localisé sur le chromosome 12. La fréquence de mutation de *KRAS* est supérieure à 90%. La mutation activatrice est ponctuelle et touche le codon 12 du gène. Elle intervient de manière précoce dans la cancérogenèse pancréatique dès le stade PanIN-1 où elle touche environ 40% des cellules jusqu'à atteindre 87% dans les PanIN-3. La mutation activatrice de *KRAS* est initiatrice de la tumorigenèse pancréatique. De nombreux modèles murins ont d'ailleurs été développés. Ainsi, les souris porteuses de la mutation *KRAS* dans le pancréas développent la séquence carcinogénétique des PanIN.

Le gène *KRAS* code la protéine RAS qui est une petite protéine G qui intervient dans les processus cellulaires de prolifération et de survie. Lorsque la protéine RAS est liée au GTP, elle est sous forme active et peut activer à son tour différentes voies de signalisation, RAF/MAPK et PI3K notamment, impliquées dans la prolifération et la survie cellulaire.

AKT2

La voie PI3K est constitutivement activée dans le PDAC par RAS mais peut l'être également suite à des altérations génétiques du gène *AKT2*. Le gène *AKT2* est localisé sur le chromosome 19. Il peut faire l'objet d'amplification génique dans 10 à 15% des cas.

BRAF

Le gène *BRAF*, localisé sur le chromosome 7, est le siège de mutations dans 5% des cas qui ont lieu dans les tumeurs *KRAS* sauvages.

ERBB2

Le gène *ERBB2* est localisé sur le chromosome 17 et peut faire l'objet d'amplification dans moins de 5% des cas.

Il existe d'autres mutations activatrices touchant des oncogènes comme les gènes *CMYC*, *MYB*, ou encore *EGFR* qui sont sujets à des amplifications géniques.

B. II. 5. 2. Les gènes suppresseurs de tumeurs

Les gènes suppresseurs de tumeurs sont des régulateurs négatifs de la prolifération cellulaire. Des mutations récessives les rendent inactifs (les deux copies de ces gènes sont inactivées dans les cancers).

Les gènes suppresseurs de tumeur les plus fréquemment inactivés dans l'adénocarcinome canalaire sont les gènes *p16/CDKN2A*, *TP53* et *DPC4/SMAD4*.

p16/CDKN2A

Le gène *p16/CDKN2A* est codé par le chromosome 9. Il s'agit du gène le plus fréquemment inactivé dans plus de 95% des cancers du pancréas. Les mécanismes responsables de la perte d'expression de ce gène sont :

- une délétion homozygote (des deux allèles) dans 40% des cas
- une mutation intragénique dans un allèle associée à une perte de l'autre allèle (40%)
- une hyperméthylation du promoteur du gène (15%)

Le gène *p16/CDKN2A* code une protéine de la famille des CDK (cyclin-dépendent kinase) qui a pour rôle d'inhiber la progression du cycle cellulaire par le point de contrôle G1/S.

TP53

Le gène *TP53* est localisé sur le chromosome 17. Il est inactivé dans 50 à 75% des cas de PDAC par inactivation génique sur un allèle associée à la perte de l'autre allèle.

Le produit du gène, la protéine p53, possède des fonctions importantes dans le cycle cellulaire puisqu'elle régule la transition G1/S et l'arrêt en phase G2 afin de permettre la réparation de l'ADN. Si les dommages de l'ADN ne sont pas réparés alors p53 induit l'apoptose.

DPC4/SMAD4

Le gène *DPC4/SMAD4*, localisé sur le chromosome 18, est inactivé dans 55% des cancers du pancréas soit par délétion homozygote (30% des cas) soit par inactivation génique sur le premier allèle associée à une perte du second allèle (25%).

La protéine SMAD4 est un facteur de transcription impliqué dans la voie de signalisation du TGF- β qui a pour rôle d'inhiber la prolifération cellulaire.

D'autres gènes suppresseurs de tumeurs sont inactivés dans le cancer du pancréas mais en fréquence moins importante (<5%) comme *MKK4*, *STK11*, *TGF β 1*, *TGF β 2*, *ACVR1B*.

B. II. 5. 3. Les gènes de réparation de l'ADN

Les gènes de réparation de l'ADN codent des protéines capables de détecter et de réparer les lésions de l'ADN, ils assurent ainsi le maintien de l'intégrité du génome. Ils sont également souvent inactivés dans les cellules cancéreuses. Contrairement aux oncogènes ou suppresseurs de tumeurs dont l'inactivation confère un avantage prolifératif pour la cellule cancéreuse, l'inactivation des gènes de réparation de l'ADN entraîne une accumulation de dommage à l'ADN et donc une instabilité génique à l'origine d'autres mutations. Les gènes les plus inactivés sont *BRCA2*, *MLH1*, *FANC-C* avec une fréquence peu importante (<5%).

B. II. 6. Diagnostic

B. II. 6. 1. Examen clinique

Le diagnostic du cancer du pancréas est difficile car c'est une maladie silencieuse avec une absence de symptômes spécifiques. Les symptômes les plus fréquents sont l'ictère, la douleur et l'altération de l'état général (Thésaurus National de Cancérologie Digestive, 2011).

L'ictère

Il est rencontré dans 80% des tumeurs de la tête. L'ictère s'explique par une compression du canal cholédoque qui ne peut plus drainer la bile vers le duodénum et la reflue alors dans la circulation sanguine expliquant le jaunissement des yeux et de la peau.

La douleur

Elle est présente chez 90% des patients. La douleur siège dans l'épigastre et irradie le dos. Elle traduit l'envahissement rétropéritonéal avec infiltration du plexus nerveux péripancréatique.

La perte de poids

L'amaigrissement est massif, jusqu'à 10% du poids du corps, et rapide (2-3 mois).

D'autres symptômes, moins fréquents, peuvent aussi être retrouvés comme la pancréatite, la phlébite, des vomissements, des diarrhées...

Les examens cliniques permettant de poser le diagnostic sont de deux types : biologique (tests sanguins) et l'imagerie.

B. II. 6. 2. Examen biologique

Les dosages des marqueurs sanguins sont inutiles car les taux sériques sont normaux ou non spécifiques. Le marqueur tumoral le plus utilisé est l'antigène carbohydrate CA19-9 qui reconnaît le motif sialyl Lewis^a (NeuAc-Galβ1-3(Fucα1-4)GlcNAcβ1). Le taux de CA19-9 est augmenté dans le cancer du pancréas mais également dans d'autres pathologies (diabète, cancer de l'ovaire par exemple). Malgré ses piètres qualités diagnostiques, le CA19-9 est surtout utilisé pour la surveillance évolutive de la maladie comme marqueur pronostique pré et post-opératoire.

B. II. 6. 3. Examen d'imagerie

Echographie

Il s'agit de la technique de première intention pour déceler le cancer du pancréas. Les performances de l'échographie dépendent de l'expérience de l'opérateur et peuvent être réduites si le patient est en surcharge pondérale. L'adénocarcinome est visualisé sur l'échogramme comme une masse hypoéchogène.

Tomodensitométrie

La tomodensitométrie, ou scanner avec administration intraveineuse de produit de contraste iodé, est l'examen de référence pour le diagnostic, le bilan d'extension (déterminer la taille de la tumeur et rechercher d'éventuelles localisations secondaires) et la surveillance. L'adénocarcinome pancréatique se traduit par une masse hypodense avec des contours mal limités. L'examen peut rechercher également des signes indirects comme la dilatation des voies biliaires ou du canal de Wirsung en amont de la tumeur. La tomodensitométrie donne beaucoup d'informations telles que la taille et la classification de la tumeur mais présente une performance limitée lorsque la tumeur est de petite taille (inférieure à 2 cm).

IRM (Imagerie par Résonance Magnétique)

L'IRM ne présente pas plus d'avantages que la tendositométrie mais peut être une alternative pour les patients allergiques aux produits de contraste iodés. Le développement récent de l'IRM de diffusion qui repose sur la facilité des molécules d'eau à diffuser dans les milieux biologiques est très prometteur. Cette technique permet la détection de tumeurs, non visibles en tomodensitométrie, avec une excellente sensibilité et spécificité.

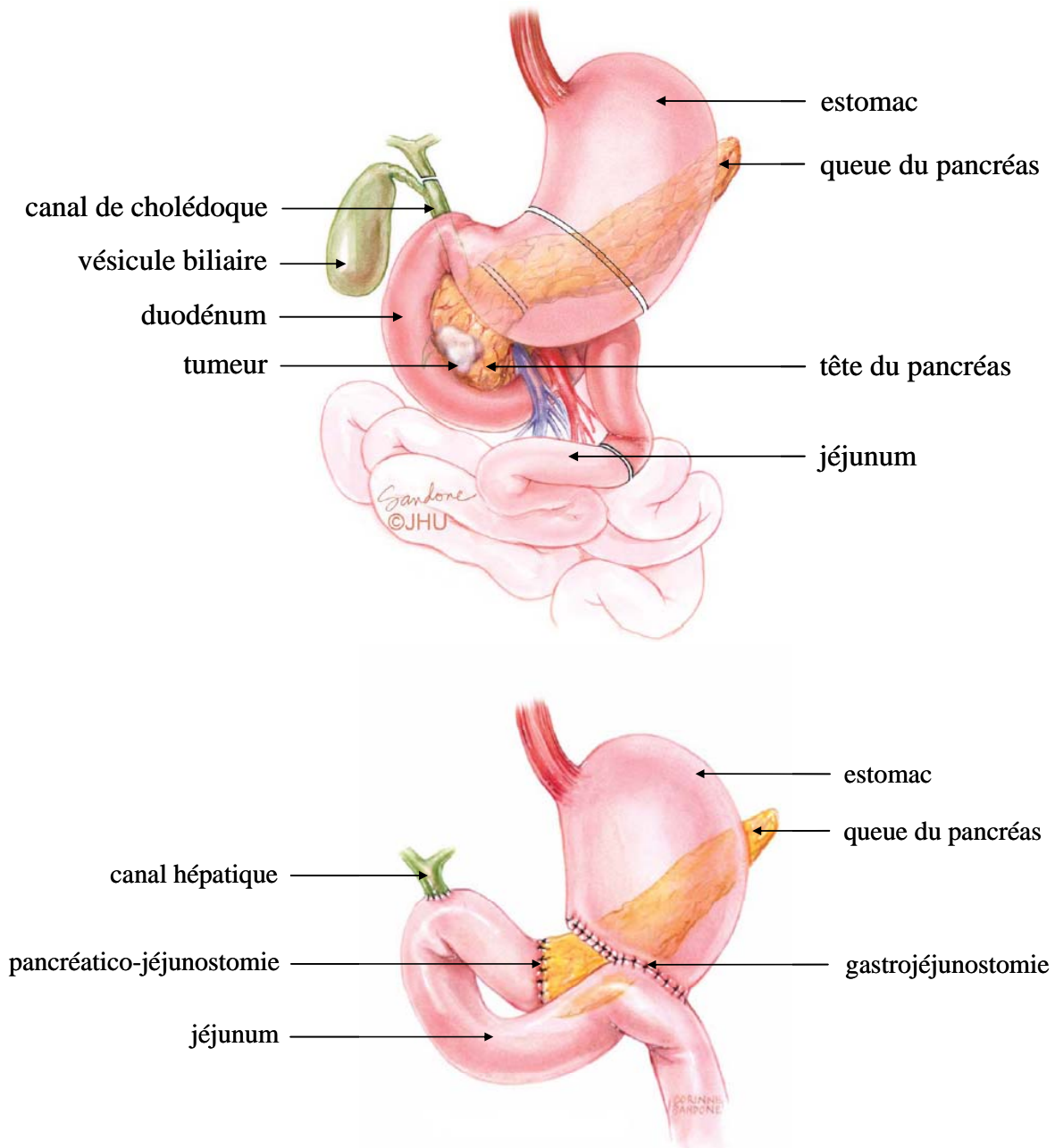


Figure 13. Duodéno-pancréatectomie céphalique (DPC).

(A) Avant l'acte chirurgical. (B) Après l'acte chirurgical. Les organes réséqués lors de la DPC incluent la partie distale de l'estomac, le duodénum, le canal cholédoque, la vésicule biliaire et la tête du pancréas. Trois anastomoses sont ensuite réalisées. L'estomac est reconnecté au jéjunum (anastomose gastro-jéjunale), le canal hépatique au jéjunum (anastomose hépatico-jéjunale) et le pancréas au jéjunum (anastomose pancréatico-jéjunale). D'après Wolfgang *et al.*, 2013. Illustrations de Corinne Sandone.

Echo-endoscopie

L'écho-endoscopie n'est pas utilisée en première intention pour le diagnostic. Elle est très performante pour détecter les tumeurs de taille inférieure à 2 cm. Elle permet de réaliser une biopsie par ponction à l'aiguille fine. Contrairement aux précédents examens, l'écho-endoscopie a l'inconvénient d'être une technique invasive.

Biopsie

Elle permet une analyse anatomopathologique afin de confirmer ou non le diagnostic du cancer du pancréas et de déterminer la nature de la tumeur. Elle n'est pas envisagée lorsque la tumeur est résécable. En revanche, elle est réalisée lorsqu'il y a un doute sur la résécabilité de la tumeur (difficulté de l'évaluation de l'envahissement locorégional) ou lorsque la tumeur est trop volumineuse et lors d'un envahissement local avancé ou métastatique. La biopsie est nécessaire pour l'orientation du traitement.

B. II. 7. Traitement

B. II. 7. 1. Chirurgie

La chirurgie est le seul traitement à visée curative pour le PDAC. Malheureusement, au moment du diagnostic seul 15 à 20% des patients en bénéficient. La chirurgie de référence pour les cancers du pancréas est la duodéno-pancréatectomie céphalique (DPC) (figure 13). Elle consiste à ôter la tête du pancréas et nécessite l'exérèse du duodénum, de la vésicule biliaire, du canal cholédoque et de la partie distale de l'estomac. Il faut ensuite rétablir le circuit digestif par une anastomose gastro-jéjunale, le circuit biliaire par une anastomose bilio-jéjunale et le circuit pancréatique en réalisant une anastomose pancréato-digestive (Wolfgang *et al.*, 2013). La mortalité post-opératoire est inférieure à 2% dans les centres spécialisés et peut atteindre 10% dans les centres non spécialisés.

L'intervention s'accompagne de nombreuses complications dont les plus fréquentes sont : le ralentissement de la vidange gastrique, la fistule pancréatique, une fuite au niveau des anastomoses, une infection abdominale, une hémorragie.

Le taux de survie à 5 ans est de l'ordre de 10 à 25%. Après la chirurgie, il existe un taux de rechute important. En conséquence, la chirurgie est accompagnée de traitements adjuvants comme la radiothérapie ou la chimiothérapie.

B. II. 7. 2. Traitements adjuvants

La grande majorité des patients (80%) ne peuvent être opérés lors d'un envahissement vasculaire artériel ou métastatique. La chimiothérapie seule ou en combinaison avec la radiothérapie est alors préconisée.

B. II. 7. 2. 1. Radiothérapie

La radiothérapie consiste à utiliser des rayons de haute énergie comme des rayons X ou des électrons produits par des accélérateurs à particules, soit des rayonnements gamma émis par des sources radioactives tel que le cobalt ou d'autres éléments radioactifs (césium, iridium). L'action de ces rayons s'exerce sur les cellules tumorales mais également sur les cellules saines voisines en entraînant des lésions à l'ADN et l'ARN. Les cellules cancéreuses se divisant plus rapidement sont plus sensibles à la radiothérapie que les cellules normales.

La dose de radiation à administrer dépend du type et de la localisation de la tumeur mais également de la. Pour le cancer du pancréas, la dose est de 45 à 60 Gy pendant environ 6 semaines (1,8 à 2 Gy/jour) accompagnée d'une chimiothérapie à faible dose utilisée comme radio-sensibilisant, comme le 5-Fluoro-uracile (5-FU) ou la gemcitabine (Crane *et al.*, 2011 ; Loehrer *et al.*, 2011 ; Schneider *et al.*, 2005 ; Small *et al.*, 2008 ; Small *et al.*, 2011). Ces doses de radiations sont très élevées et peuvent toucher les organes voisins, c'est pourquoi ce type de traitement n'est généralement administré qu'aux patients ayant un cancer très avancé (Vincent *et al.*, 2011).

La radiothérapie peut être utilisée en traitement palliatif pour améliorer le contrôle de la douleur dont souffrent beaucoup de patients et pour réduire la prise de médicaments analgésiques (Burriss and Storniolo, 1997). La radiothérapie est aussi utilisée en traitement néoadjuvant en association avec une chimiothérapie dans des cas de tumeurs résécables (Evans and Collins, 2008 ; Pingpank *et al.*, 2001) mais plusieurs études ont conduits à des résultats très discordants (1987 ; Klinkenbijnl *et al.*, 1999 ; Neoptolemos *et al.*, 2001 ; Neoptolemos *et al.*, 2004). Plusieurs études randomisées ont montré un effet moindre de la radiothérapie seule par rapport à la chimioradiothérapie pour le traitement des tumeurs pancréatiques (Huguet *et al.*, 2007 ; Krishnan *et al.*, 2007), c'est pourquoi la place de la radiothérapie reste très débattue et depuis quelques années un consensus général veut que la radiothérapie soit administrée en combinaison avec une chimiothérapie (Brunner and Eccles, 2010).

B. II. 7. 2. 2. Chimiothérapies

La mono-chimiothérapie a fait l'objet de nombreuses études chez des patients présentant une tumeur non résecable ou métastatique mais l'adénocarcinome du pancréas présente une chimiorésistance marquée et peu de drogues évaluées ces dernières années ont donné un taux de réponse supérieure à 15% tant en mono-chimiothérapie qu'en association.

5-FU

Le 5-FU est un dérivé fluoré de l'uracile dont le mécanisme d'action principal est de bloquer la méthylation de l'uracile en thymine aboutissant à une inhibition de la synthèse d'ADN. Jusque 1995, le 5-FU était le seul agent chimiothérapeutique actif dans le traitement du cancer du pancréas. L'association du 5-FU avec d'autres chimiothérapies comme la doxorubicine ou encore la mitomycine a été testée mais aucun des essais randomisés n'a montré un bénéfice significatif en terme de survie par rapport au traitement par le 5-FU seul (Cullinan *et al.*, 1985). Un essai clinique de phase III a été mis en place avec 207 patients inclus pour comparer les effets d'un traitement 5-FU seul par rapport à l'association 5-FU et cisplatine. Dans cette étude, la survie globale était comparable dans les deux groupes (Ducieux *et al.*, 2002 ; Strimpakos *et al.*, 2008). L'activité pharmacologique du 5-FU nécessite un métabolisme intracellulaire, des précurseurs comme la capécitabine ont donc été développés. La conversion de la capécitabine en 5-FU se fait sous l'action successive de trois enzymes. La dernière enzyme, la thymidine phosphorylase est surexprimée dans les tumeurs par rapport aux tissus sains ainsi la capécitabine est métabolisée de manière préférentielle dans les cellules tumorales (Bajetta *et al.*, 1996 ; Miwa *et al.*, 1998 ; Schuller *et al.*, 2000). Le bénéfice de la capécitabine par rapport au 5-FU a été démontré par un essai clinique de phase II chez des patients atteints de cancer du pancréas avancé ou métastatique (Cartwright *et al.*, 2002).

Gemcitabine

La gemcitabine est un analogue structural de la désoxycytidine. Elle pénètre dans la cellule grâce à des transporteurs spécifiques et y subit une activation intracellulaire. Son mécanisme d'action principal est le blocage de la synthèse d'ADN et l'induction de l'apoptose.

Depuis plus d'une décennie et l'essai clinique de Burris et collaborateurs, la gemcitabine est le traitement standard pour le cancer du pancréas avancé. Dans cette étude

randomisée, le bénéfice incontestable de la gemcitabine par rapport au 5-FU a été démontré avec une médiane de survie de 5,7 mois contre 4,2 mois pour le 5-FU, un taux de survie à 1 an de 18 % contre 2 % et enfin une réponse clinique de 22,2 % contre 4,8 % pour le 5-FU (Burriss and Storniolo, 1997). Afin d'améliorer le bénéfice en terme de médiane de survie, plusieurs essais cliniques ont été menés en association la gemcitabine à d'autres agents chimiothérapeutiques comme le 5-FU, la capécitabine, l'oxaliplatine, le cisplatine ou encore l'irinotécan. Cependant les résultats ont été très décevants. (Berlin *et al.*, 2000 ; Cascinu *et al.*, 1999 ; Colucci *et al.*, 2002 ; Heinemann *et al.*, 2006 ; Herrmann *et al.*, 2007 ; Hidalgo *et al.*, 1999 ; Louvet *et al.*, 2005 ; Matano *et al.*, 2000 ; Poplin *et al.*, 2009 ; Rocha Lima *et al.*, 2004 ; Stathis and Moore, 2010). Seule l'association de l'erlotinib avec la gemcitabine a permis de démontrer une amélioration du taux de survie à 1 an, 23 % contre 18 % avec la gemcitabine seule (Moore *et al.*, 2007).

Cependant, récemment, plusieurs méta-analyses ont montré un bénéfice des thérapies combinées à base de gemcitabine pour les patients en très bon état général. Dans un premier essai, comparant l'association gemcitabine et les dérivés platine, la médiane de survie était supérieure pour le groupe gemcitabine et dérivés platine que pour celui gemcitabine seule (Heinemann *et al.*, 2007). Le bénéfice de cette association de la gemcitabine avec les dérivés platine a été confirmé par une autre équipe (Sultana *et al.*, 2007).

FOLFIRINOX

Le FOLFIRINOX est la combinaison des quatre molécules suivantes : l'oxaliplatine, l'irinotécan, le 5-FU et la leucovorine. Les trois premiers étant des agents chimiothérapeutiques, la leucovorine est un acide folinique utilisé comme traitement adjuvant. La leucovorine permet de potentialiser les effets thérapeutiques du 5-FU en bloquant l'action de la thymidylate synthase. (Wolmark *et al.*, 1993).

L'essai clinique français de phase III a comparé le FOLFIRINOX à la gemcitabine dans le traitement du cancer du pancréas métastatique. Le FOLFIRINOX a permis d'augmenter de manière significative la survie globale avec une médiane de 11,1 mois contre 6,8 mois pour la gemcitabine. Le taux de survie à 1 an est de 48,4 % contre 20,6 % pour les patients traités à la gemcitabine seule. Le FOLFIRINOX a également permis un meilleur taux de réponse (31,6 % contre 9,4 %). Néanmoins, ce traitement se caractérise par une toxicité plus importante que la gemcitabine (Conroy *et al.*, 2011 ; Conroy and Mitry, 2011) c'est pourquoi son utilisation se limite aux patients en très bon état général.

folinique, 5-FU, oxaliplatine) ou encore le FOLFIRI (acide folinique, 5-FU, oxaliplatine). La toxicité secondaire de ces combinaisons partielles est acceptable mais l'effet curatif est réellement moindre que pour le FOLFIRINOX (Yoo *et al.*, 2009).

Nab-Paclitaxel

Le nab-paclitaxel est une formulation de nanosphères constituées d'albumine encapsulant le paclitaxel. L'albumine étant un transporteur naturel de molécules hydrophobes favorise le transport de l'agent anticancéreux à travers les cellules endothéliales, permet un meilleur ciblage de la tumeur. L'accumulation du paclitaxel dans la tumeur serait augmentée par la liaison spécifique de l'albumine à la protéine SPARC (*Secreted Protein Acidic and Rich in Cystein*) qui est surexprimée dans le cancer du pancréas.

L'essai international de phase III MPACT a comparé l'association du nab-Paclitaxel avec la gemcitabine et la gemcitabine seule chez 861 patients randomisés atteints d'un cancer du pancréas métastatique. L'étude a montré une amélioration de la survie globale des patients qui passe de 6,7 mois avec la gemcitabine seule contre 8,5 mois avec la combinaison. Le taux de survie à 1 an est de 22 % pour le groupe de patients traités au nab-Paclitaxel en association avec la gemcitabine contre 9 % pour la gemcitabine seule. L'ajout du nab-Paclitaxel a également permis une amélioration du taux de réponse passant de 7 à 23 % et de la survie sans progression qui passe de 3,7 à 5,5 mois.

La combinaison du nab-Paclitaxel et de la gemcitabine s'accompagne d'une toxicité hématologique (neutropénies), digestive (diarhées) et neurologique périphérique (neuropathies) mais la balance efficacité/toxicité reste favorable (Von Hoff *et al.*, 2013).

C. Les micro-ARN

Pendant longtemps, les ARN étaient considérés comme de simples intermédiaires entre l'ADN et les protéines. Mais depuis les années 1990, une nouvelle classe de petits ARN non codants a été découverte, les micro-ARN (miARN). Il s'agit d'ARN simple brin de 21 à 25 nucléotides capable de se fixer sur les ARNm pour moduler leur expression. Les miARN sont une nouvelle classe de régulateurs géniques puisqu'il a été estimé à plus de 60% les gènes humains codant pour des protéines qui seraient régulés par des miARN (Friedman *et al.*, 2009).

C. I. Découverte

Les miARN ont été découverts chez *C. elegans*. En 1993, il a été montré que le gène *lin-4*, impliqué dans la régulation développement larvaire, ne codait pas une protéine mais un petit ARN non codant d'une vingtaine de nucléotides qui dérivait d'un précurseur en épingle à cheveux (Lee *et al.*, 1993). Le gène *lin-4* est localisé dans une région d'ADN dépourvue de cadre de lecture. L'ARN *lin-4* est capable de se fixer sur des sites complémentaires situés dans le 3'-UTR de l'ARNm de *lin-14* entraînant l'inhibition de sa traduction. Aucune homologie de séquence avec le gène *lin-4* n'a été identifiée chez d'autres espèces faisant de ce mode de régulation une exception. Il faut attendre l'an 2000, avec la découverte d'un nouveau miARN chez *C. elegans* *let-7* (Reinhart *et al.*, 2000) ayant cette fois-ci des homologues chez d'autres espèces et notamment chez l'Homme (Pasquinelli *et al.*, 2000), pour généraliser ce mode de régulation.

C. II. Organisation génomique

Environ 40% des miARN humains appartiennent à des unités transcriptionnelles déjà connues et annotées du génome. Ceux-ci sont principalement trouvés dans les introns des gènes (Griffiths-Jones *et al.*, 2008 ; Rodriguez *et al.*, 2004 ; Saini *et al.*, 2007). Ils sont dans le même sens d'orientation et sont donc transcrits en même temps que leur gène hôte. Il existe de très rares cas où le miARN est situé dans l'exon d'un gène. Il existe des miARN localisés dans les régions intergéniques, ils sont alors transcrits de manière indépendante et ont leur

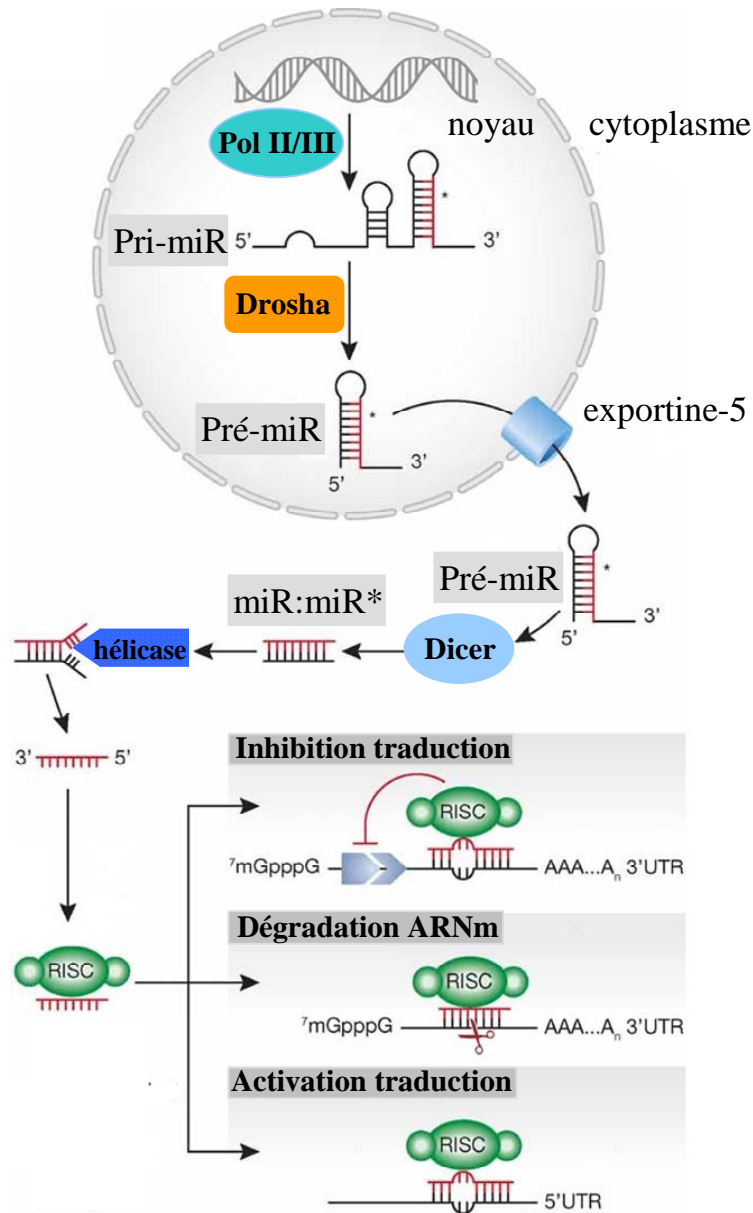


Figure 14. Biosynthèse des miARN.

La maturation des miARN débute par la transcription du gène codant le miARN en transcript primaire (pri-miR) qui est ensuite clivé dans le noyau par la RNase Drosha pour donner le miARN précurseur (pré-miR). Le pré-miR est transporté dans le cytoplasme par l'exportine 5 afin d'y être clivé par le complexe Dicer et de donner un duplexe miARN:miARN*. Le brin mature est incorporé dans le complexe RISC dans lequel il servira de guide afin de cibler l'ARNm cible et induire sa dégradation, l'inhibition ou l'activation de sa traduction. RISC : *RNA-induced silencing complex*. D'après Iorio and Croce, 2012.

propre promoteur. Un tiers des miARN du génome sont regroupés sur le même locus, organisés en « cluster », et sont transcrits de manière polycistronique (Lee *et al.*, 2002).

C. III. Biogenèse

Les miARN sont principalement transcrits dans le noyau par l'ARN polymérase II en longs transcrits primaires (pri-miARN) de plusieurs kilobases. Les pri-miARN possèdent donc une coiffe en 5' et sont polyadénylés. Toutefois, certains miARN peuvent être transcrits sous la dépendance de l'ARN polymérase III (Monteys *et al.*, 2010 ; Oszolak *et al.*, 2008). Les pri-miARN sont clivés par l'enzyme Drosha RNase III et donnent lieu à des précurseurs d'environ 70 à 100 nucléotides appelés pré-miARN. Les pré-miARN ont une structure en tige-boucle (le miARN mature et sa séquence complémentaire sont compris dans la tige). Après exportation dans le cytoplasme par l'exportine-5, la forme particulière d'épingle à cheveux des pré-miARN va être reconnue puis traitée par l'endonucléase Dicer pour donner le miARN double brin mature appelé duplex miARN/miARN* d'environ 22 nucléotides qui correspond à l'hybridation du miARN mature avec sa séquence complémentaire (Hutvagner *et al.*, 2001 ; Lau *et al.*, 2001 ; Lee *et al.*, 2003b). Le miARN mature, qui est la partie active du précurseur, va être chargé dans un complexe appelé *RNA-induced silencing complex* (RISC) alors que le miARN complémentaire inactif va être dégradé (Liu *et al.*, 2004 ; Meister *et al.*, 2004). Le miARN mature associé avec l'unité RISC permettra sa fixation sur son ARNm cible (Iorio and Croce, 2012) (figure 14).

C. IV. Nomenclature

Un système de nomenclature a été adopté permettant d'identifier et de nommer les miARN avant la publication de leur découverte (figure 15). Les miARN sont enregistrés et répertoriés dans la base de donnée miRBase (www.mirbase.org). L'annotation se base sur un système de numérotation en fonction de l'ordre de découverte du miARN (Ambros *et al.*, 2003). Le numéro du miARN est précédé du préfixe « mir » s'il s'agit du miARN précurseur ou « miR » si l'on se réfère au miARN mature suivi d'un tiret. La nature de l'espèce est indiqué par les trois premières lettres (hsa : *Homo sapiens* ; cel : *Caenorhabditis elegans*). Deux miARN ayant des séquences ne différant que par un ou deux nucléotides auront des lettres différentes comme suffixes (miR-196a et miR-196b). Si deux miARN proviennent de précurseurs et de locus génomiques différents mais possèdent la même séquence mature alors un suffixe numérique est attribué (miR-219-1 et miR-219-2). Le miARN précurseur peut

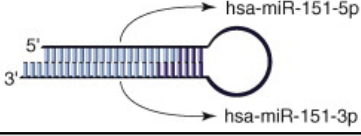
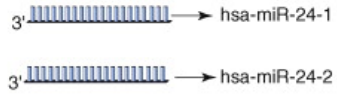
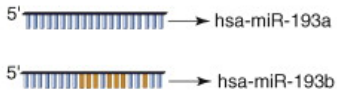
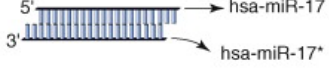
suffixe	définition	exemple
-5p & -3p	bras opposés provenant du même miARN précurseur	 hsa-miR-151-5p hsa-miR-151-3p
nombres	miARN provenant de locus génomiques différents mais ayant la même séquence mature	 hsa-miR-24-1 hsa-miR-24-2
lettres	miARN dont la séquence ne diffère que de quelques nucléotides	 hsa-miR-193a hsa-miR-193b
astérisque	bras provenant du miARN précurseur exprimé de façon minoritaire dans la cellule	 hsa-miR-17 hsa-miR-17*

Figure 15. Nomenclature des miARN.

D'après (Luense *et al.*, 2009).

produire, à partir de chacun de ces deux brins opposés, deux miARN matures qui sont notés avec le suffixe -5p ou -3p en fonction du brin d'origine (miR-219-1-3p et miR-219-1-5p). L'ancienne nomenclature distinguait les deux brins par le suffixe -s (sens) ou -as (antisens) ou lorsque l'on connaissait les niveaux d'expression des deux miARN matures issus de brins opposés, un astérisque indiquait qu'il s'agissait du miARN minoritaire mais ces deux annotations ne sont plus d'actualité. Un troisième miARN tout aussi actif mais présent de manière moins fréquente dans le cytoplasme, dérivant de la région en boucle du miARN précurseur et appelé « loop-miRNA », peut être généré (Winter *et al.*, 2013).

C.V. Interaction miARN/ARNm cible

C. V.1 Principes d'interaction

La reconnaissance de l'ARNm se fait par complémentarité de séquence entre le miARN et une séquence partiellement complémentaire située généralement dans le 3'-UTR de l'ARNm cible, appelée MRE pour *miRNA Response Element* (Elément de réponse au miARN). En fonction du degré d'appariement, l'ARNm est dégradé en cas d'appariement parfait ou l'ARNm sera non traduit si l'appariement est imparfait, ce qui est largement le cas chez l'Homme.

Le motif d'appariement le plus commun consiste en un appariement parfait entre les nucléotides 2 et 8 à l'extrémité 5' du miARN, qui constituent la région *seed* du miARN, et l'ARNm cible (Pasquinelli, 2012) (figure 16).

Un appariement imparfait en 5' du miARN peut être compensé par une forte interaction à l'extrémité 3'. La région centrale (nucléotides 10-12 du miARN) contient des mésappariements ou des boucles qui permettraient d'éviter le clivage de l'ARNm cible par le complexe RISC (figure 16). Récemment, un appariement avec des sites centraux du miARN a été décrit (Shin *et al.*, 2010) (figure 16). L'apparente flexibilité de ces règles d'appariement suggère l'implication d'autres facteurs dans l'interaction miARN/ARNm. La richesse en dinucléotides AU (résidu A en position 1 et A ou U en position 9) permettrait d'améliorer l'efficacité de l'interaction. La proximité du site d'interaction avec un codon STOP serait importante, comme la proximité avec les autres sites de liaisons du même miARN ou de miARN différents puisqu'en général, une coopération entre les différents sites est observée et permet une répression efficace de la traduction (Doench and Sharp, 2004 ; Grimson *et al.*, 2007). L'efficacité de l'interaction peut être influencée par les protéines liant l'ARN (*RNA binding proteins*) comme les protéines PUF ou HuR (Bhattacharyya *et al.*, 2006).

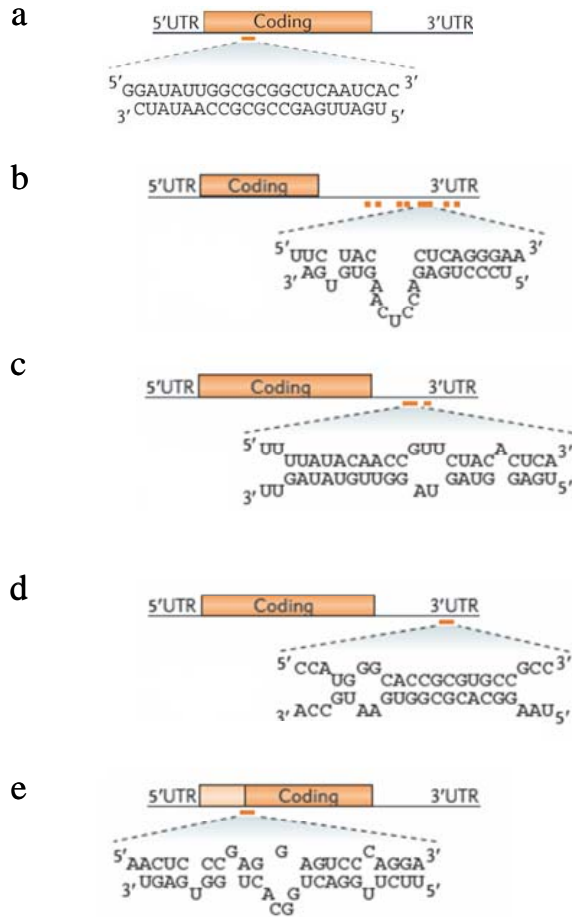


Figure 16. Exemples d'appariements des miARN avec leurs cibles.

(a) Appariement parfait retrouvé chez les plantes, (b) appariement partiel retrouvé typiquement dans le règne animal, (c) l'appariement imparfait au niveau de la séquence *seed* est compensé par une forte interaction de l'extrémité 3' du miARN avec l'ARNm cible, (d) appariement de la région centrale du miARN, (e) appariement du miARN au niveau de la région codante de l'ARNm cible et parfois qui se fait à la jonction exon/exon. D'après Pasquinelli, 2012.

Les miARN peuvent également interagir avec des sites MRE situés dans le 5'-UTR ou au niveau de la région codante de l'ARNm cible (Gu *et al.*, 2009 ; Kloosterman *et al.*, 2004 ; Orom *et al.*, 2008 ; Rigoutsos, 2009) et activer la traduction des ARNm (Henke *et al.*, 2008 ; Niepmann, 2009 ; Orom *et al.*, 2008 ; Vasudevan *et al.*, 2007 ; Vasudevan *et al.*, 2008).

C. V. 2. Identification des cibles

C. V. 2. 1 Prédiction informatives

Les programmes de prédiction de cibles utilisent plusieurs critères pour l'identification des ARNm cibles. Le critère principal repose sur la conservation phylogénétique : principalement celle de l'appariement parfait au niveau de la séquence *seed*, ainsi que la conservation des *MRE* pour favoriser l'identification de sites fonctionnels sélectionnés au cours de l'évolution (John *et al.*, 2004 ; Krek *et al.*, 2005 ; Lewis *et al.*, 2003). La structure secondaire du 3'-UTR, définie par le contexte AU, qui régit l'accessibilité du miARN à sa séquence cible constitue un autre critère utilisé par les logiciels de prédiction. Une liste de plusieurs dizaines à centaines de cibles pour un miARN donné peut alors être obtenue mais ces dernières n'ont pas toujours une réalité biologique. Des validations expérimentales sont alors nécessaires.

C. V. 2. 2. Méthodes expérimentales

La surexpression et/ou l'inhibition du miARN suivie(s) de la mesure de l'effet sur l'expression de la cible endogène d'une part et sur l'utilisation de gènes rapporteurs comme la luciférase, fusionnée au 3'-UTR du gène cible, d'autre part, est une approche *in vitro* permettant de valider une cible prédite. L'identification des ARNm cibles endogènes peut également se faire *in vivo* par des méthodes biochimiques qui ont l'avantage d'être très sensibles en permettant d'identifier plusieurs ARNm cibles. Ces méthodes reposent sur l'immunoprécipitation des complexes miRISC et les plus connues sont le CLIP-seq pour *ultraviolet crosslinking and immunoprecipitation coupled to deep sequencing* ou le HITS-CLIP pour *high-throughput sequencing coupled with ultraviolet crosslinking and immunoprecipitation* (Chi *et al.*, 2009 ; Hafner *et al.*, 2010 ; Leung *et al.*, 2011 ; Zisoulis *et al.*, 2010). Ces techniques permettent d'identifier les séquences de fixation des miARN au niveau des ARNm cibles et grâce aux nouvelles technologies de séquençage de déterminer la séquence cible au nucléotide près. Ces techniques très informatives ont apporté toutes les données relatives aux

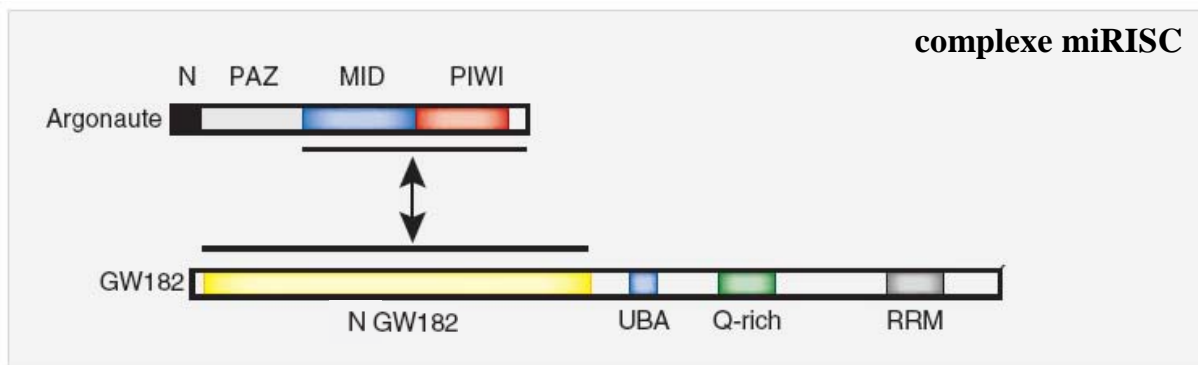


Figure 17. Complexe miRISC.

Domaines structuraux des protéines composant RISC. Les protéines AGO renferment un domaine Nt (N), un domaine de liaison au miARN, PAZ, et deux domaines d'interactions avec la protéine GW182, MID et PIWI. Les protéines GW182 sont constituées d'un domaine Nt (N GW182), riche en répétitions GW, capable d'interagir avec les domaines MID et PIWI des protéines AGO. Cette région riche en GW associée aux domaines UBA et *Q-rich* est responsable de la localisation des protéines GW182 dans les *P-bodies*. PAZ : Piwi-Argonaute-Zwilli, MID : *middle*, PIWI : *P-element induced wimpy testis*, UBA : *putative ubiquitin-associated domain*, Q-rich : domaine riche en résidus glutamine et RRM : RNA-recognition motif. D'après Fabian and Sonenberg, 2012.

règles d'interaction miARN / ARNm comme l'appariement au niveau de la séquence *seed*, la conservation phylogénétique ou l'accessibilité des sites de fixation et de mettre en évidence les interactions des miARN au niveau des régions codantes ainsi que l'existence de sites de fixation ne répondant pas aux règles classiques d'appariement. La limite de ces techniques de CLIP est qu'elles ne permettent pas d'affirmer la fonctionnalité de l'interaction mise en évidence.

C. VI. Modes d'action

Les miARN fonctionnent sous la forme d'un complexe nommé miRISC (figure 17) composé du miARN et de protéines de la famille Argonaute (Ago) et GW182 (*Glycine-Tryptophan repeat-containing protein of 182 kDa*). Dans ce complexe ribonucléoprotéique, le miARN sert de guide en reconnaissant l'ARNm cible et les protéines sont les effectrices de l'inhibition de la répression des ARNm cibles (Fabian and Sonenberg, 2012).

