

UNIVERSITE DE LILLE NORD DE FRANCE  
LABORATOIRE CANTHER UMR9020 CNRS – UMR1277 INSERM

## **THESE DE DOCTORAT**

Pour l'obtention du titre de

### **DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LILLE**

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

Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

---

# **Instabilité génomique et mécanismes moléculaires régulés par le long ARN non codant *H19* dans les cancers du sein.**

---

Présentée et soutenue publiquement par

**Clément LECERF**

Le 7 décembre 2020

#### **Jury**

Président :	Dr. Dominique LEPRINCE
Rapporteurs :	Dr. Fabienne MEGGETTO-PRADELLE Pr. Philippe BECUWE
Examineurs :	Pr. Xuefen LE BOURHIS Dr. Isabelle TOURNIER
Directeur de thèse :	Pr. Eric ADRIAENSSENS



## Remerciements

---

*Je souhaite tout d'abord remercier le Docteur **Dominique Leprince**, le Docteur **Fabienne Meggetto-Pradelle**, le Professeur **Philippe Becuwe** et le Docteur **Isabelle Tournier**, qui ont accepté de lire ce manuscrit et d'évaluer mes travaux. Votre participation à mon jury de thèse m'honore beaucoup, et je vous remercie pour le temps que vous y avez consacré. Un grand merci à **Philippe Becuwe** et **Dominique Leprince** pour avoir participé au suivi de ma thèse pendant ces 3 ans et permis son évolution.*

*Je remercie le Professeur **Xuefen Le Bourhis**, directrice de l'ancienne unité INSERM U908 et cheffe de l'équipe "Plasticité Cellulaire et Cancer" dans la nouvelle unité CANTHER. Merci de m'avoir accueilli pour mon master 2 recherche puis pour ma thèse. Votre intérêt pour mon travail et vos conseils avisés m'ont beaucoup appris, scientifiquement comme personnellement. Merci pour votre investissement pendant nos réunions et rédactions communes.*

*J'aimerais ensuite remercier le Professeur **Eric Adriaenssens** pour son encadrement depuis mon master 2. Eric, je ne saurais expliquer à quel point ces 4 années de travail à vos côtés ont été enrichissantes. Merci de m'avoir permis de mener à bien ce travail, ainsi que pour votre confiance à tout moment, les bons comme les moins bons. Vous m'avez fait profiter de votre expérience et de vos connaissances desquelles j'ai énormément appris. Je retiendrai également vos fameux "J'ai pensé à un truc" qui résonnaient soudainement dans le bureau et qui étaient souvent synonymes de manips supplémentaires ! Mais pour autant, cela reflète votre philosophie constructive et votre capacité à ne négliger aucun détail. Evidemment, il n'y a pas que la science dans la vie, et j'aurai toujours un souvenir agréable de l'ambiance du bureau de la H19 team, nos discussions scientifiques ou non, votre humour sans pareille ainsi que toutes les anecdotes et histoires qui ont ponctué la vie au labo. Pour tout cela, merci beaucoup.*

*Mes remerciements s'adressent ensuite à tous les membres du laboratoire : **Robert-Alain**, merci pour vos conseils et astuces pour les manips, ainsi que pour les enseignements. **Valérie Chopin**, nous n'avons pas eu beaucoup d'occasions de discuter mais je retiendrai les conseils d'organisation rigoureuse qui sont nécessaires au travail au laboratoire. **Pierre-Olivier**, merci pour vos remarques constructives au fur et à mesure des réunions, et merci à **Pamela** pour sa bonne humeur et pour m'avoir donné l'opportunité de passer la formation de SST. Merci également à tous les deux pour votre investissement dans les pots ! **Chann**, merci pour ta disponibilité au quotidien, avec toi il y a toujours une solution. Ta polyvalence et ton enthousiasme sans faille imposent le respect. Merci à **Valérie Cendré**, pour ton aide avec les commandes mais aussi pour l'organisation de mon congrès à San Diego (tout ça pour ça me diras-tu, mais bon). Grâce à toi je ne verrai plus jamais les mots fléchés de la même manière (un clin d'œil ici à **Eric**). **Isabelle**, merci pour ton aide quotidienne indispensable au labo et ta spontanéité. On peut toujours compter sur toi, garde ton naturel et ta bonne humeur ! **Nathalie**, merci pour tes conseils et ton soutien, même d'un étage à l'autre. Bonne continuation ! Merci également à **Véronique Fafeur** d'avoir contribué à la bonne ambiance du bureau grâce à ses anecdotes et sa bonne humeur. Je remercie également l'équipe de l'IRCL : **Samuel, Nicole, Christine** et **Mélanie**, j'ai toujours été très bien accueilli quand je venais*

irradier ou utiliser le cytomètre, et pour ça merci beaucoup. Enfin, merci à **Fabrice Lejeune** pour sa sympathie et son aide dans les manips, à **Erwan Goy** pour les fameux essais comètes, et à **Thomas Rico** pour les vecteurs rapporteurs.

*J'ai fait partie d'un laboratoire qui accueille beaucoup d'étudiants (en stage, en master, en thèse), ce qui je pense représente une chance dans la dure tâche que constitue la thèse. La cohésion, la bonne ambiance ainsi que le soutien mutuel que nous avons toujours eus sont des atouts majeurs. Tout le mal que je vous souhaite, c'est que cela continue !*

*Merci à **Constance** pour m'avoir formé en M2 et pour avoir été là au quotidien. Ta rigueur scientifique et ta patience m'ont beaucoup aidé ! **Barbara**, tu as également été d'une aide précieuse pendant mon M2 et au début de ma thèse. Je garderai en mémoire ta bonne humeur infaillible et communicative, tes coiffures aussi variées qu'impressionnantes et tes rires aux éclats ! Merci également à **Jérémy** pour les moments partagés. Et rassure-toi Barbara, mon bac à légumes est toujours aussi rempli ! **Bernadette**, je ne me fais pas de souci pour toi car je sais que tout se passe bien pour toi, je te souhaite que cela continue !*

***Justine**, la "maman" du labo, sur qui on peut toujours compter. Ta motivation sans faille et ton soutien ont été très précieux, et ce même à distance dans mes moments de doute ou de baisse de motivation. Je me souviendrai des soirées passées ensemble, des pique-niques les soirs d'été à la Citadelle (une pensée pour **Axel**) ou encore quand tu m'envoyais des memes de Baby Yoda en rafale. Tu as toujours été et tu es toujours présente, même depuis ton départ à LA, et pour ça (ainsi que pour tout le reste), je te remercie. Il y a tout de même un point négatif, je ne pourrai plus imposer Classic 21 au labo, comme quoi tout se perd !*

*Un grand merci à **Romain**, avec qui j'ai passé de très bons moments au labo comme en-dehors (comment ne pas citer cette fameuse soirée traquenard, j'y pense toujours avec amusement). Toujours dispo pour prodiguer conseils et astuces de manips, ton investissement et ta rigueur scientifique sont vraiment inspirants, ces qualités te permettront j'en suis sûr de t'épanouir professionnellement. Le café du matin animé des discussions/débats autour de Star Wars, The Witcher (ça m'a manqué pendant cette dernière année), ainsi que les soirées qu'on a pu passer ensemble avec **Harmony** (sur qui on peut toujours compter, et que je remercie également) ont été de réelles "bouffées d'air frais" pendant ma thèse, et je vous en remercie tous les deux !*

*Une fois n'est pas coutume, et même si tu as pris un malin plaisir à vandaliser tant mon matériel que mon bureau (soulignons quand même ton vice avec tes satanés stickers de la Reine des Neiges !), je tiens à te remercier **Nadège**, parce que malgré tout tu as été et tu es toujours une amie proche (bien que tu sois partie vivre la vie de château à Versailles). Je me souviens encore des journées entières que tu passais seule dans la salle de bio mol, avec ton fameux "big vecteur", et qui illustrent parfaitement la force de caractère et la volonté d'aller jusqu'au bout qui te sont propres. J'ai rarement vu quelqu'un d'aussi efficace et organisée, et bien sûr je garderai en mémoire nos discussions de tout et de rien qui pouvaient durer des heures. J'ai toujours notre photo de groupe lors de ta soirée de thèse sur l'écran de mon ordi, tout comme j'ai toujours un stock de chips en polystyrène dans mon bureau en prévision d'un prochain assaut ! Je te remercie pour ton aide et pour ton amitié, au labo comme en-dehors pendant nos soirées jeux, et pendant le tournage des fameuses vidéos de fin de thèse que tu organisais de main de maître (une pensée ici pour **Kévin**).*

*Ihsan, ton sourire et ta gentillesse ont vraiment été un plus au labo ! Tu fais partie de ces personnes qui rendent le quotidien plus agréable, et pour ça je te remercie. Je me souviens encore du bruit de tes talons dans le couloir quand tu courais entre les manips et les cours, ton départ du labo a laissé un vide mais je sais que tu aimes ce que tu fais maintenant ! J'en profite également pour remercier **Jérémy**, pour nos discussions parfois philosophiques, et pour ta contribution à la bonne ambiance du labo. Bon courage chez Genfit chef !*

*Place à la H19 team maintenant avec **Jordan**, qui a participé à ma formation quand je suis arrivé en M2 et avec qui j'ai travaillé pendant 3 ans. Merci pour tous ces petits trucs et astuces à la MacGyver dont tu avais le secret. Je me souviendrai toujours du moment où on a dû s'organiser en binôme sur le projet p53, et la vitesse des résultats grâce à notre organisation, aussi bien technique que théorique. Aujourd'hui, ce projet est terminé (au moment où j'écris ces lignes le papier est en reviewing), je pense qu'on peut en être fiers ! Bonne continuation chez Ozyme, je sais que tu aimes ton boulot donc je ne me fais pas de souci pour toi !*

*Evidemment, comment ne pas te citer **Quentin** et te remercier pour cette amitié sincère depuis la L2 ! Depuis les fous rires en amphitheâtre jusqu'à maintenant où chacun va soutenir sa thèse, en passant par les crasses qu'on complotait (coucou **Nadège**) ou encore les bons moments à Deauville, on en a fait du chemin, et je pense qu'on peut être fiers de nous (mais ne prends pas trop la grosse tête non plus !). Tu es quelqu'un de très capable, investi à 100% dans tout ce que tu fais, toujours avec une bonne blague à placer (ou pas). Merci pour toutes ces années et plein de bonnes choses pour la suite !*

*Après les plus vieux, viennent les plus jeunes ! **Marie D**, alias "la grande Marie", tu verras que même si tout ne s'est pas passé comme tu l'espérais, tu ressortiras plus forte de cette rude épreuve qu'est la thèse. Bon courage pour la suite, et attention à l'excès de verdure ! **Marie W**, **Sarah**, bon courage également pour le rush final ! **Ludivine**, merci pour ces moments de franche rigolade quand je m'arrêtais devant la 2D parce que je t'entendais chanter ! Garde cette bonne attitude qui est la tienne, et bon courage ! **Mathilde**, tu as découvert cette année les joies de la bio mol, bon courage pour ta thèse, tu verras que ça passe très vite ! **Julien** et **Andria**, bon courage pour la thèse ! Et enfin, la relève est assurée avec **Evodie** (et oui la team H19 est présente partout). Tu as pu constater avec cette première année que la vie au labo n'est pas de tout repos. Tu as déjà énormément appris, à beaucoup de niveaux, et tu en apprendras encore. Je ne peux que te souhaiter beaucoup de réussite ! J'aimerais également remercier les personnes qui ont été de passage au labo pendant ma thèse : **Anaïs**, **Pauline F**, **Aurélien**, **Julia**, **Aurélien**, **Geoffrey**, **Thomas**, **Martin** et **Tony**.*

*Outre le laboratoire, j'ai eu la chance d'être entouré de nombreux amis ces dernières années. J'adresse un immense merci aux vieux copains (non pas qu'on prenne de l'âge, mais ça commence quand même à faire un bout de temps), la team Chocapic du jeudi soir, sur qui j'ai toujours pu compter quand j'avais besoin de décompresser en allant boire une pinte. **Mathis**, on en aura vécu des aventures depuis tout ce temps ! Merci pour tous ces moments, pour les soirées "fête du slip" et pour ton amitié précieuse. **Mélissa**, ton soutien indéfectible, ton oreille attentive (mais aussi les cookies, soyons honnêtes) ainsi que ton amour inconditionnel des puppies auront vraiment apporté une touche positive et un réconfort inestimable depuis qu'on se connaît. Merci du fond du cœur, et bon courage pour ta thèse ! **Pierre**, merci pour tous ces*

moments mémorables que nous avons partagés, pour ton humour intarissable et pour ton soutien en tant que parrain et surtout en tant qu'ami. Et si Ghost revient en concert à Lille, ce coup-ci on ira ! **Debora**, ma fillotte au sale caractère mais au grand cœur, merci d'avoir été là, sache acquérir le cuir du dinosaure tout en conservant la fraîcheur du nouveau-né ! Je remercie également **Julien** et son saladier d'épinards, **Livia** la fine stratège des jeux de société, **Alexandre**, **Salomé**, **Pierre F** sans oublier **Raphaëlle**, l'élèveuse de tortues expatriée en Belgique. Depuis toutes ces années maintenant nous cultivons notre amitié autour d'une bonne bière et/ou d'un bon welsh, faisons en sorte que cela continue longtemps !

Je remercie également mon ami d'enfance **Thibaut**, malgré l'éloignement nous avons su rester proches. **Deucks** mon poilu, tu es de ces amis sur qui on peut toujours compter et j'affectionne tout particulièrement nos moments passés ensemble. Au plaisir d'une prochaine mise à sac de nos appartements respectifs (coucou **Alizé**) et de nos prochains concerts ! Merci également à **Thoma & Fanny**, hâte d'être en novembre ! Une pensée toute particulière pour **Rémy**, **Nathan** et **Romain**, depuis le début de l'aventure HairSound jusqu'à aujourd'hui où nous avons chacun nos activités respectives ici ou là, nous avons su conserver et entretenir notre amitié, merci à vous trois ! Je salue également les **faluchards lillois** (avec une pensée particulière pour la filière Sciences et les frangins **Fanny** et **Marc**), merci pour tous les bons moments et continuez à porter fièrement notre coiffe ! Enfin, mes fillottes **Debora** (oui encore toi) et **Romane**, j'ai essayé de vous transmettre ce que je savais, mais vous m'avez également toutes les deux et chacune à votre façon apporté beaucoup (plus que vous ne le pensez). Romane, tu es débrouillarde et je sais que tu réussiras à t'épanouir dans ta vie étudiante (mais pas que).