C. VI. 1. Le complexe RISC

Les protéines AGO

Les protéines sont constituées de quatre domaines conservés ; le domaine Nt, Piwi-Argonaute-Zwilli (PAZ), *middle* (MID) et *P-element induced wimpy testis* (PIWI) (figure 17). Les analyses structurales par cristallographie montrent que les protéines AGO possèdent une architecture bilobée avec les domaines Nt et PAZ dans un lobe et les domaines MID et PIWI dans le second (Song *et al.*, 2004). Le domaine PAZ reconnaît et lie l'extrémité 3' débordante, composée de 2 nucléotides, du miARN mature. Le domaine PIWI forme une poche hydrophobe contenant le domaine catalytique RNase H constitué de résidus conservés DDH (Asp/Asp/His). Les domaines PIWI et MID interagissent avec l'extrémité 5'-phosphate du miARN (Jinek and Doudna, 2009 ; Peters and Meister, 2007). Le recrutement d'ions Mg^{2+} au niveau de la jonction des domaines PIWI et MID est nécessaire à l'activité RNase H qui peut alors cliver l'ARNm au centre du duplexe miARN/ARNm, entre les nucléotides 10-11 (Elbashir *et al.*, 2001 ; Engels and Hutvagner, 2006 ; Martinez and Tuschl, 2004). Chez l'Homme, il existe 4 protéines AGO (AGO 1 à 4) mais seule AGO2 possède un domaine catalytique actif et efficace (Liu *et al.*, 2004).

Les protéines GW182

Chez l'Homme, il existe 3 protéines GW182 nommées *trinucleotide repeat-containing protein* (TNRC) 6A, B et C. Le segment Nt des protéines renferme de nombreuses répétitions de type GW, WG ou GWG impliquées dans l'interaction avec les protéines AGO (El-Shami *et al.*, 2007 ; Lian *et al.*, 2009 ; Takimoto *et al.*, 2009 ; Yao *et al.*, 2011) (figure 17). La disruption de cette interaction empêche la répression induite par les miARN (Behm-Ansmant *et al.*, 2006 ; Eulalio *et al.*, 2008 ; Till *et al.*, 2007). Le domaine Nt GW est suivi du *putative ubiquitin-associated domain* (UBA) et d'un domaine riche en résidus glutamine (*Q-rich*) responsable de la localisation des protéines GW182 dans les foci cytoplasmiques appelés « corps-P » (*P-bodies*) ou « corps-GW » (*GW bodies*) , qui contiennent des enzymes de dégradation des ARNm et sont impliqués dans le catabolisme et/ou le stockage des ARNm non traduits (Eystathioy *et al.*, 2002 ; Eystathioy *et al.*, 2003 ; Ingelfinger *et al.*, 2002 ; Sheth and Parker, 2003 ; van Dijk *et al.*, 2002).

L'extrémité Ct referme le domaine *RNA Recognition Motif* (RRM) qui est impliqué non pas dans l'interaction avec l'ARNm mais dans sa déstabilisation et l'inhibition de sa traduction (Baillat and Shiekhattar, 2009 ; Zipprich *et al.*, 2009) (figure 17).

C. VI. 2. Mécanismes de régulation par les miARN

C. VI. 2. 1. Deadénylation et dégradation des ARNm

Le mécanisme de dégradation, par les miARN, de l'ARNm cible a été démontré par diverses observations comme la diminution des transcrits cibles après surexpression d'un miARN particulier (Selbach *et al.*, 2008). L'inhibition de Dicer, AGO ou GW182 entraîne une augmentation des niveaux d'ARNm dans la cellule. De plus, les niveaux d'expression des ARNm et des protéines cibles sont généralement corrélés et, au sein de la cellule, les microARN associés aux ARNm sont retrouvés dans des régions particulières : les *P-bodies* qui sont des sites de stockage et de dégradation des ARNm (Jakymiw *et al.*, 2007).

La protéine GW182 recrutée par AGO s'associe avec la protéine de liaison à la queue polyA PAPB (*PolyA binding protein*). L'ARNm peut être dégradé soit dans le sens 3'-5' ou dans le sens 5'-3' avec d'abord un enlèvement de la coiffe suivi de la dégradation de l'ARNm par des exonucléases (Coller and Parker, 2004) (Fabian *et al.*, 2010) (figure 18a).

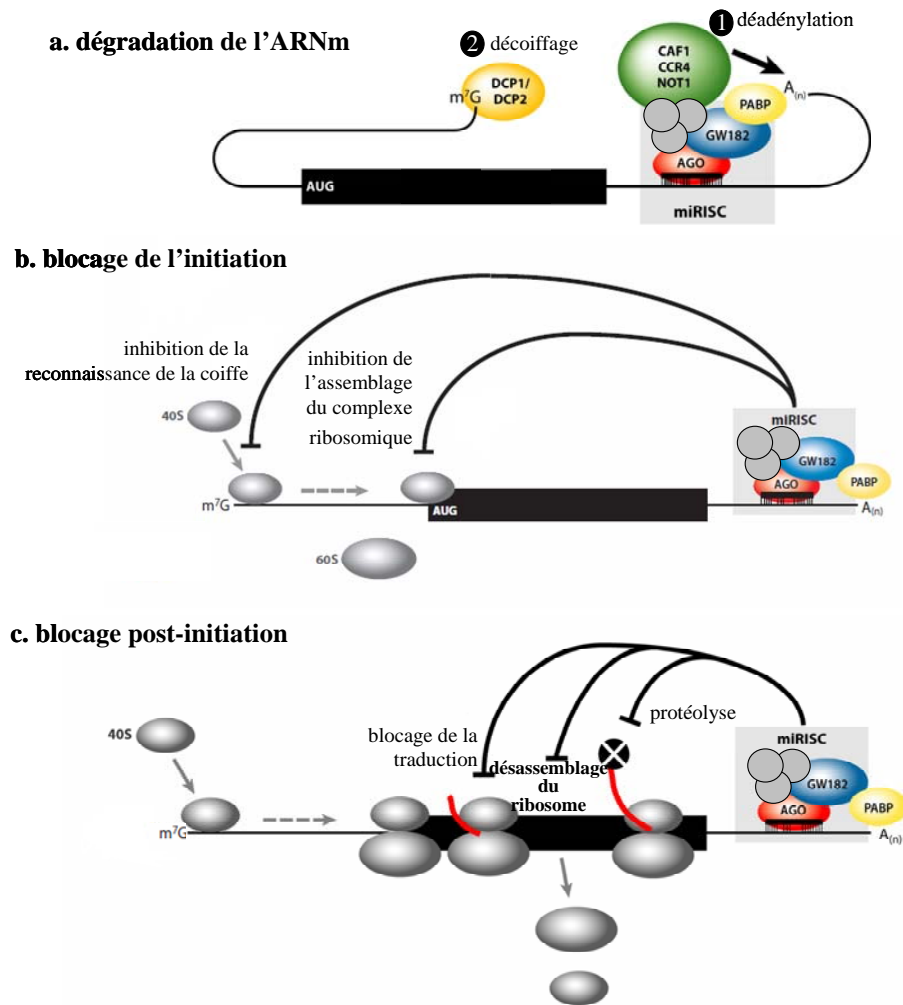


Figure 18. Modes d'action des miARN.

(a) Le complexe miRISC interagit avec le complexe déadénylase (CCR4-NOT1) afin de favoriser la déadénylation de la queue polyA ($A_{(n)}$). La déadénylation nécessite l'interaction directe de la protéine GW182 avec la *poly(A)-binding protein* (PABP), la coiffe en 5' est ensuite retirée par le complexe de décoiffage (DCP1/DCP2). (b) Blocage de l'initiation de la traduction : le complexe miRISC empêche soit la reconnaissance et le recrutement de la sous-unité ribosomale 40S, soit la formation du complexe ribosomale 80S. (c) Blocage post-initiation : le complexe miRISC inhibe l'étape d'élongation de la traduction en induisant le désassemblage du ribosome ou en favorisant la protéolyse du polypeptide naissant. Les sphères grises au niveau du complexe RISC représentent de potentiels protéines du complexe pas encore identifiées. Elles faciliteraient la répression de la traduction.

AGO : Argonaute; CAF1 : *CCR4-associated factor*; CCR4 : *carbon catabolite repression 4 protein*; NOT1 : *negative on TATA-less*. D'après Fabian *et al.*, 2010.

C. VI. 2. 2. Inhibition de la traduction

Les mécanismes de blocage de la traduction par les miARN sont sujets à controverse et ne sont pas bien décryptés. Certaines études montrent une régulation au niveau de l'étape d'initiation de la traduction et d'autres pendant l'étape d'élongation (Fabian *et al.*, 2010).

De nombreuses études ont montré que les miARN entraînaient une diminution de l'expression protéique de la cible sans changement de son taux d'ARNm suggérant donc un blocage de la traduction (Doench and Sharp, 2004 ; Pillai, 2005). L'analyse du gradient de polysomes des cibles du miARN let-7 montre une diminution de l'association aux polysomes (Ding and Grosshans, 2009). Dans les cellules HeLa, les miARN sont capables de réprimer efficacement la traduction des ARNm ayant une coiffe m7G alors que les ARNm produits à partir d'une séquence *Internal Ribosome Entry Site* (IRES) et donc dépourvus de coiffe ou ayant une coiffe non fonctionnelle ne sont pas réprimés par les miARN (Humphreys *et al.*, 2005 ; Pillai, 2005 ; Zdanowicz *et al.*, 2009).

La coiffe m7G et la queue poly(A) sont nécessaires à la répression de la traduction induite par les miARN (Mathonnet *et al.*, 2007 ; Thermann and Hentze, 2007 ; Wakiyama *et al.*, 2007 ; Wang *et al.*, 2006). Ces données suggèrent que le blocage de la traduction par les miARN intervient à l'étape d'initiation. Les mécanismes proposés sont l'inhibition de la reconnaissance de la coiffe (Mathonnet *et al.*, 2007 ; Thermann and Hentze, 2007 ; Wakiyama *et al.*, 2007 ; Wang *et al.*, 2006) ou l'inhibition de l'assemblage du complexe ribosomique (Chendrimada *et al.*, 2007 ; Wang *et al.*, 2008) (figure 18b). D'autres études suggèrent une inhibition de la traduction après l'étape d'initiation confortée par l'observation d'une association des miARN aux polysomes (Huntzinger and Izaurralde, 2011). Les mécanismes impliqués seraient une protéolyse du peptide naissant ou une dissociation du complexe ribosomique de l'ARNm (Petersen *et al.*, 2006) (figure 18c).

C. VI. 2. 3. Activation de la traduction

Ces dernières années, il a été décrit qu'en fonction de l'état de prolifération des cellules, les miARN peuvent réprimer (cellules en prolifération) ou activer (cellules en quiescence) la traduction. En effet, Vasudevan et collaborateurs ont montré que dans des cellules quiescentes (arrêtées en G0/G1) miR-369-3 associé à AGO2 se fixe sur le 3'-UTR du *tumor necrosis factor α* (TNF- α) au niveau d'une séquence ARE (*AU rich element*) pour recruter la protéine *fragile X-related protein 1* (FXR1) et permettre ainsi l'activation de la

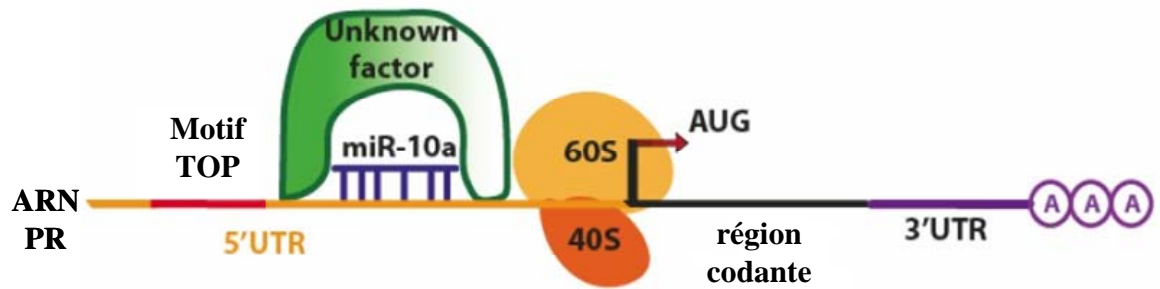


Figure 19. Exemple d'activation de la traduction.

Le site de fixation du miR-10a se situe en aval du motif 5'-terminal oligopyrimidine tract (TOP) présent sur les ARNm des protéines ribosomales (PR). L'appariement entre le miARN et le 5'-UTR est partiel. D'après Da Sacco and Masotti, 2012.

traduction de la protéine TNF- α (Vasudevan and Steitz, 2007 ; Vasudevan *et al.*, 2007). Le plus souvent, l'activation de la traduction se fait par l'interaction du miARN au niveau du 5'-UTR des gènes. miR-10a interagit avec le motif 5'-*terminal oligopyrimidine tract* (TOP), situé dans le 5'-UTR des ARNm codant des protéines ribosomales, pour stimuler leur traduction (Orom *et al.*, 2008) (figure 19).

C. VII. miARN et cancer du pancréas

Des études ont montré que plus de la moitié des miARN étaient localisés au sein du génome dans des sites fragiles, des points de cassures, d'amplification ou de perte d'hétérozygotie. Cela laisse à penser qu'ils sont impliqués dans la cancérogenèse. De plus, l'altération de l'expression des miARN a été associée à différents types de tumeur (cerveau, poumon, prostate, foie, pancréas notamment) (Lu *et al.*, 2005) suggérant un rôle clé des miARN en tant qu'oncogène ou suppresseur de tumeur.

De nombreuses études ont dressé le profil d'expression des miARN dans l'adénocarcinome pancréatique. L'expression des miARN dans les lignées cellulaires et les tissus pancréatiques cancéreux a été comparée respectivement à celle des lignées cellulaires et tissus pancréatiques sains (Bloomston *et al.*, 2007 ; Lee *et al.*, 2007 ; Szafranska *et al.*, 2007). Parmi les nombreux miARN dérégulés on retrouve : miR-21 et miR-155 sur-exprimés dans les tumeurs pancréatiques (tableau 1).

C. VII. 1. miR-21

miR-21 est proposé comme l'un des meilleurs marqueurs de dérégulation cancéreuse. En effet, dans une étude d'expression des miARN à partir de tissus représentant les tumeurs solides les plus fréquentes, il est le seul miARN retrouvé sur-exprimé dans tous les types de tumeurs (Volinia *et al.*, 2006). Une première étude visant à mettre en évidence les effets biologiques de miR-21 sur les propriétés cellulaires (Moriyama *et al.*, 2009) a montré son rôle en tant qu'oncogène puisqu'il favorise la prolifération cellulaire et induit l'apoptose et une seconde étude corrélant l'expression de miR-21 aux données cliniques (Giovannetti *et al.*, 2010) a montré que son expression est associée à un mauvais pronostic dans le cancer du pancréas. L'inhibition de l'expression du miR-21 et miR-221 dans les cellules cancéreuses pancréatiques entraîne un arrêt du cycle cellulaire accompagné par une augmentation de l'expression des protéines suppresseur de tumeurs PTEN, RECK et p27. De plus, la

Tableau 1. Cibles des miARN surexprimés dans le PDAC.

miARN	cibles validées
miR-21	PDCDA, PTEN, BTG2, TGFBR2, MARCKS, pellino-1, TM1, Maspin, PPARalpha, RECK, NFIB, CDC25A, LRRFIP1, BCL2, RTN4, HNRPK, TA63
miR-210	AcvR1b, ISCU, COX10, E2F3, RAD52, MNT, FGFRL1, HOXA1, HOXA9
miR-155	TP53INP1, FOXP3, FOXO3a, CYR61, RHOA, SMAD1, SMAD5, HIVEP2, CEBPB, RUNX2, MYO10, MyD88, SHIP1, C/EBPbeta, IFN-gamma Ralpha, JARID2, BACH1, ZIC3, ZNF652, AGTR1, AT1R, RIPK1, FADD, AID, JARID2, RHOA
miR-196a	S100A9, KRT5, SPRR2C, HOXA7, HOXB8, HOXC8, HOXD8, HMGA2, ANXA1
miR-200b	RND3
miR-221	PUMA, PTEN, MDM2, PI3K, ICAM-1, p27, Bmf, Bim, p57
miR-222	PUMA, PTEN, p27, Bim, MMP1, SOD2, STAT5A
miR-15b	Arl2, BCL2
miR-186	P2X7
miR-190	NeuroD
miR-95	

D'après Zhang *et al.*, 2011.

combinaison des antimir avec la gemcitabine a un effet synergique sur la prolifération cellulaire (Park *et al.*, 2009).

C. VII. 1. miR-155

miR-155 est décrit dans la littérature comme l'un des miARN les plus dérégulés dans les cancers. En effet, il est sur-exprimé dans un grand nombre de cancers (sein, côlon, poumon, pancréas...) suggérant un rôle potentiel en tant qu'oncogène. Des gènes cibles pour ce miARN ont été validés par des expériences de transfections du 3'-UTR des gènes cibles et mesure d'activité luciférase. Parmi ces cibles, on retrouve le facteur de transcription comme *Hypoxia-Inducible Factor 1* (HIF-1), la protéine nucléaire *Tumor Protein 53 Induced Nuclear Protein 1* (TP53INP1) ou encore la protéine de liaison *Fas-Associated via Death Domain protein* (FADD) faisant de miR-155 un régulateur pléiotropique du maintien de l'homéostasie cellulaire (Faraoni *et al.*, 2009). Enfin, Habbe et collaborateurs ont proposé miR-155 comme biomarqueur de la néoplasie pancréatique puisqu'il est surexprimé dans les lésions précurseurs IPMN (Habbe *et al.*, 2009).

Ces deux miARN sont retrouvés surexprimés dans les stades PanIN, par exemple miR-155 dans les PanIN-2 et miR-21 dans les PanIN-3 (Ryu *et al.*, 2010 ; Yu *et al.*, 2012).

De nombreux miARN, parmi lesquels on retrouve let-7a, sont également retrouvés sous-exprimés dans le cancer du pancréas et décrits comme suppresseurs de tumeurs.

C. VII. 3. let-7a

Let-7a est décrit comme suppresseur de tumeur puisqu'il inhibe l'expression des oncogènes Kras et HMGA2 (Akao *et al.*, 2006 ; Johnson *et al.*, 2007 ; Lee and Dutta, 2007) et son expression est fortement diminuée dans le PDAC (Bloomston *et al.*, 2007 ; Szafranska *et al.*, 2007 ; Torrisani *et al.*, 2009).

C. VII. 4. miR-150

Un autre miARN proposé comme suppresseur de tumeur dans le cancer du pancréas, le miR-150, cible la mucine MUC4. Il a été montré que sa surexpression inhibe la

croissance, la clonogénicité, la migration et l'invasion des cellules tumorales pancréatiques (Srivastava *et al.*, 2011).

C. VII. miR-219-1-3p

Récemment, l'étude de Schultz et collaborateurs s'est intéressée pour la première fois à dresser le profil d'expression des miARN à partir de tissus de cancer du pancréas non micro-disséqués incluant donc les cellules cancéreuses canalaire mais aussi stromales puisque l'on sait que dans le cancer du pancréas le stroma représente une composante importante (Erkan *et al.*, 2012).

Parmi les miARN les plus différenciellement exprimés, miR-219-1-3p s'est avéré être d'un intérêt particulier pour nos études puisqu'il ciblerait potentiellement la mucine MUC4.

Le gène *MIR219-1* est localisé sur le chromosome 6 en p21.32. Ce gène est très conservé entre les espèces et notamment entre l'Homme et la souris.

Il est impliqué dans la régulation du rythme circadien (Cheng *et al.*, 2007). En effet, par des expériences de CHIP, il a été montré que la protéine *Circadian Locomotor Output Cycles Kaput* (CLOCK), acteur important de l'horloge circadienne, est capable d'interagir avec la région activatrice du gène murin *miR219-1*. L'inactivation du gène chez la souris entraîne un allongement de la période circadienne.

De plus, des souris possédant une délétion conditionnelle de l'enzyme Dicer au niveau des cellules précurseurs d'oligodendrocytes et des cellules matures présentent un défaut de myélinisation (Dugas *et al.*, 2010). Des analyses par puces miARN ont montré que *miR219-1* était le miARN dont l'expression était la plus induite lors de la différenciation oligodendrocytaire. Le *miR219-1* seul est capable d'induire la différenciation des oligodendrocytes à partir de cellules précurseurs en culture mais peut également restaurer de manière partielle le défaut de myélinisation observée dans les cellules oligodendrocytaires des souris possédant une délétion conditionnelle de l'enzyme Dicer.

Un autre rôle pour le *miR219-1* lui serait attribué dans les troubles comportementaux liés à une fonction diminuée des récepteurs NMDA (acide N-méthyl-D-aspartique). Les travaux de Kocerha et collaborateurs suggèrent que *miR219-1* régulerait négativement la cascade de signalisation du récepteur NMDA (Kocerha *et al.*, 2009).

Aucune donnée concernant le miR-219-1-3p dans le domaine de l'oncologie n'est à l'heure actuelle publiée dans la littérature.

C. VIII. Les miARN vers la clinique ?

L'identification de marqueurs biologiques pour la détection du cancer du pancréas est un enjeu majeur pour la recherche afin d'améliorer le diagnostic, le pronostic et les stratégies thérapeutiques. Ces dernières années, plusieurs miARN ont été identifiés en tant que biomarqueurs dans le cancer du pancréas. Ces découvertes ont été facilitées grâce au développement des technologies (micro-puces et PCR quantitative) permettant d'analyser les variations d'expressions des miARN entre tissus sains et tissus cancéreux. Ainsi, il a été montré que le profil d'expression de 217 miARN contre 16 000 ARNm était suffisant pour classer la grande majorité des cancers (Lu *et al.*, 2005).

De plus, la découverte de miARN dans les fluides biologiques tels que le sérum, le plasma, la salive ou encore les urines a démontré leur potentiel d'utilisation en tant que marqueur dans le cancer (Lawrie *et al.*, 2008). Les miARN de par leur petite taille et contrairement aux ARN sont résistants à l'action des ribonucléases, aux températures et aux pH extrêmes (Chen *et al.*, 2008 ; Mitchell *et al.*, 2008). Ils sont donc très stables et facilement détectables dans le sang mais aussi dans les tissus inclus en paraffine. Et de manière plus intéressante, l'expression des miARN circulants, et notamment ceux présents dans le sérum, est corrélée à l'état physiopathologique du tissu d'origine. L'ensemble de ces observations démontre l'intérêt des miARN en tant que biomarqueurs non invasifs du cancer.

C. VIII. 1. miARN comme marqueur diagnostique

Plusieurs études mettent en évidence des signatures d'expression des miARN spécifiques pour le pancréas sain, la pancréatite chronique et le PDAC. Ces études ont montré que l'expression du miR-216 et du miR-217 et que l'absence d'expression du miR-133a est caractéristique du pancréas sain. Dans la même étude, il a été montré une expression aberrante de 26 miARN dans le PDAC. Parmi ces miARN, la combinaison du miR-217 et du miR-196a discriminait le pancréas sain et la pancréatite chronique du PDAC (Szafranska *et al.*, 2007). Dans une autre étude, il a été montré que la surexpression de quatre miARN dans le plasma, miR-21, miR-210, miR-155 et miR-196a pouvait permettre le diagnostic de PDAC avec une

sensibilité et une spécificité de 64% et 89% respectivement en comparaison avec des sujets contrôles (Wang *et al.*, 2009). Ces quatre miARN sont retrouvés surexprimés dans les lésions précurseurs PanIN suggérant une utilisation des ces miARN en tant que marqueurs précoces et non invasifs pour le diagnostic. Une autre étude menée par Liu et collaborateurs a montré que la combinaison de deux miARN miR-16 et miR-196a avec le CA19-9 permettait d'augmenter la performance de ce dernier pour arriver à une sensibilité de plus de 85% et spécificité de plus de 90 % (Liu *et al.*, 2012). Les caractéristiques épigénétiques des miARN peuvent également être utilisées pour le diagnostic. Un des mécanismes de l'inactivation de l'expression de miARN est l'hyperméthylation. Il a été montré que l'hyperméthylation de la région codant miR-148a était responsable de la perte d'expression de ce miARN dans les lésions PanIN et que cette hyperméthylation permet de distinguer la pancréatite chronique du PDAC (Hanoun *et al.*, 2010b).

Toutes ces études expérimentales sont très encourageantes mais nécessitent la validation clinique pour l'utilisation de ces miARN pour le diagnostic.

C. VIII. 2. miARN comme marqueur pronostique

La régulation des processus cellulaires importants par les miARN laisse à penser qu'ils seraient impliqués dans le pronostic du cancer ou dans la réponse aux thérapies.

De nombreuses études ont suggéré un rôle pronostique des miARN dans le cancer du pancréas. Il a été montré que six miARN pouvaient prédire une survie à long terme (supérieure à 24 mois) et que la forte expression de miR-196a-2 permettait de prédire une faible survie (Bloomston *et al.*, 2007). Une deuxième étude corrélant l'expression de miR-21 aux données cliniques a montré que la surexpression de miR-21 était associée à une survie plus courte (Giovannetti *et al.*, 2010). De la même manière, la surexpression des miR-155, miR-203, miR-210 et miR-222 était associée à un risque plus élevé de décès chez les patients atteints d'adénocarcinome pancréatique (Greither *et al.*, 2010). Le fort taux d'expression de miR-10b est également corrélé à une survie plus faible et a même été proposé comme outil de stratification des patients candidats à la chirurgie (Frampton *et al.*, 2011 ; Frampton *et al.*, 2012 ; Nakata *et al.*, 2011 ; Setoyama *et al.*, 2011).

Les miARN peuvent également prédire la réponse aux différentes chimiothérapies. Par exemple, l'étude de Giovanetti collaborateurs a montré que les cellules cancéreuses pancréatiques exprimant fortement miR-21 étaient plus résistantes à la gemcitabine puisque le

miR-21 était capable d'inhiber les activités anti-prolifératives et pro-apoptotique de la gemcitabine (Giovannetti *et al.*, 2010).

C. VIII. 3. Les miARN en thérapie

L'avantage des miARN repose sur leur capacité à cibler plusieurs molécules, parfois organisées en réseau, ce qui leur confère une grande efficacité dans la régulation des processus biologiques cellulaires. Il existe deux grandes stratégies pour l'utilisation des miARN en thérapie : restaurer l'expression de miARN dont l'expression est diminuée dans le cancer ou cibler les miARN surexprimés à l'aide d'oligonucléotides synthétiques ou de constructions virales.

Restauration

La réexpression de miARN peut se faire avec des oligonucléotides synthétiques qui sont des molécules d'ARN double brin pouvant être modifiés pour améliorer la stabilité et l'efficacité d'entrée dans la cellule. La restauration de l'expression du miR-34a dans les cellules cancéreuses pancréatiques humaines MIA PaCa-2 et BxPC-3 entraîne une inhibition de la clonogénicité et de l'invasion cellulaires, de la formation des tumeurs *in vivo*. La diminution d'expression de Bcl-2 et Notch1/2 favorise l'apoptose et l'arrêt du cycle cellulaire en G1 et en G2/M ce qui rend les cellules plus sensibles à la chimiothérapie et aux radiations (Ji *et al.*, 2009). La restauration de l'expression du miARN let-7a dans des cellules cancéreuses pancréatiques humaines inhibe la prolifération cellulaire *in vitro*, l'expression de la protéine KRAS mais ne parvient pas à inhiber la croissance tumorale *in vivo* (Torrisoni *et al.*, 2009).

Inhibition

Les oligonucléotides antimiR ont été développés pour diminuer l'expression des miARN. Les antimiR sont des oligonucléotides antisens modifiés complémentaires à la séquence du miARN mature cible ce qui permet d'inhiber l'expression endogène du miARN. Les propriétés clés des antimiR sont leur spécificité et leur forte affinité à leur miARN cible. La modification chimique de l'antimiR doit lui permettre d'être facilement intégré dans la cellule, de ne pas être rapidement excrété, d'être stable *in vivo* et de permettre une fixation forte et spécifique sur leur séquence du miARN cible. Plusieurs modifications chimiques ont été utilisées pour générer soit les antagomiR avec l'ajout sur l'oxygène en 2' du ribose d'un

groupement méthyle soit les *locked nucleic acid* (LNA) possédant un pont méthylène entre l'oxygène en position 2' de l'ose et le carbone en 4'. Les antagomiR sont plus résistants à l'action des nucléases et ont une affinité à l'ARN plus élevée que les antimiRs non modifiés. Les LNA ont l'avantage de former un complexe thermodynamique très stable avec l'ARN.

Le premier essai clinique chez l'Homme a été développé par le groupe *Santaris Pharma* au Danemark pour étudier l'effet du LNA-antimiR-122. Il s'agit d'un essai randomisé, effectué en double aveugle, évaluant une dose unique avec comme contrôle une molécule placebo mené chez 64 hommes volontaires sains (LNA-antimiR-122 ; NCT00688012). Le miR-122 est le plus abondant dans le foie. Le virus de l'hépatite C (VHC) possède dans son génome deux sites spécifiques de fixation pour le miR-122 au niveau de la région 5' non codante qui étaient nécessaires pour la réplication du virus. L'équipe de Kauppinen a montré que l'administration du LNA-antimiR-122 chez la souris entraînait une déplétion du miR-122 (Elmen *et al.*, 2008b). Dans une deuxième étude menée chez le chimpanzé, ils ont montré une séquestration efficace de miR-122 accompagnée d'une diminution du taux plasmatique de cholestérol sans cytotoxicité du LNA (Elmen *et al.*, 2008a). Il a aussi été montré une diminution des taux de VHC accompagnée d'une suppression de la virémie, sans effets secondaires ni signes de résistance virale (Lanford *et al.*, 2009 ; Lanford *et al.*, 2010). L'essai clinique de phase 2a initié par Santaris avec le LNA-antimiR-122 renommé miravirsén a été testé chez 36 patients porteurs d'une hépatite C1 chronique. Les patients ont été randomisés pour recevoir soit un placebo, soit 3, 5 ou 7 mg/kg de miravirsén en injections sous-cutanées hebdomadaires durant 5 semaines.

Au terme d'un suivi de 18 semaines, il a été observé une diminution dose-dépendante de la charge virale sous miravirsén, se maintenant après la fin du traitement. À la plus forte dose testée (7 mg/kg, 9 patients), la diminution moyenne de la charge virale était de 3 log UI/ml contre 0,4 dans le groupe placebo ($p = 0,002$), avec 4 cas de charge indétectable. Aucun effet secondaire du traitement n'a été observé durant la période de l'étude. Il n'a pas non plus été mis en évidence de mutations pouvant évoquer une résistance virale (Janssen *et al.* 2011).

La voie est donc ouverte pour la poursuite de l'évaluation thérapeutique des oligonucléotides anti-sens en hépatologie. La prudence s'impose néanmoins dans la mesure où le miR-122, cible du miravirsén, est aussi un gène suppresseur de tumeur pour le carcinome hépatocellulaire, complication déjà connue de l'infection à VHC.

Objectifs

Le cancer du pancréas est caractérisé par une grande résistance aux traitements chimiothérapeutiques et par un pronostic redoutable (survie à 5 ans inférieure à 5%). La néo-expression de la mucine MUC4, dès les stades précoces de la cancérogenèse pancréatique, pourrait donc représenter une cible thérapeutique potentielle. Les travaux antérieurs ont montré la régulation de l'expression de la mucine MUC4 au niveau transcriptionnel et épigénétique. La découverte ces dernières années d'une nouvelle classe de régulateurs géniques que sont les miARN a apporté une complexité supplémentaire dans les mécanismes de régulation post-transcriptionnelle.

Dans ce contexte bibliographique, les objectifs de mon travail au cours de ma thèse ont été (i) d'étudier l'expression des miARN dans différentes lignées pancréatiques humaines cancéreuses, (ii) d'étudier la régulation de l'expression de la mucine MUC4 par les miARN et (iii) d'identifier les miARN impliqués dans la chimiorésistance médiée par MUC4 dans le cancer du pancréas.

Résultats

Partie I

Sélection des miARN

Dans cette première partie du travail, le but était d'établir le profil d'expression des miARN dans différentes lignées cellulaires pancréatiques humaines cancéreuses (Capan-1, Capan-2 et MIA PaCa-2) et normales (HPNE et HPDE) afin de mettre en évidence les miARN dérégulés dans le cancer du pancréas et/ou ciblant potentiellement la mucine MUC4.

Le profil d'expression des miARN dans des lignées cellulaires pancréatiques humaines cancéreuses (Capan-1, Capan-2, MIA PaCa-2) ou normales (HPNE, HPDE) a été étudié par une approche miRnomique par puces miARN. Une approche par bioinformatique à l'aide des bases de données *TargetScan*, *Microcosm* et *MiRanda* nous a permis, dans un second temps, de sélectionner plusieurs miARN ciblant potentiellement le gène *MUC4*.

I. 1. Etablissement du profil d'expression des miARN

L'étude de l'expression des miARN a été réalisée par puce 8X15K (Agilent). Les lames contiennent 1500 sondes ciblant le millier de miARN décrits en 2010 dans *miRBase*. L'extraction de la fraction d'ARN totaux, comprenant les miARN, est effectuée à partir des lignées Capan-1, Capan-2, MIA PaCa-2, HPNE et HPDE. Ces deux dernières lignées ont été utilisées comme référence car elles sont non-tumorigènes et possèdent l'oncogène Kras et la protéine p16 sous forme sauvage. La variation d'expression des miARN est considérée comme significative pour une différence supérieure ou égale à 2 par rapport au contrôle.

Les miARN exprimés différemment entre la lignée cellulaire Capan-1 et les lignées cellulaires HPNE et HPDE sont au nombre de 30 parmi lesquels on retrouve miR-155, miR-100 et miR-125b sur-exprimés respectivement d'un facteur 6,62, 5,52 et 6,37.

Concernant la lignée cellulaire Capan-2, comparée aux lignées cellulaires HPNE et HPDE, près de 80 miARN sont dérégulés. Parmi les miARN sur-exprimés, on retrouve miR-376a, miR-125b, miR-100, miR-155 et miR-221.

La comparaison de l'expression des miARN entre les cellules MIA PaCa-2 et les lignées cellulaires HPNE et HPDE met en évidence 19 miARN exprimés de manière différentielle. Les taux de sur-expression sont de 24,76, 39,58 et 60,03 respectivement pour miR-155, miR-100 et miR-125b.

On note que l'on retrouve miR-155, miR-125b et miR-100 communément sur-exprimés dans les trois lignées cellulaires cancéreuses Capan-1, Capan-2, MIA PaCa-2. Il s'agit de trois miARN déjà décrits dans trois études mettant en évidence, soit par puces à

miARN soit par PCR en temps réel, les miARN dont l'expression était fortement altérée dans le cancer du pancréas (Bloomston *et al.*, 2007 ; Lee *et al.*, 2007 ; Szafranska *et al.*, 2007). De plus, l'étude de Szafranska et collaborateurs a montré que l'expression de miR-217 était spécifique du pancréas sain (Szafranska *et al.*, 2007). Nous avons donc mesuré l'expression de miR-217 dans l'ensemble de nos lignées cellulaires cancéreuses pancréatiques humaines disponibles au laboratoire (Capan-1, Capan-2, BxPC-3, Panc-1 et MIA PaCa-2). Le miR-217 est exprimé uniquement dans les lignées HPDE et HPNE et il n'est pas détecté dans les lignées cancéreuses (figure 20).

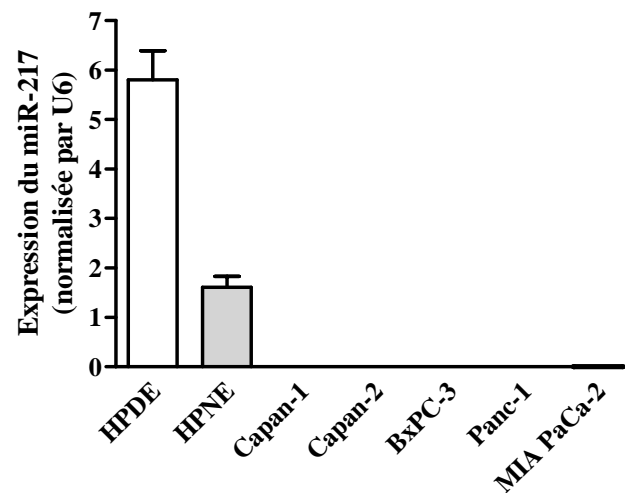


Figure 20. Expression du miR-217 dans les cellules pancréatiques humaines. L'expression du miR-217 a été déterminée par qRT-PCR dans 5 lignées cellulaires cancéreuses pancréatiques humaines et dans les deux lignées pancréatiques normales HPDE et HPNE. L'expression du petit ARN nucléaire U6 a été utilisée comme témoin interne.

L'ensemble de ces résultats nous permet donc de valider les profils d'expression des miARN pour notre étude.

Peu de miARN déjà décrits dans la littérature ont été retrouvés sous-exprimés dans les trois lignées Capan-1, Capan-2 et MIA PaCa-2. Il s'agit des miARN suivants : miR-34a, let-7a, miR-148a et miR-96.

I. 2. Prédiction et sélection des miARN ciblant potentiellement *MUC4*

Les prédictions bioinformatiques des miARN ciblant potentiellement *MUC4* ont été effectuées grâce aux bases de données *TargetScan*, *Microcosm* et *MiRanda*. Seuls les miARN

prédits par au moins deux de ces trois bases de données ont été sélectionnés (Tableau 2). L'étude d'expression sur puce des miARN a permis de mettre en évidence que seul le miARN let-7a avait une expression diminuée dans les lignées cellulaires cancéreuses pancréatiques humaines Capan-1, Capan-2 et MIA PaCa-2 et aurait un site de fixation sur le 3'-UTR de *MUC4*. De plus, nous avons également sélectionné miR-210 pour les études fonctionnelles parce que bien qu'il soit décrit dans la littérature comme étant sur-exprimé dans le cancer du pancréas, il possède un site de fixation potentiel au niveau du 3'-UTR de *MUC4*.

Le choix des miARN régulateurs de *MUC4* dans le cancer du pancréas s'est fait ensuite selon les trois critères suivants :

- (1) avoir une expression diminuée dans les lignées cellulaires cancéreuses pancréatiques,
- (2) être décrit dans la littérature comme étant fortement dérégulé dans le cancer du pancréas,
- (3) avoir au moins un site potentiel de fixation sur le 3'-UTR de *MUC4*.

Les miARN répondant à au moins deux de ces critères sont : let-7a, miR-98, miR-145, miR-210 et miR-219-1-3p.

Tableau 2. Prédiction des miARN ciblant potentiellement *MUC4* à partir des trois bases de données

miARN	<i>TargetScan</i>	<i>Microcosm</i>	<i>MiRanda</i>
let-7a	✓	✓	✓
miR-98	✓	✓	✓
miR-145	✓	✓	✓
miR-210	✓	✓	✓
miR-219-1-3p		✓	✓

I. 3. Validation de l'expression des miARN par PCR quantitative

Le niveau d'expression des miARN sélectionnés a été déterminé par PCR quantitative dans les lignées cellulaires cancéreuses pancréatiques humaines Capan-1, Capan-2, BxPC-3, Panc-1 et MIA PaCa-2 et comparée à celui de la lignée normale HPDE (figure 21).

L'expression de let-7a est augmentée dans les lignées cellulaires Capan-1 et Capan-2 comparativement aux cellules HPDE mais ne varie pas dans les lignées cellulaires BxPC-3 et Panc-1. On observe une diminution de l'expression dans la lignée cellulaire MIA PaCa-2.

L'expression du miR-98 est fortement diminuée dans toutes les lignées cellulaires cancéreuses pancréatiques humaines comparativement aux cellules HPDE sauf dans les cellules Capan-2.

L'expression du miR-145 est diminuée dans l'ensemble des lignées cellulaires cancéreuses pancréatiques humaines étudiées Capan-1, Capan-2, BxPC-3, Panc-1 et MIA PaCa-2 comparativement aux cellules HPDE.

L'expression du miR-210 est augmentée dans les lignées cellulaires cancéreuses Capan-1, Capan-2, Panc-1 et MIA PaCa-2 comparativement aux cellules HPDE.

Comme pour le miR-145, miR-219-1-3p est sous-exprimé dans les cinq lignées cellulaires cancéreuses pancréatiques humaines Capan-1, Capan-2, BxPC-3, Panc-1 et MIA PaCa-2 comparativement aux cellules HPDE.

Sur la base de ces résultats, nous avons donc décidé de focaliser nos études sur miR-145 et miR-219-1-3p et leur capacité à réguler l'expression de la mucine MUC4.

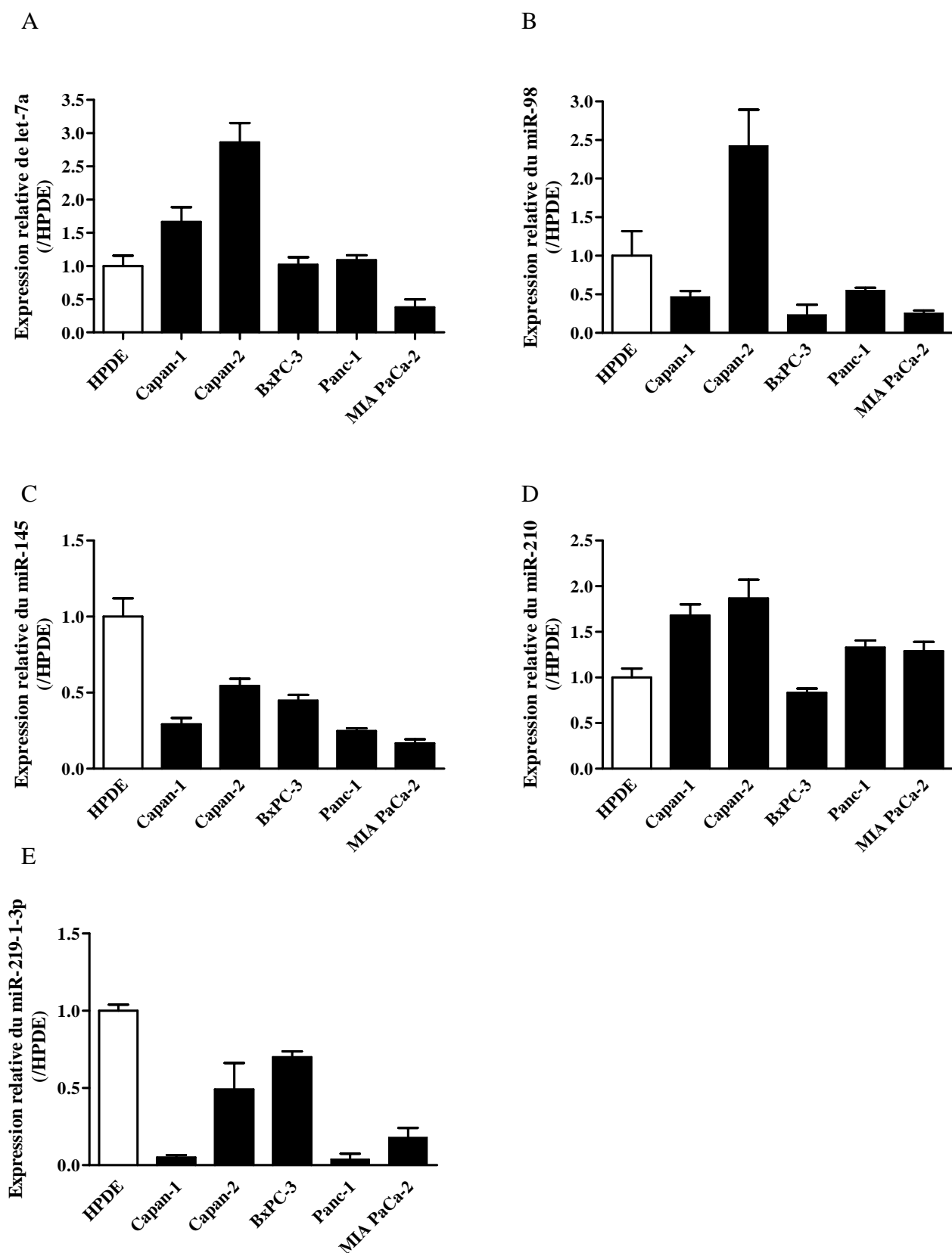


Figure 21. Expression des miARN dans les cellules cancéreuses pancréatiques humaines.