Je remercie également chaleureusement **mes parents** ainsi que ma sœur **Charlotte** pour leur soutien au quotidien. Vous avez toujours été présents pour moi, merci de m'avoir laissé suivre ma voie et d'avoir cru en moi.

Malheureusement, la fin de ces 3 ans de thèse aura été marquée par l'épidémie de Covid-19 et les 2 mois de confinement en conséquence. Pour autant, ce fut une chance (si je puis dire) pour moi car cela m'aura permis d'avancer de façon non négligeable dans l'écriture de ce manuscrit. Il faut dire que quitte à rester enfermé chez soi, autant mettre son temps à profit ! De plus, même pendant cette période si particulière, vous avez tous et toutes été présents (même de loin), ce qui m'a été d'un grand soutien. Pour citer un vieux hobbit : « Je ne connais pas la moitié d'entre vous autant que je le voudrais, et j'aime moins de la moitié d'entre vous à moitié moins que vous ne le méritiez ! ».

Et n'oubliez pas : la Force sera avec vous, toujours.

*"In a dark place we find ourselves, and a little more knowledge lights our way."*

Yoda, Star Wars - Episode III

## Résumé

---

*H19* est un long ARN non codant jouant un rôle clé dans la tumorigenèse et la progression tumorale de nombreux cancers. Notre équipe a montré que l'expression du gène *H19* est activée par E2F1, réprimée par des suppresseurs de tumeur comme p53 et RB, et impliquée dans le cycle cellulaire des cellules cancéreuses mammaires.

Mes travaux de thèse démontrent que *H19* interagit avec p53 dans les cellules cancéreuses mammaires. Ceci entraîne la dégradation de p53, et altère son activité en empêchant sa translocation dans le compartiment nucléaire. Nous montrons que *H19* interagit non seulement avec p53 mais aussi avec MDM2, formant un complexe ternaire. De plus, *H19* réduit l'activité transcriptionnelle de p53 et empêche l'arrêt du cycle cellulaire, l'induction de l'apoptose et la sénescence des cellules après endommagement de leur ADN. En outre, nous mettons en évidence que l'expression de *H19* favorise l'instabilité génomique, entraînant l'accumulation de mutations. Ensuite, nous avons analysé l'implication de *H19* dans la réponse aux dommages de l'ADN. Nous montrons que *H19* réprime la phosphorylation du variant d'histone H2AX. Ceci s'accompagne d'une augmentation de l'activité de réparation par jonction des extrémités non homologues (NHEJ) et par recombinaison homologue (HR). Des essais comètes révèlent que l'expression de *H19* réduit la proportion de cassures de l'ADN, suggérant que *H19* permet l'accélération de la réparation de l'ADN. Enfin, nous avons étudié l'implication ainsi que la contribution relative de *H19* et de son miR-675 dans l'augmentation du potentiel métastatique mammaire. Nous montrons que *H19* comme le miR-675 favorisent la migration et l'invasion des cellules, ainsi que leur clonogénicité. *H19* induit la transition épithélio-mésenchymateuse des cellules, mais le miR-675 semble augmenter l'expression des marqueurs épithéliaux et mésenchymateux, suggérant un phénotype hybride ou une transition mésenchymo-épithéliale. De plus, nous montrons pour la première fois que le miR-675, comme *H19*, favorise le phénotype souche des cellules cancéreuses mammaires.

Pour conclure, mes résultats de thèse mettent en évidence de nouveaux mécanismes impliquant le lncRNA *H19* dans la tumorigenèse et la progression tumorale mammaire, suggérant ainsi un rôle pertinent pour *H19* en tant que marqueur diagnostique et thérapeutique.

Mots-clés : *H19*, long ARN non codant, miR-675, cancer du sein, instabilité génomique, métastase, cellule souche cancéreuse





# Abstract

---

*H19* is a long non-coding RNA described to play key roles in the progression and metastasis of cancers from different tissue origins. We have previously shown that the *H19* gene is activated by E2F1, repressed by p53 and RB tumor suppressors and implicated in breast cancer cell cycle progression.

My PhD work demonstrates that *H19* can interact with p53 in breast cancer cells. This interaction induces p53 degradation but also impairs p53 function by preventing its translocation into the nuclear compartment. We show that *H19* interacts not only with p53 but also with MDM2 to form a ternary complex. Moreover, *H19* reduces p53 transcriptional activities and impairs cell cycle blockage, apoptosis induction and senescence of cells after DNA damage. Furthermore, we highlight that *H19* expression favors also genetic instability, allowing for the accumulation of gene mutations. Thereafter, we investigated the implication of *H19* during the DNA damage response. We show that *H19* expression represses the activation of histone variant H2AX. Interestingly, this is accompanied by enhanced repair mechanisms such as non-homologous end-joining (NHEJ) and homologous recombination (HR). Comet assays revealed that *H19* expression reduces the DNA breaks proportion, suggesting that *H19* accelerates DNA repair. Finally, we determine the implication but also the relative contribution of *H19* and its miR-675 in the enhancement of breast cancer metastatic potential. We show that both *H19* and miR-675 enhance cell migration and invasion as well as colony formation. *H19* induces epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) but interestingly, miR-675 seems to simultaneously increase the expression of both epithelial and mesenchymal markers, suggesting the induction of a hybrid phenotype or mesenchymal-to-epithelial transition (MET). Finally, we demonstrated for the first time that miR-675, like its precursor *H19*, increases stemness properties of breast cancer cells.

To conclude, our findings highlight new mechanisms of lncRNA *H19* in breast cancer tumorigenesis and aggressiveness, thus suggesting an interesting role for *H19* as a prognostic and therapeutic marker.