L'expression de (A) let-7a (B) miR-98 (C) miR-145 (D) miR-210 et (E) miR-219-1-3p a été déterminée par qRT-PCR dans 5 lignées cellulaires cancéreuses pancréatiques humaines. L'expression des miARN dans les différentes lignées cellulaires cancéreuses est rapportée à celle dans les HPDE. L'expression de U6 a été utilisée comme témoin interne.

I. 4. Régulation de MUC4 par les miARN

La régulation de l'expression de MUC4 a été effectuée par une étude fonctionnelle de gain de fonction. Les lignées cellulaires cancéreuses pancréatiques humaines Capan-1, Capan-2 et BxPC-3, exprimant MUC4, ont été transfectées de manière transitoire avec le miARN d'intérêt. Par western-blotting, nous observons une forte diminution de l'expression protéique de MUC4 exercée par le miR-219-1-3p en revanche miR-145 n'altère pas l'expression de MUC4 (figure 22).

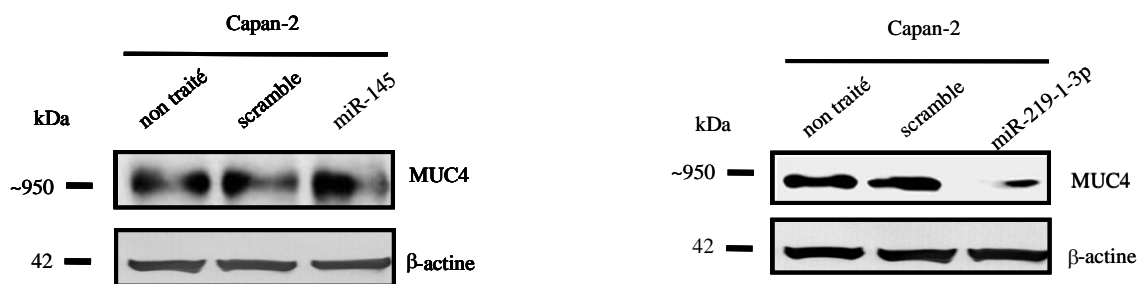


Figure 22. L'expression protéique de MUC4 est inhibée par miR-219-1-3p. Western-blotting de MUC4 et de la β -actine après transfection transitoire du miR-145 et du miR-219-1-3p dans les cellules Capan-2.

Nous avons alors focalisé la suite de nos travaux sur le miR-219-1-3p puisque

(i) son expression est diminuée dans l'ensemble des 5 lignées cellulaires pancréatiques humaines comparativement à la lignée contrôle HPDE

(ii) il inhibe l'expression protéique de la mucine MUC4

De plus, au début de mes travaux, aucune cible de ce miARN n'était connue et son rôle dans le cancer du pancréas était encore à déterminer.

Partie II

miR-219-1-3p est un régulateur négatif de l'expression de la
mucine MUC4

Les buts de cette étude étaient d'étudier la régulation de l'expression de la mucine MUC4 par le miR-219-1-3p et d'évaluer son rôle sur les propriétés biologiques des cellules cancéreuses pancréatiques *in vitro* et sur la progression tumorale *in vivo*.

Le profil d'expression de la mucine MUC4 est altéré dans un grand nombre de cancers épithéliaux et plus particulièrement dans le cancer du pancréas. En effet, MUC4 n'est pas exprimée dans le pancréas sain en revanche on la retrouve néo-exprimée dès les stades précoces de la carcinogenèse pancréatique et son expression augmente progressivement jusqu'à atteindre un taux maximal au stade de l'adénocarcinome. De plus, la mucine MUC4 apparaît comme un acteur important dans le processus de tumorigenèse pancréatique puisque différentes études ont montré que MUC4 contribue à la progression tumorale en favorisant la prolifération et la survie cellulaires (Chaturvedi *et al.*, 2007) ; (Workman *et al.*, 2009), la migration cellulaire et la croissance tumorale (Jonckheere *et al.*, 2012) et confère aux cellules cancéreuses pancréatiques une résistance à la gemcitabine (Skrypek *et al.*, 2013). L'ensemble de ces données suggère que MUC4 pourrait représenter une cible thérapeutique potentielle pour des thérapies ciblées précoces ou servir comme marqueur pronostique et/ou précoce.

Les mécanismes moléculaires responsables de l'induction de l'expression de MUC4 dès les stades précoces de la cancérogenèse pancréatique sont toutefois encore inconnus. Le gène *MUC4* est régulé *in vitro* par des mécanismes transcriptionnels et par des mécanismes épigénétiques de méthylation de l'ADN et de modifications post-traductionnelles des histones. Récemment, un mécanisme de régulation post-transcriptionnel de *MUC4* par les miARN a été décrit (Srivastava *et al.*, 2011).

Les miARN sont connus pour réguler l'expression des gènes en se fixant généralement sur des séquences nucléotidiques au sein du 3'-UTR (Mattick and Makunin, 2005). Suite à l'étude de la séquence du 3'-UTR de *MUC4*, nous avons identifié deux sites potentiels de fixation pour le miR-219-1-3p. Le rôle potentiel du miR-219-1-3p dans le cancer du pancréas a été évalué en déterminant son expression par qRT-PCR dans différentes lignées cellulaires cancéreuses pancréatiques humaines et dans des tissus de patients atteints d'adénocarcinome pancréatique. Afin de déterminer si la mucine MUC4 est une cible directe du miR-219-1-3p, deux approches complémentaires de sur-expression transitoire ou stable et d'inhibition du miARN ont été utilisées. L'effet du miARN sur la prolifération cellulaire, et sur les voies de signalisation associées, mais également sur la migration cellulaire a été évalué *in vitro*. A l'aide d'un modèle de xénogreffes sous-cutanées chez la souris SCID, nous avons étudié le

rôle du miR-219-1-3p sur la progression tumorale. Enfin, le modèle murin *Pdx1-Cre;LSL-Kras^{G12D}*, nous a permis d'étudier l'expression du miR-219-1-3p dès les stades précoces de la cancérogenèse épithéliale et d'établir s'il existait une relation entre l'expression du miARN et celle de MUC4.

**miR-219-1-3p is a negative regulator of the mucin MUC4 expression and
is a tumor suppressor in pancreatic cancer**

Fatima Lahdaoui^{1,2,3}, Yannick Delpu^{4,5}, Audrey Vincent^{1,2,3}, Florence Renaud^{1,2,3}, Mathieu
Messenger^{1,2,3}, Belinda Duchêne^{1,2,3}, Emmanuelle Leteurtre^{1,2,3}, Christophe Mariette^{1,2,3},
Jérôme Torrisani^{4,5}, Nicolas Jonckheere^{1,2,3} and Isabelle Van Seuningen^{1,2,3}

1 Inserm, UMR837, Jean Pierre Aubert Research Center (JPARC), Team 5 “Mucins,
epithelial differentiation and carcinogenesis”, rue Polonovski, 59045 Lille Cedex, France

2 Université Lille Nord de France, Lille, France

3 Centre Hospitalier Régional et Universitaire de Lille, Lille, France

4 Inserm, UMR 1037, Cancer Research Center of Toulouse (CRCT), 1 avenue Jean Poulhès,
31432 Toulouse cedex 4, France

5 Université Paul Sabatier, Toulouse, France

Running title: MUC4 regulation by miR-219-1-3p in pancreatic cancer

Corresponding author: Dr Isabelle Van Seuningen, Inserm UMR837/JPARC, rue
Polonovski, 59045 Lille Cedex, France, Phone: +33 6 31 52 90 30, Fax: +33 3 20 53 85 62,
E-Mail: isabelle.vanseuningen@inserm.fr

Financial support: Fatima Lahdaoui is a recipient of a PhD fellowship of la Ligue Nationale
Contre le Cancer. This work is supported by a grant from la Ligue Nationale Contre le Cancer
(Equipe Labellisée Ligue 2013, IVS). Isabelle Van Seuningen is the recipient of a “Contrat
Hospitalier de Recherche Translationnelle” (AVIESAN/CHRT).

Abstract

Pancreatic Ductal Adenocarcinoma (PDAC) is among the most lethal cancers in the world with one of the worst outcome. The oncogenic mucin MUC4 has been identified as an actor of pancreatic carcinogenesis as it is involved in many processes regulating pancreatic cancer cell biology. MUC4 is not expressed in healthy pancreas whereas it is expressed very early in pancreatic carcinogenesis. Targeting *MUC4* in these early steps may thus appear as a promising strategy to slow-down pancreatic tumorigenesis. miRNA negative regulation of *MUC4* could be one mechanism to efficiently downregulate *MUC4* gene expression in early pancreatic neoplastic lesions. Using *in silico* studies, we found two putative binding sites for miR-219-1-3p in the 3'-UTR of *MUC4* and showed that miR-219-1-3p expression is down-regulated both in PDAC-derived cell lines and human PDAC tissues compared to their normal counterparts. We then showed that miR-219-1-3p negatively regulates MUC4 mucin expression *via* its direct binding to *MUC4* 3'-UTR. MiR-219-1-3p overexpression (transient and stable) in pancreatic cancer cell lines induced a decrease of cell proliferation associated with a decrease of cyclin D1 and a decrease of Akt and Erk pathway activation. MiR-219-1-3p overexpression also decreased cell migration. Furthermore, miR-219-1-3p expression was found to be conversely correlated with Muc4 expression in early pancreatic intraepithelial neoplasia (PanIN) lesions of *Pdx1-Cre;LSL-Kras^{G12D}* mice. Most interestingly, *in vivo* studies showed that miR-219-1-3p injection in xenografted pancreatic tumors in mice decreased both tumor growth and MUC4 mucin expression. Altogether, these results identify miR-219-1-3p as a new negative regulator of MUC4 oncomucin that possesses tumor suppressor activity in PDAC.

Keywords: MUC4, mucin, pancreatic cancer, miR-219-1-3p.

Introduction

Pancreatic cancer is the fourth leading cause of death by cancer in western countries. With a survival rate of six months and a five-year survival about 5%, pancreatic cancer is characterized by a poor prognosis due to a late diagnosis and the lack of efficient treatment (Vincent *et al.*, 2011). Pancreatic Ductal Adenocarcinoma (PDAC) is by far the most frequent pancreatic cancer since it represents approximately 90 % of pancreatic tumors. PDAC develops from non-invasive precursor lesions. Histologically three different types of precursor lesions have been described. Among them, Pancreatic Intraepithelial Neoplasia (PanIN) lesions are the most common (Hruban *et al.*, 2008).

The membrane-bound mucin MUC4, which is not expressed in healthy pancreas, is neoexpressed in early PanIN lesions. MUC4 is involved in pancreatic carcinogenesis (proliferation, migration, invasion and chemoresistance) (Jonckheere *et al.*, 2012 ; Jonckheere and Van Seuning, 2010 ; Skrypek *et al.*, 2013), its expression correlates with the disease advancement (Swartz *et al.*, 2002) and it is the membrane partner of oncogenic receptor ErbB2 (Jonckheere *et al.*, 2012). As such this oncomucin appears as a good target to slow down pancreatic tumorigenesis.

MUC4 gene is located on the chromosome 3q29, a chromosomal region characterized by a high CpG content. Our previous studies on *MUC4* epigenetic regulation have shown that *MUC4* 5'-UTR is hypermethylated in the human PDAC cell line Panc-1 which does not express MUC4 whereas this region is hypomethylated in the PDAC cell line Capan-1 which expresses a high level of MUC4 (Vincent *et al.*, 2008). Furthermore, histone deacetylation is also involved in the repression of *MUC4* in PDAC cells (Jonckheere *et al.*, 2004 ; Vincent *et al.*, 2008). From these results, a model for *MUC4* epigenetic regulation in pancreatic carcinogenesis was proposed (Vincent *et al.*, 2008).

Next to epigenetic regulation by DNA methylation and histone modifications, gene regulation by microRNAs (miRNA) recently appeared as a new exciting strategy to control gene expression in cancers which could possibly translate into clinical applications (Humeau *et al.*, 2013 ; Kasinski and Slack, 2011). miRNAs are small non-coding RNA of 18-25 nt length which are conserved throughout evolution. They post-transcriptionally regulate gene expression by triggering either cleavage or translation inhibition of their target mRNAs (Bartel, 2004). miRNAs are involved in the regulation of cellular development, proliferation, differentiation, apoptosis and carcinogenesis. In many cancers, miRNAs are aberrantly expressed and either mediate the oncogenic process or display a tumor suppressor effect depending on their mRNA target (Calin and Croce, 2006).

Over the past years, advanced technologies used in miRNA expression studies have shown a general downregulation of miRNAs in tumors including pancreatic cancer (Lu *et al.*, 2005). However studies aiming at identifying miRNA regulating *MUC4* expression in PDAC remain scarce. In the only study published so far, *MUC4* 3'-UTR was shown to be directly targeted by miR-150 in HPAF, Panc10.05 and Colo357 PDAC cell lines (Srivastava *et al.*, 2011). To our interest as we were studying *MUC4* regulation by miR-219-1-3p in PDAC cells, Schultz *et al.* showed that miR-219-1-3p was strongly inhibited in pancreatic cancer *versus* normal tissue (Schultz *et al.*, 2012), confirming the real interest in studying the impact of this miRNA on pancreatic cancer cell biology.

In this report, we not only identify miR-219-1-3p as a new negative regulator of MUC4 mucin expression in the early steps of pancreatic carcinogenesis, but also show that miR-219-1-3p possesses tumor suppressive activity. MiR-219-1-3p appears thus as a good target to slow down pancreatic tumorigenesis.

Results

Identification of two putative miR-219-1-3p binding sites in the *MUC4* 3'-UTR

Using bioinformatic algorithms, we searched miRNAs putative binding sites in human *MUC4* 3'-UTR. Several miRNAs came out and miR-219-1-3p became of particular interest since, at that time, no target gene had been experimentally validated for this miRNA and nothing was known about its biological role in pancreatic carcinogenesis. Two miR-219-1-3p putative binding sites were identified covering the nucleotides 19-40 (site #1) and 356-372 (site #2) of *MUC4* 3'-UTR (Figure 1A). Sequence alignment of human miR-219-1-3p among different species revealed that it is fully conserved across species (Figure 1A).

miR-219-1-3p is downregulated in human PDAC cell lines and tissues

To validate the potential of miR-219-1-3p in pancreatic cancer, its expression was studied both in PDAC cultured cells and human PDAC tissues by qRT-PCR. Our results indicate that miR-219-1-3p expression was reduced in all five PDAC cell lines (Capan-1, Capan-2, BxPC-3, Panc-1 and MIA PaCa-2) compared with normal human pancreatic ductal cells (HPDE) (Figure 1B). As expected, *MUC4* mucin is expressed in Capan-1, Capan-2 and BxPC-3 cell lines (Jonckheere *et al.*, 2004 ; Rachagani *et al.*, 2012) (Figure 1B insert). Absence of *MUC4* expression in Panc-1 was already shown as being due to epigenetic repression of *MUC4* gene (Jonckheere *et al.*, 2004). In MIA PaCa-2, *MUC4* gene is also epigenetically repressed by DNA methylation (not shown). miR-219-1-3p expression in twenty-two paired human PDAC tissues and their corresponding non tumoral adjacent tissues indicated a significant down-regulation of miR-219-1-3p in 19 out of 22 PDAC tissues (Wilcoxon signed-rank test, $p=0.0164$) (Figure 1C). Interestingly, in the three human PDAC tissues in which miR-219-1-3p was overexpressed (patients #20-22), *MUC4* expression was not observed (Figure 1C insert).

MUC4 is a direct target of miR-219-1-3p

To study MUC4 regulation by miR-219-1-3p, Capan-1, Capan-2 and BxPC-3 cell lines were transiently transfected with miR-219-1-3p mimics or with a scrambled miRNA (Supplementary Figure S1A). Over-expression of miR-219-1-3p led to a marked reduction of MUC4 protein level in the three cell lines when compared to the scramble miRNA transfected cells (Figure 2A, left panel). Conversely, inhibition of miR-219-1-3p in Capan-2 and BxPC-3 cells, the two cell lines showing the highest level of miR-219-1-3p expression, using anti-miR-219-1-3p oligonucleotides, led to an increase of MUC4 protein expression (Capan-2, 2.05 fold and BxPC-3, 1.64 fold) (Figure 2A, right panel).

To determine whether miR-219-1-3p regulates MUC4 expression by directly interacting with the *MUC4* mRNA, we then used an affinity-based approach in which biotinylated miR-219-1-3p or scramble miRNAs were transfected into Capan-2 cells. Using qRT-PCR, we show a significant enrichment of *MUC4* mRNA (5.28 fold, $p=0.0011$) in the miR-219-1-3p pull-down compared to the scramble miRNA transfected cells (Figure 2B).

To functionally validate this interaction, we cloned the 3'-UTR of human *MUC4* downstream of the luciferase reporter gene (pGL3-*MUC4*-3'UTR). As shown in figure 2C, miR-219-1-3p overexpression led to a significant decrease of pGL3-*MUC4*-3'-UTR luciferase activity both in Capan-1 ($p<0.001$) and BxPC-3 ($p<0.05$) cell lines compared to cells transfected with scramble miRNAs. Mutation of both miR-219-1-3p binding sites (site #1 mut or site #2 mut) restored normal luciferase activity of *MUC4* 3'-UTR (Figure 2C). When cells were transfected with anti-miR-219-1-3p, pGL3-*MUC4*-3'-UTR luciferase activity significantly increased ($p<0.01$) in both cell lines compared to the scramble miRNA transfected cells. No effect was observed on mutated forms pGL3-*MUC4*-site#1_mut or pGL3-*MUC4*-site#2_mut (Figure 2D). Altogether these results indicate that miR-219-1-3p inhibits MUC4 expression through a direct interaction within its 3'-UTR.

miR-219-1-3p inhibits proliferation and migration of PDAC cells *in vitro*

Since MUC4 is directly targeted by miR-219-1-3p, we investigated whether miR-219-1-3p was also able to interfere with proliferative and migrating properties of pancreatic cancer cells. Capan-1 ($p < 0.001$), Capan-2 ($p < 0.05$) and BxPC-3 ($p < 0.01$) cell growth was significantly decreased 72 h post-transfection of miR-219-1-3p mimics compared to scramble miRNA (Figure 3A) whereas inhibition of endogenous miR-219-1-3p by anti-miR-219-1-3p led to a significant increase of cell proliferation both in Capan-2 ($p < 0.01$) and BxPC-3 ($p < 0.01$) cells at 48h and 72h post-transfection (Figure 3B). To further determine whether miR-219-1-3p expression could be associated with the progression of pancreatic cancer, we evaluated its effect on the cell migrating behaviour. As shown in Figure 3C, miR-219-1-3p over-expression significantly reduced migration of Capan-1 and Capan-2 cells ($p < 0.01$) and of BxPC-3 to a lower extent. Taken together, these data show that miR-219-1-3p modulates biological properties of PDAC cells by decreasing both their proliferation and migration properties. Previous studies have shown that direct knock-down of MUC4 in Capan-2 cells led to a decrease of cell proliferation and migration (Jonckheere *et al.*, 2012). To test the hypothesis whether the decreased proliferation and migration observed in this report was due, at least in part, to the ability of miR-219-1-3p to inhibit MUC4 expression, transient transfections with anti-miR-219-1-3p in Capan-2 MUC4-KD cells were carried out. The results show that proliferation and migration promoting effects of anti-miR-219-1-3p are strongly attenuated in Capan-2 MUC4-KD cells (Supplemental Figure S2) suggesting the implication of MUC4 in miR-219-1-3p-mediated reduced cell proliferation and migration.

miR-219-1-3p biological activities impair signalling pathways associated with cell cycle, cell proliferation and cell survival

To decipher the molecular mechanisms related to the decreased proliferation observed in PDAC cells transiently over-expressing miR-219-1-3p, we assessed the expression of cyclin D1 cell cycle marker and the activation of Akt and Erk signalling pathways as these were previously reported to be responsible for decreased proliferation mediated by MUC4 (Chaturvedi *et al.*, 2008b ; Jonckheere *et al.*, 2012). Our results indicate that miR-219-1-3p overexpression induces a strong decrease of cyclin D1 expression in the three cell lines (Figure 3D). Furthermore, the phosphorylation levels of Akt and Erk were also decreased in miR-219-1-3p-transfected cells compared with miRNA scramble-transfected cells. These results indicate that miR-219-1-3p reduces PDAC cell proliferation by inhibiting cell cycle progression and by reducing proliferation- and survival-associated signalling pathway activation.

To further assess the biological activities of miR-219-1-3p, we generated two pancreatic stable cell lines over-expressing miR-219-1-3p. Successful and significant over-expression of miR-219-1-3p in Capan-1 (Capan-1 LV miR-219, 6.34 fold, $p < 0.001$) and in Capan-2 (Capan-2 LV miR-219, 12.68 fold, $p < 0.001$) cells was confirmed by qRT-PCR (Supplementary Figure S1C). Over-expression of miR-219-1-3p (i) inhibited MUC4 protein expression by 60% in Capan-1 cells and by 80% in Capan-2 cells (Figure 4A), (ii) significantly reduced the proliferation rate of Capan-1 as early as 96h ($p < 0.01$) and of Capan-2 as early as 72h ($p < 0.05$) (Figure 4B) and (iii) reduced their migrating capacity (Capan-1, $p < 0.001$ and Capan-2 $p < 0.01$) (Figure 4C). In Capan-2, stable over-expression of miR-219-1-3p led to a decrease of cyclin D1 expression and a decrease of both Erk and Akt activation. In Capan-1 the same effects were visualized except for Akt (Supplemental Figure S3). Taken together, these results indicate that stable over-expression of miR-219-1-3p in PDAC cells led

to the same biological effects (decreased proliferation and decreased migration) as those observed in transiently transfected cells.

miR-219-1-3p inhibits pancreatic tumor progression *in vivo*

To further assess the tumor suppressive activity of miR-219-1-3p *in vivo* and its possible value as a therapeutic tool, a xenograft tumor model was established with Capan-1, Capan-2 and MIA PaCa-2 cells in SCID mice. As shown in figure 5A, intratumoral injection of miR-219-1-3p in both Capan-1 and Capan-2 led to a significant decrease ($p < 0.05$) of tumor growth 6 and 7 days post-injection, respectively. Tumor growth further decreased until the experimental end-point was reached ($p < 0.05$). A significant decrease of tumor growth was also observed a week post-injection in MIA PaCa-2 cells compared to control mice (data not shown). Measurement of miR-219-1-3p and MUC4 expression in these tumors confirmed the overexpression of miR-219-1-3p (Figure 5B) conversely to MUC4 that was weakly (Capan-1) or no longer (Capan-2) expressed when compared with controls (Figure 5C). Decreased expression of Ki67 in miR-219-1-3p tumors confirmed miR-219-1-3p negative effect on proliferation. Thus, these results confirm (i) the tumor suppressor activity of miR-219-1-3p on PDAC cell growth and (ii) the converse correlation between miR-219-1-3p and MUC4 expression in pancreatic tumors.

Muc4 expression is conversely correlated to miR-219-1-3p expression in PanIN lesions

To establish a correlation between MUC4 and miR-219-1-3p expression early in the development of pancreatic cancer, their expression was studied in the pancreas of the *Pdx1-Cre;LStopL-Kras^{G12D}* preclinical mouse model of pancreatic cancer. We found that miR-219-1-3p was strongly expressed in normal acinar cells ($Kras^{WT}$) (Figure 6A). In PanIN lesions ($Kras^{G12D}$), miR-219-1-3p expression was strongly decreased when compared to normal

tissues. Its expression in ductal neoplastic cells was conversely correlated to Muc4 expression. Immunohistochemistry and qRT-PCR were then respectively used to measure Muc4 and miR-219-1-3p expression levels in PanIN lesions. In mouse PanIN lesions (Kras^{G12D}), miR-219-1-3p expression was significantly decreased ($p < 0.001$) when compared to normal pancreatic tissue (Kras^{WT}) (Figure 6B). To establish the converse correlation between miR-219-1-3p and Muc4 expression, a score for Muc4 was calculated. As shown in Figure 6C, a negative correlation between miR-219-1-3p and Muc4 expression was observed in PanIN tissues ($r = -0,5847$, $p = 0.0137$; Spearman's correlation). In conclusion, Muc4 over-expression in mouse PanIN lesions is associated with miR-219-1-3p loss of expression suggesting, in addition to the data obtained in xenograft studies, that the up-regulation of Muc4 in early PanIN lesions may result from the repression of miR-219-1-3p.

Discussion

In this study, we have identified miR-219-1-3p as a novel negative regulator of MUC4 mucin expression in PDAC cells as early as in PanIN1/2 neoplastic lesions. Moreover, we show that miR-219-1-3p inhibits pancreatic cancer cell proliferation *in vitro* and *in vivo* and migration *in vitro*. MiR-219-1-3p appears thus as a good target to (1) reduce pancreatic cancer cell proliferation and (2) inhibit expression of oncogenic MUC4 mucin.

MUC4 is an actor of pancreatic tumorigenesis as it contributes to tumor progression by inducing cell proliferation, survival and migration (Chaturvedi *et al.*, 2007 ; Jonckheere *et al.*, 2012 ; Jonckheere and Van Seuning, 2008b). Moreover neo-expression of MUC4 in the early stages of pancreatic carcinogenesis confers to this mucin a potential interest as a therapeutic target in pancreatic cancer (Jonckheere *et al.*, 2010 ; Swartz *et al.*, 2002). Although molecular mechanisms responsible for the induction of MUC4 expression in cancer are not well-defined, it is known that MUC4 may be regulated at the transcriptional level *via* the epidermal growth factor (Perrais *et al.*, 2001) and transforming growth factor β (Andrianifahanana *et al.*, 2005 ; Jonckheere *et al.*, 2004) pathways among others (Singh *et al.*, 2007) and at the epigenetic level *via* DNA methylation and histone modifications (Vincent *et al.*, 2008). Recently, miRNAs were shown to be involved in posttranscriptional regulation of MUC4 (Srivastava *et al.*, 2011). In the present study using complementary approaches (*in vitro* stable and transient transfections and *in vivo* models) we demonstrate that MUC4 is a functional target of miR-219-1-3p. We showed that miR-219-1-3p inhibits MUC4 expression at the protein level, that miR-219-1-3p directly interacts with *MUC4* mRNA and that miR-219-1-3p exerts its repressive effect by binding to the two nucleotidic sites in the *MUC4* 3'-UTR. We showed that overexpression of miR-219-1-3p inhibits cell proliferation and reduces migration of PDAC cells by targeting MUC4. MUC4 is known to be involved in Akt and MAPK survival signalling pathways and cell cycle progression regulation (Jonckheere *et al.*,

2012). Inhibition of cell proliferation by miR-219-1-3p prompted us to study MUC4 downstream survival and apoptotic signalling pathways in the context of its regulation by miR-219-1-3p. We found that cyclin D1 expression decreased concomitantly to the inhibition of activation of Akt and MAPK signalling pathways whereas apoptosis does not seem to be involved. More interestingly, increasing evidence of miRNA influence on cell behaviour through the regulation of multiple target genes prompted us to search for putative targets of miR-219-1-3p using an *in silico* approach. CDK1 and ICAM-1 known to promote cell proliferation and migration were identified however pull-down experiments did not allow us to validate these targets in pancreatic cancer cells (data not shown). This indicates that miR-219-1-3p may act as a tumor suppressor in PDAC development mainly by targeting the oncogenic mucin MUC4 and by affecting associated downstream signalling pathways. Accordingly to this observation, we found that miR-219-1-3p expression was conversely correlated to Muc4 in mouse PanIN and that in the three human PDAC tissues overexpressing miR-219-1-3p, MUC4 was not observed. This suggests that the negative regulation of MUC4 by miR-219-1-3p involves a conserved mechanism between these two species.

MIR219-1 was initially described as a brain-specific miRNA as a clock and light regulated gene playing a role in regulating the length of the circadian cycle (Cheng *et al.*, 2007) and as a key regulator of oligodendrocyte differentiation (Dugas *et al.*, 2010 ; Zhao *et al.*, 2010b). Down-regulation of miR-219-1-3p in PDAC cell lines and PDAC tissues, found in this report, suggests a new tumor suppressive function for this miRNA in pancreatic cancer. To determine the mechanisms underlying miR-219-1-3p downregulation, we searched for the genomic region containing *MIR219-1* gene using the UCSC Genome Browser and we observed that *MIR219-1* gene is located within a CpG island. Preliminary experiments in pancreatic cancer cells to determine whether DNA hypermethylation could impair miR-219-1-3p expression were carried out. Inhibition of DNA methylation with 5-aza-2'-deoxycytidine treatment led to

up-regulation of miR-219-1-3p expression, suggesting that aberrant DNA methylation may be associated with miR-219-1-3p silencing in PDAC cells (data not shown). Another mechanism which could control miR-219-1-3p expression is genetic alteration. The majority of miRNAs are located in cancer-associated genomic regions such as common breakpoint regions, fragile sites, minimal regions of loss of heterozygosity and amplification (Calin *et al.*, 2004). By genomic sequence analysis Xu *et al.* mapped the *MIR219-1* gene to chromosome 6p21.32 (Xu *et al.*, 2007). Genome-wide copy number analysis in PDAC enabled the identification of the 6p region as a region of high frequency loss (Lin *et al.*, 2003 ; Mahlamaki *et al.*, 2002) suggesting that the chromosomal region in which lies *MIR219-1* may be the subject of genetic alterations. Therefore, epigenetic and/or genetic mechanisms may also be responsible for *MIR219-1* silencing in PDAC, which is another argument to propose miR-219-1-3p as a promising tumor suppressor candidate.

As we were studying MUC4 regulation by miR-219-1-3p, several studies proposed miRNAs signatures of pancreatic cancer (Bloomston *et al.*, 2007 ; Lee *et al.*, 2007 ; Szafranska *et al.*, 2007). In the most recent study Schultz *et al.* performed a miRNA profiling array using for the first time non micro-dissected human tissues in order to discover new miRNA differentially expressed in pancreatic tissues, including stromal and cancer cells, comparing PDAC to normal pancreas (Schultz *et al.*, 2012). Among the miRNAs that were down-regulated in PDAC compared to normal tissues, miR-219-1-3p emerged as one of the most relevant, confirming the interest of studying the biological role of this miRNA for which nothing was known in pancreatic carcinogenesis. However, to date, a very small number of studies explored miRNAs expression alterations in PanIN lesions (Humeau *et al.*, 2013 ; Yu *et al.*, 2012 ; du Rieu *et al.*, 2010). Our analysis of miR-219-1-3p expression in genetically engineered mice *Kras*^{G12D}-driven pancreatic cancer model allowed us to show that miR-219-

1-3p down-regulation is an early event of pancreatic carcinogenesis as miR-219-1-3p expression is lost in the PanINs pre-neoplastic lesions.

Based on these observations, the early miR-219-1-3p repression and the resulting increased expression of the transmembrane mucin MUC4 may represent two key events that favor pancreatic tumor progression. It is therefore tempting to speculate that induction of MUC4 expression in the early steps of pancreatic carcinogenesis is epigenetically regulated by DNA methylation at two levels (i) directly on its 5'-UTR (Vincent *et al.*, 2008) and (ii) *via* repression of its inhibitor miR-219-1-3p (this report). Hence, identification of these two mechanisms regulating MUC4 expression in pancreatic cancer gives new insight to develop a novel therapeutic approach targeting MUC4 that would combine miRNA and methylated gene-specific reactivation using artificial transcription factors (Zhang *et al.*, 2012).

In summary, our findings indicate that miR-219-1-3p is a good tumor-suppressor candidate inhibiting both MUC4 expression and MUC4 downstream signalling pathways, highlighting the therapeutic potential of miR-219-1-3p in pancreatic cancer.

Materials and methods

Cell culture

Human pancreatic ductal epithelial cells (HPDE) were obtained from Dr M.S. Tsao (UHN, Toronto, Canada) (Furukawa *et al.*, 1996 ; Torrisani *et al.*, 2001). BxPC-3 and MIA PaCa-2 pancreatic cancer cells were purchased from ATCC and were cultured as described before (Torrisani *et al.*, 2009). Capan-1, Capan-2 (ATCC) and Panc-1 (ECACC) pancreatic cancer cells were grown as previously described (Perrais *et al.*, 2001).

Human Samples

Paired human PDAC and their corresponding non tumoral tissues were collected from surgical resections of 22 patients with PDAC from 2006 to 2009 in Lille University Hospital. Signed informed consent was obtained from all patients.

Establishment of miR-219-1-3p over-expressing stable cell lines

Capan-1 LV-miR-Neg and Capan-2 LV-miR-219 stable cell lines were obtained as previously described (Torrisani *et al.*, 2009) miR-219-1_F 5'-TGCTGAGAGTTGAGTCTGGACGTCCCGGTTTTGGCCACTGACTGACCGGGACGTCCAGTCAACTCT-3' and miR-219-1_R 5'-CCTGAGAGTTGACTGGACGTCCCGGTCAGTCAGTGGCCAAAACCGGGACGTCCAGACTCAACTCTC-3' oligonucleotides were annealed and cloned into pcDNA-6.2-GW/emGFP-miR vector (Life Technologies, Villeban sur Yvette, France) to obtain pcDNA6.2-GW/emGFP-miR-219 vector. pcDNA6.2-GW/emGFP-miR-Neg vector (Life Technologies) was used as control. GFP-miR-219 and GFP-miR-Neg cassettes were cloned into pDONR221 (Life Technologies), using the BP Clonase reaction (Life Technologies), and subsequently transferred into pLenti4/TO/V5-DEST lentiviral vector (Life Technologies), using the LR Clonase reaction (Life Technologies) to create pLenti4/TO/GFP-miR-219 and

pLenti4/TO/GFP-miR-Neg vectors, respectively. Lentiviral particles were produced in HEK-293FT cells with pLenti4/TO/GFP-miR-219 and pLenti4/TO/GFP-miR-Neg vectors and ViraPower lentiviral packaging mix (Life Technologies). Capan-1 and Capan-2 cells were incubated with the lentiviral particles (multiplicity of infection, 1) for 24 hr and subsequently selected with Zeocin (Invivogen, Toulouse, France) at 100 µg/ml for 2 weeks. Efficiency of viral infection and selection was estimated by measuring the percentage of GFP-expressing cells by flow cytometric analysis. Overexpression of mature miR-219-1-3p was quantified by quantitative reverse transcriptase-polymerase chain reaction (qRT-PCR) as described below.

***Pdx1-Cre;LSL-Kras^{G12D}* mouse model**

Pdx1-Cre mice were obtained from the Mouse Models of Human Cancer Consortium (MMHCC, USA). *LStopL-Kras^{G12D}* mice were obtained from Dr D. Tuveson (Cambridge Research Institute, England) (Olive and Tuveson, 2006). All procedures were in accordance with the guideline of animal care committee (Comité Ethique Expérimentation Animale Nord Pas-de-Calais, #AF042008). *LSL-Kras^{G12D}* (*Kras^{WT}*) and *Pdx1-Cre* mice were maintained as heterozygous lines and crossed to obtain *Kras^{G12D}* (*Pdx1-Cre;LSL-Kras^{G12D}*) mice. Mice were sacrificed at 9 months of age. Two pathologists scored independently the PanIN grade as PanIN-1 and PanIN-2. Tail snips, harvested from offsprings of *LSL-Kras^{G12D}* and *Pdx1-Cre* mice, were digested overnight, and genomic DNA was extracted using the Nucleospin Tissue kit (Macherey Nagel, Hoerd, Germany). The *Cre* and *Kras^{G12D}* alleles were identified by PCR.

miRNA target prediction

To identify miRNA potentially targeting *MUC4* 3'-UTR, Microcosm (www.ebi.ac.uk/enright-srv/microcosm) and MiRanda (<http://www.microrna.org>) databases were used. The mature miRNA sequence was confirmed with miRBase (<http://microrna.sanger.ac.uk/>).

pGL3-*MUC4*-3'-UTR cloning

The *MUC4* 3'-UTR was amplified from Capan-2 genomic DNA using the following primers: MUC4_3'-UTR_F: 5'-CGCTCTAGAGGGCCAGGTTCTCCTATTTTC-3' and MUC4_3'-UTR_R: 5'-CGCTCTAGAGGCCACCAGAAGAAAATCAA-3'. The PCR product was digested with XbaI restriction enzyme and inserted into pGL3 Promoter vector (Promega, Charbonnières-les-Bains, France) downstream of the luciferase gene. To generate pGL3-MUC4-site#1_mut miR-219-1-3p binding site #1 sequence ACCTCAAGACTCACCTC was mutated to ACCTCAAGAAGAACCTC and the miR-219-1-3p binding site #2 sequence TTCAAATTA ACTCT was mutated to TTCAAATTGGCGAT (pGL3-MUC4-site#2_mut) using the Quick-Change XL Site-Directed Mutagenesis[®] kit (Stratagene, Agilent Technologies, Massy, France).

Cell transfection and luciferase reporter assays

Cells were transfected with pre-miR-219-1-3p (9 nM) or anti-miR-219-1-3p (18 nM) by the reverse transfection method using the siPORT[™] NeoFX transfection reagent (Ambion, Life Technologies, Villeban sur Yvette, France). Cells transfected with the siPORT[™] NeoFX transfection reagent (untreated) or a scramble sequence were examined in parallel as controls. Cells were subjected to RNA or protein extraction 48h post transfection. Co-transfection were carried out in the presence of 1 µg of pGL3-*MUC4*-3'UTR reporter plasmid and either pre-

miR-219-1-3p precursor or anti-miR-219-1-3p (Ambion, Life Technologies). Luciferase activity and protein assays were performed as described in Skrypek *et al.*, 2013.

RNA isolation and qRT-PCR

Total RNA including miRNAs from cells and from Formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) was extracted using miRNeasy Mini Kit (Qiagen, Courtaboeuf, France) and RecoverAll™ Total Nucleic Acid Isolation Kit (Ambion). One µg of RNA was reverse transcribed with the QuantiMiR Reverse Transcription Kit (System Biosciences, Ozyme, Saint Quentin Yvelines, France). qRT-PCR was carried out using *Sso Fast EVA Green*® Supermix (Bio-Rad, Marnes-la-Coquette, France) and *CFX96* Detection System (Bio-Rad). The forward primer was the same sequence as the mature miR-219-1-3p (AGAGTTGAGTCTGGACGTCCCG), and the universal reversed primer was provided in the QuantiMiR Reverse Transcription Kit (System Biosciences, Ozyme). Human and mouse U6 snRNA, used as controls, were amplified with primers provided from the QuantiMiR Reverse Transcription Kit (System Biosciences, Ozyme). Expression levels were calculated using the $2^{-\Delta Ct}$ method. The miR-219-1-3p expression level was normalized against U6 snRNA and was assayed in triplicate in three independent experiments.

Biotin pull-down assay

Capan-2 cells (1×10^6) were transfected in triplicate with 3'-biotinylated miR-219-1-3p or 3'-biotinylated scramble miRNA (Dharmacon, Thermo Scientific, Brebières, France) at 100 nM final as described above. Biotin pull-down assay was performed as previously described (Lal *et al.*, 2011). RNA was directly extracted from the beads (pulled-down RNA) or from the input RNA using the miRNeasy Mini kit (Qiagen). Extracted RNA was subjected to cDNA synthesis as previously described (Van Seuning *et al.*, 2000). qPCR was performed using

the SsoFast Evagreen[®] Supermix kit (Bio-Rad) following manufacturer's protocol using the CFX96 real-time PCR system (Bio-Rad). Primers used were: MUC4_F, GCCCAAGCTACAGTGTGACTCA; MUC4_R, ATGGTGCCGTTGTAATTTGTTGT; GAPDH_F, CCACATCGCTCAGACACCAT; GAPDH_R, CCAGGCGCCCAATACG. The *MUC4* mRNA levels were normalized to the mRNA level of *GAPDH* in the miR-219-1-3p pull down and then normalized to the amount in the input to obtain the enrichment ratio. This was calculated using the $2^{-\Delta Ct}$ method. Three independent experiments were carried out.

Cell proliferation and migration assays

Capan-1, Capan-2 and BxPC-3 cells were transfected with pre-miR-219-1-3p or scramble miRNA and then seeded at 10^5 cells/well in 6-well plates. Cells were counted at 24, 48, and 72 h post-transfection using Countess[®] Automated Cell Counter (Life Technologies). In stable cell lines, cells were counted until 134 h. Cells were transfected during 24 h, 5×10^4 cells were then plated into migration chambers (Pharmingen, BD Biosciences, Le Pont de Claix, France). Each experiment was assayed in triplicate in at least three independent experiments.

Subcutaneous xenografts

Capan-1, Capan-2 (2×10^6 cells in 100 μ l Matrigel[®]) cells were injected subcutaneously into the flank of eight-week-old male Severe Combined Immunodeficient (SCID) mice (CB17, Charles Rivers, L'Arbresle, France) to generate a tumor. Once palpable tumors developed (250 mm^3), 20 μ g of pcDNA6.2-miR-219 or pcDNA6.2-miR-neg vector complexed with ExGen 500 transfection reagent (Euromedex, Souffelweyersheim, France) in 5% (w/v) glucose were injected in tumors. Six mice were used per group. Tumor size was monitored by measuring length (l) and width (L) twice a week and tumor volume was calculated with the

formula ($l^2 \times L$). All procedures were in accordance with the guideline of animal care committee (Comité Ethique Expérimentation Animale Nord Pas-de-Calais, #122012).

Immunoblotting

Cell lysis, western-blotting, immunostaining and protein assay were carried out as described before (Piessen *et al.*, 2007). The membranes were incubated with phospho-Erk1/2 (Thr202/Tyr204) (clone 20G11, 1/500), Erk1/2 (clone I37F5, 1/500), phospho-Akt (Ser473) (clone D9E, 1/1000), Akt (clone C67E7, dilution 1/1000), cyclin D1 (clone DCS6, dilution 1/500), all from Cell Signalling Technology, (Ozyme) MUC4 (clone 8G7, 1/500), Bax (clone N-20, 1/500) and Bcl_{XL} (clone H-5, 1/500) from Santa Cruz Biotechnology Inc. (Heidelberg, Germany) and β -actin (A5441, 1/5000) from Sigma-Aldrich (Saint Quentin Fallavier, France). Antibodies were diluted in 5% (w/v) non-fat dry milk in Tris-Buffered Saline Tween-20[®] (TBS-T), except for MUC4 and β -actin diluted in TBS-T, and incubated overnight at 4°C. The membranes were then incubated with peroxidase-conjugated secondary antibodies (Sigma-Aldrich). The signal was detected using LAS 4000 apparatus (Fujifilm, F.S.V.T., Courbevoie, France). Bands were quantified with the image analysis software Gel analyst (Clara Vision, Verrières-le-Buisson, France). Three independent experiments were performed.

Immunohistochemistry

Tumor tissues were fixed in formalin and embedded in paraffin. Tissue sections (5 μ m) were stained with hematoxylin and eosin. Immunostaining with primary antibodies for human MUC4 (8G7) or mouse Muc4 (1G8) (Santa Cruz Biotechnology Inc.) and human Ki67 (Leica Microsystems, Nanterre, France) were performed as described previously (Jonckheere *et al.*, 2007 ; van der Sluis *et al.*, 2004). The slides were scored independently by two pathologists.

Intensity of staining was graded as weak (1), moderate (2) or strong (3). The percentage of ductal stained cells was graded as 1 (0-25%), 2 (25-50%), 3 (50-75%) and 4 (75-100%). Total score was calculated by multiplying the intensity score and percentage score.

miRNA *in situ* hybridization

In situ hybridization for miR-219-1-3p was performed in the formalin-fixed and paraffin-embedded mouse pancreatic tissue specimens by using the MiRCURY LNA microRNA ISH Optimization Kit (Exiqon, Vedbaek, Denmark) according to the manufacturer's protocol. The miR-219-1-3p locked nucleic acid sequence is 5'-DIG- CGGGACGTCCAGACTCAACTCT - 3'-DIG. The slides were then counterstained with nuclear fast red (Sigma-Aldrich) and mounted with mounting medium (VWR, Fontenay sous Bois, France).

Statistical analyses

All statistical analyses were carried out using the Graphpad Prism 4.0 software. Unless indicated, differences between groups were analysed using the Student's *t*-test or Anova test. Data were shown as mean \pm SEM and considered significant when $p < 0.05$ *, $p < 0.01$ ** or $p < 0.001$ ***.

Conflict of interest: Authors declare no conflict of interest.

Acknowledgments

We thank D. Tuveson (Cambridge Research Institute, England) for the kind gift of *LStopL-Kras^{G12D}* mouse model, Dr M. S. Tsao (University Health Network, Toronto, Canada) for the kind gift of HPDE cells, M.H. Gevaert and R. Siminsky (Department of Histology, Faculty of Medicine, University of Lille 2) for their technical help, Dr C. Cauffiez (EA4483, University of Lille 2) and Dr M. Perrais (Inserm UMR837, team 5, Lille) for the *in situ* hybridization studies, the technical platforms IFR114/IMPRT for luciferase measurements (A.S Drucbert) and the animal facility (D. Taillieu).

References

1. Vincent A, Herman J, Schulick R, Hruban RH, Goggins M. Pancreatic cancer. *Lancet* 2011; **378**: 607-620.
2. Hruban RH, Maitra A and Goggins M. Update on pancreatic intraepithelial neoplasia. *Int J Clin Exp Pathol* 2008;1:306-16.
3. Jonckheere N, Skrypek N, Merlin J, Dessein AF, Dumont P, Leteurtre E, *et al.* The Mucin MUC4 and Its Membrane Partner ErbB2 Regulate Biological Properties of Human CAPAN-2 Pancreatic Cancer Cells via Different Signalling Pathways. *PLoS One* 2012; **7**: e32232.
4. Jonckheere N, Van Seuning I. The membrane-bound mucins: From cell signalling to transcriptional regulation and expression in epithelial cancers. *Biochimie* 2010; **92**: 1-11.
5. Skrypek N, Duchene B, Hebbar M, Leteurtre E, van Seuning I, Jonckheere N. The MUC4 mucin mediates gemcitabine resistance of human pancreatic cancer cells via the Concentrative Nucleoside Transporter family. *Oncogene* 2013; **32**: 1714-1723.
6. Swartz MJ, Batra SK, Varshney GC, Hollingsworth MA, Yeo CJ, Cameron JL, *et al.* MUC4 expression increases progressively in pancreatic intraepithelial neoplasia. *Am J Clin Pathol* 2002; **117**: 791-796.
7. Vincent A, Ducourouble MP, Van Seuning I. Epigenetic regulation of the human mucin gene MUC4 in epithelial cancer cell lines involves both DNA methylation and histone modifications mediated by DNA methyltransferases and histone deacetylases. *Faseb J* 2008; **22**: 3035-3045.
8. Jonckheere N, Perrais M, Mariette C, Batra SK, Aubert JP, Pigny P, *et al.* A role for human MUC4 mucin gene, the ErbB2 ligand, as a target of TGF-beta in pancreatic carcinogenesis. *Oncogene* 2004; **23**: 5729-5738.
9. Kasinski AL, Slack FJ. Epigenetics and genetics. MicroRNAs en route to the clinic: progress in validating and targeting microRNAs for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2011; **11**: 849-864.
10. Humeau M, Torrisani J, Cordelier P. miRNA in clinical practice: pancreatic cancer. *Clin Biochem* 2013; **46**: 933-936.
11. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 2004; **116**: 281-297.
12. Calin GA, Croce CM. MicroRNA signatures in human cancers. *Nat Rev Cancer* 2006; **6**: 857-866.
13. Lu J, Getz G, Miska EA, Alvarez-Saavedra E, Lamb J, Peck D, *et al.* MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* 2005; **435**: 834-838.
14. Srivastava SK, Bhardwaj A, Singh S, Arora S, Wang B, Grizzle WE, *et al.* MicroRNA-150 directly targets MUC4 and suppresses growth and malignant behavior of pancreatic cancer cells. *Carcinogenesis* 2011; **32**: 1832-1839.
15. Schultz NA, Werner J, Willenbrock H, Roslind A, Giese N, Horn T, *et al.* MicroRNA expression profiles associated with pancreatic adenocarcinoma and ampullary adenocarcinoma. *Mod Pathol* 2012; **25**: 1609-1622.
16. Rachagani S, Macha MA, Ponnusamy MP, Haridas D, Kaur S, Jain M, *et al.* MUC4 potentiates invasion and metastasis of pancreatic cancer cells through stabilization of fibroblast growth factor receptor 1. *Carcinogenesis* 2012; **33**: 1953-1964.

17. Chaturvedi P, Singh AP, Chakraborty S, Chauhan SC, Bafna S, Meza JL, *et al.* MUC4 mucin interacts with and stabilizes the HER2 oncoprotein in human pancreatic cancer cells. *Cancer Res* 2008; **68**: 2065-2070.
18. Chaturvedi P, Singh AP, Moniaux N, Senapati S, Chakraborty S, Meza JL, *et al.* MUC4 mucin potentiates pancreatic tumor cell proliferation, survival, and invasive properties and interferes with its interaction to extracellular matrix proteins. *Mol Cancer Res* 2007; **5**: 309-320.
19. Jonckheere N, Van Seuning I. The membrane-bound mucins: how large O-glycoproteins play key roles in epithelial cancers and hold promise as biological tools for gene-based and immunotherapies. *Crit Rev Oncog* 2008; **14**: 177-196.
20. Jonckheere N, Skrypek N, van Seuning I. Mucins and pancreatic cancer. *Cancers* 2010; **2**: 1794-1812.
21. Perrais M, Pigny P, Ducourouble MP, Petitprez D, Porchet N, Aubert JP, *et al.* Characterization of human mucin gene MUC4 promoter: importance of growth factors and proinflammatory cytokines for its regulation in pancreatic cancer cells. *J Biol Chem* 2001; **276**: 30923-30933.
22. Andrianifahanana M, Agrawal A, Singh AP, Moniaux N, van Seuning I, Aubert JP, *et al.* Synergistic induction of the MUC4 mucin gene by interferon-gamma and retinoic acid in human pancreatic tumour cells involves a reprogramming of signalling pathways. *Oncogene* 2005; **24**: 6143-6154.
23. Singh AP, Chauhan SC, Andrianifahanana M, Moniaux N, Meza JL, Copin MC, *et al.* MUC4 expression is regulated by cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in pancreatic adenocarcinoma cells via transcriptional and post-translational mechanisms. *Oncogene* 2007; **26**: 30-41.
24. Cheng HY, Papp JW, Varlamova O, Dziema H, Russell B, Curfman JP, *et al.* microRNA modulation of circadian-clock period and entrainment. *Neuron* 2007; **54**: 813-829.
25. Dugas JC, Cuellar TL, Scholze A, Ason B, Ibrahim A, Emery B, *et al.* Dicer1 and miR-219 Are required for normal oligodendrocyte differentiation and myelination. *Neuron* 2010; **65**: 597-611.
26. Zhao X, He X, Han X, Yu Y, Ye F, Chen Y, *et al.* MicroRNA-mediated control of oligodendrocyte differentiation. *Neuron* 2010; **65**: 612-626.
27. Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, Hyslop T, Noch E, Yendamuri S, *et al.* Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; **101**: 2999-3004.
28. Xu S, Witmer PD, Lumayag S, Kovacs B, Valle D. MicroRNA (miRNA) transcriptome of mouse retina and identification of a sensory organ-specific miRNA cluster. *J Biol Chem* 2007; **282**: 25053-25066.
29. Lin M, Cai D, Luo M. Identification of chromosomal imbalances in pancreatic carcinoma using comparative genomic hybridization. *Chin Med J (Engl)* 2003; **116**: 1156-1160.
30. Mahlamaki EH, Barlund M, Tanner M, Gorunova L, Hoglund M, Karhu R, *et al.* Frequent amplification of 8q24, 11q, 17q, and 20q-specific genes in pancreatic cancer. *Genes Chromosomes Cancer* 2002; **35**: 353-358.
31. Bloomston M, Frankel WL, Petrocca F, Volinia S, Alder H, Hagan JP, *et al.* MicroRNA expression patterns to differentiate pancreatic adenocarcinoma from normal pancreas and chronic pancreatitis. *JAMA* 2007; **297**: 1901-1908.
32. Lee EJ, Gusev Y, Jiang J, Nuovo GJ, Lerner MR, Frankel WL, *et al.* Expression profiling identifies microRNA signature in pancreatic cancer. *Int J Cancer* 2007; **120**: 1046-1054.

33. Szafranska AE, Davison TS, John J, Cannon T, Sipos B, Maghnouj A, *et al.* MicroRNA expression alterations are linked to tumorigenesis and non-neoplastic processes in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Oncogene* 2007; **26**: 4442-4452.
34. Yu J, Li A, Hong SM, Hruban RH, Goggins M. MicroRNA alterations of pancreatic intraepithelial neoplasias. *Clin Cancer Res* 2012; **18**: 981-992.
35. du Rieu MC, Torrisani J, Selves J, Al Saati T, Souque A, Dufresne M, *et al.* MicroRNA-21 is induced early in pancreatic ductal adenocarcinoma precursor lesions. *Clin Chem* 2010; **56**: 603-612.
36. Zhang B, Xiang S, Zhong Q, Yin Y, Gu L and Deng D. The p16-specific reactivation and inhibition of cell migration through demethylation of CpG islands by engineered transcription factors. *Hum Gene Ther* 2012;23:1071-81.
37. Furukawa T, Duguid WP, Rosenberg L, Viallet J, Galloway DA, Tsao MS. Long-term culture and immortalization of epithelial cells from normal adult human pancreatic ducts transfected by the E6E7 gene of human papilloma virus 16. *Am J Pathol* 1996; **148**: 1763-1770.
38. Torrisani J, Bouisson M, Puente E, Capella G, Laurent-Puig P, Berger A, *et al.* Transcription of SST2 somatostatin receptor gene in human pancreatic cancer cells is altered by single nucleotide promoter polymorphism. *Gastroenterology* 2001; **120**: 200-209.
39. Torrisani J, Bournet B, du Rieu MC, Bouisson M, Souque A, Escourrou J, *et al.* let-7 MicroRNA transfer in pancreatic cancer-derived cells inhibits in vitro cell proliferation but fails to alter tumor progression. *Hum Gene Ther* 2009; **20**: 831-844.
40. Olive KP, Tuveson DA. The use of targeted mouse models for preclinical testing of novel cancer therapeutics. *Clin Cancer Res* 2006; **12**: 5277-5287.
41. Lal A, Thomas MP, Altschuler G, Navarro F, O'Day E, Li XL, *et al.* Capture of microRNA-bound mRNAs identifies the tumor suppressor miR-34a as a regulator of growth factor signaling. *PLoS Genet* 2011;7:e1002363.
42. Van Seuning I, Perrais M, Pigny P, Porchet N, Aubert JP. Sequence of the 5'-flanking region and promoter activity of the human mucin gene MUC5B in different phenotypes of colon cancer cells. *Biochem J* 2000; **348 Pt 3**: 675-686.
43. Piessen G, Jonckheere N, Vincent A, Hemon B, Ducourouble MP, Copin MC, *et al.* Regulation of the human mucin MUC4 by taurodeoxycholic and taurochenodeoxycholic bile acids in oesophageal cancer cells is mediated by hepatocyte nuclear factor 1alpha. *Biochem J* 2007; **402**: 81-91.
44. Jonckheere N, Vincent A, Perrais M, Ducourouble MP, Male AK, Aubert JP, *et al.* The human mucin MUC4 is transcriptionally regulated by caudal-related homeobox, hepatocyte nuclear factors, forkhead box A, and GATA endodermal transcription factors in epithelial cancer cells. *J Biol Chem* 2007; **282**: 22638-22650.
45. van der Sluis M, Melis MH, Jonckheere N, Ducourouble MP, Buller HA, Renes I, *et al.* The murine Muc2 mucin gene is transcriptionally regulated by the zinc-finger GATA-4 transcription factor in intestinal cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; **325**: 952-960.

Figure 1. miR-219-1-3p is downregulated in pancreatic cancer cell lines and PDAC tissues. (A) Identification of two putative miR-219-1-3p binding sequences in the *MUC4* 3'-UTR at nucleotides 19-40 (site #1) and 356-372 (site #2). Alignment of the hsa-miR-219-1-3p seed region in different species (human Hs, mouse Mm, rat Rn and chimpanzee Ptr) demonstrates conservation across species. (B) MiR-219-1-3p expression was determined by qRT-PCR in Capan-1, Capan-2, BxPC-3, Panc-1 and MIA PaCa-2 pancreatic cancer cells and compared to the HPDE cells (arbitrarily set to 1). Western-blotting analysis of MUC4 and β -actin expression (insert). (C) qRT-PCR analysis of miR-219-1-3p expression in 22 paired human pancreatic cancers and their corresponding healthy tissues. Results are expressed using $2^{-\Delta C_t}$ method ($\Delta C_t = C_t \text{ miR-219-1-3p} - C_t \text{ U6}$). MiR-219-1-3p expression in PDAC tissues and non tumoral pancreatic tissues were compared using the Wilcoxon signed-rank test ($p < 0.05$ *). Immunohistochemical staining of MUC4 in patients #10 (left) and #22 (right) (insert). Original magnification, 20x. Scale bar = 50 μm .

Figure 2. miR-219-1-3p directly inhibits the expression of MUC4 through its 3'-UTR. (A) Western-blotting analysis of MUC4 and β -actin expression in Capan-1, Capan-2 and BxPC-3 cells not transfected (untreated) or transfected with either scramble pre-miRNA (scramble) or pre-miR-219-1-3p (miR-219-1-3p) (left panel) and Capan-2 and BxPC-3 cells transfected with anti-miR scramble or anti-miR-219-1-3p (right panel). (B) Biotinylated miR-219-1-3p or scramble miRNAs were transfected in Capan-2 cells. Enrichment of *MUC4* mRNA was assessed by qRT-PCR. The MUC4/GAPDH ratio was calculated and normalized to the input. (C, D) Cells were cotransfected with a reporter plasmid containing either the wild-type (WT) or mutant versions in binding site #1 (site #1 mut) or binding site #2 (site #2 mut) of pGL3-*MUC4*-3'-UTR in the presence of pre-miR-219-1-3p or scramble pre-miRNA (C) or in the presence of anti-miR-219-1-3p or scramble anti-miRNA (D). Luciferase activity in (C) scramble miR- or (D) scramble anti-miR-transfected cells was arbitrarily set to 1. Data are reported as mean \pm SEM for three independent experiments (p<0.05 *, p<0.01 ** or p<0.001 ***).

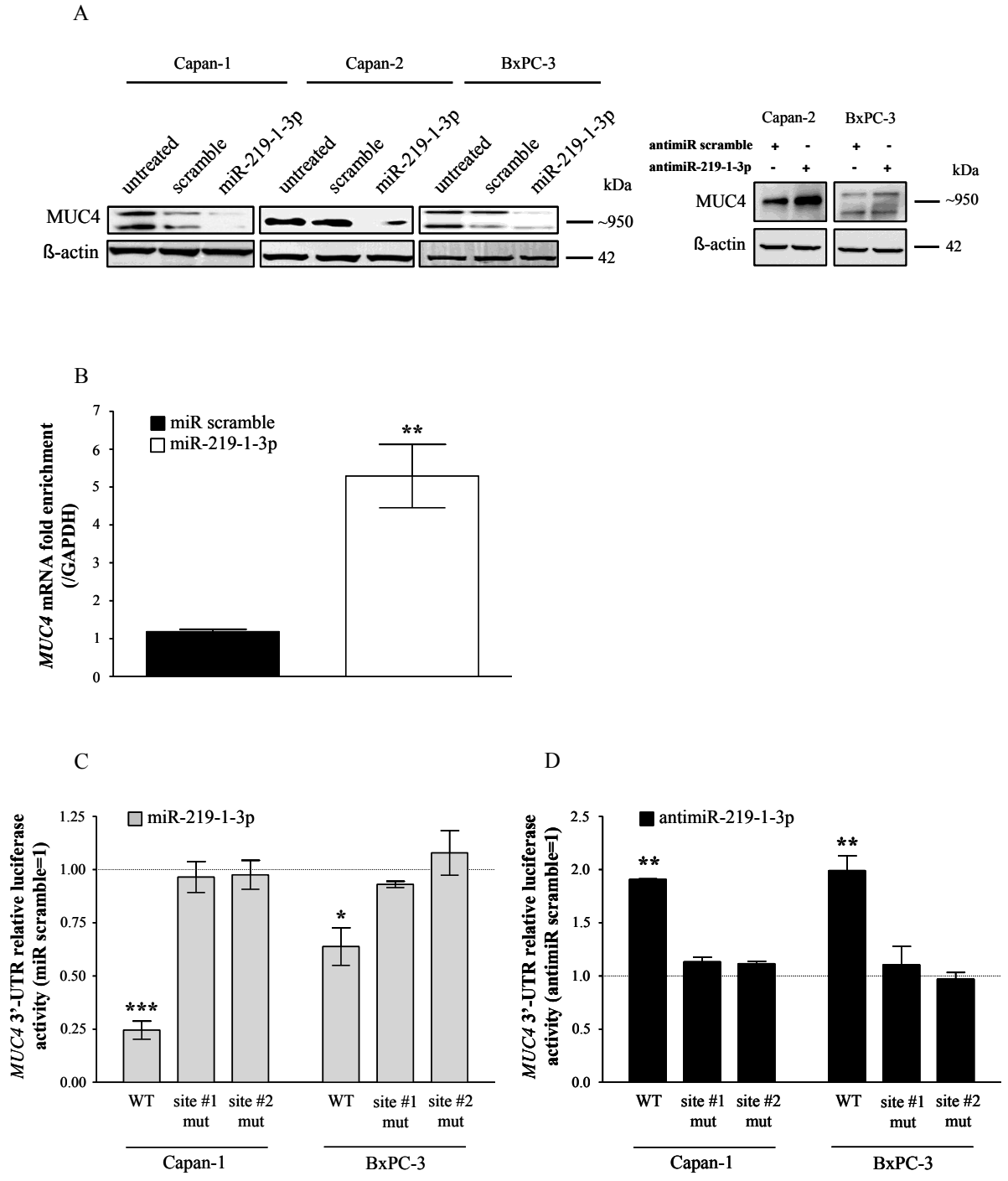


Figure 2

Figure 3. miR-219-1-3p inhibits pancreatic cancer cell proliferation and migration. (A) Overexpression of miR-219-1-3p inhibits proliferation of Capan-1, Capan-2 and BxPC-3 cells. (B) Inhibition of miR-219-1-3p increases proliferation of Capan-2 and BxPC-3 cells. (C) Capan-1, Capan-2 and BxPC-3 cells were transfected with pre-miR-219-1-3p or scramble pre-miRNA for 24 h. Results are expressed as average migrating cell number per field. Data are reported as mean \pm SEM for three independent experiments ($p < 0.05$ *, $p < 0.01$ ** or $p < 0.001$ ***). (D) MiR-219-1-3p inhibits proliferation and signaling pathways downstream of MUC4. Western-blotting analysis of cyclin D1, p-Akt, Akt, p-Erk and Erk levels in Capan-1, Capan-2 and BxPC-3 cells after miR-219-1-3p transfection. β -actin serves as the loading control. Bands were quantified by densitometry.

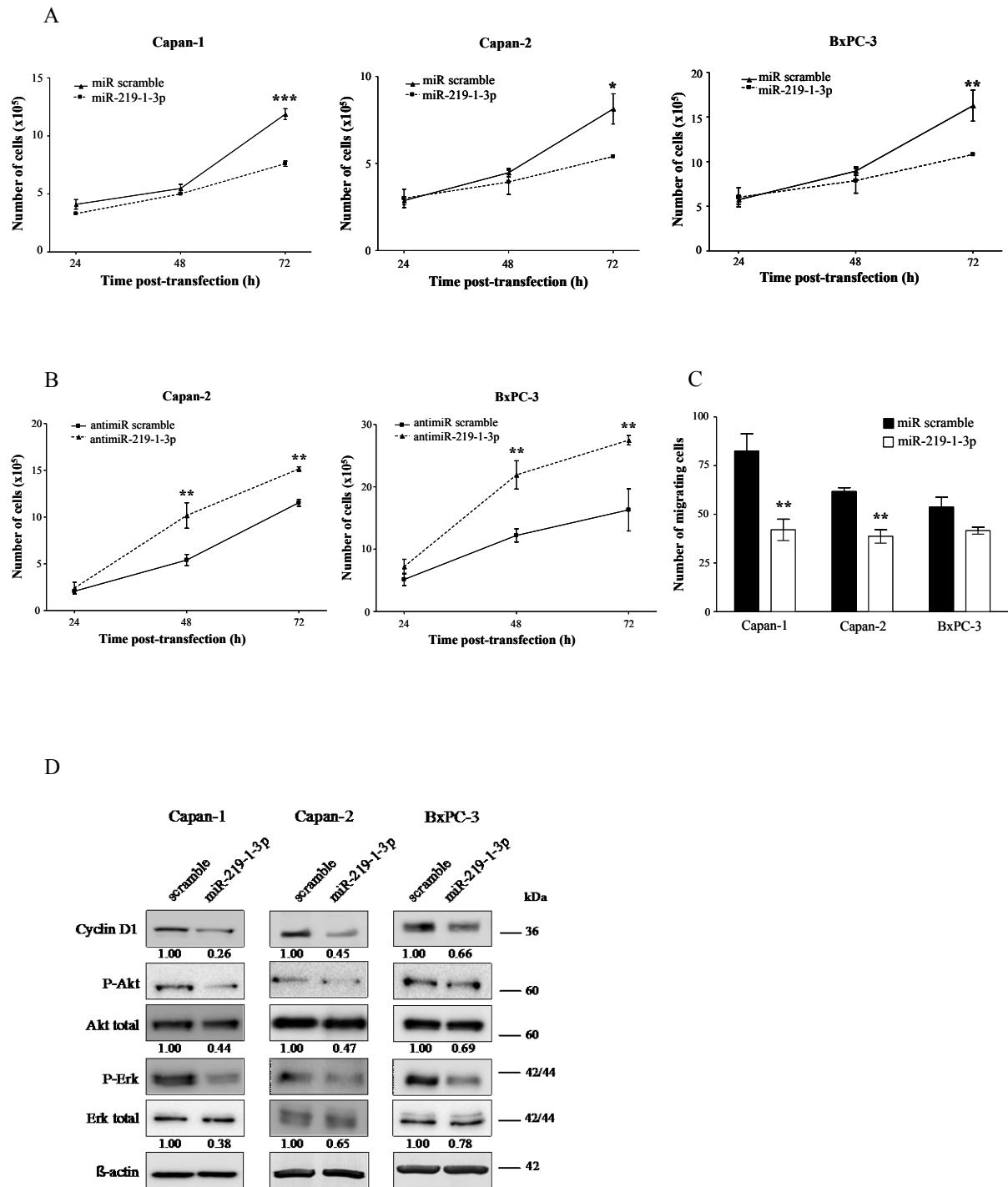
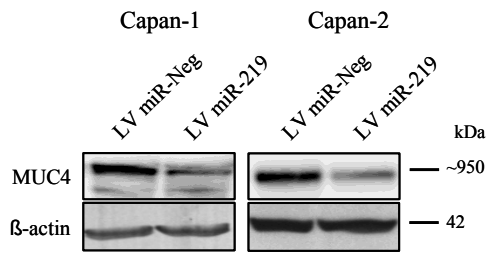


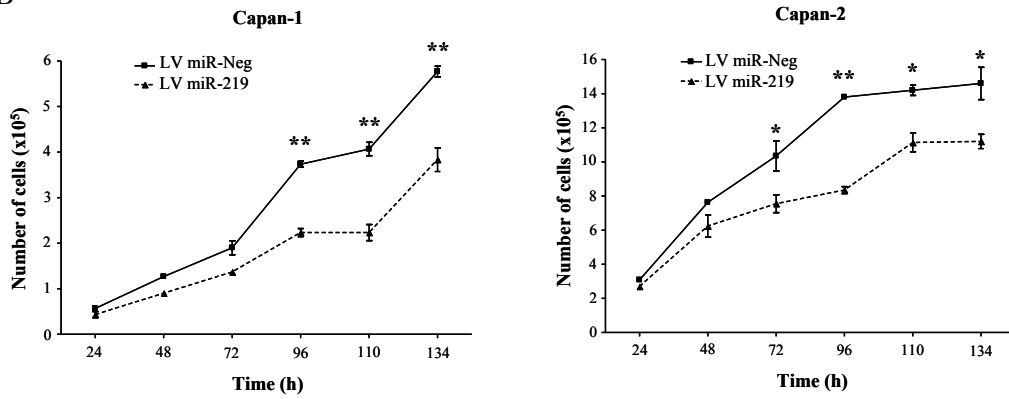
Figure 3

Figure 4. Characterization of stable miR-219-1-3p expressing cell lines. (A) Western-blotting analysis of MUC4 and β -actin expression in Capan-1 LV miR-219, Capan-2 LV miR-219 and their controls Capan-1 LV miR-Neg and Capan-2 LV miR-Neg. (B) Proliferation and (C) migration properties of Capan-1 LV miR-219 and Capan-2 LV miR-219 cells compared to their controls (LV miR-Neg). Data are reported as mean \pm SEM for three independent experiments (p<0.05 *, p<0.01 ** or p<0.001 ***).

A



B



C

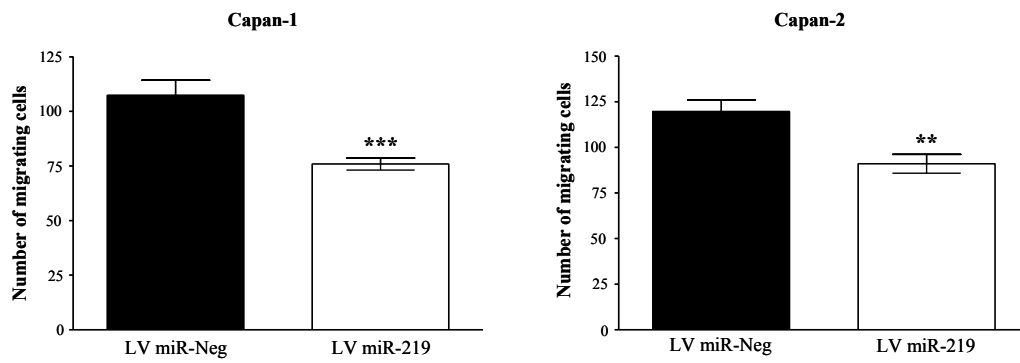


Figure 4

Figure 5. miR-219-1-3p inhibits pancreatic tumor growth *in vivo*. Left panel: Capan-1 and right panel: Capan-2 cells. (A) Cells were xenografted subcutaneously into SCID mice and the established tumors were then treated with either pcDNA6.2-miR-neg or pcDNA6.2-miR-219 vectors. Measurement of tumor growth was performed following intratumoral injection of miR vectors and tumor volume was calculated ($p < 0.05$ *). Results are expressed as the ratio of tumor progression relative to tumor volume on the day of miRNA injection (arbitrarily set to 1). (B) Expression of miR-219-1-3p in xenografted tumors was measured by qRT-PCR ($p < 0.05$ *, $p < 0.001$ ***). (C) Expression of MUC4 and Ki67 in xenografted tumors was studied by immunohistochemistry. Original magnification, 20x. Scale bar = 50 μ m.

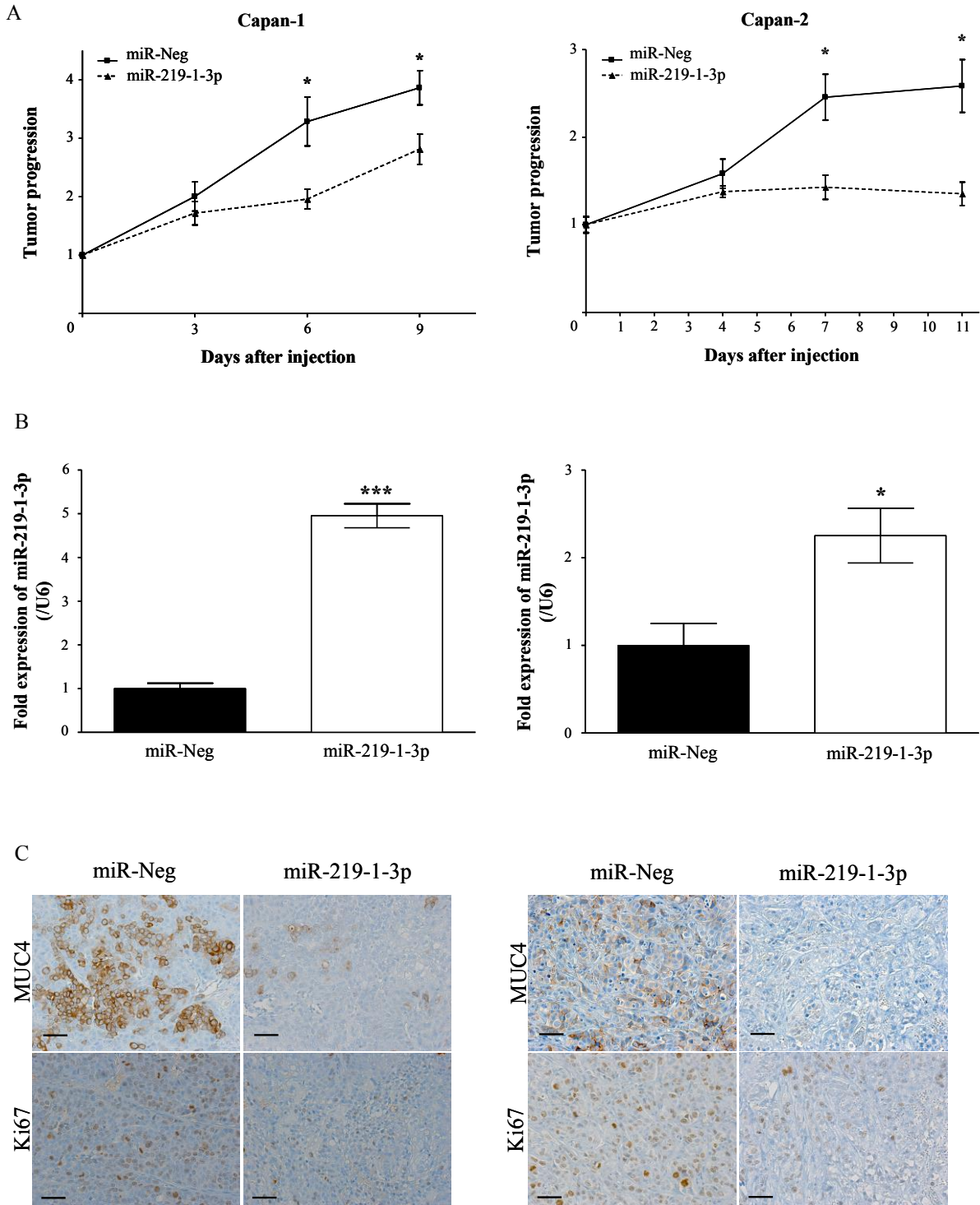


Figure 5

Figure 6. miR-219-1-3p expression is conversely correlated to Muc4 expression in early pancreatic PanIN lesions. (A) Hematoxylin and eosin staining (left panel), MUC4 immunohistochemical staining (middle panel) and miR-219-1-3p *in situ* hybridization (right panel) in mice tissues. Original magnification, 20x. Scale bar = 50 μ m. (B) Expression of miR-219-1-3p in PanINs (Kras^{G12D}) and normal pancreas (Kras^{WT}) by qRT-PCR. Data were normalized to U6 expression and expressed as $2^{-\Delta Ct}$ (p<0.001 ***). (C) Correlation analysis between miR-219-1-3p expression and Muc4 expression. Statistical analyses were performed using Pearson's correlation coefficient ($r = -0,5847$, $p = 0.0137$).

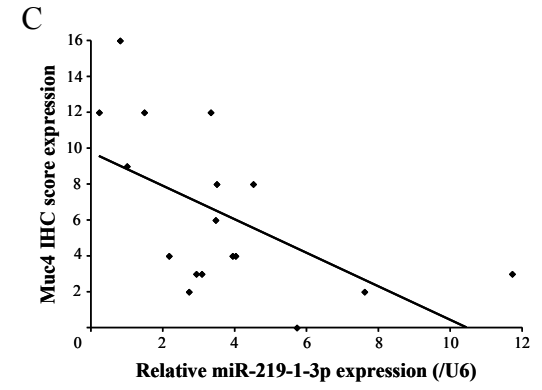
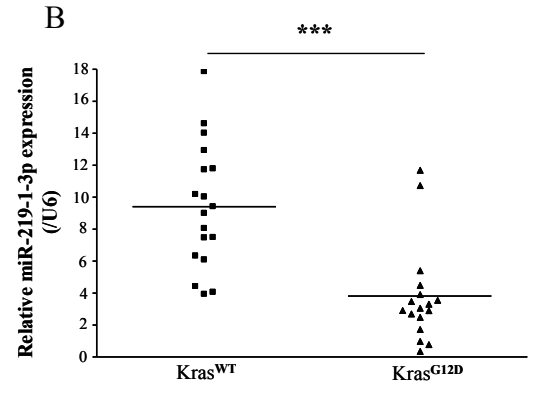
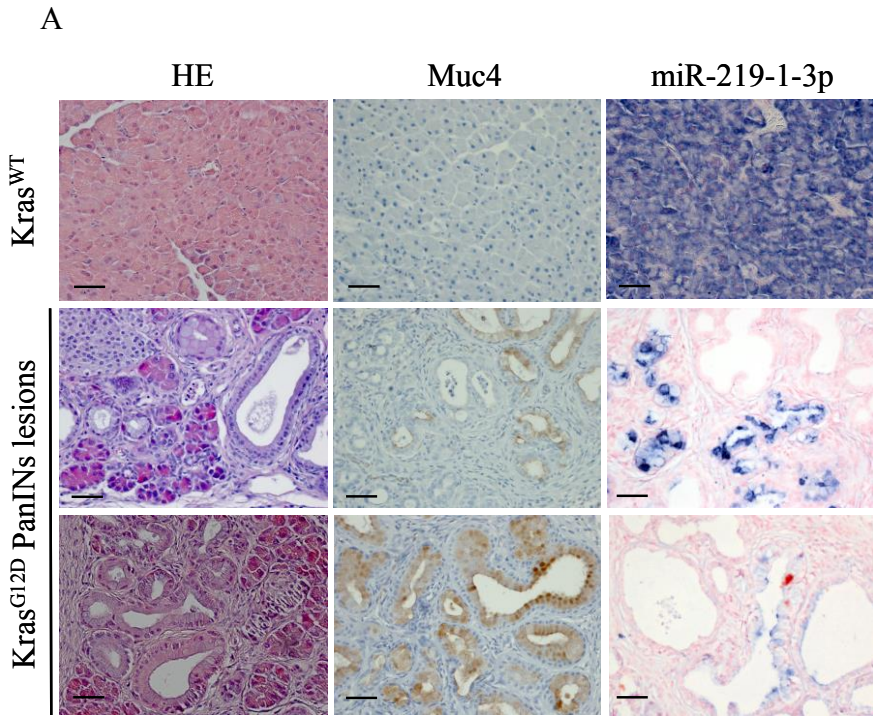
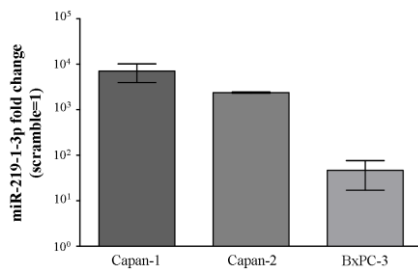
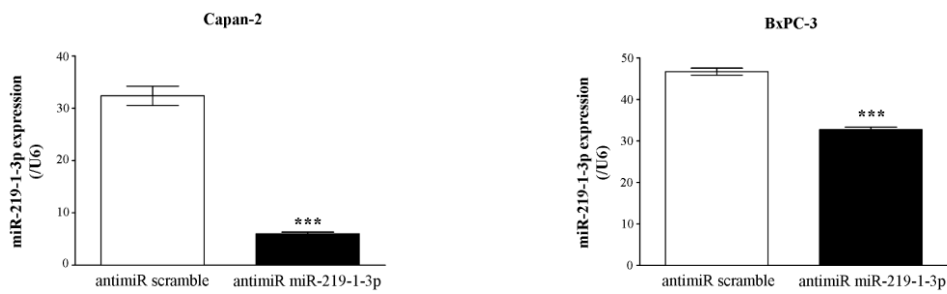


Figure 6

A



B



C

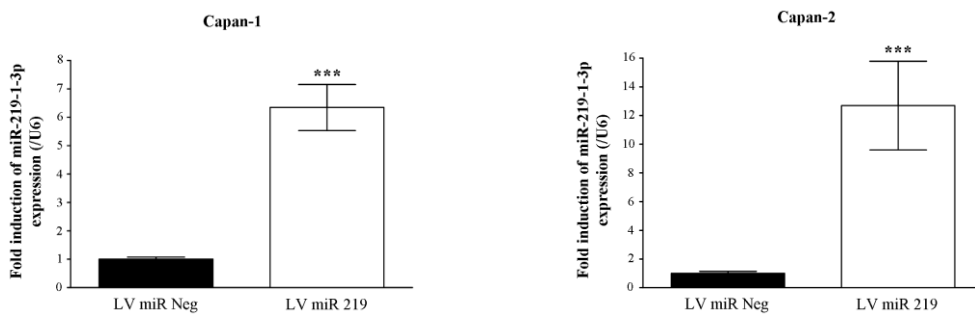
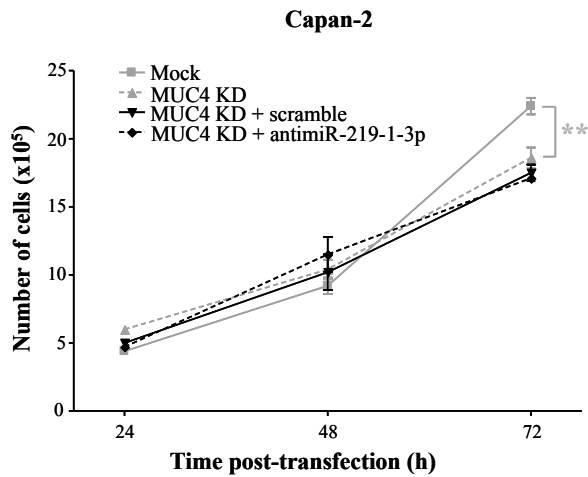


Figure S1. (A) miR-219-1-3p fold change after miR-219-1-3p transient transfection in Capan-1, Capan-2 and BxPC-3 cell lines. (B) miR-219-1-3p expression after anti-miR-219-1-3p transient transfection in Capan-2 and BxPC-3 cell lines. (C) miR-219-1-3p induction in Capan-1 and Capan-2 stable miR-219-1-3p over-expressing cell lines. Values represent the mean of three independent experiments. Expression of miR-219-1-3p has been calculated using $2^{-\Delta Ct}$ method. MiR-219-1-3p expression level was normalized to that of U6. ($p < 0.001$ ***).

A



B

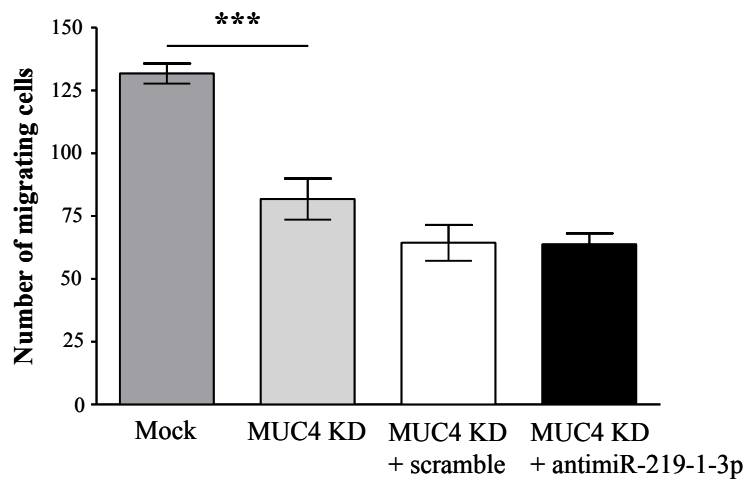


Figure S2. MUC4 is involved in miR-219-1-3p effects on cell proliferation and migration.

Proliferation (A) and migration (B) assays were performed in Capan-2 knocked-down cells alone or transfected with anti-miR-219-1-3p or scramble anti-miRNA. Results are expressed as average migrating cell number per field. Data are reported as mean \pm SEM for three independent experiments ($p < 0.05$ *, $p < 0.01$ ** or $p < 0.001$ ***).

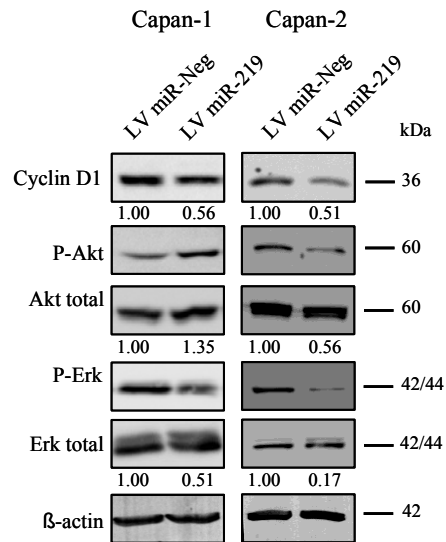


Figure S3. Survival signaling pathways altered in Capan-1 and Capan-2 miR-219-1-3p over-expressing stable cell lines. Western-blot analysis of cyclin D1 and Akt and Erk signaling pathways.

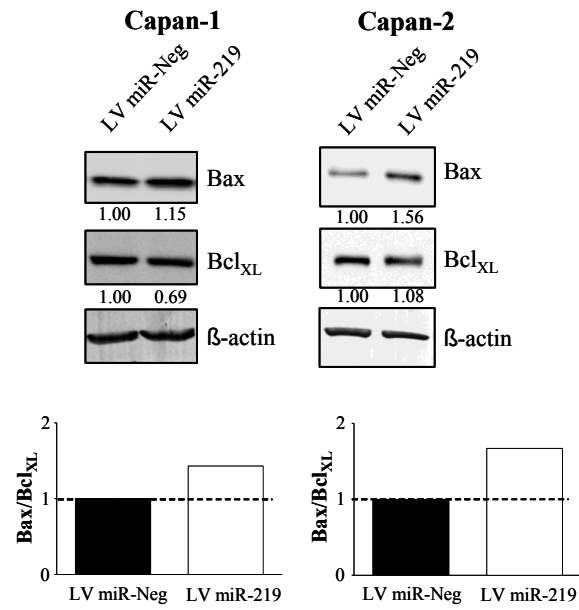


Figure S4. Western-blot analysis of Bax and Bcl_{XL} Capan-1 and Capan-2 miR-219-1-3p over-expressing stable cell lines. β-actin serves as the loading control. Bands were quantified by densitometry and Bax/Bcl_{XL} ratio was determined and represented as histograms.

Dans cette étude, nos résultats montrent que :

- (1) l'expression du miR-219-1-3p est diminuée dans les cellules cancéreuses pancréatiques et dans les tissus de patients atteints d'adénocarcinome pancréatique par rapport aux tissus sains,
- (2) l'expression de la mucine MUC4 est inhibée par la fixation directe du miR-219-1-3p au niveau de son 3'-UTR,
- (3) miR-219-1-3p diminue la migration cellulaire et entraîne également un ralentissement de la prolifération cellulaire qui est associée à une diminution de l'expression de la cycline D1 et de l'activation des voies Erk et Akt,
- (4) l'injection intratumorale du miR-219-1-3p ralentit fortement la croissance tumorale *in vivo*,
- (5) la perte d'expression du miR-219-1-3p est un événement précoce de la cancérogenèse pancréatique et il existe une corrélation inverse entre l'expression du miR-219-1-3p et l'expression de MUC4.

L'ensemble de ces résultats a permis d'identifier le miR-219-1-3p comme régulateur négatif de l'expression de MUC4 et pourrait agir comme suppresseur de tumeur dans le cancer du pancréas.

Partie III

miARN et chimiorésistance

Le cancer du pancréas se caractérise par une extrême résistance aux chimiothérapies actuelles. La compréhension des mécanismes liés à la chimiorésistance est nécessaire pour améliorer la détection et le traitement de ce cancer. De nombreuses études ont montré le rôle des miARN dans la résistance aux chimiothérapies. En effet, il a été rapporté que les miARN étaient capables d'altérer la chimiosensibilité des cellules en ciblant des gènes codant des protéines comme les transporteurs de drogues ou encore les voies de signalisation importantes pour le métabolisme des drogues ou pour la survie cellulaire (Kutanzi *et al.*, 2011). Dans le laboratoire, nous avons montré l'implication de la mucine MUC4 dans la chimiorésistance des cellules cancéreuses pancréatiques à la gemcitabine et aux drogues du protocole FOLFIRINOX (Skrypek *et al.*, 2013).