**Keywords** : *H19*, long non-coding RNA, miR-675, breast cancer, genetic instability, metastasis, cancer stem cells



# Table des matières

---

<b>Remerciements</b> .....	<b>3</b>
<b>Résumé</b> .....	<b>7</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>9</b>
<b>Table des matières</b> .....	<b>11</b>
<b>Table des illustrations</b> .....	<b>15</b>
Figures .....	<b>15</b>
Tableaux.....	<b>16</b>
<b>Liste des acronymes et abréviations</b> .....	<b>17</b>
<b>INTRODUCTION</b> .....	<b>21</b>
<b>I – La glande mammaire</b> .....	<b>23</b>
A- Anatomie & histologie.....	<b>23</b>
B- Développement de la glande mammaire .....	<b>25</b>
<b>II – Le cancer du sein</b> .....	<b>28</b>
A- Epidémiologie.....	<b>28</b>
B- Facteurs de risque.....	<b>30</b>
C- Développement d’une tumeur mammaire .....	<b>33</b>
1) Etapes de développement d’une tumeur mammaire .....	<b>33</b>
2) Origine cellulaire du cancer du sein.....	<b>34</b>
3) Influence du micro-environnement tumoral .....	<b>43</b>
D- Origine du cancer du sein : le rôle des cellules souches cancéreuses .....	<b>45</b>
1) Modèles de développement tumoral .....	<b>45</b>
2) Généralités sur les cellules souches cancéreuses (CSCs) .....	<b>48</b>
3) Identification et étude des cellules souches cancéreuses.....	<b>51</b>
4) Résistance aux thérapies et reprogrammation.....	<b>54</b>
E- Hétérogénéité des tumeurs mammaires.....	<b>57</b>
1) Classification histopathologique .....	<b>59</b>
2) Classification clinique.....	<b>59</b>
3) Classification moléculaire .....	<b>60</b>
F- Traitements du cancer du sein .....	<b>63</b>
1) Chirurgie .....	<b>64</b>
2) Radiothérapie.....	<b>64</b>
3) Chimiothérapie.....	<b>65</b>
4) Thérapies ciblées .....	<b>66</b>
G- Résistance aux traitements : focus sur la réparation des dommages de l’ADN .....	<b>68</b>
1) Induction de dommages.....	<b>68</b>
2) Dommages induits par les traitements anti-cancéreux .....	<b>70</b>
3) Mécanismes de réparation de l’ADN .....	<b>72</b>
4) Réparation de l’ADN & cancer .....	<b>73</b>
<b>III – Les longs ARNs non codants</b> .....	<b>75</b>
A- Généralités sur les longs ARNs non codants .....	<b>75</b>

1) Découverte et historique.....	75
2) Classification des longs ARNs non codants.....	77
B- Modes d'action des longs ARNs non codants .....	79
1) Fonctions des lncRNAs dans le noyau.....	80
2) Fonctions des lncRNAs dans le cytoplasme.....	88
C- Longs ARNs non codants et glande mammaire.....	91
1) lncRNAs et développement de la glande mammaire.....	92
2) lncRNAs et cancer du sein .....	93
<b>IV – Les petits ARNs non codants .....</b>	<b>97</b>
A- Historique et généralités sur les microRNAs .....	97
1) Découverte des miRNAs .....	97
2) Nomenclature des miRNAs .....	97
B- Voies de synthèse des microRNAs .....	99
1) Voie canonique.....	99
2) Voies non canoniques .....	105
C- Rôles des microRNAs .....	106
1) Modes d'action des miRNAs .....	107
2) Les miRNAs dans la tumorigenèse .....	109
<b>V – Le long ARN non codant <i>H19</i>.....</b>	<b>112</b>
A- L'empreinte génomique parentale .....	112
1) Historique .....	112
1) Mise en place et maintien .....	114
B- Le locus <i>H19/IGF2</i> .....	117
1) Empreinte génomique parentale au locus <i>H19/IGF2</i> .....	117
2) Modifications post-traductionnelles au locus <i>H19/IGF2</i> .....	119
3) Pathologies associées au locus <i>H19/IGF2</i> .....	120
4) Autres transcrits au locus <i>H19/IGF2</i> .....	121
C- Le gène <i>H19</i> .....	122
1) Historique .....	122
2) <i>H19</i> et empreinte génomique .....	124
3) Régulation de l'expression du gène <i>H19</i> .....	125
D- <i>H19</i> & cancer.....	128
1) <i>H19</i> : oncogène ou suppresseur de tumeur ?.....	129
2) Surexpression de <i>H19</i> dans le cancer .....	130
3) Modes d'action de <i>H19</i> dans le cancer .....	130
<b>PRESENTATION DE LA THESE &amp; OBJECTIFS .....</b>	<b>137</b>
<b>MATERIELS ET METHODES.....</b>	<b>141</b>
<b>I – Culture cellulaire.....</b>	<b>143</b>
A- Entretien des lignées .....	143
B- Irradiation .....	144
C- Traitements .....	144
<b>II – Transfections.....</b>	<b>145</b>
A- Mise au point des plasmides .....	145

1) Obtention du plasmide pEZH2-EGFP .....	145
2) Obtention du plasmide DP-EZH2 .....	146
3) Obtention du plasmide pH19-mCherry.....	147
B- Transfection de plasmides .....	147
C- Transfection de siRNAs .....	147
D- Transfection de mimics/anti-miRs .....	148
<b>III – Analyses d’expression</b> .....	<b>148</b>
A- Profils d’expression génique tumoraux .....	148
B- Extraction d’ARNs, rétro-transcription (RT) et RT-PCR en temps réel (qPCR) .....	149
C- Extraction de protéines .....	151
D- Western blot .....	151
E- Immunocytochimie.....	153
F- Immunofluorescence .....	153
<b>IV – Mise en évidence des interactions</b> .....	<b>154</b>
A- Immunoprécipitation des ARNs.....	154
B- Immunoprécipitation des protéines .....	154
C- GST <i>pull-down</i> .....	155
<b>V – Tests phénotypiques</b> .....	<b>155</b>
A- Test de clonogénicité .....	155
B- Test de formation de sphères .....	156
C- Tests de migration et d’invasion cellulaire .....	156
D- Essais comètes.....	157
E- Détection du stress oxydant.....	157
F- Test HPRT .....	157
G- Analyse du cycle cellulaire .....	158
H- Analyse de la sénescence .....	158
I- Analyse de la mort cellulaire .....	159
J- Test de résistance à l’anoïkis.....	159
<b>VI – Expériences <i>in vivo</i></b> .....	<b>160</b>
Injection en poisson zèbre transgénique.....	160
<b>VII – Analyses statistiques</b> .....	<b>160</b>
<b>RESULTATS</b> .....	<b>161</b>
<b>I – Le long ARN non codant <i>H19</i> inhibe p53 et favorise l’instabilité génomique</b> .....	<b>163</b>
A- Introduction .....	163
B- <i>H19</i> réprime la protéine p53 de façon post-traductionnelle .....	163
C- <i>H19</i> séquestre p53 dans le cytoplasme .....	165
D- <i>H19</i> perturbe les phénotypes associés à l’activité de p53 .....	166
E- <i>H19</i> interagit simultanément avec p53 et MDM2 pour induire la dégradation de p53 ...	169
<b>II – Le long ARN non codant <i>H19</i> favorise la réparation de l’ADN des cellules cancéreuses mammaires</b> .....	<b>173</b>
A- Introduction .....	173
B- <i>H19</i> favorise l’instabilité génomique.....	173
C- L’expression de <i>H19</i> diminue le nombre de foci de $\gamma$ H2AX.....	175

D- L'expression de <i>H19</i> est associée à une diminution des cassures de l'ADN.....	176
E- <i>H19</i> augmente l'activité des systèmes de réparation des cassures de l'ADN .....	180
F- <i>H19</i> favorise une réparation précoce des cassures de l'ADN .....	182
G- <i>H19</i> interagit avec EZH2 pour réprimer l'expression de <i>rif1</i> .....	185
<b>III – Contributions relatives du long ARN non codant <i>H19</i> et de son miR-675 dans l'agressivité des cellules cancéreuses mammaires</b> .....	<b>191</b>
A- Introduction .....	191
B- <i>H19</i> et le miR-675 favorisent l'invasion des cellules cancéreuses mammaires <i>in vivo</i> .....	191
C- <i>H19</i> et le miR-675 favorisent la migration et l'invasion des cellules cancéreuses mammaires <i>in vitro</i> .....	194
D- <i>H19</i> et le miR-675 régulent différemment l'expression des marqueurs épithéliaux et mésenchymateux.....	198
E- <i>H19</i> et le miR-675 favorisent la clonogénicité des cellules cancéreuses mammaires .....	201
F- <i>H19</i> et le miR-675 sont tous deux impliqués dans l'acquisition d'un phénotype souche cancéreux.....	202
<b>DISCUSSION &amp; PERSPECTIVES</b> .....	<b>209</b>
<b>I – L'expression de <i>H19</i> réprime p53 et perturbe les phénotypes associés</b> .....	<b>213</b>
<b>II – Réparation des cassures de l'ADN favorisée par <i>H19</i> et survie des cellules cancéreuses mammaires</b> .....	<b>220</b>
<b>III – <i>H19</i> et son miR-675 agissent de façon séquentielle dans la dissémination métastatique des cellules cancéreuses mammaires</b> .....	<b>227</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE</b> .....	<b>235</b>
<b>ANNEXES</b> .....	<b>285</b>
<b>Annexe 1</b> .....	<b>287</b>
<b>Annexe 2</b> .....	<b>321</b>
<b>Annexe 3</b> .....	<b>323</b>

# Table des illustrations

---

## FIGURES

Figure 1 : Anatomie et structure de la glande mammaire .....	23
Figure 2 : Histologie de la glande mammaire .....	24
Figure 3 : Evolution de la glande mammaire au cours de la vie de la femme .....	27
Figure 4 : Données statistiques sur le cancer du sein chez les femmes dans le monde en 2018 .....	28
Figure 5 : Données statistiques sur le cancer du sein chez les femmes en France en 2018 .....	29
Figure 6 : Evolution de l'incidence et de la mortalité par cancer du sein de 1990 à 2018 en France ...	30
Figure 7 : Etapes du développement d'une tumeur mammaire .....	33
Figure 8 : Les principales caractéristiques des cellules cancéreuses .....	35
Figure 9 : Altérations génétiques dans le cancer du sein .....	38
Figure 10 : Représentation des modèles théoriques de développement tumoral .....	45
Figure 11 : Représentation de variants histologiques d'adénocarcinomes du sein .....	58
Figure 12 : Courbes de survie associées aux différents sous-types de cancer du sein .....	61
Figure 13 : Schéma de la prise en charge thérapeutique classique du cancer du sein non métastatique .....	63
Figure 14 : Lésions de l'ADN induites par les traitements anti-cancéreux et mécanismes de réparation .....	69
Figure 15 : Mécanismes de réparation des cassures de l'ADN .....	73
Figure 16 : Proportions des transcrits codants et non codants dans le génome humain .....	76
Figure 17 : Principales catégories de longs ARNs non codants (lncRNAs) .....	77
Figure 18 : Principales fonctions cellulaires des lncRNAs .....	80
Figure 19 : Rôle des lncRNAs dans la stabilité chromosomique : exemple du lncRNA <i>TERRA</i> .....	82
Figure 20 : Rôle des lncRNAs dans l'inactivation du chromosome X .....	84
Figure 21 : Rôle des lncRNAs <i>HOTAIR</i> et <i>HOTTIP</i> dans la régulation de l'expression génique .....	86
Figure 22 : Rôle des lncRNAs dans la glande mammaire normale et cancéreuse .....	92
Figure 23 : Biosynthèse des miRNAs selon la voie canonique .....	99
Figure 24 : Représentation schématique des pri- et pré-miRNAs .....	100
Figure 25 : Voies de synthèse non canoniques des miRNAs .....	105
Figure 26 : Modes d'action des miRNAs dans la régulation de l'expression génique .....	107
Figure 27 : Les génomes maternel et paternel sont tous deux requis pour la reproduction des mammifères .....	113
Figure 28 : Le locus <i>H19/IGF2</i> chez l'homme .....	118
Figure 29 : Transcrits identifiés au locus <i>H19/IGF2</i> .....	121
Figure 30 : Découvertes majeures concernant <i>H19</i> et son implication dans le cancer du sein .....	122
Figure 31 : Structure secondaire du lncRNA transcrit à partir du gène <i>H19</i> .....	123
Figure 32 : Modes d'action du lncRNA <i>H19</i> dans le cancer .....	131
Figure 33 : Cartes des plasmides utilisés pour la création du plasmide pEZH2-EGFP .....	146
Figure 34 : Carte du plasmide DP-EZH2 .....	146
Figure 35 : Carte du plasmide pH19-mCherry .....	147
Figure 36 : <i>H19</i> réprime la protéine p53 dans les cellules cancéreuses mammaires .....	166
Figure 37 : <i>H19</i> empêche la translocation nucléaire de p53 après traitement à la doxorubicine .....	168
Figure 38 : <i>H19</i> réprime l'activité de p53 .....	169
Figure 39 : Formation d'un complexe ternaire <i>H19/p53/MDM2</i> .....	171

Figure 40 : Corrélation d'expression entre <i>H19</i> et MDM2 dans les échantillons BRCA de TCGA .....	174
Figure 41 : <i>H19</i> augmente la fréquence de mutation des cellules .....	176
Figure 42 : <i>H19</i> réprime la phosphorylation de l'histone H2AX .....	177
Figure 43 : L'expression de <i>H19</i> diminue la proportion de cassures de l'ADN des cellules cancéreuses mammaires .....	180
Figure 44 : <i>H19</i> favorise la réparation des cassures de l'ADN par HR et NHEJ .....	183
Figure 45 : <i>H19</i> permet l'activation des mécanismes de réparation de l'ADN de façon plus précoce .....	185
Figure 46 : L'expression de <i>H19</i> active la voie de réponse aux dommages de l'ADN .....	186
Figure 47 : <i>H19</i> réprime l'expression de <i>rif1</i> par l'intermédiaire de la protéine EZH2 .....	191
Figure 48 : <i>H19</i> et le miR-675 favorisent tous deux l'invasion des cellules cancéreuses mammaires <i>in vivo</i> .....	193
Figure 49 : <i>H19</i> et le miR-675 favorisent tous deux la migration des cellules cancéreuses mammaires .....	197
Figure 50 : <i>H19</i> et le miR-675 favorisent tous deux l'invasion des cellules cancéreuses mammaires .....	199
Figure 51 : Effets de <i>H19</i> et du miR-675 sur l'expression des marqueurs de l'EMT .....	201
Figure 52 : <i>H19</i> et le miR-675 favorisent la formation de clones cancéreux mammaires .....	203
Figure 53 : Action de <i>H19</i> et du miR-675 sur le phénotype souche des cellules cancéreuses mammaires .....	205
Figure 54 : <i>H19</i> et le miR-675 favorisent tous deux l'acquisition du phénotype cellulaire souche cancéreux mammaire .....	206
Figure 55 : Spectre de mutation de gènes fréquemment mutés dans les cancers humains .....	217
Figure 56 : Principe du séquençage par ChIRP (ChIRP-seq) .....	225
Figure 57 : Marquage par immunofluorescence de la phosphorylation de l'histone H2AX dans des cellules MDA-MB-231 surexprimant stablement ou non <i>H19</i> .....	227
Figure 58 : Contributions relatives du lncRNA <i>H19</i> et de son miR-675 dans la progression tumorale mammaire .....	231
Figure 59 : Génération d'un allèle <i>H19</i> déficient pour le miR-675 .....	235