Dans ce travail, nous avons donc cherché à identifier les miARN impliqués dans la chimiorésistance médiée par MUC4. Pour cela, nous avons :

- 1- identifié l'influence du miR-219-1-3p sur la résistance des cellules à la gemcitabine
- 2- essayé d'établir une relation avec l'expression de MUC4

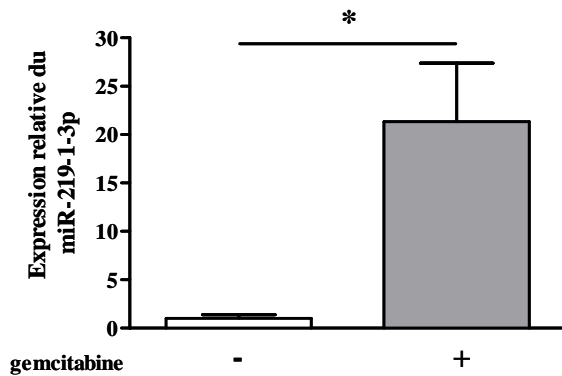
Dans le chapitre II de nos travaux, nous avons montré l'activité suppresseur de tumeur du miR-219-1-3p dans le cancer du pancréas puisque :

- 1- son expression est fortement diminuée dans le cancer du pancréas,
- 2- il régule négativement l'expression de la mucine oncogénique MUC4
- 3- il inhibe la prolifération et la migration des cellules cancéreuses pancréatiques humaines.

III. 1. Effet de la gemcitabine sur l'expression du miR-219-1-3p

Pour évaluer son rôle dans la sensibilité des cellules cancéreuses pancréatiques humaines à la gemcitabine, nous avons d'abord déterminé la dose IC₅₀ de gemcitabine pour la lignée cellulaire Capan-2 (dose nécessaire pour obtenir 50% de survie cellulaire). Les cellules Capan-2 ont donc été traitées par la dose IC₅₀ en gemcitabine retenue soit 45 nM pendant 48h et 72h puis nous avons mesuré l'expression du miR-219-1-3p par qRT-PCR et constaté une augmentation de l'expression après 48h et 72h respectivement d'un facteur 21,34 (*, p=0,0283) et 4,88 (*, p=0,0198) (figure 23).

A



B

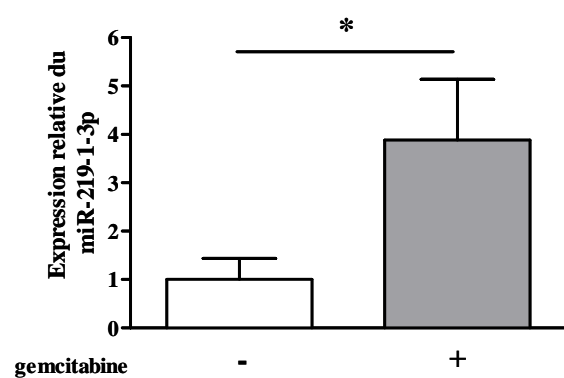


Figure 23. Expression du miR-219-1-3p après traitement à la gemcitabine. Les cellules Capan-2 ont été traitées pendant (A) 48 h et (B) 72 h à la dose IC_{50} de gemcitabine. L'expression du miR-219-1-3p a été mesurée par qRT-PCR et normalisée avec l'expression de l'ARN U6. L'expression des cellules non traitées est rapportée à 1.

III. 2. Effet du miR-219-1-3p sur la sensibilité des cellules à la gemcitabine

Nous avons ensuite évalué la sensibilité des cellules à la gemcitabine après transfection transitoire du miR-219-1-3p dans les trois lignées Capan-1, Capan-2 et BxPC-3. Pour cela, les cellules ont été transfectées avec le miR-219-1-3p pendant 24 h puis traitées à la gemcitabine à différentes concentrations pendant 24 h. La survie cellulaire a été mesurée en réalisant un test de viabilité cellulaire au sel de tétrazolium (MTT). Aucune différence de survie cellulaire n'est observée pour les trois lignées cellulaires transfectées par le miR-219-1-3p après traitement à la gemcitabine (figure 24). La surexpression transitoire du miR-219-1-3p n'altère donc pas la sensibilité de ces cellules à la gemcitabine.

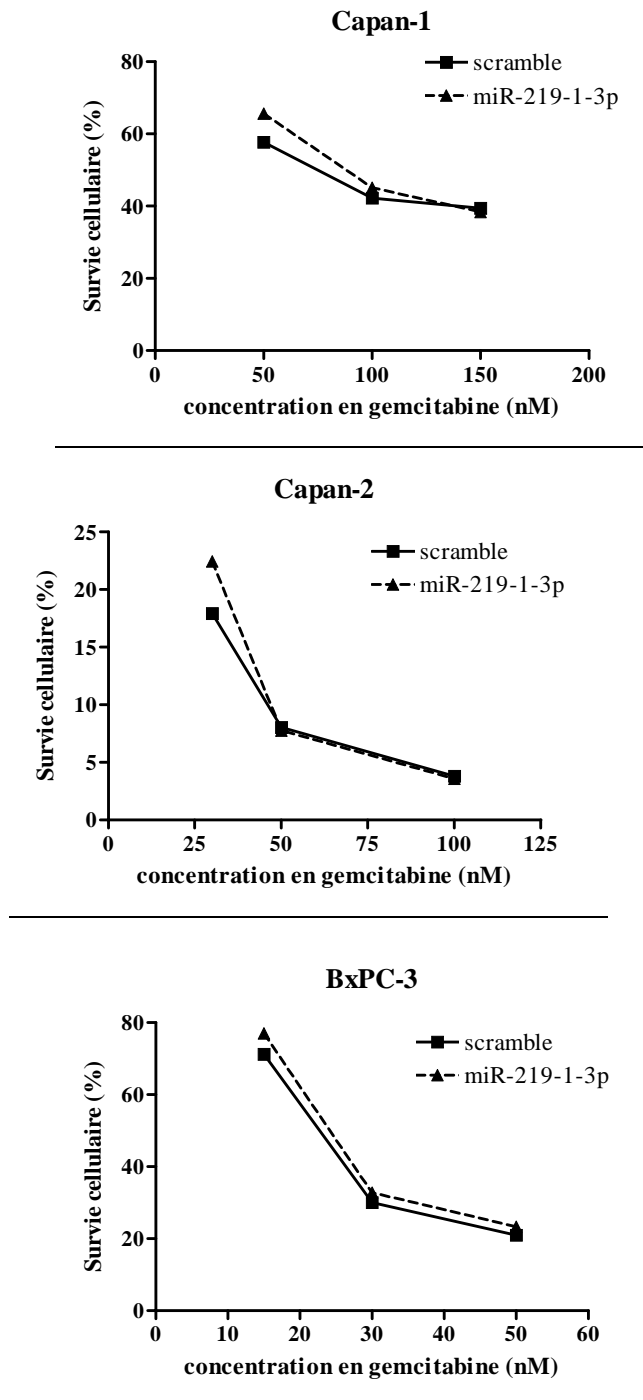


Figure 24. Effet du miR-219-1-3p sur la sensibilité à la gemcitabine des cellules cancéreuses pancréatiques humaines. La sensibilité cellulaire à la gemcitabine a été mesurée dans les cellules Capan-1, Capan-2 et BxPC-3 après 24 h de traitement. La survie cellulaire représente le nombre de cellules traitées par rapport au nombre de cellules non traitées exprimée en pourcentage.

La sensibilité à la gemcitabine de la lignée stable Capan-2 sur-exprimant le miR-219-1-3p (Capan-2 LV miR-219) a été également évaluée en déterminant la dose IC₅₀ de la gemcitabine. La dose IC₅₀ pour la lignée contrôle Capan-2 LV miR-Neg est de 19,4 nM et de 18,1 nM pour la lignée Capan-2 LV miR-219. Nos résultats montrent qu'il n'y a pas de différence significative entre les doses IC₅₀ (figure 25). Ainsi la sensibilité à la gemcitabine des cellules cancéreuses pancréatiques humaines n'est pas altérée par le miR-219-1-3p.

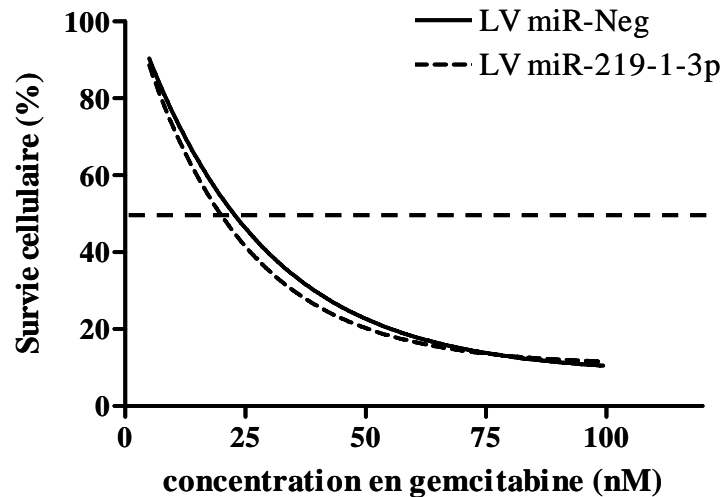


Figure 25. Effet de la surexpression du miR-219-1-3p dans la lignée stable Capan-2 LV miR-219. Mesure de la sensibilité à la gemcitabine des cellules Capan-2 LV miR-Neg et Capan-2 LV miR-219 par détermination de la dose IC₅₀ après 24 h de traitement par la gemcitabine. La survie cellulaire représente le nombre de cellules traitées par rapport au nombre de cellules non traitées exprimé en pourcentage.

Notre hypothèse de départ suggérait un rôle de miR-219-1-3p sur la sensibilité à la gemcitabine des cellules cancéreuses pancréatiques humaines puisque :

- (i) MUC4 est impliquée dans la résistance à la gemcitabines des cellules cancéreuses pancréatiques,
- (ii) miR-219-1-3p régule négativement l'expression de la mucine MUC4,
- (iii) l'expression du miR-219-1-3p est induite après traitement à la gemcitabine.

Néanmoins l'ensemble de nos résultats démontre que le miR-219-1-3p n'a aucun effet sur la sensibilité à la gemcitabine des cellules cancéreuses pancréatiques humaines.

Tableau 3. Liste des miARN différentiellement exprimés (facteur de variation >1,2, p<0,05) dans les cellules Capan-2 MUC4-KD comparées aux cellules contrôles (Mock).

miARN	taux de variation (MUC4-KD/Mock)
hsa-miR-361-3p	20,74
hsa-miR-584-5p	16,08
hsa-miR-424-5p	1,52
hsa-miR-4270	1,49
hsa-miR-1268a	1,49
hsa-miR-10b-5p	1,48
hsa-miR-574-5p	1,27
hsa-miR-155-5p	1,25
hsa-miR-17-3p	-1,23
hsa-miR-3651	-1,27
hsa-miR-19b-3p	-1,30
hsa-miR-193a-3p	-1,32
hsa-miR-29b-3p	-1,35
hsa-miR-455-3p	-1,47
hsa-miR-132-3p	-1,58
hsa-miR-96-5p	-1,63

III .3 . Modèles cellulaires invalidés pour MUC4 et chimiorésistance

Au laboratoire, nous avons montré l'implication directe de MUC4 dans la chimiorésistance à la gemcitabine (Skrypek *et al.*, 2013) et aux drogues du protocole FOLFIRINOX. Ainsi, les modèles cellulaires pancréatiques invalidés pour MUC4 sont plus sensibles au 5-fluoro-uracile mais plus résistants à l'oxaliplatine (Skrypek N, Thèse 3^{ème} cycle, Lille, 2012).

Dans le but d'identifier de nouveaux miARN impliqués dans la chimiorésistance médiée par MUC4, nous avons donc établi par puce miARN 8x15K (Agilent) le profil d'expression des miARN dans la lignée Capan-2 déficiente en MUC4 (MUC4-KD) afin de mettre en évidence les miARN différentiellement exprimés et donc potentiellement régulés par MUC4. Ainsi, 17 miARN ont été identifiés. Parmi ceux-ci, miR-361-3p et miR-584-5p sont fortement surexprimés (respectivement d'un facteur 20,7 et 16,1) dans les cellules MUC4-KD comparativement aux cellules contrôles (Mock) alors que miR-132-3p et miR-96-5p sont les plus sous-exprimés (d'un facteur -1,6 pour les deux) (Tableau 3).

L'expression des miR-361-3p, miR-584-5p, miR-455-3p, miR-132-3p et miR-96-5p a ensuite mesurée par qRT-PCR afin de vérifier la variation d'expression dans les cellules MUC4-KD. La surexpression du miR-361-3p et du miR-584-5p n'a pas été confirmée par qRT-PCR alors que pour les 3 miARN miR-455-3p, miR-132-3p et miR-96-5p, les résultats montrent effectivement une diminution d'expression significative ($p < 0,001$) dans les cellules invalidées pour MUC4 (figure 26). Ces résultats suggèrent donc une régulation positive de ces miARN par MUC4.

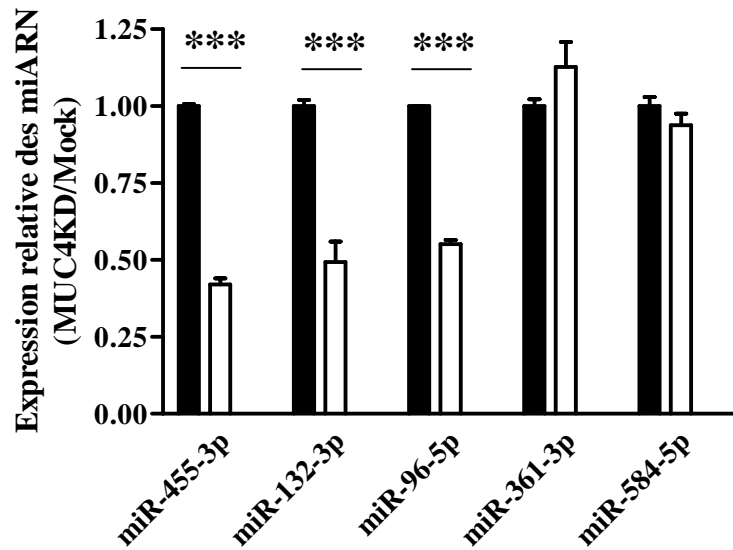


Figure 26. Expression relative des miR-455-3p, miR-132-3p, miR-96-5p, miR-361-3p et miR-584-5p dans les cellules Capan-2 MUC4KD. L'expression des miARN a été déterminée par qRT-PCR et normalisée par l'expression de l'ARN U6. L'expression des miARN dans les cellules MUC4-KD est rapportée à leur expression dans les cellules contrôles (Mock).

Nous avons pu mettre en évidence un profil d'expression différentiel des miARN entre les cellules invalidées pour MUC4 et les cellules contrôles. Les mécanismes de régulation de ces miARN par MUC4 et leur rôle dans la chimiorésistance dépendante de MUC4 des cellules cancéreuses pancréatiques humaines restent encore à déterminer.

Discussion

La discussion portera sur la partie « sélection des miARN » et la partie « miARN et chimiorésistance ». La discussion de la partie « miR-219-1-3p est régulateur négatif de l'expression de la mucine MUC4 et un suppresseur de tumeur dans le cancer du pancréas » figure dans l'article.

Malgré les avancées technologiques et les progrès médicaux, le cancer du pancréas est une maladie dont le pronostic sombre est lié à un diagnostic tardif. Bien qu'il soit placé au 9^{ème} rang des cancers par sa fréquence, il se classe au 4^{ème} rang des causes de décès par cancer en France. Ce cancer se caractérise par une extrême résistance aux traitements chimiothérapeutiques. Les seules chances d'une survie à long terme résident dans l'exérèse chirurgicale alors que seule une minorité de patients présentent une maladie localisée lors du diagnostic. La découverte de nouvelles cibles thérapeutiques constitue donc un réel défi.

En tant que partenaire à la membrane de l'oncogène ErbB2, et de par ses propriétés à réguler la prolifération et la survie cellulaires, la mucine MUC4 est considérée comme un acteur clé de la tumorigenèse (Chaturvedi *et al.*, 2008b ; Jonckheere *et al.*, 2012). De plus, il est maintenant clairement établi que le profil d'expression des mucines est altéré dans un grand nombre de cancers (Jonckheere and Van Seuning, 2010). Dans le cancer du pancréas, la surexpression de MUC4 est associée à un mauvais pronostic (Swartz *et al.*, 2002). La néo-expression de MUC4 dès les stades précoces de l'adénocarcinome pancréatique fait donc de cette mucine une cible thérapeutique potentielle (Van Seuning *et al.*, 2008).

Au laboratoire, les travaux de l'équipe ont largement contribué à la compréhension des mécanismes de régulation d'expression de la mucine MUC4 au niveau transcriptionnel et épigénétique. Avec la découverte des miARN, une nouvelle classe de régulateurs géniques, un niveau de complexité supplémentaire est venu s'ajouter à la compréhension du contrôle de l'expression des gènes. Lorsque j'ai débuté mes travaux de thèse, rien n'était connu concernant la régulation de *MUC4* par les miARN.

I. Sélection des miARN ciblant potentiellement MUC4

I. 1. Expression des miARN dans différentes lignées cancéreuses pancréatiques humaines

De nombreuses études ont dressé le profil d'expression des miARN dans l'adénocarcinome pancréatique. L'expression des miARN dans les lignées cellulaires et les

tissus pancréatiques cancéreux a été comparée respectivement à celle des lignées cellulaires et tissus pancréatiques sains (Bloomston *et al.*, 2007 ; Lee *et al.*, 2007 ; Schultz *et al.*, 2012 ; Szafranska *et al.*, 2007 ; Yu *et al.*, 2012).

Le profil d'expression des miARN des lignées cellulaires cancéreuses pancréatiques humaines Capan-1, Capan-2 et MIA PaCa-2 et des lignées cellulaires humaines pancréatiques « normales » HPNE et HPDE, a été établi. Nous avons opté pour ces trois lignées cancéreuses puisqu'elles présentent des états de différenciation qui ne sont pas les mêmes. En effet, la lignée Capan-1 est bien différenciée et issue d'une métastase hépatique (Fogh *et al.*, 1977). La lignée Capan-2 est issue d'une tumeur primaire bien différenciée (Dahiya *et al.*, 1993) alors que la lignée MIA PaCa-2 provient d'une tumeur peu différenciée (Yunis *et al.*, 1977). L'objectif de cette étude était de sélectionner les miARN candidats sous-exprimés dans les lignées cancéreuses et régulant potentiellement l'expression de la mucine oncogénique MUC4.

L'analyse des résultats a montré une surexpression globale des miARN dans les lignées cancéreuses comparativement aux lignées normales HPNE et HPDE ce qui est en accord avec les précédentes études ayant comparé l'expression des miARN dans le cancer du pancréas (Bloomston *et al.*, 2007 ; Lee *et al.*, 2007 ; Szafranska *et al.*, 2007) alors que le phénomène inverse est décrit dans la plupart des tumeurs (Lu *et al.*, 2005). Trois miARN, miR-100, miR-125b et miR-155, ont été retrouvés surexprimés dans les trois lignées cellulaires d'adénocarcinome pancréatique (Capan-1, Capan-2 et MIA PaCa-2). Ces trois miARN ont déjà été décrits comme augmentés dans le cancer du pancréas (Bloomston *et al.*, 2007 ; Lee *et al.*, 2007 ; Szafranska *et al.*, 2007).

Dans le cancer du pancréas, miR-155 est surexprimé dans le sang et dans les tissus de patients atteints d'adénocarcinome pancréatique (Bhattacharyya *et al.*, 2004 ; Volinia *et al.*, 2006) ce qui fait de ce miARN un biomarqueur potentiel. Par ailleurs, l'expression de ce miARN est également augmentée dans les lésions précurseurs de type IPMN (Habbe *et al.*, 2009).

Un grand nombre de cibles a été identifié pour le miR-155. Il a été montré une inhibition de l'expression de la protéine myYD88 impliquée dans la cascade de signalisation des cytokines pro-inflammatoires par miR-155 (Tang *et al.*, 2010). Il réprime également l'expression de la protéine pro-apoptotique TP53INP1 (Gironella *et al.*, 2007) ou encore celle de la protéine régulatrice des voies de signalisation JAK et STAT appelée *cytokine signaling 1* (Jiang *et al.*, 2010).

La surexpression de miR-155 dans le cancer du pancréas et dans le cancer colorectal, notamment, est associée à une survie plus faible chez les patients (Papaconstantinou *et al.*, 2013 ; Shibuya *et al.*, 2010). A la vue de ces multiples rôles et de sa surexpression dans différents cancers, miR-155 apparaît comme un véritable marqueur pour la détection du cancer du pancréas et d'autres tumeurs.

Peu de données sont décrites dans la littérature concernant miR-100 dans le cancer du pancréas. L'étude de Lee et collaborateurs a montré que miR-100 figure parmi les 20 miARN les plus surexprimés dans le cancer pancréatique (Lee *et al.*, 2007). En revanche, l'expression de miR-100 est diminuée dans le cancer de l'ovaire (Nagaraja *et al.*, 2010) et de l'endomètre (Torres *et al.*, 2012). Récemment, une étude dans le cancer du sein a montré que la perte d'expression de miR-100, associée à la surexpression du facteur de croissance de l'insuline de type 2 (IGF2) entraîne une augmentation de la prolifération cellulaire (Gebeshuber CA and Martinez J., 2013). L'expression de miR-100 est donc tissu-dépendante.

Si les études des groupes de Schmittgen (Lee *et al.*, 2007) et de Croce (Szafranska *et al.*, 2007) présentent le miR-125b surexprimé dans le cancer du pancréas, celle de Goggins (Yu *et al.*, 2012) montre une perte d'expression de ce miARN au stade PanIN-3 de la cancérogenèse pancréatique. De manière intéressante, l'expression de la mucine MUC1 est réprimé par miR-125b dans différents modèles cellulaires de cancer mammaire (Rajabi *et al.*, 2010). Dans notre étude nous avons montré une surexpression du miR-125b dans les cellules cancéreuses pancréatiques humaines comparativement aux cellules normales HPNE et HPDE.

L'expression de let-7a est retrouvée diminuée dans les trois lignées cancéreuses par rapport aux lignées normales. Si miR-155 se voit attribuer un rôle d'oncogène, let-7a est également impliqué dans les mécanismes régulant la cancérogenèse. En effet, let-7a est décrit comme suppresseur de tumeur puisqu'il inhibe l'expression des oncogènes *KRAS* et *HMGA2* (Akao *et al.*, 2006 ; Johnson *et al.*, 2007 ; Lee and Dutta, 2007).

Il est à noter que peu de miARN sont communément dérégulés à la fois dans les trois lignées cancéreuses (trois sur-exprimés et un seul sous-exprimé) mais il faut aussi rappeler que les analyses des puces miARN ont été réalisées à partir de cellules possédant des états de différenciation non identiques. Or, il est clairement établi que l'expression des miARN est dépendante de l'état de différenciation (Lu *et al.*, 2005). Ainsi, la variabilité des états de différenciation des cellules choisies nous a permis de refléter l'hétérogénéité tumorale dans le cancer du pancréas.

Il faut également être prudent quant aux informations données par les puces miARN. Même si elles peuvent indiquer les niveaux d'expression des miARN présents dans une lignée

cellulaire, elles ne sont pas quantitatives. Il s'agit d'une approche comparative permettant de mettre en évidence les miARN exprimés de manière différente entre cellules cancéreuses et normales pour notre étude. Par ailleurs, malgré le phénotype normal des cellules HPNE et HPDE il a été suggéré que leur immortalisation pouvait altérer l'expression des miARN (Giovannetti *et al.*, 2010). En effet, l'expression de miR-21 a été détectée de manière identique entre différentes lignées cellulaires cancéreuses et la lignée HPNE et les auteurs ont émis l'hypothèse que l'immortalisation de ces cellules par l'expression ectopique de la sous-unité de la télomérase hTERT pouvait expliquer l'expression de miR-21 dans ces cellules HPNE (Moriyama *et al.*, 2009).

I. 2. Prédiction bioinformatiques des miARN ciblant potentiellement MUC4

La régulation épigénétique des gènes de mucines, et plus particulièrement de *MUC4*, a fait l'objet de nombreux travaux au sein du laboratoire. Ainsi, un modèle de régulation épigénétique, notamment par méthylation de l'ADN et modifications des histones, a été proposé pour *MUC4* (Vincent *et al.*, 2008). Néanmoins, la régulation de *MUC4* par les miARN, impliqués également dans les mécanismes épigénétiques, restait un champ inexploité au début de ma thèse. En effet, malgré les nombreux miARN prédits comme pouvant cibler *MUC4* au niveau de son 3'-UTR, rien n'était connu concernant la régulation de *MUC4* par les miARN. Durant ma thèse, en 2011, l'étude de Srivastava et collaborateurs a permis de montrer pour la première fois la régulation de *MUC4* par les miARN, et plus particulièrement par le miR-150, dans le cancer du pancréas (Srivastava *et al.*, 2011).

Les prédictions bioinformatiques des miARN ciblant potentiellement *MUC4* ont été réalisées à l'aide des trois bases de données *TargetScan*, *Microcosm* et *miRanda*. Même si ces logiciels de prédiction se basent tous sur la complémentarité requise au niveau de l'interaction entre la séquence *seed* du miARN et l'ARNm, ils possèdent différents critères de prédiction (thermodynamique, accessibilité du miARN par rapport à la structure secondaire de l'ARNm...) d'où le choix de croiser les prédictions de ces trois bases de données afin de sélectionner les miARN candidats. La nécessité d'avoir des critères supplémentaires s'expliquent par la complexité des interactions miARN / ARNm qui ne reposent pas toujours sur les règles classiques d'appariements. Par ailleurs, il existe d'autres facteurs influençant l'action des miARN sur leur cible comme les protéines de liaison à l'ARN (RBP, *RNA Binding Protein*) qui modulent le recrutement du miARN en favorisant ou en bloquant l'accessibilité de la cible (Kedde *et al.*, 2007).

La performance de ces outils de prédictions peut être mesurée selon deux paramètres : la **sensibilité** représentée par le pourcentage de cibles correctement prédites sur le total des cibles valides et la **spécificité** qui est le pourcentage de cibles correctement prédites parmi toutes les cibles prédites (Witkos *et al.*, 2011). Ces différents outils génèrent ainsi des faux positifs et des faux négatifs qui sont des cibles non validées expérimentalement et des cibles existantes *in vivo* non prédites respectivement.

Les différents algorithmes présentent donc des caractéristiques différentes.

MiRanda (John *et al.*, 2004) se base sur la comparaison de la complémentarité de séquence entre le miARN et le 3'-UTR de l'ARNm cible mais prend également en compte l'énergie de liaison du duplexe miARN / ARNm, la conservation du site de liaison et de sa position le long du 3'-UTR. La coopération des miARN à cibler le même ARNm ou la possibilité pour un même miARN d'avoir plusieurs sites de fixation au niveau du 3'-UTR permet d'augmenter la spécificité de l'algorithme (Betel *et al.*, 2008).

TargetScan (Lewis *et al.*, 2003) permet une flexibilité de la complémentarité entre le miARN et la séquence cible au niveau du 3'-UTR de l'ARNm. Différents paramètres contribuent à améliorer la sensibilité du programme tels que la richesse en nucléotides AU présents à proximité (30 nt en amont et en aval) du site de fixation, la conservation de la séquence *seed* entre les espèces, la présence de sites en dehors du 3'-UTR et le mésappariement (de type boucle) en 5' du miARN (Grimson *et al.*, 2007).

Microcosm se base sur une complémentarité parfaite entre la séquence *seed* et le site de liaison. Les sites cibles sont ensuite soumis à une modélisation statistique permettant de déterminer la stabilité thermodynamique de l'interaction avec le miARN.

Le choix s'est porté sur les miARN prédits par au moins deux de ces bases de données. Ainsi, let-7a, miR-98, miR-145, miR-210 et miR-219-1-3p ont été sélectionnés. Les sites putatifs de liaison de ces différents miARN ont été identifiés grâce au logiciel *BLASTN*. La génération de faux positifs et de faux négatifs par les différents algorithmes nécessite donc une validation fonctionnelle des miARN candidats. Pour cela, nous avons procédé en deux étapes.

Nous avons dans un premier temps évalué l'expression de ces différents miARN dans un panel plus large de lignées cellulaires cancéreuses (Capan-1, Capan-2, BxPC-3, Panc-1 et MIA PaCa-2) et dans la lignée cellulaire normale HPDE. L'expression des miARN est très hétérogène au sein des cellules cancéreuses. MiR-145 et miR-219-1-3p présentent un profil

d'expression remarquable puisqu'ils sont sous-exprimés dans l'ensemble des lignées cancéreuses comparativement à la lignée HPDE. Nous avons opté pour ces deux miARN puisque leur expression diminuée pourrait expliquer l'expression de la mucine MUC4 dans les cellules cancéreuses.

Afin de valider le rôle potentiel de ces miARN en tant que régulateur de l'expression génique de *MUC4*, nous avons mesuré l'expression protéique de MUC4 en présence de chacun de ces deux miARN. Les études par western-blotting nous ont permis de mettre en évidence une régulation négative de MUC4 au niveau traductionnel par miR-219-1-3p. Si miR-145 fait l'objet d'un grand intérêt dans le domaine de l'oncologie, aucune donnée concernant miR-219-1-3p n'était publiée actuellement.

En conclusion, nos travaux sur la régulation de MUC4 par les miARN montrent que miR-219-1-3p est capable d'inhiber l'expression protéique de MUC4 en se fixant directement sur son 3'-UTR et que cette régulation s'ajoute à la complexité des autres mécanismes de régulation de cette mucine dans le cancer. Le ciblage des miARN semble donc s'ajouter à la longue liste des approches permettant à termes le contrôle de l'expression de cette mucine oncogénique dont le rôle dans la progression tumorale n'est plus à démontrer.

II. miARN et chimiorésistance

I. 1. miR-219-1-3p et gemcitabine

Le rôle du miR-219-1-3p sur les propriétés biologiques des cellules a montré qu'il entraînait une inhibition de la prolifération et une diminution de la cycline D1. De plus, les travaux réalisés au laboratoire ont montré l'implication de la mucine MUC4 dans la résistance des cellules cancéreuses pancréatiques à la gemcitabine (Skrypek *et al.*, 2013). En tant que régulateur négatif de l'expression de MUC4, nous avons supposé un rôle du miR-219-1-3p sur la sensibilité des cellules à la gemcitabine. L'induction de l'expression du miR-219-1-3p après traitement des cellules par la drogue nous a confortés dans notre hypothèse. Nous avons alors entrepris de réaliser des tests de survie cellulaire après traitement par la gemcitabine des cellules transfectées de manière transitoire ou stable avec le miR-219-1-3p. A la vue des résultats préliminaires obtenus, il semble que le miR-219-1-3p n'ait pas d'impact sur la sensibilité à la drogue. L'induction d'expression du miR-219-1-3p ne constituerait pas un

mécanisme d'action de la gemcitabine. Les études ayant porté sur l'implication de MUC4 dans les mécanismes de chimiorésistances ont montré que MUC4 diminuait l'activité proapoptotique des cellules (Bafna *et al.*, 2009 ; Skrypek *et al.*, 2013). Or l'étude par western-blotting des marqueurs apoptotiques Bax et Bcl_{XL} (résultats non montrés) indique que le miR-219-1-3p n'altère pas l'expression de ces protéines ce qui pourrait expliquer l'absence d'effet du miR-219-1-3p sur la survie des cellules après traitement par la gemcitabine.

I. 2. Expression des miARN dans les cellules déficientes en MUC4

Nous avons alors changé d'approche afin d'identifier les miARN impliqués dans la chimiorésistance médiée par MUC4. Cette nouvelle stratégie avait pour but de montrer si MUC4 faisait appel aux miARN pour conférer la résistance des cellules à la gemcitabine. Afin de mettre en évidence les miARN potentiellement régulés par MUC4 nous avons dressé le profil d'expression des miARN dans les cellules déficientes en MUC4 pour le comparer à celui des cellules contrôles. Les miARN présentant les taux de variations les plus importants sont miR-361-3p et miR-584-5p, miR-132-3p, miR-455-3p et miR-96-5p.

La piste la plus intéressante semble être celle des miR-584-5p et miR-455-3p. En effet, dans le cancer du rein à cellules claires, miR-584 décrit comme suppresseur de tumeur, inhibe l'expression de l'oncogène ROCK-1 et diminue l'invasion des cellules (Fils-Aime *et al.*, 2013). D'autre part, la régulation de miR-584-5p par le TGF- β (Fils-Aime *et al.*, 2013) est d'un intérêt particulier puisque des travaux précédents de l'équipe ont montré que le TGF- β active la transcription de *MUC4* (Jonckheere *et al.*, 2004). Concernant miR-455-3p, il est impliqué dans la résistance des cellules de glioblastomes au temozolomide (Ujifuku *et al.*, 2010). De manière intéressante, d'après les prédictions *in silico* MUC4 est une cible potentielle de miR-455-3p. On suppose une boucle d'auto-régulation entre miR-455-3p et MUC4.

I. 2. Utilisation des miARN comme marqueur prédictif ou de résistance aux chimiothérapies ?

Il a été montré par plusieurs études que la réponse aux différentes thérapies cancéreuses pouvait être modulée par le niveau d'expression de certains miARN. Ainsi, l'expression, entre autres de let-7, miR-21, miR-27 et miR-28 influencerait la réponse à la

doxorubicine dans le cancer du sein, miR-30, miR-214 et miR-335 influenceraient la réponse au cisplatine dans le cancer de l'ovaire (Hummel *et al.*, 2010).

Les données bibliographiques ne cessent d'argumenter pour une utilisation des miARN en tant que marqueurs de réponse ou de résistance aux thérapies. Cela est encouragé par les dernières découvertes concernant les miARN. Récemment, il a été montré l'expression des miARN à l'extérieur de la cellule, dans les fluides biologiques constitue un moyen de détection non-invasif (Mitchell *et al.*, 2008). Il ne s'agit pas d'un mécanisme passif mais plutôt d'un mécanisme de sécrétion. Ainsi, les miARN peuvent être retrouvés sous diverses formes : à l'intérieur de vésicules ou d'exosomes, au sein de corps apoptotiques ou encore liés aux protéines AGO qui les protègent de la dégradation par les ribonucléases présentes dans le milieu extracellulaire (Turchinovich *et al.*, 2011 ; Zhu and Fan, 2011). Cela suggère un mode de signalisation paracrine des miARN. Ainsi, les miARN peuvent être détectés également à partir d'exosomes issus du sang. Il a été décrit que de nombreuses tumeurs libèrent activement et de manière accrue des exosomes dans le sang par rapport à des cellules proliférantes normales (Taylor and Gercel-Taylor, 2008). Les miARN circulant dans le sang représentent ainsi une perspective d'outil pronostic dans le cancer.

En conclusion de cette partie du travail, nos résultats montrent que les miARN peuvent être utilisés en tant que marqueur de chimiorésistance dans le cancer du pancréas. L'étude des mécanismes mis en jeu ainsi que la possibilité de détection de ces miARN dans le sang permettront d'évaluer leur potentiel thérapeutique. Même si nous n'avons pas pu montrer que le miR-219-1-3p modulait la sensibilité des cellules à la gemcitabine, l'induction de son expression après traitement par la drogue suggère qu'il peut servir de marqueur de réponse à la chimiothérapie. Des études d'expression du miR-219-1-3p sur des cohortes de patients répondeurs ou non à la gemcitabine seront nécessaires.

Perspectives

I. Régulation du miR-219-1-3p

Nous avons observé une perte d'expression du miR-219-1-3p dans les lignées cellulaires cancéreuses pancréatiques humaines et dans les tissus de patients atteints d'adénocarcinome pancréatique. De nombreuses études ont montré que l'expression des miARN pouvait être régulée par méthylation de l'ADN. A l'aide du logiciel UCSC Genome Browser, nous avons observé que la région d'ADN codant pour le miR-219-1-3p est située dans un îlot CpG. De plus, le traitement des différentes lignées cellulaires cancéreuses pancréatiques humaines par la 5-aza-2'-désoxycytidine, inhibiteur de méthyltransférases, entraîne une augmentation de l'expression de miR-219-1-3p. Ceci suggère que l'hyperméthylation de l'ADN est responsable de la baisse d'expression de miR-219-1-3p dans les cellules cancéreuses pancréatiques humaines.

Nous allons déterminer le profil de méthylation de la région d'ADN codant pour le miR-219-1-3p à partir d'ADN extrait de tissus humains de cancer du pancréas par technique de MS-PCR (*Methylation Specific PCR*). Nous envisageons de corréler le profil de méthylation à l'expression du miR-219-1-3p chez les patients et démontrer l'utilisation potentielle de cette région d'ADN hyperméthylée comme marqueur du cancer du pancréas.

Ces travaux nous permettront de valider le miR-219-1-3p comme suppresseur de tumeur et d'évaluer le rôle diagnostique de son statut de méthylation dans le cancer du pancréas.

II. Implication de MUC4 sur l'effet du miR-219-1-3p sur les propriétés biologiques des cellules

Nos résultats ont permis de montrer le rôle antiprolifératif et antimigratoire du miR-219-1-3p, inhibiteur de l'expression de MUC4, dans les cellules cancéreuses pancréatiques. De plus, des travaux réalisés au laboratoire indiquent que la perte de la mucine MUC4 entraîne une inhibition de la prolifération et de la migration cellulaire ce qui suggère que les effets du miR-219-1-3p sur les propriétés biologiques des cellules s'exerceraient *via* MUC4. Afin de confirmer cette hypothèse, nous allons réaliser des transfections transitoires de l'antimiR-219-1-3p dans les modèles cellulaires déficients en MUC4 et étudier la prolifération, les voies de signalisations associées et la migration cellulaire.

Ces résultats permettront de confirmer le potentiel de MUC4 en tant que cible thérapeutique dans le cancer du pancréas.

III. Rôle du miR-219-1-3p sur la cancérogenèse pancréatique

Le pouvoir antitumoral du miR-219-1-3p a été démontré *in vivo* à l'aide d'un modèle de xélogreffe sous-cutanée de cellules cancéreuses pancréatiques. Nous allons évaluer l'impact du miR-219-1-3p sur la séquence carcinogénétique du cancer du pancréas grâce au modèle *Pdx1-Cre;LStopL-Kras^{G12D}*. L'injection de miR-219-1-3p se fera en solution saline dans la veine de la queue de souris. Puis les souris seront sacrifiées à différents temps (3, 6, 9 et 12 mois) afin de comparer la cinétique d'apparition des PanIN avec des souris contrôles. L'expression de la mucine MUC4 sera également étudiée par immunohistochimie pour évaluer l'effet du miR-219-1-3p sur son expression. Dans un second temps, si nous constatons un ralentissement de la séquence d'apparition des PanIN et éventuellement un effet du miR-219-1-3p sur l'expression de MUC4, nous réaliserons l'injection du miR-219-1-3p dans le modèle triple transgénique *Pdx1-Cre;LStopLKras^{G12D}; MUC4^{KO}* développé au laboratoire par le Dr. Nicolas Jonckheere.

Ces travaux permettront d'évaluer le potentiel thérapeutique du miR-219-1-3p comme suppresseur de tumeur et inhibiteur de l'expression de la mucine MUC4.

IV. miARN et chimiorésistance

IV.1. Modèles cellulaires invalidés pour MUC4

Nous avons donc établi le profil d'expression des miARN dans ces lignées afin de mettre en évidence les miARN différenciellement exprimés potentiellement régulés par MUC4 et donc potentiellement impliqués dans la chimiorésistance des cellules à la gemcitabine ou aux drogues du protocole FOLFIRINOX. Ainsi 17 miARN ont été identifiés parmi lesquels miR-361-3p, miR-584-5p, miR-455-3p, miR-132-3p et miR-96-5p sont les plus dérégulés. Nous allons valider par qRT-PCR la sur ou la sous-expression des 4 miARN sélectionnés dans les cellules déficientes en MUC4.

Les modifications de la sensibilité à la gemcitabine ou aux drogues du protocole FOLFIRINOX seront évaluées en déterminant l'IC₅₀ des différentes chimiothérapies dans nos modèles cellulaires par test au tétrazolium de sodium (MTT) après traitement par les

différentes drogues des cellules transfectées transitoirement avec le miR-219-1-3p ou l'inhibiteur du miARN. Nous tenterons d'identifier des cibles de ces miARN en s'intéressant plus particulièrement aux acteurs du métabolisme de la gemcitabine et des drogues du protocole FOLFIRINOX, notamment les protéines hCNT1/3, MRP4, ABCG2, DPYD et CTR1 dont l'expression est altérée dans les cellules invalidées pour MUC4.

Ces travaux nous permettront de valider ces miARN comme marqueurs de chimiorésistance et de déterminer leurs rôles dans les mécanismes de chimiorésistance médié par MUC4.

IV. 2 . Patients

Nous disposons d'une cohorte de 200 patients du Pr M Hebbar (oncologue, Equipe 5 UMR837, CHRU Lille) pour laquelle nous avons, dans un premier temps, sélectionné 16 échantillons (8 répondeurs et 8 non répondeurs à la gemcitabine selon les critères RECIST) prélevés préalablement au traitement chimiothérapeutique. Des études par qRT-PCR seront réalisées sur les échantillons de cancer pancréatique pour l'expression des miARN d'intérêt et des protéines du métabolisme de la gemcitabine. Le statut d'expression de ces gènes d'intérêt sera corrélé à la réponse au traitement par la gemcitabine.

Ces travaux nous permettront de proposer de nouveaux marqueurs prédictifs de la réponse aux drogues de chimiothérapie.

Appendice technique

A. Culture cellulaire

A.1. Lignées cellulaires

A. 1. a. HPNE

La lignée cellulaire humaine *Human Pancreatic Nestin-Expressing Cells* (HPNE) est faite de cellules pancréatiques canalaire normales, d'un patient de 52 ans, immortalisées avec la sous-unité catalytique de la télomérase humaine (Lee *et al.*, 2003a). Ces cellules sont fusiformes, non-tumorigènes et poussent en mono-couche. Cette lignée a été obtenue suite à un accord de transfert de matériel (MTA) avec le Dr M. Ouellette (Centre Médical Universitaire du Nebraska, UNMC, Omaha, Nebraska, USA).

A. 1. b. HPDE

La lignée cellulaire humaine *Human Pancreatic Ductal Epithelial Cells* (HPDE) est faite de cellules pancréatiques canalaire normales, d'une patiente de 63 ans, immortalisées à l'aide du papillomavirus humain. Ces cellules sont polygonales, non-tumorigènes et poussent en mono-couche (Furukawa *et al.*, 1996). Ces cellules ont été obtenues suite à un accord de transfert de matériel (MTA) avec le Dr M. Tsao (Centre Médical Universitaire du Nebraska, UNMC, Omaha, Nebraska, USA).

A. 1. c. Capan-1

La lignée cellulaire humaine Capan-1 est issue d'une métastase hépatique émanant de l'adénocarcinome pancréatique d'un patient caucasien de 40 ans. Ces cellules sont bien différenciées, prismatiques et tumorigènes (Fogh *et al.*, 1977). Ces cellules proviennent de l'*American Type Culture Collection* (ATCC).

A.1.d.Capan-2

La lignée cellulaire humaine Capan-2 est issue de l'adénocarcinome pancréatique d'un patient de type caucasien de 56 ans. Ces cellules sont bien différenciées, polygonales, tumorigènes et poussent en mono-couche (Dahiya *et al.*, 1993). Ces cellules proviennent de l'ATCC.

A. 1. e. BxPC-3

La lignée cellulaire humaine BxPC-3 est issue d'un adénocarcinome pancréatique d'une patiente de type caucasien de 61 ans. Ces cellules sont rondes et ont tendance à pousser

en îlots (Tan *et al.*, 1986). Ces cellules ont été obtenues dans le cadre de la collaboration avec le Dr J. Torrisani (CRCT, Inserm UMR1037, Toulouse, France).

A. 1. f. Panc-1

La lignée cellulaire humaine Panc-1 est issue d'un adénocarcinome pancréatique d'une patiente de type caucasien de 56 ans. Ces cellules sont rondes et de petites tailles et poussent en mono-couche (Lieber *et al.*, 1975). Ces cellules proviennent de l'*European Cell Culture Collection* (ECACC).