## **TABLEAUX**

Tableau 1 : Principaux facteurs de risque d'apparition du cancer du sein chez la femme .....	32
Tableau 2 : Gènes dont le promoteur est hyper- ou hypométhylé dans le cancer du sein .....	41
Tableau 3 : Marqueurs de surface spécifiques des CSCs selon le type de cancer .....	52
Tableau 4 : Stades cliniques du cancer du sein déterminés par la classification TNM .....	60
Tableau 5 : Classification moléculaire des sous-types de cancer du sein .....	62
Tableau 6 : Récapitulatif des principales stratégies thérapeutiques utilisées selon le sous-type de cancer du sein .....	67
Tableau 7 : Cibles connues du miR-675 dans le cancer .....	133
Tableau 8 : Séquences des amorces utilisées pour la création du plasmide pEZH2-EGFP .....	145
Tableau 9 : Séquences des siRNAs utilisés .....	147
Tableau 10 : Références des mimic et anti-miR utilisés .....	148
Tableau 11 : Séquences des amorces utilisées en qPCR .....	150
Tableau 12 : Liste des anticorps utilisés en western blot .....	152
Tableau 13 : Liste des anticorps utilisés en immunofluorescence .....	154
Tableau 14 : Liste des gènes cibles putatifs de <i>H19</i> impliqués lors de la réponse aux dommages de l'ADN dans les cellules MCF-7 .....	189



# Liste des abréviations & acronymes

---

## 0-1

---

**53BP1** : p53-binding protein 1  
**5C** : chromosome conformation capture-carbon copy  
**6-TG** : 6-thioguanine  
**8-OxoG** : 8-oxoguanine

## A

---

**ABC** : ATP-binding cassette  
**ADN** : acide désoxyribonucléique  
**AGO** : Argonaute  
**AJCC** : American Joint Committee on Cancer  
**AKT** : Ak strain thymona  
**ALDH** : aldéhyde déshydrogénase  
**ANOVA** : Analysis of Variance  
**APC** : adenomatous polyposis coli  
**APE1** : apurinic endonuclease 1  
**ARA** : adriamycin resistance associated  
**ARID1A** : AT-rich interaction domain 1A  
**ARN** : acide ribonucléique  
**ARNm** : ARN messenger  
**ARNt** : ARN de transfert  
**ATCC** : American Type Culture Collection  
**ATM** : ataxia telangiectasia mutated  
**ATR** : ataxia telangiectasia and Rad3-related

## B

---

**BACE-AS** : Alzheimer-associated  $\beta$ -secretase 1  
**BAX** : BCL2-associated X protein  
**BCA** : bicinchonic acid  
**BCL2** : B-cell lymphoma 2  
**BDNF** : brain-derived neurotrophic factor  
**BER** : base-excision repair  
**Bik** : BCL2-interacting killer  
**BRAF** : v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1  
**BRCA** : BReast Cancer  
**BRIP1** : BRCA1 interacting protein c-terminal helicase 1  
**BSA** : bovine serum albumine

## C

---

**C3PO** : component 3 promoter of RISC  
**CAF** : cancer-associated fibroblast  
**CANTHER** : Cancer Heterogeneity, Plasticity and Resistance to Therapies  
**CASP8** : caspase 8  
**Cbl-b** : Casitas b-lineage lymphoma proto-oncogene b  
**CCI** : carcinome canalaire invasif

**CCIS** : carcinome canalaire *in situ*  
**CCND1** : cyclin D1  
**CD** : cluster of différenciation  
**Cdc25** : cell division control protein 25  
**CDH3** : cadherin 3  
**ChIP** : chromatin immunoprecipitation  
**CDKN1A** : cyclin-dependent kinase inhibitor 1A  
**cDNA** : ADN complémentaire  
**ceRNA** : competitive endogenous RNA  
**circRNA** : circular RNA  
**ChIRP** : chromatin isolation by RNA purification  
**CHK1** : checkpoint kinase 1  
**CHK2** : checkpoint kinase 2  
**CHO** : chinese hamster ovary cells  
**CK5/6** : cytokeratin 5/6  
**CLDN** : claudin  
**CLIS** : carcinome lobulaire *in situ*  
**COLDAIR** : cold assisted intronic non-coding RNA  
**CpG** : cytosine-phosphate-guanine  
**CRD-BP** : cMyc mRNA coding region instability determinant binding protein  
**CSC** : cellule souche cancéreuse  
**Ct** : cycle threshold  
**CtBP** : c-terminal-binding protein  
**CTCF** : CCCTC-binding factor  
**CtIP** : CtBP-interacting protein

## D

---

**DAP** : 2,6-diaminopurine  
**DAPI** : 2-(4-amidinophenyl)-1H-indole-6-carboxamide  
**DDR** : DNA damage response  
**DDX11** : DEAD/H-box helicase 11  
**DGCR8** : DiGeorge syndrome chromosomal (or critical) region 8  
**DHFR** : dehydrofolate reductase  
**DGT** : dihydrotestostérone  
**DLL** : delta-like ligand  
**DMEM** : Dulbecco's Modified Eagle Medium  
**DMR** : differentially methylated region  
**DNA-PK** : DNA-dependent protein kinase  
**DNMT** : DNA methyltransferase  
**DSB** : double strand break  
**DTA** : A fragment of diphteria toxin

## E

---

**E2F1** : E2F transcription factor 1  
**EDTA** : ethylene diamine tetra-acetic acid  
**EED** : embryonic ectoderm development  
**EGF** : epidermal growth factor  
**EGFP** : enhanced green fluorescent protein

**EGFR** : epidermal growth factor receptor  
**eIF4E** : eukaryotic translation initiation factor 4<sup>E</sup>  
**EMT** : epithelial-to-mesenchymal transition  
**ENCODE** : Encyclopedia of DNA Elements  
**EpCAM** : epithelial cell adhesion molecule  
**ER** : estrogen receptor  
**ERB-B2** : erythroblastosis oncogene B2  
**ERCC** : endonuclease non-catalytic subunit  
**ERCC2** : ERCC excision repair 2  
**eRNA** : enhancer RNA  
**ESA** : epithelial surface antigen  
**EXO1** : human exonuclease 1  
**EZH2** : enhancer of zeste homolog 2

## F

---

**FANC** : Fanconi anemia complementation group  
**FDA** : Food and Drug Administration  
**FEN1** : flap endonuclease 1  
**FGF** : fibroblast growth factor  
**FGFR2** : fibroblast growth factor receptor 2  
**FLC** : flowering repressor locus  
**FMR1** : fragile X mental retardation 1  
**FXR1** : FMR1 autosomal homolog 1

## G

---

**GAS5** : growth arrest specific 5  
**GLOBOCAN** : Global Cancer Observatory  
**GST** : glutathion S-transférase  
**GTP** : guanosine triphosphate  
**Gy** : gray