A.1.g. MIA PaCa-2

La lignée cellulaire humaine MIA PaCa-2 est issue d'un carcinome pancréatique d'un patient de type caucasien de 65 ans. Ces cellules sont fusiformes, volumineuses et possèdent un cytoplasme abondant. Elles ont tendance à pousser les unes sur les autres (Yunis *et al.*, 1977). Ces cellules ont été obtenues dans le cadre de la collaboration avec le Dr J. Torrisani (CRCT, Inserm UMR1037, Toulouse, France).

Les caractéristiques et les principales mutations des lignées cellulaires cancéreuses sont respectivement présentées dans les tableaux 4 et 5. Les lignées cellulaires sont maintenues en culture à 37°C sous 5% de CO₂. Les conditions de culture de ces lignées cellulaires sont décrites dans le tableau 6.

Tableau 4. Caractéristiques des lignées cellulaires cancéreuses pancréatiques.

Lignée	Âge	Sexe	Origine	Métastase	Différenciation	Référence
Capan-1	40	homme	métastase hépatique	oui	bien	(Fogh <i>et al.</i> , 1977)
Capan-2	56	homme	tumeur primaire	non	bien	(Dahiya <i>et al.</i> , 1993)
BxPC-3	61	femme	tumeur primaire	non	moyennement	(Tan <i>et al.</i> , 1986)
Panc-1	56	homme	tumeur primaire	oui	peu	(Lieber <i>et al.</i> , 1975)
MIA PaCa-2	65	homme	tumeur primaire	n.d.	peu	(Yunis <i>et al.</i> , 1977)

n.d. : non décrit

Tableau 5. Principales mutations présentes dans les lignées cancéreuses pancréatiques.

Lignée	KRAS	TP53	CDKN2A/p16	DPC4/SMAD4	Référence
Capan-1	mut	mut	mut	mut	Loukopoulos <i>et al.</i> , 2004
Capan-2	mut	WT	WT	WT	Aoki Y <i>et al.</i> , 2000
BxPC-3	WT	mut	WT	mut	Hahn <i>et al.</i> , 1996
Panc-1	mut	mut	mut	WT	Berrozpe <i>et al.</i> , 1994
MIA PaCa-2	mut	mut	mut	WT	Caldas <i>et al.</i> , 1994

WT : allèle sauvage ; mut : allèle muté

Tableau 6. Composition des milieux de culture

Lignée cellulaire	Composition du milieu de culture
HPNE	DMEM (2/3), M3 Base (1/3)
	5% (v/v) SVF
	EGF recombinant à 10 ng/ml 100 unités/ml de pénicilline et 100 µg/ml streptomycine
HPDE	KSF, Extrait pituitaire bovin à 12,5 mg/ml
	EGF recombinant à 10 ng/ml
	100 unités/ml de pénicilline et 100 µg/ml streptomycine
Capan-1	RPMI 1640, L-Glutamine 2 mM
	15% (v/v) SVF
	100 unités/ml de pénicilline et 100 µg/ml streptomycine
Capan-2	RPMI 1640, L-Glutamine 2 mM
	10% (v/v) SVF
	100 unités/ml de pénicilline et 100 µg/ml streptomycine
BxPC-3	RPMI 1640, L-Glutamine 2 mM
	10% (v/v) SVF
	100 unités/ml de pénicilline et 100 µg/ml streptomycine Pyruvate 1 mM
Panc-1	DMEM, L-Glutamine 2 mM
MIA PaCa-2	10% (v/v) SVF
	100 unités/ml de pénicilline et 100 µg/ml streptomycine

DMEM : *Dulbecco's Modified Eagle Medium* ; SVF : *Sérum de Veau Fœtal* ; KSF : *Keratinocyte Serum Free* ; EGF : *Epidermal Growth Factor* ; RPMI : *Roswell Park Memorial Institute*

A. 2. Etablissement de lignées cellulaires stables sur-exprimant miR-219-1-3p

Les lignées stables Capan-1 LV-miR-219 et Capan-2 LV-miR-219 ont été obtenues par infection lentivirale du plasmide pLenti4/TO/GFP-miR-219 grâce à la collaboration du Dr. J. Torrisani (CRCT, Inserm UMR1037, Toulouse, France). Brièvement, les séquences sens 5'-TGCTGAGAGTTGAGTCTGGACGTCCCGGTTTTGGCCACTGACTGACCGGGACGTCCAGTCAACTCT-3' et antisens 5'-CCTGAGAGTTGACTGGACGTCCCGGTCA GTCAGTGGCCAAAACCGGGACGTCCAGACTCAACTCTC-3' ont été clonées dans le vecteur pcDNA-6.2-GW/emGFP-miR (Life Technologies) pour obtenir le vecteur pcDNA6.2-GW/emGFP-miR-219. Le vecteur pcDNA6.2-GW/emGFP-miR-Neg (Life Technologies) a été utilisé comme contrôle. Les cassettes GFP-miR-219 and GFP-miR-Neg ont été clonées dans le vecteur pDONR221 (Life Technologies) puis transférées dans le vecteur lentiviral pLenti4/TO/V5-DEST (Life Technologies) pour donner respectivement les vecteurs pLenti4/TO/GFP-miR-219 et pLenti4/TO/GFP-miR-Neg,.

Les particules lentivirales ont été produites avec les vecteurs pLenti4/TO/GFP-miR-219 et pLenti4/TO/GFP-miR-Neg à l'aide du kit *ViraPower lentiviral packaging mix* (Life Technologies). Les lignées Capan-1 et Capan-2 ont été incubées en présence des particules lentivirales (multiplicité d'infection de 1) pendant 24 h avant d'être sélectionnées avec de la zéocine (Invivogen) à 100 µg/ml pendant 2 semaines.

L'efficacité de l'infection virale et de la sélection virale a été calculée en mesurant le pourcentage de cellules exprimant la GFP par cytométrie en flux. La surexpression du miR-219-1-3p a été déterminée par qRT-PCR.

B. Tissus

B.1. Patients

Les échantillons de tissus pancréatiques inclus en paraffine ont été obtenus grâce à une collaboration avec la tumorothèque du Centre de Biologie et Pathologie de Lille (Pr E. Leteurtre, Anatomopathologiste, Inserm UMR837-Equipe 5). Vingt-deux prélèvements tissulaires, présentant un adénocarcinome pancréatique moyennement ou bien différencié, appariés ont été sélectionnés et analysés.

B.2. Modèle murin *Pdx-1 –Cre/Kras^{G12D}*

Un des problèmes du cancer du pancréas est le diagnostic tardif de la maladie. La compréhension des lésions PanIN permettrait un diagnostic plus précoce du PDAC.

Pdx-1 est un facteur de transcription essentiel impliqué dans le développement du pancréas. L'inactivation du gène *Pdx-1* chez la souris empêche la formation du pancréas. Il est exprimé dès le stade embryonnaire E8.5. Toutes les cellules du pancréas adulte (cellules exocrines, endocrines et canalaies) dérivent de cellules précurseurs exprimant le gène *Pdx-1*.

Le modèle murin *Pdx-1-Cre/Kras^{G12D}*, développé par Hingorani et collaborateurs (Hingorani *et al.*, 2003), utilise la technologie Cre-Lox pour générer des souris mutantes avec une activation spécifique dans le pancréas du gène *Kras* activé (porteur de la mutation G12D). Des souris, porteuses de l'allèle *Kras^{G12D}* en amont duquel on retrouve un codon stop flanqué de site Lox P, sont croisées avec des souris exprimant une CRE recombinase sous contrôle du promoteur *Pdx-1*. L'excision de la cassette « Stop » permet l'expression du *Kras* activé spécifiquement dans le pancréas. Les souris porteuses de l'allèle *Kras* muté dans le pancréas (*Pdx-1 –Cre/Kras^{G12D}*) développent des lésions PanIN dès l'âge de trois à six semaines. Ces PanIN sont semblables aux PanIN humaines puisqu'elles reproduisent la même progression histologique du stade PanIN-1A jusque PanIN-3 et éventuellement au-delà d'un an un adénocarcinome (10% des cas).

C. Biologie cellulaire

C.1. Transfection cellulaire

Le travail est effectué sous PSM en conditions stériles. Les solutions et réactifs sont aussi stériles et de qualité culture cellulaire. Les volumes décrits correspondent à l'utilisation de boîtes à 6 puits. La solution lyophilisée de miARN (Life Technologies) a été reprise dans 500 µl d'eau *RNase free* fournie de sorte à obtenir une solution stock de 10 µM.

Le protocole de transfection est dit « inverse » puisque les cellules sontensemencées et transfectées le jour même. Les mises au point ont été effectuées pour les lignées cellulaires Capan-1, Capan-2 et BxPC-3. Le nombre optimal de cellules est de 2×10^5 cellules et la concentration optimale finale en miARN est de 9 nM.

Les cellules sont trypsinisées et reprises dans du milieu neuf pour obtenir 1×10^5 cellules dans 1 ml de milieu de culture complété en SVF. L'agent de transfection siPORT™ *NeoFX* (Life Technologies) (1,2 µl) est dilué dans un volume final de milieu

Opti-MEM[®] (Life Technologies) de 25 µl par puits et incubé 10 min à température ambiante (T° amb). Le miARN (miR-219-1-3p ou *scramble*) est ajouté à raison de 1,8 µl par puits aux 25 µl de la solution diluée d'agent de transfection. Le mélange est homogénéisé à l'aide de la micropipette puis incubé de nouveau 10 min à T° amb afin que les complexes ARN/agent de transfection puissent se former. Enfin 2 ml de suspension cellulaire soit 2 x 10⁵ cellules sont ajoutés par puits. La plaque est placée à l'étuve à 37°C sous 5% CO₂ pendant 48 h.

Les complexes ARN/agent de transfection étant stables en présence de sérum, il n'est pas nécessaire de changer le milieu des cellules. Après 48h, les cellules sont soumises à une extraction des ARN totaux ou des protéines totales.

C. 2. Clonage du 3'-UTR de *MUC4*

La séquence du 3'-UTR de *MUC4* a été obtenue à partir de la base de données Ensembl. Les amorces d'amplification ont ainsi pu être choisies. Un site de restriction XbaI a été ajouté à l'extrémité 5' des oligonucléotides afin de permettre le clonage en aval du gène de la luciférase dans le vecteur pGL3-Promoter (Promega). Les séquences oligonucléotidiques sont les suivantes : 3'-UTR-MUC4S : 5'-CGCTCTAGAGGGCCAGG TTCTCCTATTTTC-3' et 3'-UTR-MUC4AS 5'-CGCTCTAGAGGCCACCAGAAGAAA ATCAA-3'. La taille du produit de PCR doit être de 505 paires de bases (pb).

La réaction d'amplification par PCR est réalisée sur l'ADN génomique (ADNg) total humain isolé à partir de la lignée d'adénocarcinome pancréatique Capan-2 à l'aide du kit NucleoSpin[®] Tissue (Macherey-Nagel).

Le mélange réactionnel (50 µl) est le suivant :

Tampon enzyme 10X	5 µl
(Tris-HCl 100 mM, pH 8,3, KCl 500 mM, MgCl ₂ 15 mM, Roche Diagnostic)	
dNTP (20 mM, Eurogentec)	2 µl
Amorce sens 5 µM	2 µl
Amorce anti-sens 5 µM	2 µl
Taq DNA Polymérase (250 U, Roche Applied Science)	2 µl
ADNg	5 µl
Eau stérile <i>nuclease-free</i>	27 µl

Les produits de PCR, purifiés à l'aide du kit *Wizard® SV Gel PCR Clean up system* (Promega) selon le protocole du fournisseur, sont ensuite clonés dans le vecteur pGL3-Promoter (Promega) préalablement soumis à une digestion par XbaI (BioLabs) puis déphosphorylé en présence de phosphatase alcaline (2 unités (U), Roche) pendant 1h à 37°C. Le clonage en vecteur s'effectue par ligation en présence de T4 DNA ligase pendant 2h à T° amb à l'aide du kit Rapid DNA Ligation (Roche Applied Science).

Les bactéries compétentes JM109 (Promega) sont transformées par 5 µl de produit de ligation. Un volume de 120 µl de bactéries transformées est étalé sur boîte de Petri contenant du milieu Luria Broth (LB)-Agar et de l'ampicilline à 50 µg/ml et placées une nuit à 37°C. Les clones obtenus sont repiqués dans 5 ml de milieu LB en présence d'ampicilline à 50 µg/ml et incubés une nuit à 37°C sous agitation. L'ADN plasmidique est préparé à l'aide du kit QIAprep® Spin Miniprep (Qiagen) puis digéré par l'enzyme XbaI pendant 1h à 37°C. La présence de l'insert est visualisée après électrophorèse en gel d'agarose 0,8% (p/v) en solution Tris-Borate-EDTA (TBE) 1X contenant du bromure d'éthidium (BET) à 10 µg/ml.

Le séquençage des plasmides présentant l'insert se fait sur les deux brins grâce à l'utilisation des amorces sens pGL3-*forward* : 5'- ACGCAAGAAAATCAGAGAG -3' et pGL3-*reverse* : 5'- GTTTGTCCAAACTCATCAAT -3 (GATC Biotech, Mulhouse, France). Les alignements de séquences sont effectués grâce au logiciel BLASTN.

Les souches bactériennes des clones sens (1 ml) sont conservées à -80°C dans 2 ml de glycérol stérile. Des préparations du plasmide contenant le 3'-UTR de *MUC4* (pGL3-*MUC4*-3'UTR) en grande quantité sont ensuite effectuées à l'aide du kit NucleoBond® Xtra Maxi Plus EF (Macherey-Nagel).

Les mutants pGL3-*MUC4*-3'UTR pour les sites de fixation du miR-219-1-3p ont été générés. Le premier site de fixation ACCTCAAGACTCACCTC a été muté en ACCTCAAGAAGAACCTC pour donner le plasmide pGL3-*MUC4*-site#1_mut et le second site TTCAAATTAACTCT a été muté en TTCAAATTGGCGAT pour donner pGL3-*MUC4*-site#2_mut à l'aide du kit Quick-Change XL Site-Directed Mutagenesis® (Stratagene).

Les expériences de co-transfections cellulaires transitoires se font avec 1 µg de plasmide en présence des précurseurs de miARN comme précédemment décrit (§ C.1).

C. 3. Prolifération cellulaire

Dans une plaque à 6 puits, 1×10^5 cellules transfectées sont ensemencées par puits. Chaque condition est réalisée en triple. Les cellules sont comptées 24, 48 et 72h après transfection à l'aide de l'automate *Countess[®] Automated Cell Counter* (Life Technologies).

C. 4. Migration cellulaire

Les cellules sont transfectées pendant 24h puis 5×10^5 cellules reprises dans du milieu sans SVF sont ensemencées en chambre de Boyden[®] (*BD BioCoat Control Insert*, BD Bioscience). Chaque condition est réalisée en triple. Les cellules sont incubées pendant 24h à l'étuve à 37°C sous 5% CO₂.

Les cellules ayant migrées se retrouvent sur la face inférieure de la chambre. Elles sont alors fixées par une solution commerciale de méthanol (kit *Diff-Quick*, Medion Diagnostics). La coloration et le montage sont réalisés avec le liquide de montage *Vectashiel[®] HardSet Mounting Medium* (Vector Laboratories) contenant du 4',6'-diamidino-2-phénylindole (DAPI) permettant le marquage des noyaux cellulaires. Les cellules sont comptées en microscopie à fluorescence.

D. Biologie moléculaire

D.1. Extraction des ARN totaux à partir de cellules

L'extraction des ARN totaux s'effectue à l'aide du kit *miRNeasy[®] Mini* (Qiagen) selon les instructions du fournisseur. Ce kit permet de récupérer une fraction d'ARN totaux comprenant les ARN de petite taille et donc les miARN. Brièvement, les cellules sont lysées par une solution phénol/guanidine. Après l'addition de chloroforme, la fraction d'ARN totaux est séparée des protéines et de l'ADN puis est purifiée sur colonne de silice. L'élution se fait avec 30 µl d'eau *RNase free* de préférence dans des tubes à centrifuger de 1,5 ml traités anti-adsorption (Eppendorf[®]) pour éviter toute perte d'ARN et pour une conservation prolongée.

La concentration de l'ARN total purifié est déterminée par spectrophotométrie à la longueur d'onde de 260 nm (*Nanodrop[®] ND-1000 Spectrophotometer*, Thermo Scientific) et les rapports A260 nm/A280 nm et A260 nm/A230 nm sont calculés. Pour une qualité optimale, ces ratios doivent être compris entre 1,8 et 2. Les échantillons sont conservés à -80°C jusqu'à utilisation.

D.2. Extraction d'ARN totaux à partir de tissus inclus en paraffine

L'extraction de l'ARN total à partir des tissus inclus en paraffine s'effectue à l'aide du kit *RecoverAll™ Total Nucleic Acid Isolation* (Life Technologies) selon le protocole du fournisseur. La quantité de matériel initiale est de un copeau de 10 µm pour les tissus de patients et de trois copeaux de 20 µm pour les tissus de souris.

Brièvement l'extraction se fait en 4 étapes. La première étape est l'étape de déparaffinage avec l'ajout de 1 ml de xylène suivi de deux lavages à l'éthanol absolu. La deuxième étape est la digestion du tissu à la protéinase en incubant les échantillons 15 min à 50°C puis 15 min à 80°C. La troisième étape est la purification des acides nucléiques après précipitation à l'éthanol. La dernière étape comprend une digestion à la DNase suivie de lavages successifs. L'élution est réalisée par l'ajout de 10 µl d'eau *RNase free* pour les tissus de patients et 60 µl pour les tissus de souris, de préférence dans tubes à centrifuger de 1,5 ml traités anti-adsorption (Eppendorf®) pour éviter toute perte d'ARN. Les échantillons sont conservés à -20°C.

La concentration de l'ARN total est ensuite mesurée par spectrophotométrie à la longueur d'onde de 260 nm (Nanodrop® ND-1000 Spectrophotometer, Thermo Scientific) et les rapports A260 nm/A280 nm et A260 nm/A230 nm sont calculés. Pour une qualité optimale, ces ratios doivent être compris entre 1,8 et 2.

D.3. Pucés à miARN

Les cellules sontensemencées à raison de $0,2 \times 10^6$ cellules par flacon de culture de 25 cm² (T25) puis mises en culture jusqu'à confluence. L'étude est réalisée en quadruple pour chaque lignée cellulaire. L'extraction des ARN totaux est effectuée à l'aide du kit miRNeasy® Mini (Qiagen). L'analyse quantitative et qualitative des ARN est déterminée par spectrophotométrie à la longueur d'onde de 260 nm (Nanodrop® ND-1000 Spectrophotometer, Thermo Scientific) et par électrophorèse capillaire (Bioanalyzer 2100, Agilent) (plate-forme de génomique fonctionnelle, IFR114/Institut de Médecine Prédictive et de Recherche Thérapeutique IMPRT, Université Lille 2). Le *RNA Integrity Number* (RIN) doit être supérieur ou égal à 8 pour autoriser l'étude de l'échantillon sur puce à miARN et la quantité nécessaire minimale est de 100 ng.

L'étude de l'expression des miARN dans les différentes lignées cellulaires est effectuée grâce à des pucés 8x15K (Agilent) sur la plate-forme de génomique fonctionnelle

(Dr M. Figeac, IFR114/IMPRT, Université Lille 2). Les sondes présentes sur les puces (1500 sondes ou *spots*) ciblent les 1000 miARN décrits en 2010, dans la base de données *miRBase*. Les résultats sont analysés avec le logiciel *GeneSpring*. Le traitement des données pour l'analyse miARN se fait en trois étapes. La première étape est la correction du bruit de fond qui consiste en la soustraction de l'intensité du bruit de fond à celle du signal. Le rapport intensité du signal/intensité du bruit de fond doit être supérieur ou égal à 2. La deuxième étape est celle de la normalisation. Elle a pour but de s'affranchir des biais techniques. La dernière étape est la mesure de l'expression différentielle. Un gène est considéré comme significativement surexprimé dans l'échantillon par rapport au contrôle si $R_i/G_i \geq 2$ (où R_i est le niveau d'expression d'un spot « i » marqué par un fluorophore rouge et G_i est le niveau d'expression du spot « i » marqué par un fluorophore vert).

D.4. Prédiction des miARN ciblant potentiellement *MUC4*

Les prédictions bioinformatiques des séquences des miARN ciblant potentiellement *MUC4* et des sites putatifs de liaison ont été effectuées à partir de trois bases de données : *TargetScan* www.targetscan.org (version 5), *Microcosm* www.ebi.ac.uk/enright-srv/microcosm (version 5) et *MiRanda* www.microrna.org (version 4). Les logiciels de prédiction se basent sur plusieurs critères : la complémentarité de la région *seed*, la conservation de cette séquence au cours de l'évolution, l'énergie libre requise pour l'interaction et la stabilité thermodynamique (par la recherche de structures secondaires) de cette interaction. En fonction du logiciel choisi, les critères de sélection seront différents et classés de manière prioritaire différente d'où la nécessité de croiser les prédictions de différentes bases de données.

D.5. Rétrotranscription d'ARN « classiques »

La synthèse d'ADN complémentaire (ADNc) est réalisée à partir d'1 µg d'ARN totaux dans le tampon Tris-HCl 50 mM, pH 8,3, KCl 75 mM, MgCl₂ 3 mM, DTT 10 mM en présence de désoxynucléotides triphosphate (dNTP) (50 mM, Eurogentec), d'oligo(dT) (0,5 µg/µl, Promega) et de rétrotranscriptase recombinante M-MLV (Moloney-Murine Leukemia Virus) (200 U, Promega). Les échantillons sont incubés pendant 5 min à 70°C. La rétrotranscription est réalisée en incubant les échantillons 1h à 42°C puis la réaction est arrêtée

par dénaturation des échantillons pendant 10 min à 94°C. Les solutions d'ADNc sont conservées à -20°C.

D.6. Rétrotranscription des miARN

La synthèse d'ADNc à partir d'ARN de petite taille se fait à l'aide du kit QuantiMiR™ RT (System Biosciences). La quantité initiale d'ARN peut être comprise entre 10 picogrammes et aller jusque 10 µg. Néanmoins la quantité minimale mise au point pour effectuer la rétrotranscription à partir de tissus inclus en paraffine est de 10 ng. La rétrotranscription se fait en trois étapes :

La première étape est l'ajout de la queue polyA.

La réaction se fait dans le mélange suivant :

ARN total	5 µl
tampon polyA 5X	2 µl
MnCl ₂ 25 mM	1 µl
ATP 5 mM	1,5 µl
polyA polymérase	0,5 µl

Le mélange est incubé 30 min à 37°C.

La deuxième étape consiste en l'ajout de 0,5 µl de solution adaptatrice d'oligo dT puis à une incubation de 5 min à 60 °C.

La troisième étape est la synthèse d'ADNc selon la réaction suivante :

tampon 5X	4 µl
dNTP	2 µl
DTT 0,1 M	1,5 µl
eau RNase free	1,5 µl
rétrotranscriptase	1 µl

Le mélange est incubé 1h à 42°C puis 10 min à 95°C pour arrêter la synthèse d'ADNc. Les solution d'ADNc sont conservées à -20°C.

Tableau 7. Séquence des amorces MUC4 et GAPDH utilisées pour la qPCR

nom du gène		séquence de l'amorce (5' → 3')	Tm (°C)	taille de l'amplicon (pb)
MUC4	sens	GCCCAAGCTACAGTGTGACTC	58	81
	antisens	ATGGTGCCGTTGTAATTTGTTGA		
GAPDH	sens	CTCAACTTTAACTGGAAAGAATGTC	58	70
	antisens	TCCTTTTCACCAGCAAGCT		

Tableau 8. Séquence des amorces miARN utilisées pour la qPCR

nom du miARN	séquence miARN (5' → 3')	séquence de l'amorce (5' → 3')	Tm (°C)
let-7a	CUAUACAAUCUACUGUCUUUC	CTATACAATCTACTGTCCTTTC	52
miR-98	UGAGGUAGUAAGUUGUAUUGUU	TGAGGTAGTAAGTTGTATTGTT	53
miR-145	GUCCAGUUUCCCAGGAAUCCCU	GTCCAGTTTTCCAGGAATCCCT	62
miR-210	CUGUGCGUGUGACAGCGGCUGA	CTGTGCGTGTGACAGCGGCTGA	66
miR-219-1-3p	AGAGUUGAGUCUGGACGUCCCG	AGAGTTGAGTCTGGACGTCCCG	63
miR-96-5p	UUUGGCACUAGCACAUUUUUGCU	TTTGCCACTAGCACATTTTTGCT	57
miR-132-3p	UACAGUCUACAGCCAUGGUCG	TAACAGTCTACAGCCATGGTCG	60
miR-361-3p	UCCCCAGGUGUGAUUCUGAUUU	TCCCCAGGTGTGATTCTGATTT	60
miR-455-3p	GCAGUCCAUGGGCAUAUACAC	GCAGTCCATGGGCATATACAC	60
miR-584-5p	UUAUGGUUUGCCUGGGACUGAG	TTATGGTTTGCCTGGGACTGAG	60

D. 7. qPCR classique

La réaction pour un puits (20 µl) se fait dans le mélange suivant :

SsoFast™ EvaGreen® supermix 2X	10 µl
amorce sens (5 µM)	1 µl
amorce antisens (5 µM)	1 µl
eau <i>nuclease free</i>	7 µl

Le volume d'ADN matriciel ajouté par puits est de 1 µl. L'amplification se fait sur l'appareil CFX96™ Real-Time System (Bio-Rad) selon le protocole suivant : un cycle d'activation de l'enzyme à 95°C pendant 30 s, suivi de 40 cycles comportant chacun une étape de dénaturation à 95°C pendant 3 s et une étape d'hybridation/élongation pendant 3 s à la température d'hybridation. Une étape de réalisation d'une courbe de fusion permettant de vérifier la spécificité de la PCR est systématiquement réalisée. Cette étape consiste en un chauffage progressif de 60°C à 95°C avec un incrément de 0,5°C pendant 2 s. Les séquences des amorces sont indiquées dans le tableau 7. Le gène GAPDH est utilisé comme témoin interne. L'expression du gène est calculée selon la formule $2^{-\Delta Ct}$ avec $\Delta Ct = Ct_{\text{gène}} - Ct_{\text{GAPDH}}$.

D. 8. qPCR miARN

L'ADNc matriciel est dilué au 1/100^{ème} si la quantité initiale d'ARN utilisée pour la rétrotranscription est de 1 µg. La séquence sens utilisée pour la réaction d'amplification est la séquence mature du miARN retrouvée à partir de la base de donnée miRBase et convertie en séquence ADN. Les séquences sens des miARN sont répertoriées dans le tableau 8.

L'amorce antisens est universelle et est fournie dans le kit QuantiMiR™ RT (System Biosciences). La réaction pour un puits (20 µl) se fait dans le mélange suivant :

SsoFast™ EvaGreen® supermix 2X	10 µl
amorce sens (5 µM)	2 µl
amorce antisens (10 µM)	0,5 µl
eau <i>nuclease free</i>	qsp 20 µl

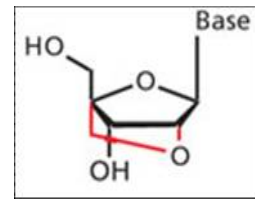
Le volume d'ADN matriciel ajouté par puits est de 1 µl pour les ADN dilués au 1/100^{ème} ou 2 µl pour les ADNc rétrotranscrits à partir de moins d'1 µg. L'amplification se fait comme précédemment décrit (§ D. 7.). L'ARN U6 est utilisé comme témoin interne.

L'amorce sens U6 humaine ou murine est fournie dans le kit. L'expression du gène est calculée selon la formule $2^{-\Delta Ct}$ avec $\Delta Ct = Ct_{miARN\ d'intérêt} - Ct_{U6}$.

D. 9. Hybridation in situ (HIS) de miARN à partir de tissus inclus en paraffine

Les études d'expression par puce miARN ou PCR quantitative ont permis de mettre en évidence les altérations d'expressions des miARN dans les cellules cancéreuses pancréatiques humaines et dans les tissus de patients atteints de cancer du pancréas.

Une des difficultés de l'HIS pour miARN repose sur leur petite taille (une vingtaine de nucléotides de longueur). La technologie *Locked Nucleic Acid* (LNA) a permis d'augmenter la performance de cette technique. Un LNA est un analogue d'acides nucléiques



contenant un pont méthylène entre l'oxygène en position 2' et le carbone en position 4' du ribose. Le pont permet de bloquer le ribose en conformation C3' endo ce qui permet d'augmenter la stabilité de la molécule et les propriétés d'hybridation et d'avoir ainsi une très forte affinité entre la molécule de LNA et le miARN.

Figure. Structure d'un LNA

Principe

L'HIS du miR-219-1-3p est réalisée selon le protocole du kit *miRCURY LNA™ microRNA ISH Optimization (FFPE)* (Exiqon).

La sonde LNA utilisée pour le miR-219-1-3p est doublement marquée à la digoxigénine aux extrémités 5' et 3'. Il s'agit d'une sonde d'ADN dont la séquence est complémentaire à celle du miR-219-1-3p. Le traitement à la protéinase K permet de démasquer les miARN et de faciliter l'accès du LNA qui va aller s'hybrider sur la séquence du miR-219-1-3p. Les digoxigénines vont être reconnues par un anticorps spécifique anti-digoxigénine couplé à la phosphatase alcaline. Cet enzyme permet de convertir le substrat 4-nitro-bleu-tétrazolium (NBT) et 5-bromo-4-chloro-3'-indolylphosphate (BCIP) en précipité bleu insoluble.

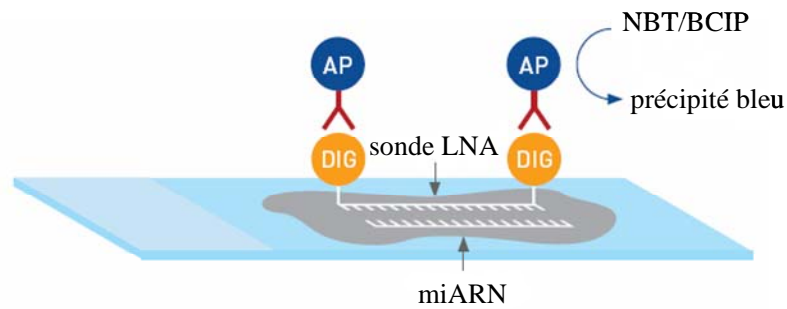


Figure. Schéma du principe d'HIS. D'après Exiqon

Recommandations

L'étude d'HIS a été réalisée sur des tissus de pancréas de souris *Pdx1-Cre;LSL-Kras^{WT}* et *Pdx1-Cre;LSL-Kras^{G12D}*. Les molécules d'ARN étant relativement fragiles et sensibles à la dégradation, il est nécessaire de fixer de manière rapide et efficace les tissus pour l'HIS c'est pourquoi les tissus doivent être manipulés avec des gants et dans un environnement *RNase free* afin de préserver le tissu pour l'analyse HIS.

Protocole

Inclusion des tissus

Les tissus sont fixés dans une solution de formaldéhyde 4% (v/v) pendant 24h puis immergés dans de l'éthanol à 70% (v/v) avant d'être inclus en paraffine dans le Service d'Histologie de la Faculté de Médecine de Lille-Pôle Recherche. Le tissu est ensuite coupé en sections de 5 µm d'épaisseur et monté sur des lames traitées électrostatiques SuperFrost® Plus. Les échantillons doivent être analysés dans les 6 mois suivant la coupe et conservés à 4°C. Un contrôle histologique a été réalisé sur une lame colorée à l'Hématoxyline-Eosine (HE).

Déparaffinage

Le déparaffinage des tissus se fait dans 3 bains successifs de 5 min de xylène suivis de 3 bains de 5 min d'éthanol de titre décroissant 100%, 96% puis 70% (v/v).

Traitement à la protéinase K

La durée du traitement et la concentration de la protéinase K doivent être optimisés en fonction de la nature (espèce : murin, humain et type : pancréas, rein...) et de la durée de fixation du tissu.

Les conditions conseillées sont :

concentration	0,5 – 5 µg/ml
durée	5 – 30 min

La concentration optimale en protéinase K est de 2 µg/ml. La solution stock de protéinase K à 18 mg/ml (Proteinase K, recombinant, PCR Grade, Roche Applied Science) est diluée à 2 µg/ml dans le tampon suivant :

Tris-HCl 1 M pH 7,4	5ml
0,5 M EDTA	2 ml
NaCl 5 M	0,2 ml
qsp eau nuclease free	1000 ml

Les lames sont donc recouvertes avec ~300 µl de protéinase K à 2 µg/ml puis incubées 5 min à 37°C dans une chambre d'hybridation humide (*Dako Hybridizer*). Les lames sont ensuite lavées dans deux bains successifs de PBS (Phosphate-buffered Saline) 1X.

Hybridation

Les coupes de tissus sont déshydratées dans une série de bains d'éthanol à des concentrations de plus en plus élevées : 1 min dans de l'éthanol à 70 % (v/v) , 1 min dans de l'éthanol à 96 % (v/v) et 1 min dans de l'éthanol absolu. Les coupes sont séchées à l'air libre pendant 15 min.

- Préparation de la sonde *miRCURY LNATM Detection probe*

La sonde est commercialisée à raison de 250 pmoles dans 10 µl soit à une concentration de 25 µM. A moins d'être utilisée dans les 4 semaines après réception, la sonde doit être conservée à -20°C après avoir été aliquotée et préparée de la manière suivante. La sonde est transférée dans un tube à centrifuger de 1,5 ml traité anti-adsorption puis incubée pendant 4 min à 90°C. Le tube est brièvement centrifugé. La sonde est ensuite diluée dans le tampon d'hybridation 1X préalablement dilué fourni dans le kit (*microRNA ISH Buffer 2X*) en fonction de la concentration souhaitée. Pour obtenir une concentration de 100 nM, il faut réalisée une dilution au 1/250^{ème} en ajoutant 1,25 ml d'eau *RNase free* et 1,25 ml de *microRNA ISH Buffer 2X* aux 10 µl de la sonde. Des aliquots de 50 à 100 µl sont préparées et conservés à -20°C.

- Détermination de la concentration de la sonde

Il existe une relation critique entre le nombre de copies du miARN, la concentration de la sonde et l'intensité du signal obtenu lors de l'HIS. Les données concernant le nombre de copies des miARN présent dans un tissu (Liang et al, 2007) indiquent que le miR-219-1 est présente un nombre faible de copies dans le pancréas. La concentration conseillée par le fournisseur pour la sonde est de 50 nM, nous avons donc testé deux conditions de concentration pour la sonde 50 et 100 nM. La concentration retenue est de 100 nM.

- Détermination de la température d'hybridation

En règle générale, la température optimale d'hybridation pour l'HIS se fait 20°C en-deça du T_m de la sonde. La séquence de la sonde LNA pour le miR-219-1-3p est CGGGACGTCCAGACTCAACTCT et a un T_m de 81°C. La température optimale d'hybridation serait alors de 61°C. Or les instructions du fournisseur conseillent d'utiliser une température d'hybridation comprise entre 50°C et 60°C. De plus, la température de fusion de la paraffine étant de 60°C et au vu de la fragilité du tissu pancréatique, la température d'hybridation choisie est de 55°C.

Un volume de 25 µl de la sonde diluée à 100 nM est déposé sur le tissu. Une lamelle est ensuite disposée sur la lame afin d'assurer une répartition homogène de la sonde sur le tissu. Veillez à éviter la formation de bulle d'air sous la lamelle. Les lames sont placées dans la chambre d'hybridation humide (*Dako Hybridizer*) pour y être incubées 2 h à 55°C.

Lavages

Les solutions stringentes de lavage SSC (*Saline Sodium Citrate*) sont préparées à partir de tampon SSC 20 X (UltraPure™ 20X SSC, Life Technologies) dilué dans de l'eau *RNase free* afin d'obtenir des solutions à 5X, 1X et 0,2X.

A la sortie de la chambre d'hybridation, les lamelles sont retirées délicatement en plongeant les lames dans du tampon SSC 5X à T° amb pendant quelques minutes. Les lavages sont réalisés de la manière suivante :

tampon SSC 5X	5 min	55°C
tampon SSC 1X	5 min	55°C
tampon SSC 1X	5 min	55°C
tampon SSC 0,2X	5 min	55°C
tampon SSC 0,2X	5 min	55°C
tampon SSC 0,2X	5 min	T° amb

Blocage et incubation de l'anticorps anti-DIG

Les lames sont recouvertes de la solution de blocage *Block Buffer* (Roche Applied Science) et incubées pendant 15 min à T° amb. L'anticorps anti-DIG (sheep anti-DIG-AP, Fab fragments, Roche Applied Science) est dilué au 1/800^{ème} dans la solution de blocage. La solution de blocage est retirée et la solution d'anticorps est appliquée sur le tissu pour une incubation de 2h à T° amb.

Révélation

Après 3 lavages de 3 min dans du PBS- Tween[®]-20 (1 ml de Tween[®]-20 dans 1l de PBS), les lames sont incubées une nuit à T° amb avec ~50 µl de la solution de substrat NBT/BCIP (1-Step Solution[™] NBT/BCIP, Thermo Scientific) et recouvertes de lamelles. Les lames sont placées à l'abri de la lumière.

La réaction est arrêtée en incubant les lames 2 x 5 min dans une solution de Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM et KCl 10 mM. Deux lavages d'1 min avec de l'eau désionisée sont ensuite effectués.

Montage

Un volume de 200 µl de liquide de contre-coloration Nuclear Fast Red[™] (Vector Laboratories) est appliqué pendant 1 min. Les lames sont rincées avec de l'eau pendant ~10 min puis déshydratées dans des bains successifs d'1 min d'éthanol à 70% (v/v), 96% (v/v) et 100%. Quelques gouttes de liquide de montage (Mounting Medium Eukitt[®], VWR) sont déposées sur la lamelle avant de la déposer (en évitant la formation de bulle d'air) sur la coupe de tissu. Les lames sont lues le lendemain au microscope optique.

E. Biochimie

E. 1. Dosage de l'activité luciférase

Les cellules sont lysées à l'aide du tampon *Reporter Lysis Buffer* (RLB) (Promega). L'activité luciférase est mesurée en présence de luciférine sur un luminomètre Mithras LB 904 (Berthold Technologies) (Anne-Sophie Drucbert, IFR114/IMPRT, Université Lille 2). Le dosage de protéines de l'extrait cellulaire total est déterminé par la méthode à l'acide

bicinchoninique (BCATM Protein Assay Reagent, Pierce). L'activité luciférase est mesurée puis rapportée à la quantité de protéines totales dans l'échantillon.

E. 2. Extraction de protéines totales

Le travail se fait sur glace. Le tampon de lyse utilisé est le tampon RIPA (*Radio Immune Precipitation Assay*, Sigma-Aldrich) Tris-HCl 50 mM, pH 8.0 contenant 150 mM de chlorure de sodium, 1% (v/v) de NP-40, 0,5% (v/v) de désoxycholate de sodium et 0,1% (v/v) de sodium dodécyl sulfate. Une pastille de cocktail d'inhibiteurs de protéases *Complete mini-protease inhibitor cocktail* (Roche Applied Science) est ajoutée extemporanément à 10 ml de tampon RIPA.

Le milieu des cellules est éliminé par aspiration. Les cellules sont ensuite lavées avec une solution de PBS 1X, lysées avec 110 µl (6puits), 250 µl (T25) ou 500 µl (flacon de culture de 75 cm² T75) de tampon RIPA + inhibiteurs et incubées 5 min à 4°C. Après avoir gratté les cellules, le lysat cellulaire est transféré dans un tube à centrifuger de 1,5 ml posé sur glace. Le tube est centrifugé à 8 000g pendant 10 min à 4°C pour culotter les débris cellulaires. Le surnageant est transféré dans un nouveau tube à centrifuger de 1,5 ml placé sur la glace, les protéines sont dosées par la méthode à l'acide bicinchoninique (BCATM Protein Assay Reagent, Pierce). L'échantillon est conservé à -80°C.

E. 3. Western-blotting MUC4

En raison de la taille importante de l'apomucine MUC4 (~950 kDa), l'électrophorèse se fait en gel d'agarose 2% (p/v) (20 x 15 cm) contenant 350 mM de Tris-HCl, pH 8,8 et 0,05% (p/v) de sodium dodécylsulfate (SDS). Les extraits protéiques totaux sont dénaturés à 100°C pendant 5 min en présence de tampon de dénaturation SDS-2X [Tris-HCl 0,25 mM, pH 6,8, SDS 0,1% (v/v), β-mercaptoéthanol 10% (v/v), glycérol 20% (v/v), bleu de bromophénol 0,05% (p/v)] avant d'être déposés sur le gel à raison de 20 µg de protéines par puits. La concentration protéique a été déterminée préalablement par la méthode BCA. La migration électrophorétique est réalisée en solution Tris 25 mM, pH 8,3, glycine 190 mM, SDS 0,05% (p/v) pendant 5 h à 100V. Le transfert est réalisé de manière passive sur membrane de nitrocellulose (0,2 µm, Schleicher et Schüll) en solution Tris 25 mM, pH 8,3, glycine 190 mM, méthanol 10% (v/v) et SDS 0,005% (p/v) pendant une nuit.

La membrane est ensuite saturée par une solution tamponée de TBS-T [Tris-HCl 50 mM, pH 8,3, NaCl 150 mM, Tween[®]20 0,05% (v/v)] contenant du lait écrémé en poudre à 5% (p/v) pendant 2 h. Après trois lavages de 5 min avec du TBS-T, la membrane est incubée pendant 2 h à T° amb avec l'anticorps primaire anti-MUC4 (sc-53945, Santa Cruz) dilué au 1/200^{ème} dans le TBS-T. La membrane est de nouveau rincée 3 x 5 min avec le TBS-T puis incubée 1 h à T° amb avec l'anticorps secondaire de souris couplé à la peroxydase de Raifort dilué au 1/10 000^{ème} dans le TBS-T.

La révélation immunologique s'effectue à T° amb pendant 5 min avec le mélange Luminol/Enhancer (5 ml) et la solution stable peroxyde (5 ml) (SuperSignal West Pico Chemiluminescent System, Pierce). L'acquisition d'image se fait sur l'appareil LAS 4000 (Fujifilm). La β -actine est utilisée comme témoin de charge.

E. 4. Western-blotting

Les protéines (20 μ g) sont dénaturées dans le tampon de lyse SDS-2X [Tris-HCl 0,25 mM, pH 6,8, SDS 0,1% (v/v), β -mercaptoéthanol 10% (v/v), glycérol 20% (v/v), bleu de bromophénol 0,05% (p/v)] pendant 5 min à 100°C. La séparation des protéines se fait sur gel de polyacrylamide. Le gel comprend un gel de concentration (à 5%) et un gel de séparation (à 10 ou 13%, en fonction de la taille de la protéine). Les protéines dénaturées ainsi que 7 μ l de marqueur de masse moléculaire *PageRuler*[™] (Fermentas) sont déposés sur le gel. La migration est effectuée à 35 mA constant par gel pendant ~1h dans la solution d'électrophorèse Tris 25 mM, glycine 190 mM, pH 8,3, SDS 0,05 % (v/v).

Après séparation des protéines, celles-ci sont transférées sur membrane de fluorure de polyvinylidène (PVDF, 0,45 μ m, Millipore) pendant 1h à 100V dans la solution de transfert (Tris 25 mM, glycine 192 mM, pH 8,3, méthanol 20 % (v/v) et SDS 0,005 % (v/v)). La membrane est incubée dans du TBS-T contenant 5% (p/v) de lait écrémé en poudre pendant 2h à T° amb sous agitation pour bloquer les sites non-spécifiques. Trois lavages de 5 min dans du TBS-T sous agitation sont réalisés. La membrane est ensuite incubée 2h à T° amb ou une nuit à 4°C en présence de l'anticorps primaire (Tableau 9). Après 3 lavages de 5 min dans du TBS-T, la membrane est mise en présence de l'anticorps secondaire correspondant (en fonction de l'espèce) couplé à la peroxydase dilué au 1/10 000^{ème} dans le TBS-T pendant 1h à T° amb sous agitation. La membrane est lavée 3 fois 5 min dans du TBST.

La révélation se fait en incubant la membrane dans une solution ECL (Enhanced Chemiluminescence, Pierce). L'acquisition d'image se fait sur l'appareil LAS 4000 (Fujifilm). La β -actine est utilisée comme témoin de charge.