## H

---

**HAT** : histone acétyltransférase / hypoxanthine-aminopterin-thymidine  
**HCA** : hyperplasie canalaire atypique  
**HDAC** : histone désacétylase  
**HDMT** : histone déméthylase  
**HEPES** : Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-piperazine éthane sulfonique  
**HER2** : human epidermal growth factor receptor 2  
**HES** : hairy and enhancer of split  
**HEY** : hairy/enhancer of split related with YRPW motif protein 1  
**HGP** : Human Genome Project  
**HGF/SF** : hepatocyte growth factor/scatter factor  
**HMOF** : histone acetylase ortholog of Drosophila males absent on the first  
**HMT** : histone méthyltransférase  
**HMG** : high mobility group  
**HOTAIR** : HOX transcript antisense RNA  
**HOTS** : H19 opposite tumor suppressor  
**HOTTIP** : HOXA transcript at the distal tip  
**HOX** : homeobox  
**HPRT** : hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1  
**HR** : homologous recombination

**HRP** : horseradish peroxidase  
**HSC70** : heat shock 70 kDa protein

## I

---

**IC** : imprinting control  
**ICL** : interstrand cross-link  
**IDH1** : isocitrate dehydrogenase 1  
**IGF** : insulin growth factor  
**IGFBP-3** : insulin-like growth factor binding protein 3  
**IgG** : immunoglobuline G  
**IHC** : immunohistochimie  
**IL** : interleukin  
**IMP1** : IGF2 mRNA binding protein 1  
**INCa** : Institut National contre le Cancer  
**INSERM** : Institut National de la Santé et de la Recherche Médical  
**IP** : immunoprécipitation  
**IR** : imprinting region  
**IRM** : imagerie par résonance magnétique  
**IRES** : internal ribosome entry site

## J

---

**JAK** : Janus-associated kinase

## K

---

**kb** : kilobase  
**KD** : knock-down  
**kDa** : kiloDalton  
**KLF4** : Krüppel-like factor 4  
**KO** : knock-out  
**kpb** : kilopaire de bases  
**KRAS** : Kirsten ras oncogene homolog

## L

---

**LAM** : leucémie myéloïde aiguë  
**LIG4** : DNA ligase 4  
**lincRNA** : large-intergenic non-coding RNA  
**LLC** : leucémie lymphoïde chronique  
**lncRNA** : long non-coding RNA  
**LOI** : loss of imprinting  
**LRP5/6** : low-density lipoprotein-related receptor protein 5/6  
**LSD1** : lysine-specific histone demethylase 1  
**LSINCT5** : long stress-induced non-coding transcript 5

## M

---

**MALAT1** : metastasis-associated lung adenocarcinoma transcript 1  
**MAPK** : mitogen-activated protein kinase  
**MAP3K1** : mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1  
**Mb** : mégabase  
**MBD** : methyl-binding domain

**MCF-7** : Michigan Cancer Foundation-7  
**MDA-MB-231** : Monroe Dunawat Anderson-Metastasis Breast cancer cell line-231  
**MDGF-1** : mammary derived growth factor 1  
**MDGI** : mammary-derived growth inhibitor  
**MDM2** : mouse double minute 2 homolog / E3 ubiquitin-protein ligase  
**MEG3** : maternally expressed 3  
**MEK/ERK** : MAPK kinase/extracellular signal-regulated kinase  
**MET** : mesenchymal-to-epithelial transition  
**MGMT** : méthylguanine méthyltransférase  
**miRNA** : micro-RNA  
**MLL** : mixed-lineage leukemia  
**MMR** : mismatch repair  
**Mre11** : meiotic recombination 11  
**MRN** : Mre11-Rad50-Nbs1  
**mTOR** : mechanistic target of rapamycin kinase  
**MV** : mégavolt  
**MW** : molecular weight  
**MYC** : myelocytomatosis oncogene

## N

---

**N<sup>3</sup>MeG** : N<sup>3</sup>-méthylguanine  
**NANOG** : nanog homeobox  
**Nbs1** : Nijmegen breakage syndrome protein 1  
**ncRNA** : non-coding RNA  
**NEAT1** : nuclear-enriched autosomal transcript 1  
**NER** : nucleotide-excision repair  
**NF-κB** : nuclear factor κB  
**NGF** : nerve growth factor  
**NHEJ** : non-homologous end joining  
**NMD** : nonsense-mediated decay  
**nt** : nucléotide  
**NT4/5** : neurotrophin 4/5  
**NUP153** : nuclear pore complex protein 153

## O

---

**O<sup>6</sup>-MeG** : O<sup>6</sup>-méthylguanine  
**OCT4** : octamer-binding transcription factor 4  
**OMS** : Organisation Mondiale de la Santé  
**ORF** : open reading frame

## P

---

**PACT** : double strand RNA binding domain  
**PALB2** : partner and localizer of BRCA2  
**PARP** : poly-ADP ribose polymerase  
**pb** : paire de bases  
**PBS** : phosphate buffered saline  
**PCR** : polymerase chain reaction  
**PDX** : patient-derived xenograft  
**PI3K** : phosphatidylinositol-4,5-biphosphate 3-kinase  
**PIK3CA** : PI3K catalytic subunit  
**PINC** : pregnancy-induced non-coding RNA  
**PKC** : protein kinase C

**PNUTS** : phosphatase 1 nuclear targeting subunit  
**Pol II** : ARN polymérase II  
**PR** : progesterone receptor  
**PRC2** : Polycomb repressive complex 2  
**PTEN** : phosphatase and tensin homolog  
**PTENP1** : PTEN pseudogene 1  
**PUMA** : p53 upregulated modulator of apoptosis  
**PVDF** : polyfluorure de vinylidène  
**PXDN** : peroxidase homolog

## Q

---

**qPCR** : quantitative PCR

## R

---

**Rad51** : Rad51 recombinase  
**RB** : retinoblastoma  
**RBP** : RNA-binding protein  
**RIF1** : replication timing regulatory factor 1  
**RIP** : RNA immunoprecipitation  
**RIPA** : radioimmunoprecipitation assay buffer  
**RISC** : RNA-induced silencing complex  
**RNA-seq** : RNA sequencing  
**RNP** : ribonucléoprotéique  
**RoR** : regulator of reprogramming  
**ROS** : reactive oxygen species  
**RPA** : replication protein A  
**RPLP0** : ribosomal protein lateral stalk subunit P0  
**RPMI** : Roswell Park Memorial Institute medium  
**RT** : rétro-transcription  
**RUNX1** : Runt-related transcription factor 1

## S

---

**SAM** : S-adénosylméthionine  
**SD** : standard deviation  
**SDS** : sodium dodecyl sulfate  
**SF2/ASF** : pre-mRNA-splicing factor/alternative splicing factor  
**SFC** : sphere-forming capacity  
**siRNA** : small interfering RNA  
**SKA2** : spindle and kinetochore-associated protein 2  
**SOX2** : SRY-related HMG-box 2  
**SRA** : steroid receptor RNA activator 1  
**SRP** : signal recognition particule  
**SSB** : single strand break  
**STAT3** : signal transducer and activator of transcription 3  
**SV** : sarcoma virus  
**SVF** : sérum de veau fœtal

## T

---

**T-rec** : telomerase recruitment cluster  
**TALEN** : transcription activator-like effector nucleases  
**TAM** : tumor-associated macrophage