Tableau 9. Liste des anticorps utilisés pour le western-blot

marqueur	taille (kDa)	gel (%)	clone	dilution	espèce
Cycline D1	36	10	clone DCS6 Cell Signaling Technology	1/500	souris
p27kip	27	13	RB-9019 Lab Vision Neomarker	1/500	lapin
phospho-Akt	60	10	D9E Cell Signaling Technology	1/1000	lapin
Akt	60	10	C67E7 Cell Signaling Technology	1/1000	lapin
phospho-p42/44	42/44	10	20G11 Cell Signaling Technology	1/500	lapin
p42/44	42/44	10	137F5 CST	1/500	lapin
β -actine	42	10	A5441 Sigma-Aldrich	1/10 000	souris

E. 5. Immunohistochimie

Comme pour l'HIS, les tissus sont fixés dans une solution de formaldéhyde 4% (v/v) pendant 24h puis immergés dans de l'éthanol à 70% (v/v) avant d'être inclus en paraffine dans le Service d'histologie de la Faculté de Médecine de Lille-Pôle Recherche. Le tissu est ensuite coupé en sections de 5 μ m d'épaisseur et monté sur lames adhésives SuperFrost® Plus. Un contrôle histologique est réalisé sur une lame colorée à l'Hémalun-Eosine (HE).

E. 5.1 Immunohistochimie manuelle

Déparaffinage

Les lames sont déparaffinées en les placent 5 min dans deux bains successifs de xylène puis dans deux bains successifs d'éthanol absolu suivis d'un bain d'éthanol à 95% (v/v) et d'un bain d'eau.

Démasquage des sites antigéniques

Les lames sont chauffées dans une solution tampon citrate pH 6 (Dako) au four à micro-ondes à une puissance de 700W pendant 20 min. Les lames sont ensuite refroidies pendant 30 minutes à T° amb.

Inhibition des peroxydases endogènes

L'activité des peroxydases endogènes est inhibée par incubation des lames dans une solution d'eau oxygénée à 3 % (v/v) pendant 30 minutes. Les lames sont rincées deux fois pendant 5 min dans du PBS 1X.

Blocage de la fixation non spécifique des anticorps

Les lames sont incubées dans du tampon de blocage, *blocking reagent*, fourni dans le kit M.O.M. (Vector Laboratories) pendant 1 h à T° amb. Les lames sont ensuite rincées deux fois 5 min dans du PBS 1X.

Incubation de l'anticorps primaire

Un volume de 100 µl d'anticorps primaire anti-Muc4 (1G8, sc-33654) dilué au 1/200^{ème} dans la solution de dilution commerciale *M.O.M. diluent* fournie dans le kit M.O.M. (Vector Laboratories), est déposé sur la coupe de tissu. Les lames sont incubées pendant 30 min à T° amb. Un contrôle positif (tissu de côlon exprimant Muc4) et un contrôle négatif (solution de dilution commerciale *M.O.M diluent* seule) sont réalisés pour chaque série de lames.

Incubation de l'anticorps secondaire

Après avoir rincé quatre fois les lames pendant 5 min dans du PBS 1X, un volume de 100 µl d'anticorps secondaire anti-souris biotinylé (*M.O.M. biotinylated anti-mouse IgG reagent*, kit M.O.M.) est appliqué pendant 10 min à T° amb.

Application du complexe avidine-biotine-peroxydase

Quatre lavages de 5 min dans du PBS 1X sont réalisés. Les lames sont incubées pendant 5 min à T° amb dans la solution VECTASTAIN® ABC Reagent (Vector Laboratories) préparée 30 min auparavant selon les instructions du fournisseur.

Révélation

Les lames sont rincées six fois pendant 5 min dans du PBS 1X. Avant une incubation de 2 à 3 min dans la solution chromogène de 3,3'-diaminobenzidine tétrahydrochloride (DAB, Sigma-Aldrich) préparée 1h auparavant selon les instructions du fournisseur. Les lames sont placées à l'abri de la lumière. Le chromogène est oxydé par la peroxydase et donne un précipité brun insoluble dans l'eau et les solvants organiques. Les lames sont ensuite rincées à l'eau déminéralisée afin d'arrêter la réaction.

Contre-coloration

La contre-coloration est réalisée avec la solution d'hématoxyline (Sigma-Aldrich) pendant 1 min. Les lames sont rincées à l'eau courante puis dans une solution de carbonate de lithium saturée et de nouveau rincées à l'eau courante. La contre-coloration permet de marquer en bleu les noyaux des cellules.

Montage

Les lames sont déshydratées en les immergeant dans des bains successifs de 5 min d'éthanol à 95 % (v/v), d'éthanol absolu (deux fois) et de xylène (deux fois). Les lames sont ensuite montées en appliquant une goutte de liquide de montage Pertex (**Mounting medium for light microscopy**, Histolab) entre la lame et une lamelle (en évitant la formation de bulles d'air). Les lames sont conservées à T° amb.

E. 5.2 Immunohistochimie sur automate

Les coupes sont déparaffinées et prétraitées au tampon citrate comme précédemment décrit. L'immunohistochimie MUC4 est réalisée sur automate (ES, Ventana Medical Systems). Toutes les étapes sont automatisées sauf l'ajout de l'anticorps primaire. L'anticorps primaire anti-MUC4 (8G7, sc-53945, Santa Cruz) est dilué au 1/200^{ème} dans la solution de dilution commerciale (*diluent*, Ventana). Un contrôle positif (tissu de côlon exprimant MUC4) et un contrôle négatif (solution de dilution commerciale seule) sont réalisés pour chaque série de lames. Les lames sont déshydratées et montées comme précédemment décrit.

E. 6. Pull-down

Lyse cellulaire

Les cellules Capan-2 ont été transfectées par le miR-219-1-3p biotinylé ou le miARN *scramble* biotinylé en 3' (Dharmacon) pendant 24 h comme précédemment décrit. Les cellules ont été trypsinisées puis centrifugées 5 min à 500 x g. Le culot cellulaire est lavé deux fois avec du PBS 1X avant d'être repris par 700 µl de tampon de lyse composé de Tris-HCl 20 mM pH 7,5, KCl 100 mM, MgCl₂ 5mM, NP-40 0,3% (v/v), 50 U de *RNase OUT* (Invitrogen), une pastille de cocktail d'inhibiteurs de protéases *Complete mini-protease inhibitor cocktail* (Roche Applied Science). Il est incubé sur la glace pendant 5 min.

Préparation de billes

Les billes de streptavidine (Invitrogen) sont bloquées pendant 2h à 4°C dans le tampon de lyse contenant de l'ARN de transfert de levure à 1 mg/ml (Life Technologies) et de la BSA (*Bovin Serum Albumin*) à 1 mg/ml. Les billes sont lavées deux fois avec le tampon lyse.

Pull-down

Le lysat est ensuite centrifugé à 10 000 x g pendant 10 min avant d'être ajouté aux billes et incubé pendant 4h à 4°C. Les billes sont ensuite lavées à 5 reprises avec le tampon de lyse. L'extraction d'ARN s'effectue directement à partir des billes à l'aide du kit miRNeasy[®] Mini (Qiagen) comme décrit précédemment (§ D.1).

F. Statistiques

Les tests statistiques ont été effectués à l'aide du logiciel GraphPad Prism[®] 2003 (GraphPad software Inc). Les différences entre groupes sont analysées par le *t* test de Student ou par le test ANOVA. Les données sont exprimées comme la moyenne moyenne ± l'erreur standard de la moyenne (S.E.M.) et considérées comme significatives pour une *p-value* (p) inférieure à 0,05 (p<0,05 *, p<0,1 ** ou p<0,01 ***).

Bibliographie

- (1987). "Further evidence of effective adjuvant combined radiation and chemotherapy following curative resection of pancreatic cancer. Gastrointestinal Tumor Study Group." **Cancer** 59(12): 2006-2010.
- Akao, Y., Y. Nakagawa and T. Naoe (2006). "let-7 microRNA functions as a potential growth suppressor in human colon cancer cells." **Biol Pharm Bull** 29(5): 903-906.
- Ambros, V., B. Bartel, D. P. Bartel, C. B. Burge, J. C. Carrington, X. Chen, G. Dreyfuss, S. R. Eddy, S. Griffiths-Jones, M. Marshall, M. Matzke, G. Ruvkun and T. Tuschl (2003). "A uniform system for microRNA annotation." **RNA** 9(3): 277-279.
- Andrianifahanana, M., A. Agrawal, A. P. Singh, N. Moniaux, I. van Seuning, J. P. Aubert, J. Meza and S. K. Batra (2005). "Synergistic induction of the MUC4 mucin gene by interferon-gamma and retinoic acid in human pancreatic tumour cells involves a reprogramming of signalling pathways." **Oncogene** 24(40): 6143-6154.
- Andrianifahanana, M., A. P. Singh, C. Nemos, M. P. Ponnusamy, N. Moniaux, P. P. Mehta, G. C. Varshney and S. K. Batra (2007). "IFN-gamma-induced expression of MUC4 in pancreatic cancer cells is mediated by STAT-1 upregulation: a novel mechanism for IFN-gamma response." **Oncogene** 26(51): 7251-7261.
- Bafna, S., S. Kaur and S. K. Batra (2010). "Membrane-bound mucins: the mechanistic basis for alterations in the growth and survival of cancer cells." **Oncogene** 29(20): 2893-2904.
- Bafna, S., S. Kaur, N. Momi and S. K. Batra (2009). "Pancreatic cancer cells resistance to gemcitabine: the role of MUC4 mucin." **Br J Cancer** 101(7): 1155-1161.
- Bafna, S., A. P. Singh, N. Moniaux, J. D. Eudy, J. L. Meza and S. K. Batra (2008). "MUC4, a multifunctional transmembrane glycoprotein, induces oncogenic transformation of NIH3T3 mouse fibroblast cells." **Cancer Res** 68(22): 9231-9238.
- Baillat, D. and R. Shiekhatar (2009). "Functional dissection of the human TNRC6 (GW182-related) family of proteins." **Mol Cell Biol** 29(15): 4144-4155.
- Bajetta, E., C. Carnaghi, L. Somma and C. G. Stampino (1996). "A pilot safety study of capecitabine, a new oral fluoropyrimidine, in patients with advanced neoplastic disease." **Tumori** 82(5): 450-452.
- Bartel, D. P. (2004). "MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function." **Cell** 116(2): 281-297.
- Behm-Ansmant, I., J. Rehwinkel, T. Doerks, A. Stark, P. Bork and E. Izaurralde (2006). "mRNA degradation by miRNAs and GW182 requires both CCR4:NOT deadenylase and DCP1:DCP2 decapping complexes." **Genes Dev** 20(14): 1885-1898.
- Berlin, J. D., S. Adak, D. J. Vaughn, D. Flinker, L. Blaszkowsky, J. E. Harris and I. Benson (2000). "A phase II study of gemcitabine and 5-fluorouracil in metastatic pancreatic cancer: an Eastern Cooperative Oncology Group Study (E3296)." **Oncology** 58(3): 215-218.
- Berman, J. J., J. Albores-Saavedra, D. Bostwick, R. Delellis, J. Eble, S. R. Hamilton, R. H. Hruban, G. L. Mutter, D. Page, T. Rohan, W. Travis and D. E. Henson (2006). "Precancer: a conceptual working definition -- results of a Consensus Conference." **Cancer Detect Prev** 30(5): 387-394.
- Betel, D., M. Wilson, A. Gabow, D. S. Marks and C. Sander (2008). "The microRNA.org resource: targets and expression." **Nucleic Acids Res** 36(Database issue): D149-153.
- Bhattacharyya, S., E. R. Siegel, G. M. Petersen, S. T. Chari, L. J. Suva and R. S. Haun (2004). "Diagnosis of pancreatic cancer using serum proteomic profiling." **Neoplasia** 6(5): 674-686.
- Bhattacharyya, S. N., R. Habermacher, U. Martine, E. I. Closs and W. Filipowicz (2006). "Relief of microRNA-mediated translational repression in human cells subjected to stress." **Cell** 125(6): 1111-1124.

- Bitler, B. G., A. Goverdhan and J. A. Schroeder (2010). "MUC1 regulates nuclear localization and function of the epidermal growth factor receptor." **J Cell Sci** 123(Pt 10): 1716-1723.
- Bloomston, M., W. L. Frankel, F. Petrocca, S. Volinia, H. Alder, J. P. Hagan, C. G. Liu, D. Bhatt, C. Taccioli and C. M. Croce (2007). "MicroRNA expression patterns to differentiate pancreatic adenocarcinoma from normal pancreas and chronic pancreatitis." **JAMA** 297(17): 1901-1908.
- Brunner, T. B. and C. L. Eccles (2010). "Radiotherapy and chemotherapy as therapeutic strategies in extrahepatic biliary duct carcinoma." **Strahlenther Onkol** 186(12): 672-680.
- Bureau, C., N. Hanoun, J. Torrisani, J. P. Vinel, L. Buscail and P. Cordelier (2009). "Expression and Function of Kruppel Like-Factors (KLF) in Carcinogenesis." **Curr Genomics** 10(5): 353-360.
- Burris, H. and A. M. Storniolo (1997). "Assessing clinical benefit in the treatment of pancreas cancer: gemcitabine compared to 5-fluorouracil." **Eur J Cancer** 33 Suppl 1: S18-22.
- Calin, G. A. and C. M. Croce (2006). "MicroRNA signatures in human cancers." **Nat Rev Cancer** 6(11): 857-866.
- Calin, G. A., C. Sevignani, C. D. Dumitru, T. Hyslop, E. Noch, S. Yendamuri, M. Shimizu, S. Rattan, F. Bullrich, M. Negrini and C. M. Croce (2004). "Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers." **Proc Natl Acad Sci U S A** 101(9): 2999-3004.
- Cartwright, T. H., A. Cohn, J. A. Varkey, Y. M. Chen, T. P. Szatrowski, J. V. Cox and J. J. Schulz (2002). "Phase II study of oral capecitabine in patients with advanced or metastatic pancreatic cancer." **J Clin Oncol** 20(1): 160-164.
- Cascinu, S., R. R. Silva, S. Barni, R. Labianca, L. Frontini, E. Piazza, G. Pancera, P. Giordani, L. Giuliodori, M. A. Pessi, V. Fusco, G. Luporini, R. Cellerino and G. Catalano (1999). "A combination of gemcitabine and 5-fluorouracil in advanced pancreatic cancer, a report from the Italian Group for the Study of Digestive Tract Cancer (GISCAD)." **Br J Cancer** 80(10): 1595-1598.
- Chaturvedi, P., A. P. Singh and S. K. Batra (2008a). "Structure, evolution, and biology of the MUC4 mucin." **Faseb J** 22(4): 966-981.
- Chaturvedi, P., A. P. Singh, S. Chakraborty, S. C. Chauhan, S. Bafna, J. L. Meza, P. K. Singh, M. A. Hollingsworth, P. P. Mehta and S. K. Batra (2008b). "MUC4 mucin interacts with and stabilizes the HER2 oncoprotein in human pancreatic cancer cells." **Cancer Res** 68(7): 2065-2070.
- Chaturvedi, P., A. P. Singh, N. Moniaux, S. Senapati, S. Chakraborty, J. L. Meza and S. K. Batra (2007). "MUC4 mucin potentiates pancreatic tumor cell proliferation, survival, and invasive properties and interferes with its interaction to extracellular matrix proteins." **Mol Cancer Res** 5(4): 309-320.
- Chauhan, S. C., M. C. Ebeling, D. M. Maher, M. D. Koch, A. Watanabe, H. Aburatani, Y. Lio and M. Jaggi (2012). "MUC13 mucin augments pancreatic tumorigenesis." **Mol Cancer Ther** 11(1): 24-33.
- Chen, X., Y. Ba, L. Ma, X. Cai, Y. Yin, K. Wang, J. Guo, Y. Zhang, J. Chen, X. Guo, Q. Li, X. Li, W. Wang, J. Wang, X. Jiang, Y. Xiang, C. Xu, P. Zheng, J. Zhang, R. Li, H. Zhang, X. Shang, T. Gong, G. Ning, K. Zen and C. Y. Zhang (2008). "Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases." **Cell Res** 18(10): 997-1006.
- Chendrimada, T. P., K. J. Finn, X. Ji, D. Baillat, R. I. Gregory, S. A. Liebhaber, A. E. Pasquinelli and R. Shiekhattar (2007). "MicroRNA silencing through RISC recruitment of eIF6." **Nature** 447(7146): 823-828.

- Cheng, H. Y., J. W. Papp, O. Varlamova, H. Dziema, B. Russell, J. P. Curfman, T. Nakazawa, K. Shimizu, H. Okamura, S. Impey and K. Obrietan (2007). "microRNA modulation of circadian-clock period and entrainment." **Neuron** 54(5): 813-829.
- Chi, S. W., J. B. Zang, A. Mele and R. B. Darnell (2009). "Argonaute HITS-CLIP decodes microRNA-mRNA interaction maps." **Nature** 460(7254): 479-486.
- Coller, J. and R. Parker (2004). "Eukaryotic mRNA decapping." **Annu Rev Biochem** 73: 861-890.
- Colley, K. J. (1997). "Golgi localization of glycosyltransferases: more questions than answers." **Glycobiology** 7(1): 1-13.
- Colucci, G., F. Giuliani, V. Gebbia, M. Biglietto, P. Rabitti, G. Uomo, S. Cigolari, A. Testa, E. Maiello and M. Lopez (2002). "Gemcitabine alone or with cisplatin for the treatment of patients with locally advanced and/or metastatic pancreatic carcinoma: a prospective, randomized phase III study of the Gruppo Oncologia dell'Italia Meridionale." **Cancer** 94(4): 902-910.
- Conroy, T., C. Gavaille and A. Adenis (2011). "Metastatic pancreatic cancer: old drugs, new paradigms." **Curr Opin Oncol** 23(4): 390-395.
- Conroy, T. and E. Mitry (2011). "[Chemotherapy of metastatic pancreatic adenocarcinoma: challenges and encouraging results]." **Bull Cancer** 98(12): 1439-1446.
- Crane, C. H., G. R. Varadhachary, J. S. Yordy, G. A. Staerke, M. M. Javle, H. Safran, W. Haque, B. D. Hobbs, S. Krishnan, J. B. Fleming, P. Das, J. E. Lee, J. L. Abbruzzese and R. A. Wolff (2011). "Phase II trial of cetuximab, gemcitabine, and oxaliplatin followed by chemoradiation with cetuximab for locally advanced (T4) pancreatic adenocarcinoma: correlation of Smad4(Dpc4) immunostaining with pattern of disease progression." **J Clin Oncol** 29(22): 3037-3043.
- Crepin, M., N. Porchet, J. P. Aubert and P. Degand (1990). "Diversity of the peptide moiety of human airway mucins." **Biorheology** 27(3-4): 471-484.
- Cullinan, S. A., C. G. Moertel, T. R. Fleming, J. R. Rubin, J. E. Krook, L. K. Everson, H. E. Windschitl, D. I. Twito, R. F. Marschke, J. F. Foley and et al. (1985). "A comparison of three chemotherapeutic regimens in the treatment of advanced pancreatic and gastric carcinoma. Fluorouracil vs fluorouracil and doxorubicin vs fluorouracil, doxorubicin, and mitomycin." **JAMA** 253(14): 2061-2067.
- Dahiya, R., K. S. Kwak, J. C. Byrd, S. Ho, W. H. Yoon and Y. S. Kim (1993). "Mucin synthesis and secretion in various human epithelial cancer cell lines that express the MUC-1 mucin gene." **Cancer Res** 53(6): 1437-1443.
- Delpu, Y., N. Hanoun, H. Lulka, F. Sicard, J. Selves, L. Buscail, J. Torrisani and P. Cordelier (2011). "Genetic and epigenetic alterations in pancreatic carcinogenesis." **Curr Genomics** 12(1): 15-24.
- Delpu, Y., H. Lulka, F. Sicard, N. Saint-Laurent, F. Lopez, N. Hanoun, L. Buscail, P. Cordelier and J. Torrisani (2013). "The rescue of miR-148a expression in pancreatic cancer: an inappropriate therapeutic tool." **PLoS One** 8(1): e55513.
- Dennis, J. W., M. Granovsky and C. E. Warren (1999). "Glycoprotein glycosylation and cancer progression." **Biochim Biophys Acta** 1473(1): 21-34.
- Desseyn, J. L., V. Gouyer and D. Tetaert (2008). Architecture of the gel-forming mucins. The Epithelial Mucins: Structure/Function. Roles in Cancer and Inflammatory Diseases. I. Van Seuningem. Kerala, India, Research Signpost: 1-16.
- Ding, X. C. and H. Grosshans (2009). "Repression of *C. elegans* microRNA targets at the initiation level of translation requires GW182 proteins." **EMBO J** 28(3): 213-222.
- Doench, J. G. and P. A. Sharp (2004). "Specificity of microRNA target selection in translational repression." **Genes Dev** 18(5): 504-511.

- du Rieu, M. C., J. Torrisani, J. Selves, T. Al Saati, A. Souque, M. Dufresne, G. J. Tsongalis, A. A. Suriawinata, N. Carrere, L. Buscail and P. Cordelier (2010). "MicroRNA-21 is induced early in pancreatic ductal adenocarcinoma precursor lesions." **Clin Chem** 56(4): 603-612.
- Ducreux, M., P. Rougier, J. P. Pignon, J. Y. Douillard, J. F. Seitz, R. Bugat, J. F. Bosset, Y. Merouche, J. L. Raoul, M. Ychou, A. Adenis, F. Berthault-Cvitkovic and M. Luboinski (2002). "A randomised trial comparing 5-FU with 5-FU plus cisplatin in advanced pancreatic carcinoma." **Ann Oncol** 13(8): 1185-1191.
- Dugas, J. C., T. L. Cuellar, A. Scholze, B. Ason, A. Ibrahim, B. Emery, J. L. Zamanian, L. C. Foo, M. T. McManus and B. A. Barres (2010). "Dicer1 and miR-219 Are required for normal oligodendrocyte differentiation and myelination." **Neuron** 65(5): 597-611.
- El-Shami, M., D. Pontier, S. Lahmy, L. Braun, C. Picart, D. Vega, M. A. Hakimi, S. E. Jacobsen, R. Cooke and T. Lagrange (2007). "Reiterated WG/GW motifs form functionally and evolutionarily conserved ARGONAUTE-binding platforms in RNAi-related components." **Genes Dev** 21(20): 2539-2544.
- Elbashir, S. M., J. Harborth, W. Lendeckel, A. Yalcin, K. Weber and T. Tuschl (2001). "Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells." **Nature** 411(6836): 494-498.
- Elmen, J., M. Lindow, S. Schutz, M. Lawrence, A. Petri, S. Obad, M. Lindholm, M. Hedtjarn, H. F. Hansen, U. Berger, S. Gullans, P. Kearney, P. Sarnow, E. M. Straarup and S. Kauppinen (2008a). "LNA-mediated microRNA silencing in non-human primates." **Nature** 452(7189): 896-899.
- Elmen, J., M. Lindow, A. Silahatoglu, M. Bak, M. Christensen, A. Lind-Thomsen, M. Hedtjarn, J. B. Hansen, H. F. Hansen, E. M. Straarup, K. McCullagh, P. Kearney and S. Kauppinen (2008b). "Antagonism of microRNA-122 in mice by systemically administered LNA-antimiR leads to up-regulation of a large set of predicted target mRNAs in the liver." **Nucleic Acids Res** 36(4): 1153-1162.
- Engels, B. M. and G. Hutvagner (2006). "Principles and effects of microRNA-mediated post-transcriptional gene regulation." **Oncogene** 25(46): 6163-6169.
- Erkan, M., S. Hausmann, C. W. Michalski, A. A. Fingerle, M. Dobritz, J. Kleeff and H. Friess (2012). "The role of stroma in pancreatic cancer: diagnostic and therapeutic implications." **Nat Rev Gastroenterol Hepatol** 9(8): 454-467.
- Escande, F., L. Lemaître, N. Moniaux, S. K. Batra, J. P. Aubert and M. P. Buisine (2002). "Genomic organization of MUC4 mucin gene. Towards the characterization of splice variants." **Eur J Biochem** 269(15): 3637-3644.
- Eulalio, A., E. Huntzinger and E. Izaurralde (2008). "GW182 interaction with Argonaute is essential for miRNA-mediated translational repression and mRNA decay." **Nat Struct Mol Biol** 15(4): 346-353.
- Evans, J. M. and M. Collins (2008). "Clinically diagnosed glomus vagale tumour treated with external beam radiotherapy: a review of the published reports." **J Med Imaging Radiat Oncol** 52(6): 617-621.
- Eystathioy, T., E. K. Chan, S. A. Tenenbaum, J. D. Keene, K. Griffith and M. J. Fritzler (2002). "A phosphorylated cytoplasmic autoantigen, GW182, associates with a unique population of human mRNAs within novel cytoplasmic speckles." **Mol Biol Cell** 13(4): 1338-1351.
- Eystathioy, T., A. Jakymiw, E. K. Chan, B. Seraphin, N. Cougot and M. J. Fritzler (2003). "The GW182 protein colocalizes with mRNA degradation associated proteins hDcp1 and hLSm4 in cytoplasmic GW bodies." **RNA** 9(10): 1171-1173.
- Fabian, M. R. and N. Sonenberg (2012). "The mechanics of miRNA-mediated gene silencing: a look under the hood of miRISC." **Nat Struct Mol Biol** 19(6): 586-593.

- Fabian, M. R., N. Sonenberg and W. Filipowicz (2010). "Regulation of mRNA translation and stability by microRNAs." **Annu Rev Biochem** 79: 351-379.
- Faraoni, I., F. R. Antonetti, J. Cardone and E. Bonmassar (2009). "miR-155 gene: a typical multifunctional microRNA." **Biochim Biophys Acta** 1792(6): 497-505.
- Fauquette, V., S. Aubert, S. Groux-Degroote, B. Hemon, N. Porchet, I. Van Seuningen and P. Pigny (2007). "Transcription factor AP-2alpha represses both the mucin MUC4 expression and pancreatic cancer cell proliferation." **Carcinogenesis** 28(11): 2305-2312.
- Fauquette, V., M. Perrais, S. Cerulis, N. Jonckheere, M. P. Ducourouble, J. P. Aubert, P. Pigny and I. Van Seuningen (2005). "The antagonistic regulation of human MUC4 and ErbB-2 genes by the Ets protein PEA3 in pancreatic cancer cells: implications for the proliferation/differentiation balance in the cells." **Biochem J** 386(Pt 1): 35-45.
- Fils-Aime, N., M. Dai, J. Guo, M. El-Mousawi, B. Kahramangil, J. C. Neel and J. J. Lebrun (2013). "MicroRNA-584 and the protein phosphatase and actin regulator 1 (PHACTR1), a new signaling route through which transforming growth factor-beta Mediates the migration and actin dynamics of breast cancer cells." **J Biol Chem** 288(17): 11807-11823.
- Fischer, B. M., J. G. Cuellar, M. L. Diehl, A. M. deFreytas, J. Zhang, K. L. Carraway and J. A. Voynow (2003). "Neutrophil elastase increases MUC4 expression in normal human bronchial epithelial cells." **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol** 284(4): L671-679.
- Fogh, J., J. M. Fogh and T. Orfeo (1977). "One hundred and twenty-seven cultured human tumor cell lines producing tumors in nude mice." **J Natl Cancer Inst** 59(1): 221-226.
- Frampton, A. E., J. Krell, J. Jacob, J. Stebbing, L. R. Jiao and L. Castellano (2011). "microRNAs as markers of survival and chemoresistance in pancreatic ductal adenocarcinoma." **Expert Rev Anticancer Ther** 11(12): 1837-1842.
- Frampton, A. E., J. Krell, Y. Zhang, J. Stebbing, L. Castellano and L. R. Jiao (2012). "The role of miR-10b in metastatic pancreatic ductal adenocarcinoma." **Surgery** 152(5): 936-938; author reply 938.
- Friedman, R. C., K. K. Farh, C. B. Burge and D. P. Bartel (2009). "Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs." **Genome Res** 19(1): 92-105.
- Furukawa, T., W. P. Duguid, L. Rosenberg, J. Viallet, D. A. Galloway and M. S. Tsao (1996). "Long-term culture and immortalization of epithelial cells from normal adult human pancreatic ducts transfected by the E6E7 gene of human papilloma virus 16." **Am J Pathol** 148(6): 1763-1770.
- Geng, Y., J. R. Marshall and M. R. King (2012). "Glycomechanics of the metastatic cascade: tumor cell-endothelial cell interactions in the circulation." **Ann Biomed Eng** 40(4): 790-805.
- Giovannetti, E., N. Funel, G. J. Peters, M. Del Chiaro, L. A. Erozenski, E. Vasile, L. G. Leon, L. E. Pollina, A. Groen, A. Falcone, R. Danesi, D. Campani, H. M. Verheul and U. Boggi (2010). "MicroRNA-21 in pancreatic cancer: correlation with clinical outcome and pharmacologic aspects underlying its role in the modulation of gemcitabine activity." **Cancer Res** 70(11): 4528-4538.
- Gironella, M., M. Seux, M. J. Xie, C. Cano, R. Tomasini, J. Gommeaux, S. Garcia, J. Nowak, M. L. Yeung, K. T. Jeang, A. Chaix, L. Fazli, Y. Motoo, Q. Wang, P. Rocchi, A. Russo, M. Gleave, J. C. Dagorn, J. L. Iovanna, A. Carrier, M. J. Pebusque and N. J. Dusetti (2007). "Tumor protein 53-induced nuclear protein 1 expression is repressed by miR-155, and its restoration inhibits pancreatic tumor development." **Proc Natl Acad Sci U S A** 104(41): 16170-16175.
- Glinsky, V. V., G. V. Glinsky, K. Rittenhouse-Olson, M. E. Huflejt, O. V. Glinskii, S. L. Deutscher and T. P. Quinn (2001). "The role of Thomsen-Friedenreich antigen in

- adhesion of human breast and prostate cancer cells to the endothelium." **Cancer Res** 61(12): 4851-4857.
- Greither, T., L. F. Grochola, A. Udelnow, C. Lautenschlager, P. Wurl and H. Taubert (2010). "Elevated expression of microRNAs 155, 203, 210 and 222 in pancreatic tumors is associated with poorer survival." **Int J Cancer** 126(1): 73-80.
- Griffiths-Jones, S., H. K. Saini, S. van Dongen and A. J. Enright (2008). "miRBase: tools for microRNA genomics." **Nucleic Acids Res** 36(Database issue): D154-158.
- Grimson, A., K. K. Farh, W. K. Johnston, P. Garrett-Engele, L. P. Lim and D. P. Bartel (2007). "MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing." **Mol Cell** 27(1): 91-105.
- Gross, M. S., V. Guyonnet-Duperat, N. Porchet, A. Bernheim, J. P. Aubert and V. C. Nguyen (1992). "Mucin 4 (MUC4) gene: regional assignment (3q29) and RFLP analysis." **Ann Genet** 35(1): 21-26.
- Gu, S., L. Jin, F. Zhang, P. Sarnow and M. A. Kay (2009). "Biological basis for restriction of microRNA targets to the 3' untranslated region in mammalian mRNAs." **Nat Struct Mol Biol** 16(2): 144-150.
- Gupta, B. K., D. M. Maher, M. C. Ebeling, V. Sundram, M. D. Koch, D. W. Lynch, T. Bohlmeier, A. Watanabe, H. Aburatani, S. E. Puumala, M. Jaggi and S. C. Chauhan (2012). "Increased expression and aberrant localization of mucin 13 in metastatic colon cancer." **J Histochem Cytochem** 60(11): 822-831.
- Habbe, N., J. B. Koorstra, J. T. Mendell, G. J. Offerhaus, J. K. Ryu, G. Feldmann, M. E. Mullendore, M. G. Goggins, S. M. Hong and A. Maitra (2009). "MicroRNA miR-155 is a biomarker of early pancreatic neoplasia." **Cancer Biol Ther** 8(4): 340-346.
- Hafner, M., M. Landthaler, L. Burger, M. Khorshid, J. Hausser, P. Berninger, A. Rothballer, M. Ascano, A. C. Jungkamp, M. Munschauer, A. Ulrich, G. S. Wardle, S. Dewell, M. Zavolan and T. Tuschl (2010). "PAR-CLIP--a method to identify transcriptome-wide the binding sites of RNA binding proteins." **J Vis Exp**(41).
- Hanoun, N., C. Bureau, T. Diab, O. Gayet, N. Dusetti, J. Selves, J. P. Vinel, L. Buscail, P. Cordelier and J. Torrisani (2010a). "The SV2 variant of KLF6 is down-regulated in hepatocellular carcinoma and displays anti-proliferative and pro-apoptotic functions." **J Hepatol** 53(5): 880-888.
- Hanoun, N., Y. Delpu, A. A. Suriawinata, B. Bournet, C. Bureau, J. Selves, G. J. Tsongalis, M. Dufresne, L. Buscail, P. Cordelier and J. Torrisani (2010b). "The silencing of microRNA 148a production by DNA hypermethylation is an early event in pancreatic carcinogenesis." **Clin Chem** 56(7): 1107-1118.
- Haridas, D., S. Chakraborty, M. P. Ponnusamy, I. Lakshmanan, S. Rachagani, E. Cruz, S. Kumar, S. Das, S. M. Lele, J. M. Anderson, U. A. Wittel, M. A. Hollingsworth and S. K. Batra (2011). "Pathobiological implications of MUC16 expression in pancreatic cancer." **PLoS One** 6(10): e26839.
- Heinemann, V., R. Labianca, A. Hinke and C. Louvet (2007). "Increased survival using platinum analog combined with gemcitabine as compared to single-agent gemcitabine in advanced pancreatic cancer: pooled analysis of two randomized trials, the GERCOR/GISCAD intergroup study and a German multicenter study." **Ann Oncol** 18(10): 1652-1659.
- Heinemann, V., D. Quietzsch, F. Gieseler, M. Gonnermann, H. Schonekas, A. Rost, H. Neuhaus, C. Haag, M. Clemens, B. Heinrich, U. Vehling-Kaiser, M. Fuchs, D. Fleckenstein, W. Gesierich, D. Uthgenannt, H. Einsele, A. Holstege, A. Hinke, A. Schalhorn and R. Wilkowski (2006). "Randomized phase III trial of gemcitabine plus cisplatin compared with gemcitabine alone in advanced pancreatic cancer." **J Clin Oncol** 24(24): 3946-3952.

- Henke, J. I., D. Goergen, J. Zheng, Y. Song, C. G. Schuttler, C. Fehr, C. Junemann and M. Niepmann (2008). "microRNA-122 stimulates translation of hepatitis C virus RNA." **EMBO J** 27(24): 3300-3310.
- Herrmann, R., G. Bodoky, T. Ruhstaller, B. Glimelius, E. Bajetta, J. Schuller, P. Saletti, J. Bauer, A. Figuer, B. Pestalozzi, C. H. Kohne, W. Mingrone, S. M. Stemmer, K. Tamas, G. V. Kornek, D. Koeberle, S. Cina, J. Bernhard, D. Dietrich and W. Scheithauer (2007). "Gemcitabine plus capecitabine compared with gemcitabine alone in advanced pancreatic cancer: a randomized, multicenter, phase III trial of the Swiss Group for Clinical Cancer Research and the Central European Cooperative Oncology Group." **J Clin Oncol** 25(16): 2212-2217.
- Hidalgo, M., D. Castellano, L. Paz-Ares, C. Gravalos, M. Diaz-Puente, R. Hitt, S. Alonso and H. Cortes-Funes (1999). "Phase I-II study of gemcitabine and fluorouracil as a continuous infusion in patients with pancreatic cancer." **J Clin Oncol** 17(2): 585-592.
- Hingorani, S. R., E. F. Petricoin, A. Maitra, V. Rajapakse, C. King, M. A. Jacobetz, S. Ross, T. P. Conrads, T. D. Veenstra, B. A. Hitt, Y. Kawaguchi, D. Johann, L. A. Liotta, H. C. Crawford, M. E. Putt, T. Jacks, C. V. Wright, R. H. Hruban, A. M. Lowy and D. A. Tuveson (2003). "Preinvasive and invasive ductal pancreatic cancer and its early detection in the mouse." **Cancer Cell** 4(6): 437-450.
- Hruban, R. H., N. V. Adsay, J. Albores-Saavedra, C. Compton, E. S. Garrett, S. N. Goodman, S. E. Kern, D. S. Klimstra, G. Kloppel, D. S. Longnecker, J. Luttges and G. J. Offerhaus (2001). "Pancreatic intraepithelial neoplasia: a new nomenclature and classification system for pancreatic duct lesions." **Am J Surg Pathol** 25(5): 579-586.
- Hruban, R. H., A. Maitra, S. E. Kern and M. Goggins (2007). "Precursors to pancreatic cancer." **Gastroenterol Clin North Am** 36(4): 831-849, vi.
- Hruban, R. H., K. Takaori, D. S. Klimstra, N. V. Adsay, J. Albores-Saavedra, A. V. Biankin, S. A. Biankin, C. Compton, N. Fukushima, T. Furukawa, M. Goggins, Y. Kato, G. Kloppel, D. S. Longnecker, J. Luttges, A. Maitra, G. J. Offerhaus, M. Shimizu and S. Yonezawa (2004). "An illustrated consensus on the classification of pancreatic intraepithelial neoplasia and intraductal papillary mucinous neoplasms." **Am J Surg Pathol** 28(8): 977-987.
- Huguet, F., T. Andre, P. Hammel, P. Artru, J. Balosso, F. Selle, E. Deniaud-Alexandre, P. Ruzsniwski, E. Touboul, R. Labianca, A. de Gramont and C. Louvet (2007). "Impact of chemoradiotherapy after disease control with chemotherapy in locally advanced pancreatic adenocarcinoma in GERCOR phase II and III studies." **J Clin Oncol** 25(3): 326-331.
- Humeau, M., J. Torrisani and P. Cordelier (2013). "miRNA in clinical practice: pancreatic cancer." **Clin Biochem** 46(10-11): 933-936.
- Hummel, R., D. J. Hussey and J. Haier (2010). "MicroRNAs: predictors and modifiers of chemo- and radiotherapy in different tumour types." **Eur J Cancer** 46(2): 298-311.
- Humphreys, D. T., B. J. Westman, D. I. Martin and T. Preiss (2005). "MicroRNAs control translation initiation by inhibiting eukaryotic initiation factor 4E/cap and poly(A) tail function." **Proc Natl Acad Sci U S A** 102(47): 16961-16966.
- Huntzinger, E. and E. Izaurralde (2011). "Gene silencing by microRNAs: contributions of translational repression and mRNA decay." **Nat Rev Genet** 12(2): 99-110.
- Hutvagner, G., J. McLachlan, A. E. Pasquinelli, E. Balint, T. Tuschl and P. D. Zamore (2001). "A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA." **Science** 293(5531): 834-838.
- Ingelfinger, D., D. J. Arndt-Jovin, R. Luhrmann and T. Achsel (2002). "The human LSM1-7 proteins colocalize with the mRNA-degrading enzymes Dcp1/2 and Xrnl in distinct cytoplasmic foci." **RNA** 8(12): 1489-1501.

- Iorio, M. V. and C. M. Croce (2012). "MicroRNA dysregulation in cancer: diagnostics, monitoring and therapeutics. A comprehensive review." **EMBO Mol Med** 4(3): 143-159.
- Jakymiw, A., K. M. Pauley, S. Li, K. Ikeda, S. Lian, T. Eystathioy, M. Satoh, M. J. Fritzler and E. K. Chan (2007). "The role of GW/P-bodies in RNA processing and silencing." **J Cell Sci** 120(Pt 8): 1317-1323.
- Ji, Q., X. Hao, M. Zhang, W. Tang, M. Yang, L. Li, D. Xiang, J. T. Desano, G. T. Bommer, D. Fan, E. R. Fearon, T. S. Lawrence and L. Xu (2009). "MicroRNA miR-34 inhibits human pancreatic cancer tumor-initiating cells." **PLoS One** 4(8): e6816.
- Jiang, S., H. W. Zhang, M. H. Lu, X. H. He, Y. Li, H. Gu, M. F. Liu and E. D. Wang (2010). "MicroRNA-155 functions as an OncomiR in breast cancer by targeting the suppressor of cytokine signaling 1 gene." **Cancer Res** 70(8): 3119-3127.
- Jinek, M. and J. A. Doudna (2009). "A three-dimensional view of the molecular machinery of RNA interference." **Nature** 457(7228): 405-412.
- John, B., A. J. Enright, A. Aravin, T. Tuschl, C. Sander and D. S. Marks (2004). "Human MicroRNA targets." **PLoS Biol** 2(11): e363.
- Johnson, C. D., A. Esquela-Kerscher, G. Stefani, M. Byrom, K. Kelnar, D. Ovcharenko, M. Wilson, X. Wang, J. Shelton, J. Shingara, L. Chin, D. Brown and F. J. Slack (2007). "The let-7 microRNA represses cell proliferation pathways in human cells." **Cancer Res** 67(16): 7713-7722.
- Jonckheere, N., M. Perrais, C. Mariette, S. K. Batra, J. P. Aubert, P. Pigny and I. Van Seuningen (2004). "A role for human MUC4 mucin gene, the ErbB2 ligand, as a target of TGF-beta in pancreatic carcinogenesis." **Oncogene** 23(34): 5729-5738.
- Jonckheere, N., N. Skrypek, J. Merlin, A. F. Dessein, P. Dumont, E. Leteurtre, A. Harris, J. L. Desseyn, C. Susini, F. Frenois and I. Van Seuningen (2012). "The Mucin MUC4 and Its Membrane Partner ErbB2 Regulate Biological Properties of Human CAPAN-2 Pancreatic Cancer Cells via Different Signalling Pathways." **PLoS One** 7(2): e32232.
- Jonckheere, N., N. Skrypek and I. van Seuningen (2010). "Mucins and pancreatic cancer." **Cancers** 2(4): 1794-1812.
- Jonckheere, N. and I. Van Seuningen (2008a). The ever growing family of membrane-bound mucins. The Epithelial Mucins: Structure/Function. Roles in Cancer and Inflammatory Diseases. I. Van Seuningen. Kerala, India, Research Signpost: 17-38.
- Jonckheere, N. and I. Van Seuningen (2008b). "The membrane-bound mucins: how large O-glycoproteins play key roles in epithelial cancers and hold promise as biological tools for gene-based and immunotherapies." **Crit Rev Oncog** 14(2-3): 177-196.
- Jonckheere, N. and I. Van Seuningen (2010). "The membrane-bound mucins: From cell signalling to transcriptional regulation and expression in epithelial cancers." **Biochimie** 92(1): 1-11.
- Jonckheere, N., A. Vincent, M. Perrais, M. P. Ducourouble, A. K. Male, J. P. Aubert, P. Pigny, K. L. Carraway, J. N. Freund, I. B. Renes and I. Van Seuningen (2007). "The human mucin MUC4 is transcriptionally regulated by caudal-related homeobox, hepatocyte nuclear factors, forkhead box A, and GATA endodermal transcription factors in epithelial cancer cells." **J Biol Chem** 282(31): 22638-22650.
- Kar, S., M. Deb, D. Sengupta, A. Shilpi, S. Parbin, J. Torrisani, S. Pradhan and S. Patra (2012). "An insight into the various regulatory mechanisms modulating human DNA methyltransferase 1 stability and function." **Epigenetics** 7(9): 994-1007.
- Kasinski, A. L. and F. J. Slack (2011). "Epigenetics and genetics. MicroRNAs en route to the clinic: progress in validating and targeting microRNAs for cancer therapy." **Nat Rev Cancer** 11(12): 849-864.

- Kedde, M., M. J. Strasser, B. Boldajipour, J. A. Oude Vrielink, K. Slanchev, C. le Sage, R. Nagel, P. M. Voorhoeve, J. van Duijse, U. A. Orom, A. H. Lund, A. Perrakis, E. Raz and R. Agami (2007). "RNA-binding protein Dnd1 inhibits microRNA access to target mRNA." **Cell** 131(7): 1273-1286.
- Klein, A. P., K. A. Brune, G. M. Petersen, M. Goggins, A. C. Tersmette, G. J. Offerhaus, C. Griffin, J. L. Cameron, C. J. Yeo, S. Kern and R. H. Hruban (2004). "Prospective risk of pancreatic cancer in familial pancreatic cancer kindreds." **Cancer Res** 64(7): 2634-2638.
- Klinkenbijl, J. H., J. Jeekel, T. Sahmoud, R. van Pel, M. L. Couvreur, C. H. Veenhof, J. P. Arnaud, D. G. Gonzalez, L. T. de Wit, A. Hennipman and J. Wils (1999). "Adjuvant radiotherapy and 5-fluorouracil after curative resection of cancer of the pancreas and perampullary region: phase III trial of the EORTC gastrointestinal tract cancer cooperative group." **Ann Surg** 230(6): 776-782; discussion 782-774.
- Kloosterman, W. P., E. Wienholds, R. F. Ketting and R. H. Plasterk (2004). "Substrate requirements for let-7 function in the developing zebrafish embryo." **Nucleic Acids Res** 32(21): 6284-6291.
- Kocerha, J., M. A. Faghihi, M. A. Lopez-Toledano, J. Huang, A. J. Ramsey, M. G. Caron, N. Sales, D. Willoughby, J. Elmen, H. F. Hansen, H. Orum, S. Kauppinen, P. J. Kenny and C. Wahlestedt (2009). "MicroRNA-219 modulates NMDA receptor-mediated neurobehavioral dysfunction." **Proc Natl Acad Sci U S A** 106(9): 3507-3512.
- Komatsu, M., C. A. Carraway, N. L. Fregien and K. L. Carraway (1997). "Reversible disruption of cell-matrix and cell-cell interactions by overexpression of sialomucin complex." **J Biol Chem** 272(52): 33245-33254.
- Komatsu, M., S. Jepson, M. E. Arango, C. A. Carothers Carraway and K. L. Carraway (2001). "Muc4/sialomucin complex, an intramembrane modulator of ErbB2/HER2/Neu, potentiates primary tumor growth and suppresses apoptosis in a xenotransplanted tumor." **Oncogene** 20(4): 461-470.
- Krek, A., D. Grun, M. N. Poy, R. Wolf, L. Rosenberg, E. J. Epstein, P. MacMenamin, I. da Piedade, K. C. Gunsalus, M. Stoffel and N. Rajewsky (2005). "Combinatorial microRNA target predictions." **Nat Genet** 37(5): 495-500.
- Krishnan, S., V. Rana, N. A. Janjan, G. R. Varadhachary, J. L. Abbruzzese, P. Das, M. E. Delclos, M. S. Gould, D. B. Evans, R. A. Wolff and C. H. Crane (2007). "Induction chemotherapy selects patients with locally advanced, unresectable pancreatic cancer for optimal benefit from consolidative chemoradiation therapy." **Cancer** 110(1): 47-55.
- Kutanzi, K. R., O. V. Yurchenko, F. A. Beland, V. F. Checkhun and I. P. Pogribny (2011). "MicroRNA-mediated drug resistance in breast cancer." **Clin Epigenetics** 2(2): 171-185.
- Lal, G., G. Liu, B. Schmocker, P. Kaurah, H. Ozcelik, S. A. Narod, M. Redston and S. Gallinger (2000). "Inherited predisposition to pancreatic adenocarcinoma: role of family history and germ-line p16, BRCA1, and BRCA2 mutations." **Cancer Res** 60(2): 409-416.
- Lanford, R. E., M. J. Evans, V. Lohmann, B. Lindenbach, M. Gale, Jr., B. Rehmann, K. M. Chang and S. M. Lemon (2009). "The accelerating pace of HCV research: a summary of the 15th International Symposium on Hepatitis C Virus And Related Viruses." **Gastroenterology** 136(1): 9-16.
- Lanford, R. E., E. S. Hildebrandt-Eriksen, A. Petri, R. Persson, M. Lindow, M. E. Munk, S. Kauppinen and H. Orum (2010). "Therapeutic silencing of microRNA-122 in primates with chronic hepatitis C virus infection." **Science** 327(5962): 198-201.

- Lau, N. C., L. P. Lim, E. G. Weinstein and D. P. Bartel (2001). "An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*." **Science** 294(5543): 858-862.
- Lawrie, C. H., S. Gal, H. M. Dunlop, B. Pushkaran, A. P. Liggins, K. Pulford, A. H. Banham, F. Pezzella, J. Boulwood, J. S. Wainscoat, C. S. Hatton and A. L. Harris (2008). "Detection of elevated levels of tumour-associated microRNAs in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma." **Br J Haematol** 141(5): 672-675.
- Lee, E. J., Y. Gusev, J. Jiang, G. J. Nuovo, M. R. Lerner, W. L. Frankel, D. L. Morgan, R. G. Postier, D. J. Brackett and T. D. Schmittgen (2007). "Expression profiling identifies microRNA signature in pancreatic cancer." **Int J Cancer** 120(5): 1046-1054.
- Lee, K. M., C. Nguyen, A. B. Ulrich, P. M. Pour and M. M. Ouellette (2003a). "Immortalization with telomerase of the Nestin-positive cells of the human pancreas." **Biochem Biophys Res Commun** 301(4): 1038-1044.
- Lee, R. C., R. L. Feinbaum and V. Ambros (1993). "The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*." **Cell** 75(5): 843-854.
- Lee, Y., C. Ahn, J. Han, H. Choi, J. Kim, J. Yim, J. Lee, P. Provost, O. Radmark, S. Kim and V. N. Kim (2003b). "The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing." **Nature** 425(6956): 415-419.
- Lee, Y., K. Jeon, J. T. Lee, S. Kim and V. N. Kim (2002). "MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization." **EMBO J** 21(17): 4663-4670.
- Lee, Y. S. and A. Dutta (2007). "The tumor suppressor microRNA let-7 represses the HMGA2 oncogene." **Genes Dev** 21(9): 1025-1030.
- Leung, A. K., A. G. Young, A. Bhutkar, G. X. Zheng, A. D. Bosson, C. B. Nielsen and P. A. Sharp (2011). "Genome-wide identification of Ago2 binding sites from mouse embryonic stem cells with and without mature microRNAs." **Nat Struct Mol Biol** 18(2): 237-244.
- Lewis, B. P., I. H. Shih, M. W. Jones-Rhoades, D. P. Bartel and C. B. Burge (2003). "Prediction of mammalian microRNA targets." **Cell** 115(7): 787-798.
- Lian, S. L., S. Li, G. X. Abadal, B. A. Pauley, M. J. Fritzler and E. K. Chan (2009). "The C-terminal half of human Ago2 binds to multiple GW-rich regions of GW182 and requires GW182 to mediate silencing." **RNA** 15(5): 804-813.
- Lieber, M., J. Mazzetta, W. Nelson-Rees, M. Kaplan and G. Todaro (1975). "Establishment of a continuous tumor-cell line (panc-1) from a human carcinoma of the exocrine pancreas." **Int J Cancer** 15(5): 741-747.
- Lin, M., D. Cai and M. Luo (2003). "Identification of chromosomal imbalances in pancreatic carcinoma using comparative genomic hybridization." **Chin Med J (Engl)** 116(8): 1156-1160.
- Liu, J., M. A. Carmell, F. V. Rivas, C. G. Marsden, J. M. Thomson, J. J. Song, S. M. Hammond, L. Joshua-Tor and G. J. Hannon (2004). "Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi." **Science** 305(5689): 1437-1441.
- Liu, J., J. Gao, Y. Du, Z. Li, Y. Ren, J. Gu, X. Wang, Y. Gong, W. Wang and X. Kong (2012). "Combination of plasma microRNAs with serum CA19-9 for early detection of pancreatic cancer." **Int J Cancer** 131(3): 683-691.
- Loehrer, P. J., Sr., Y. Feng, H. Cardenas, L. Wagner, J. M. Brell, D. Cella, P. Flynn, R. K. Ramanathan, C. H. Crane, S. R. Alberts and A. B. Benson, 3rd (2011). "Gemcitabine alone versus gemcitabine plus radiotherapy in patients with locally advanced pancreatic cancer: an Eastern Cooperative Oncology Group trial." **J Clin Oncol** 29(31): 4105-4112.
- Louvet, C., R. Labianca, P. Hammel, G. Lledo, M. G. Zampino, T. Andre, A. Zaniboni, M. Ducreux, E. Aitini, J. Taieb, R. Faroux, C. Lepere and A. de Gramont (2005).

- "Gemcitabine in combination with oxaliplatin compared with gemcitabine alone in locally advanced or metastatic pancreatic cancer: results of a GERCOR and GISCAD phase III trial." **J Clin Oncol** 23(15): 3509-3516.
- Lowenfels, A. B. and P. Maisonneuve (2006). "Epidemiology and risk factors for pancreatic cancer." **Best Pract Res Clin Gastroenterol** 20(2): 197-209.
- Lu, J., G. Getz, E. A. Miska, E. Alvarez-Saavedra, J. Lamb, D. Peck, A. Sweet-Cordero, B. L. Ebert, R. H. Mak, A. A. Ferrando, J. R. Downing, T. Jacks, H. R. Horvitz and T. R. Golub (2005). "MicroRNA expression profiles classify human cancers." **Nature** 435(7043): 834-838.
- Mahlamaki, E. H., M. Barlund, M. Tanner, L. Gorunova, M. Hoglund, R. Karhu and A. Kallioniemi (2002). "Frequent amplification of 8q24, 11q, 17q, and 20q-specific genes in pancreatic cancer." **Genes Chromosomes Cancer** 35(4): 353-358.
- Mariette, C., M. Perrais, E. Leteurtre, N. Jonckheere, B. Hemon, P. Pigny, S. Batra, J. P. Aubert, J. P. Triboulet and I. Van Seuningen (2004). "Transcriptional regulation of human mucin MUC4 by bile acids in oesophageal cancer cells is promoter-dependent and involves activation of the phosphatidylinositol 3-kinase signalling pathway." **Biochem J** 377(Pt 3): 701-708.
- Martinez, J. and T. Tuschl (2004). "RISC is a 5' phosphomonoester-producing RNA endonuclease." **Genes Dev** 18(9): 975-980.
- Matano, E., P. Tagliaferri, A. Libroia, V. Damiano, A. Fabbrocini, S. De Lorenzo and A. R. Bianco (2000). "Gemcitabine combined with continuous infusion 5-fluorouracil in advanced and symptomatic pancreatic cancer: a clinical benefit-oriented phase II study." **Br J Cancer** 82(11): 1772-1775.
- Mathonnet, G., M. R. Fabian, Y. V. Svitkin, A. Parsyan, L. Huck, T. Murata, S. Biffo, W. C. Merrick, E. Darzynkiewicz, R. S. Pillai, W. Filipowicz, T. F. Duchaine and N. Sonenberg (2007). "MicroRNA inhibition of translation initiation in vitro by targeting the cap-binding complex eIF4F." **Science** 317(5845): 1764-1767.
- Mattick, J. S. and I. V. Makunin (2005). "Small regulatory RNAs in mammals." **Hum Mol Genet** 14 Spec No 1: R121-132.
- Meister, G., M. Landthaler, Y. Dorsett and T. Tuschl (2004). "Sequence-specific inhibition of microRNA- and siRNA-induced RNA silencing." **RNA** 10(3): 544-550.
- Merlin, J., L. Stechly, S. de Beauce, D. Monte, E. Leteurtre, I. van Seuningen, G. Huet and P. Pigny (2011). "Galectin-3 regulates MUC1 and EGFR cellular distribution and EGFR downstream pathways in pancreatic cancer cells." **Oncogene** 30(22): 2514-2525.
- Mitchell, P. S., R. K. Parkin, E. M. Kroh, B. R. Fritz, S. K. Wyman, E. L. Pogosova-Agadjanyan, A. Peterson, J. Noteboom, K. C. O'Briant, A. Allen, D. W. Lin, N. Urban, C. W. Drescher, B. S. Knudsen, D. L. Stirewalt, R. Gentleman, R. L. Vessella, P. S. Nelson, D. B. Martin and M. Tewari (2008). "Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection." **Proc Natl Acad Sci U S A** 105(30): 10513-10518.
- Miwa, M., M. Ura, M. Nishida, N. Sawada, T. Ishikawa, K. Mori, N. Shimma, I. Umeda and H. Ishitsuka (1998). "Design of a novel oral fluoropyrimidine carbamate, capecitabine, which generates 5-fluorouracil selectively in tumours by enzymes concentrated in human liver and cancer tissue." **Eur J Cancer** 34(8): 1274-1281.
- Moniaux, N., P. Chaturvedi, G. C. Varshney, J. L. Meza, J. F. Rodriguez-Sierra, J. P. Aubert and S. K. Batra (2007). "Human MUC4 mucin induces ultra-structural changes and tumorigenicity in pancreatic cancer cells." **Br J Cancer** 97(3): 345-357.
- Moniaux, N., F. Escande, N. Porchet, J. P. Aubert and S. K. Batra (2001). "Structural organization and classification of the human mucin genes." **Front Biosci** 6: D1192-1206.

- Moniaux, N., W. M. Junker, A. P. Singh, A. M. Jones and S. K. Batra (2006). "Characterization of human mucin MUC17. Complete coding sequence and organization." **J Biol Chem** 281(33): 23676-23685.
- Moniaux, N., S. Nollet, N. Porchet, P. Degand, A. Laine and J. P. Aubert (1999). "Complete sequence of the human mucin MUC4: a putative cell membrane-associated mucin." **Biochem J** 338 (Pt 2): 325-333.
- Monteys, A. M., R. M. Spengler, J. Wan, L. Tecedor, K. A. Lennox, Y. Xing and B. L. Davidson (2010). "Structure and activity of putative intronic miRNA promoters." **RNA** 16(3): 495-505.
- Moore, M. J., D. Goldstein, J. Hamm, A. Figer, J. R. Hecht, S. Gallinger, H. J. Au, P. Murawa, D. Walde, R. A. Wolff, D. Campos, R. Lim, K. Ding, G. Clark, T. Voskoglou-Nomikos, M. Ptasynski and W. Parulekar (2007). "Erlotinib plus gemcitabine compared with gemcitabine alone in patients with advanced pancreatic cancer: a phase III trial of the National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group." **J Clin Oncol** 25(15): 1960-1966.
- Moriyama, T., K. Ohuchida, K. Mizumoto, J. Yu, N. Sato, T. Nabae, S. Takahata, H. Toma, E. Nagai and M. Tanaka (2009). "MicroRNA-21 modulates biological functions of pancreatic cancer cells including their proliferation, invasion, and chemoresistance." **Mol Cancer Ther** 8(5): 1067-1074.
- Nagaraja, A. K., C. J. Creighton, Z. Yu, H. Zhu, P. H. Gunaratne, J. G. Reid, E. Olokpa, H. Itamochi, N. T. Ueno, S. M. Hawkins, M. L. Anderson and M. M. Matzuk (2010). "A link between mir-100 and FRAP1/mTOR in clear cell ovarian cancer." **Mol Endocrinol** 24(2): 447-463.
- Nagata, K., M. Horinouchi, M. Saitou, M. Higashi, M. Nomoto, M. Goto and S. Yonezawa (2007). "Mucin expression profile in pancreatic cancer and the precursor lesions." **J Hepatobiliary Pancreat Surg** 14(3): 243-254.
- Nakata, K., K. Ohuchida, K. Mizumoto, T. Kayashima, N. Ikenaga, H. Sakai, C. Lin, H. Fujita, T. Otsuka, S. Aishima, E. Nagai, Y. Oda and M. Tanaka (2011). "MicroRNA-10b is overexpressed in pancreatic cancer, promotes its invasiveness, and correlates with a poor prognosis." **Surgery** 150(5): 916-922.
- Neoptolemos, J. P., J. A. Dunn, D. D. Stocken, J. Almond, K. Link, H. Beger, C. Bassi, M. Falconi, P. Pederzoli, C. Dervenis, L. Fernandez-Cruz, F. Lacaine, A. Pap, D. Spooner, D. J. Kerr, H. Friess and M. W. Buchler (2001). "Adjuvant chemoradiotherapy and chemotherapy in resectable pancreatic cancer: a randomised controlled trial." **Lancet** 358(9293): 1576-1585.
- Neoptolemos, J. P., D. D. Stocken, H. Friess, C. Bassi, J. A. Dunn, H. Hickey, H. Beger, L. Fernandez-Cruz, C. Dervenis, F. Lacaine, M. Falconi, P. Pederzoli, A. Pap, D. Spooner, D. J. Kerr and M. W. Buchler (2004). "A randomized trial of chemoradiotherapy and chemotherapy after resection of pancreatic cancer." **N Engl J Med** 350(12): 1200-1210.
- Niepmann, M. (2009). "Activation of hepatitis C virus translation by a liver-specific microRNA." **Cell Cycle** 8(10): 1473-1477.
- Nollet, S., N. Moniaux, J. Maury, D. Petitprez, P. Degand, A. Laine, N. Porchet and J. P. Aubert (1998). "Human mucin gene MUC4: organization of its 5'-region and polymorphism of its central tandem repeat array." **Biochem J** 332 (Pt 3): 739-748.
- Olive, K. P. and D. A. Tuveson (2006). "The use of targeted mouse models for preclinical testing of novel cancer therapeutics." **Clin Cancer Res** 12(18): 5277-5287.
- Orom, U. A., F. C. Nielsen and A. H. Lund (2008). "MicroRNA-10a binds the 5'UTR of ribosomal protein mRNAs and enhances their translation." **Mol Cell** 30(4): 460-471.

- Ozsolak, F., L. L. Poling, Z. Wang, H. Liu, X. S. Liu, R. G. Roeder, X. Zhang, J. S. Song and D. E. Fisher (2008). "Chromatin structure analyses identify miRNA promoters." **Genes Dev** 22(22): 3172-3183.
- Papaconstantinou, I. G., A. Manta, M. Gazouli, A. Lyberopoulou, P. M. Lykoudis, G. Polymeneas and D. Voros (2013). "Expression of microRNAs in patients with pancreatic cancer and its prognostic significance." **Pancreas** 42(1): 67-71.
- Park, J. K., E. J. Lee, C. Esau and T. D. Schmittgen (2009). "Antisense inhibition of microRNA-21 or -221 arrests cell cycle, induces apoptosis, and sensitizes the effects of gemcitabine in pancreatic adenocarcinoma." **Pancreas** 38(7): e190-199.
- Pasquinelli, A. E. (2012). "MicroRNAs and their targets: recognition, regulation and an emerging reciprocal relationship." **Nat Rev Genet** 13(4): 271-282.
- Pasquinelli, A. E., B. J. Reinhart, F. Slack, M. Q. Martindale, M. I. Kuroda, B. Maller, D. C. Hayward, E. E. Ball, B. Degan, P. Muller, J. Spring, A. Srinivasan, M. Fishman, J. Finnerty, J. Corbo, M. Levine, P. Leahy, E. Davidson and G. Ruvkun (2000). "Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA." **Nature** 408(6808): 86-89.
- Perrais, M., P. Pigny, M. P. Ducourouble, D. Petitprez, N. Porchet, J. P. Aubert and I. Van Seuningen (2001). "Characterization of human mucin gene MUC4 promoter: importance of growth factors and proinflammatory cytokines for its regulation in pancreatic cancer cells." **J Biol Chem** 276(33): 30923-30933.
- Peters, L. and G. Meister (2007). "Argonaute proteins: mediators of RNA silencing." **Mol Cell** 26(5): 611-623.
- Petersen, C. P., M. E. Bordeleau, J. Pelletier and P. A. Sharp (2006). "Short RNAs repress translation after initiation in mammalian cells." **Mol Cell** 21(4): 533-542.
- Piessen, G., N. Jonckheere, A. Vincent, B. Hemon, M. P. Ducourouble, M. C. Copin, C. Mariette and I. Van Seuningen (2007). "Regulation of the human mucin MUC4 by taurodeoxycholic and taurochenodeoxycholic bile acids in oesophageal cancer cells is mediated by hepatocyte nuclear factor 1alpha." **Biochem J** 402(1): 81-91.
- Pillai, R. S. (2005). "MicroRNA function: multiple mechanisms for a tiny RNA?" **RNA** 11(12): 1753-1761.
- Pingpank, J. F., J. P. Hoffman, E. A. Ross, H. S. Cooper, N. J. Meropol, G. Freedman, W. H. Pinover, T. E. LeVoyer, A. R. Sasson and B. L. Eisenberg (2001). "Effect of preoperative chemoradiotherapy on surgical margin status of resected adenocarcinoma of the head of the pancreas." **J Gastrointest Surg** 5(2): 121-130.
- Pochampalli, M. R., R. M. el Bejjani and J. A. Schroeder (2007). "MUC1 is a novel regulator of ErbB1 receptor trafficking." **Oncogene** 26(12): 1693-1701.
- Poplin, E., Y. Feng, J. Berlin, M. L. Rothenberg, H. Hochster, E. Mitchell, S. Alberts, P. O'Dwyer, D. Haller, P. Catalano, D. Cella and A. B. Benson, 3rd (2009). "Phase III, randomized study of gemcitabine and oxaliplatin versus gemcitabine (fixed-dose rate infusion) compared with gemcitabine (30-minute infusion) in patients with pancreatic carcinoma E6201: a trial of the Eastern Cooperative Oncology Group." **J Clin Oncol** 27(23): 3778-3785.
- Porchet, N., V. C. Nguyen, J. Dufosse, J. P. Audie, V. Guyonnet-Duperat, M. S. Gross, C. Denis, P. Degand, A. Bernheim and J. P. Aubert (1991). "Molecular cloning and chromosomal localization of a novel human tracheo-bronchial mucin cDNA containing tandemly repeated sequences of 48 base pairs." **Biochem Biophys Res Commun** 175(2): 414-422.
- Rachagani, S., M. A. Macha, M. P. Ponnusamy, D. Haridas, S. Kaur, M. Jain and S. K. Batra (2012). "MUC4 potentiates invasion and metastasis of pancreatic cancer cells through

- stabilization of fibroblast growth factor receptor 1." **Carcinogenesis** 33(10): 1953-1964.
- Rajabi, H., C. Jin, R. Ahmad, C. McClary, M. D. Joshi and D. Kufe (2010). "MUCIN 1 ONCOPROTEIN EXPRESSION IS SUPPRESSED BY THE miR-125b ONCOMIR." **Genes Cancer** 1(1): 62-68.
- Reinhart, B. J., F. J. Slack, M. Basson, A. E. Pasquinelli, J. C. Bettinger, A. E. Rougvie, H. R. Horvitz and G. Ruvkun (2000). "The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*." **Nature** 403(6772): 901-906.
- Rigoutsos, I. (2009). "New tricks for animal microRNAs: targeting of amino acid coding regions at conserved and nonconserved sites." **Cancer Res** 69(8): 3245-3248.
- Rocha Lima, C. M., M. R. Green, R. Rotche, W. H. Miller, Jr., G. M. Jeffrey, L. A. Cisar, A. Morganti, N. Orlando, G. Gruia and L. L. Miller (2004). "Irinotecan plus gemcitabine results in no survival advantage compared with gemcitabine monotherapy in patients with locally advanced or metastatic pancreatic cancer despite increased tumor response rate." **J Clin Oncol** 22(18): 3776-3783.
- Rodriguez, A., S. Griffiths-Jones, J. L. Ashurst and A. Bradley (2004). "Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units." **Genome Res** 14(10A): 1902-1910.
- Ryu, J. K., S. M. Hong, C. A. Karikari, R. H. Hruban, M. G. Goggins and A. Maitra (2010). "Aberrant MicroRNA-155 expression is an early event in the multistep progression of pancreatic adenocarcinoma." **Pancreatol** 10(1): 66-73.
- Saini, H. K., S. Griffiths-Jones and A. J. Enright (2007). "Genomic analysis of human microRNA transcripts." **Proc Natl Acad Sci U S A** 104(45): 17719-17724.
- Saitou, M., M. Goto, M. Horinouchi, S. Tamada, K. Nagata, T. Hamada, M. Osako, S. Takao, S. K. Batra, T. Aikou, K. Imai and S. Yonezawa (2005). "MUC4 expression is a novel prognostic factor in patients with invasive ductal carcinoma of the pancreas." **J Clin Pathol** 58(8): 845-852.
- Sanders, W. J., T. R. Katsumoto, C. R. Bertozzi, S. D. Rosen and L. L. Kiessling (1996). "L-selectin-carbohydrate interactions: relevant modifications of the Lewis x trisaccharide." **Biochemistry** 35(47): 14862-14867.
- Schneider, B. J., E. Ben-Josef, C. J. McGinn, A. E. Chang, L. M. Colletti, D. P. Normolle, G. F. Hejna, T. S. Lawrence and M. M. Zalupski (2005). "Capecitabine and radiation therapy preceded and followed by combination chemotherapy in advanced pancreatic cancer." **Int J Radiat Oncol Biol Phys** 63(5): 1325-1330.
- Schuller, J., J. Cassidy, E. Dumont, B. Roos, S. Durston, L. Banken, M. Utoh, K. Mori, E. Weidekamm and B. Reigner (2000). "Preferential activation of capecitabine in tumor following oral administration to colorectal cancer patients." **Cancer Chemother Pharmacol** 45(4): 291-297.
- Schultz, N. A., J. Werner, H. Willenbrock, A. Roslind, N. Giese, T. Horn, M. Wojdemann and J. S. Johansen (2012). "MicroRNA expression profiles associated with pancreatic adenocarcinoma and ampullary adenocarcinoma." **Mod Pathol** 25(12): 1609-1622.
- Selbach, M., B. Schwanhauser, N. Thierfelder, Z. Fang, R. Khanin and N. Rajewsky (2008). "Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs." **Nature** 455(7209): 58-63.
- Setoyama, T., X. Zhang, S. Natsugoe and G. A. Calin (2011). "microRNA-10b: a new marker or the marker of pancreatic ductal adenocarcinoma?" **Clin Cancer Res** 17(17): 5527-5529.
- Sheth, U. and R. Parker (2003). "Decapping and decay of messenger RNA occur in cytoplasmic processing bodies." **Science** 300(5620): 805-808.

- Shibuya, H., H. Iinuma, R. Shimada, A. Horiuchi and T. Watanabe (2010). "Clinicopathological and prognostic value of microRNA-21 and microRNA-155 in colorectal cancer." **Oncology** 79(3-4): 313-320.
- Shin, C., J. W. Nam, K. K. Farh, H. R. Chiang, A. Shkumatava and D. P. Bartel (2010). "Expanding the microRNA targeting code: functional sites with centered pairing." **Mol Cell** 38(6): 789-802.
- Singh, A. P., S. C. Chauhan, M. Andrianifahanana, N. Moniaux, J. L. Meza, M. C. Copin, I. van Seuning, M. A. Hollingsworth, J. P. Aubert and S. K. Batra (2007). "MUC4 expression is regulated by cystic fibrosis transmembrane conductance regulator in pancreatic adenocarcinoma cells via transcriptional and post-translational mechanisms." **Oncogene** 26(1): 30-41.
- Singh, A. P., N. Moniaux, S. C. Chauhan, J. L. Meza and S. K. Batra (2004). "Inhibition of MUC4 expression suppresses pancreatic tumor cell growth and metastasis." **Cancer Res** 64(2): 622-630.
- Singh, A. P., S. Senapati, M. P. Ponnusamy, M. Jain, S. M. Lele, J. S. Davis, S. Remmenga and S. K. Batra (2008). "Clinical potential of mucins in diagnosis, prognosis, and therapy of ovarian cancer." **Lancet Oncol** 9(11): 1076-1085.
- Skrypek, N., B. Duchene, M. Hebbar, E. Leteurtre, I. van Seuning and N. Jonckheere (2013). "The MUC4 mucin mediates gemcitabine resistance of human pancreatic cancer cells via the Concentrative Nucleoside Transporter family." **Oncogene** 32(13): 1714-1723.
- Small, W., Jr., J. Berlin, G. M. Freedman, T. Lawrence, M. S. Talamonti, M. F. Mulcahy, A. B. Chakravarthy, A. A. Konski, M. M. Zalupski, P. A. Philip, T. J. Kinsella, N. B. Merchant, J. P. Hoffman, A. B. Benson, S. Nicol, R. M. Xu, J. F. Gill and C. J. McGinn (2008). "Full-dose gemcitabine with concurrent radiation therapy in patients with nonmetastatic pancreatic cancer: a multicenter phase II trial." **J Clin Oncol** 26(6): 942-947.
- Small, W., Jr., M. F. Mulcahy, A. Rademaker, D. J. Bentrem, A. B. Benson, B. B. Weitner and M. S. Talamonti (2011). "Phase II trial of full-dose gemcitabine and bevacizumab in combination with attenuated three-dimensional conformal radiotherapy in patients with localized pancreatic cancer." **Int J Radiat Oncol Biol Phys** 80(2): 476-482.
- Song, J. J., S. K. Smith, G. J. Hannon and L. Joshua-Tor (2004). "Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity." **Science** 305(5689): 1434-1437.
- Srivastava, S. K., A. Bhardwaj, S. Singh, S. Arora, B. Wang, W. E. Grizzle and A. P. Singh (2011). "MicroRNA-150 directly targets MUC4 and suppresses growth and malignant behavior of pancreatic cancer cells." **Carcinogenesis** 32(12): 1832-1839.
- Stathis, A. and M. J. Moore (2010). "Advanced pancreatic carcinoma: current treatment and future challenges." **Nat Rev Clin Oncol** 7(3): 163-172.
- Strimpakos, A., M. W. Saif and K. N. Syrigos (2008). "Pancreatic cancer: from molecular pathogenesis to targeted therapy." **Cancer Metastasis Rev** 27(3): 495-522.
- Su, G. H., R. H. Hruban, R. K. Bansal, G. S. Bova, D. J. Tang, M. C. Shekher, A. M. Westerman, M. M. Entius, M. Goggins, C. J. Yeo and S. E. Kern (1999). "Germline and somatic mutations of the STK11/LKB1 Peutz-Jeghers gene in pancreatic and biliary cancers." **Am J Pathol** 154(6): 1835-1840.
- Sultana, A., C. T. Smith, D. Cunningham, N. Starling, J. P. Neoptolemos and P. Ghaneh (2007). "Meta-analyses of chemotherapy for locally advanced and metastatic pancreatic cancer." **J Clin Oncol** 25(18): 2607-2615.
- Swartz, M. J., S. K. Batra, G. C. Varshney, M. A. Hollingsworth, C. J. Yeo, J. L. Cameron, R. E. Wilentz, R. H. Hruban and P. Argani (2002). "MUC4 expression increases

- progressively in pancreatic intraepithelial neoplasia." **Am J Clin Pathol** 117(5): 791-796.
- Szafranska, A. E., T. S. Davison, J. John, T. Cannon, B. Sipos, A. Maghnouj, E. Labourier and S. A. Hahn (2007). "MicroRNA expression alterations are linked to tumorigenesis and non-neoplastic processes in pancreatic ductal adenocarcinoma." **Oncogene** 26(30): 4442-4452.
- Takada, A., K. Ohmori, T. Yoneda, K. Tsuyuoka, A. Hasegawa, M. Kiso and R. Kannagi (1993). "Contribution of carbohydrate antigens sialyl Lewis A and sialyl Lewis X to adhesion of human cancer cells to vascular endothelium." **Cancer Res** 53(2): 354-361.
- Takikita, M., S. Altekruze, C. F. Lynch, M. T. Goodman, B. Y. Hernandez, M. Green, W. Cozen, M. Cockburn, M. Sibug Saber, M. Topor, C. Zeruto, B. Abedi-Ardekani, M. E. Reichman and S. M. Hewitt (2009). "Associations between selected biomarkers and prognosis in a population-based pancreatic cancer tissue microarray." **Cancer Res** 69(7): 2950-2955.
- Takimoto, K., M. Wakiyama and S. Yokoyama (2009). "Mammalian GW182 contains multiple Argonaute-binding sites and functions in microRNA-mediated translational repression." **RNA** 15(6): 1078-1089.
- Tan, M. H., N. J. Nowak, R. Loor, H. Ochi, A. A. Sandberg, C. Lopez, J. W. Pickren, R. Berjian, H. O. Douglass, Jr. and T. M. Chu (1986). "Characterization of a new primary human pancreatic tumor line." **Cancer Invest** 4(1): 15-23.
- Tang, B., B. Xiao, Z. Liu, N. Li, E. D. Zhu, B. S. Li, Q. H. Xie, Y. Zhuang, Q. M. Zou and X. H. Mao (2010). "Identification of MyD88 as a novel target of miR-155, involved in negative regulation of Helicobacter pylori-induced inflammation." **FEBS Lett** 584(8): 1481-1486.
- Taylor, D. D. and C. Gercel-Taylor (2008). "MicroRNA signatures of tumor-derived exosomes as diagnostic biomarkers of ovarian cancer." **Gynecol Oncol** 110(1): 13-21.
- Thermann, R. and M. W. Hentze (2007). "Drosophila miR2 induces pseudo-polysomes and inhibits translation initiation." **Nature** 447(7146): 875-878.
- Till, S., E. Lejeune, R. Thermann, M. Bortfeld, M. Hothorn, D. Enderle, C. Heinrich, M. W. Hentze and A. G. Ladurner (2007). "A conserved motif in Argonaute-interacting proteins mediates functional interactions through the Argonaute PIWI domain." **Nat Struct Mol Biol** 14(10): 897-903.
- Torres, A., K. Torres, A. Pesci, M. Ceccaroni, T. Paszkowski, P. Cassandrini, G. Zamboni and R. Maciejewski (2012). "Deregulation of miR-100, miR-99a and miR-199b in tissues and plasma coexists with increased expression of mTOR kinase in endometrioid endometrial carcinoma." **BMC Cancer** 12: 369.
- Torrisani, J., B. Bournet, M. C. du Rieu, M. Bouisson, A. Souque, J. Escourrou, L. Buscail and P. Cordelier (2009). "let-7 MicroRNA transfer in pancreatic cancer-derived cells inhibits in vitro cell proliferation but fails to alter tumor progression." **Hum Gene Ther** 20(8): 831-844.
- Tu, L. and D. K. Banfield (2010). "Localization of Golgi-resident glycosyltransferases." **Cell Mol Life Sci** 67(1): 29-41.
- Turchinovich, A., L. Weiz, A. Langheinze and B. Burwinkel (2011). "Characterization of extracellular circulating microRNA." **Nucleic Acids Res** 39(16): 7223-7233.
- Ujifuku, K., N. Mitsutake, S. Takakura, M. Matsuse, V. Saenko, K. Suzuki, K. Hayashi, T. Matsuo, K. Kamada, I. Nagata and S. Yamashita (2010). "miR-195, miR-455-3p and miR-10a(*) are implicated in acquired temozolomide resistance in glioblastoma multiforme cells." **Cancer Lett** 296(2): 241-248.
- van der Sluis, M., M. H. Melis, N. Jonckheere, M. P. Ducourouble, H. A. Buller, I. Renes, A. W. Einerhand and I. Van Seuning (2004). "The murine Muc2 mucin gene is

- transcriptionally regulated by the zinc-finger GATA-4 transcription factor in intestinal cells." **Biochem Biophys Res Commun** 325(3): 952-960.
- van Dijk, E., N. Cougot, S. Meyer, S. Babajko, E. Wahle and B. Seraphin (2002). "Human Dcp2: a catalytically active mRNA decapping enzyme located in specific cytoplasmic structures." **EMBO J** 21(24): 6915-6924.
- Van Seuning, I., E. Leteurtre and P. Pigny (2008). Mucins in pancreas and hepato-biliary tract. Expression, regulation, biomarkers and therapy. The Epithelial Mucins: Structure/Function. Roles in Cancer and Inflammatory Diseases. I. Van Seuning. Kerala, India, Research Signpost: 233-248.
- Van Seuning, I., M. Perrais, P. Pigny, N. Porchet and J. P. Aubert (2000). "Sequence of the 5'-flanking region and promoter activity of the human mucin gene MUC5B in different phenotypes of colon cancer cells." **Biochem J** 348 Pt 3: 675-686.
- Vasen, H. F., N. A. Gruis, R. R. Frants, P. A. van Der Velden, E. T. Hille and W. Bergman (2000). "Risk of developing pancreatic cancer in families with familial atypical multiple mole melanoma associated with a specific 19 deletion of p16 (p16-Leiden)." **Int J Cancer** 87(6): 809-811.
- Vasudevan, S. and J. A. Steitz (2007). "AU-rich-element-mediated upregulation of translation by FXR1 and Argonaute 2." **Cell** 128(6): 1105-1118.
- Vasudevan, S., Y. Tong and J. A. Steitz (2007). "Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation." **Science** 318(5858): 1931-1934.
- Vasudevan, S., Y. Tong and J. A. Steitz (2008). "Cell-cycle control of microRNA-mediated translation regulation." **Cell Cycle** 7(11): 1545-1549.
- Vincent, A., M. P. Ducourouble and I. Van Seuning (2008). "Epigenetic regulation of the human mucin gene MUC4 in epithelial cancer cell lines involves both DNA methylation and histone modifications mediated by DNA methyltransferases and histone deacetylases." **Faseb J** 22(8): 3035-3045.
- Vincent, A., J. Herman, R. Schulick, R. H. Hruban and M. Goggins (2011). "Pancreatic cancer." **Lancet** 378(9791): 607-620.
- Vincent, A. and I. Van Seuning (2008). Mucins, epigenetics and cancer. The Epithelial Mucins: Structure/Function. Roles in Cancer and Inflammatory Diseases. I. Van Seuning. Kerala, India, Research Signpost: 95-108.
- Volinia, S., G. A. Calin, C. G. Liu, S. Ambs, A. Cimmino, F. Petrocca, R. Visone, M. Iorio, C. Roldo, M. Ferracin, R. L. Prueitt, N. Yanaihara, G. Lanza, A. Scarpa, A. Vecchione, M. Negrini, C. C. Harris and C. M. Croce (2006). "A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets." **Proc Natl Acad Sci U S A** 103(7): 2257-2261.
- Von Hoff, D. D., T. Ervin, F. P. Arena, E. G. Chiorean, J. Infante, M. Moore, T. Seay, S. A. Tjulandin, W. W. Ma, M. N. Saleh, M. Harris, M. Reni, S. Dowden, D. Laheru, N. Bahary, R. K. Ramanathan, J. Taberero, M. Hidalgo, D. Goldstein, E. Van Cutsem, X. Wei, J. Iglesias and M. F. Renschler (2013). "Increased survival in pancreatic cancer with nab-paclitaxel plus gemcitabine." **N Engl J Med** 369(18): 1691-1703.
- Wakiyama, M., K. Takimoto, O. Ohara and S. Yokoyama (2007). "Let-7 microRNA-mediated mRNA deadenylation and translational repression in a mammalian cell-free system." **Genes Dev** 21(15): 1857-1862.
- Wang, B., T. M. Love, M. E. Call, J. G. Doench and C. D. Novina (2006). "Recapitulation of short RNA-directed translational gene silencing in vitro." **Mol Cell** 22(4): 553-560.
- Wang, B., A. Yanez and C. D. Novina (2008). "MicroRNA-repressed mRNAs contain 40S but not 60S components." **Proc Natl Acad Sci U S A** 105(14): 5343-5348.
- Wang, J., J. Chen, P. Chang, A. LeBlanc, D. Li, J. L. Abbruzzese, M. L. Frazier, A. M. Killary and S. Sen (2009). "MicroRNAs in plasma of pancreatic ductal

- adenocarcinoma patients as novel blood-based biomarkers of disease." **Cancer Prev Res (Phila)** 2(9): 807-813.
- Winter, J., S. Link, D. Witzigmann, C. Hildenbrand, C. Previti and S. Diederichs (2013). "Loop-miRs: active microRNAs generated from single-stranded loop regions." **Nucleic Acids Res** 41(10): 5503-5512.
- Witkos, T. M., E. Koscianska and W. J. Krzyzosiak (2011). "Practical Aspects of microRNA Target Prediction." **Curr Mol Med** 11(2): 93-109.
- Wolfgang, C. L., J. M. Herman, D. A. Laheru, A. P. Klein, M. A. Erdek, E. K. Fishman and R. H. Hruban (2013). "Recent progress in pancreatic cancer." **CA Cancer J Clin**.
- Wolmark, N., H. Rockette, B. Fisher, D. L. Wickerham, C. Redmond, E. R. Fisher, J. Jones, E. P. Mamounas, L. Ore, N. J. Petrelli and et al. (1993). "The benefit of leucovorin-modulated fluorouracil as postoperative adjuvant therapy for primary colon cancer: results from National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project protocol C-03." **J Clin Oncol** 11(10): 1879-1887.
- Workman, H. C., C. Sweeney and K. L. Carraway, 3rd (2009). "The membrane mucin Muc4 inhibits apoptosis induced by multiple insults via ErbB2-dependent and ErbB2-independent mechanisms." **Cancer Res** 69(7): 2845-2852.
- Xu, H., Y. Inagaki, Y. Seyama, G. Du, F. Wang, N. Kokudo and W. Tang (2011). "Expression of KL-6/MUC1 in pancreatic cancer tissues and its potential involvement in tumor metastasis." **Oncol Rep** 26(2): 371-376.
- Xu, S., P. D. Witmer, S. Lumayag, B. Kovacs and D. Valle (2007). "MicroRNA (miRNA) transcriptome of mouse retina and identification of a sensory organ-specific miRNA cluster." **J Biol Chem** 282(34): 25053-25066.
- Yamasaki, H., S. Ikeda, M. Okajima, Y. Miura, T. Asahara, N. Kohno and F. Shimamoto (2004). "Expression and localization of MUC1, MUC2, MUC5AC and small intestinal mucin antigen in pancreatic tumors." **Int J Oncol** 24(1): 107-113.
- Yao, B., S. Li, S. L. Lian, M. J. Fritzler and E. K. Chan (2011). "Mapping of Ago2-GW182 functional interactions." **Methods Mol Biol** 725: 45-62.
- Yoo, C., J. Y. Hwang, J. E. Kim, T. W. Kim, J. S. Lee, D. H. Park, S. S. Lee, D. W. Seo, S. K. Lee, M. H. Kim, D. J. Han, S. C. Kim and J. L. Lee (2009). "A randomised phase II study of modified FOLFIRI.3 vs modified FOLFOX as second-line therapy in patients with gemcitabine-refractory advanced pancreatic cancer." **Br J Cancer** 101(10): 1658-1663.
- Yu, C. J., J. Y. Shih, Y. C. Lee, C. T. Shun, A. Yuan and P. C. Yang (2005). "Sialyl Lewis antigens: association with MUC5AC protein and correlation with post-operative recurrence of non-small cell lung cancer." **Lung Cancer** 47(1): 59-67.
- Yu, J., A. Li, S. M. Hong, R. H. Hruban and M. Goggins (2012). "MicroRNA alterations of pancreatic intraepithelial neoplasias." **Clin Cancer Res** 18(4): 981-992.
- Yu, L. G. (2007). "The oncofetal Thomsen-Friedenreich carbohydrate antigen in cancer progression." **Glycoconj J** 24(8): 411-420.
- Yunis, A. A., G. K. Arimura and D. J. Russin (1977). "Human pancreatic carcinoma (MIA PaCa-2) in continuous culture: sensitivity to asparaginase." **Int J Cancer** 19(1): 128-135.
- Zdanowicz, A., R. Thermann, J. Kowalska, J. Jemielity, K. Duncan, T. Preiss, E. Darzynkiewicz and M. W. Hentze (2009). "Drosophila miR2 primarily targets the m7GpppN cap structure for translational repression." **Mol Cell** 35(6): 881-888.
- Zhao, Q., M. Barclay, J. Hilken, X. Guo, H. Barrow, J. M. Rhodes and L. G. Yu (2010a). "Interaction between circulating galectin-3 and cancer-associated MUC1 enhances tumour cell homotypic aggregation and prevents anoikis." **Mol Cancer** 9: 154.

- Zhao, X., X. He, X. Han, Y. Yu, F. Ye, Y. Chen, T. Hoang, X. Xu, Q. S. Mi, M. Xin, F. Wang, B. Appel and Q. R. Lu (2010b). "MicroRNA-mediated control of oligodendrocyte differentiation." **Neuron** 65(5): 612-626.
- Zhu, H. and G. C. Fan (2011). "Extracellular/circulating microRNAs and their potential role in cardiovascular disease." **Am J Cardiovasc Dis** 1(2): 138-149.
- Zipprich, J. T., S. Bhattacharyya, H. Mathys and W. Filipowicz (2009). "Importance of the C-terminal domain of the human GW182 protein TNRC6C for translational repression." **RNA** 15(5): 781-793.
- Zisoulis, D. G., M. T. Lovci, M. L. Wilbert, K. R. Hutt, T. Y. Liang, A. E. Pasquinelli and G. W. Yeo (2010). "Comprehensive discovery of endogenous Argonaute binding sites in *Caenorhabditis elegans*." **Nat Struct Mol Biol** 17(2): 173-179.