**TBST** : tris-buffered saline tween  
**TCGA** : Cancer Genome Atlas Consortium  
**TDP43** : TAR DNA-binding protein 43  
**TERC** : telomerase RNA component  
**TERRA** : telomeric repeat containing RNA  
**TERT** : telomerase reverse transcriptase  
**TGF- $\alpha$**  : transforming growth factor  $\alpha$   
**TGF- $\beta$ 1** : transforming growth factor  $\beta$ 1  
**THS** : traitement hormonal de substitution  
**TNBC** : triple negative breast cancer  
**TNF- $\alpha$**  : tumor necrosis factor  $\alpha$   
**TNM** : tumor/node/metastasis  
**TNRC9** : trinucleotide repeat-containing gene 9 protein  
**TOPO II** : topoisomérase II  
**TP53** : tumor protein 53  
**TRBP** : TAR RNA binding protein  
**treRNA** : translational regulatory RNA  
**TWIST** : Twist family BHLH transcription factor

## **U**

---

**UCA1** : urothelial cancer associated 1  
**UTDL** : unité terminale ducto-lobulaire  
**UTR** : untranslated transcribed region

## **V**

---

**VADS** : voies aéro-digestives supérieures  
**VEGF** : vascular endothelial growth factor

## **W**

---

**WAGO** : worm-specific AGO  
**WB** : western blot  
**Wnt** : Wingless-type MMTV integration site

## **X**

---

**Xic** : X inactivation center  
**Xist** : X inactive specific transcript  
**XLF** : XRCC4-like factor  
**XPA** : Xeroderma pigmentosum complementation group A

## **Z**

---

**ZEB1** : zinc finger E-box binding homeobox 1  
**ZFAS1** : ZNF1 antisense RNA 1  
**ZNFX1** : zinc finger NFX1-type containing 1  
**ZO-1** : zonula occludens 1

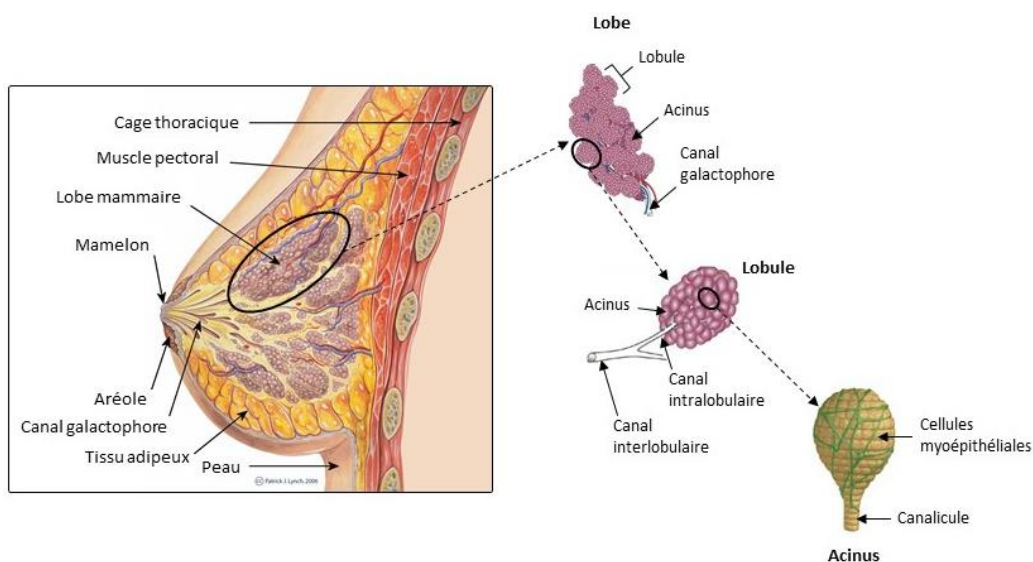
# **INTRODUCTION**



# I – La glande mammaire

## A- Anatomie & histologie

Le sein est un organe retrouvé chez tous les mammifères et qui assure la sécrétion du lait après l'accouchement. Sa structure varie selon l'âge, le cycle menstruel et l'état reproducteur de la femme. Le sein est constitué d'une glande mammaire exocrine entourée de tissu graisseux (**Figure 1**). L'ensemble de cette structure repose sur les muscles pectoraux, et son intégrité est assurée par un tissu conjonctif composé des crêtes fibro-glandulaires de Duret et des ligaments suspensoirs de Cooper. En surface, la peau entourant le mamelon est fine et pigmentée, constituant l'aréole. C'est au niveau de cette zone que l'on retrouve les glandes sébacées de Morgagni, qui s'hypertrophient pendant la grossesse et prennent le nom de tubercules de Montgomery.



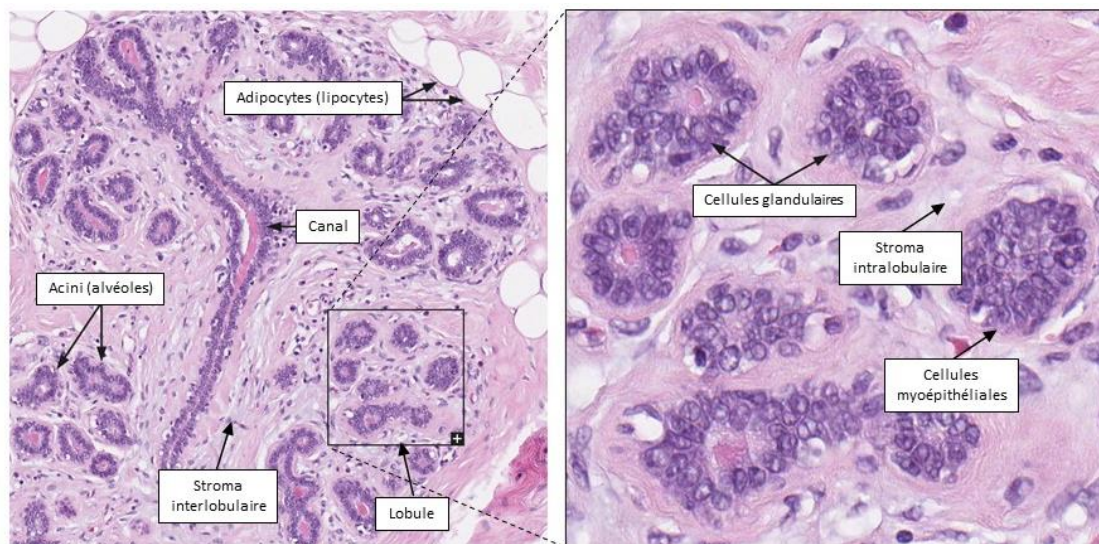
**Figure 1. Anatomie et structure de la glande mammaire.**

*Représentation schématique d'une coupe sagittale de sein et de la paroi thoracique antérieure chez la Femme. La glande mammaire est formée de tissus épithéliaux et de tissus adipeux, reposant sur les muscles pectoraux. La glande est composée de 15 à 25 lobes irréguliers dont les canaux aboutissent au niveau du mamelon, où sera expulsé le lait maternel. Les lobes sont eux-mêmes divisés en 20 à 40 lobules composés d'une arborescence de 10 à 100 acini. L'acinus est l'unité de base de production de lait maternel, qui sera sécrété dans le canalicule puis dans les canaux intra- et interlobulaire pour aboutir dans le canal galactophore jusqu'au mamelon. (Adapté de Medical Illustrations by Patrick J. Lynch et de [www.santeallaitementmaternel.com](http://www.santeallaitementmaternel.com)).*

La glande mammaire est de type tubulo-alvéolaire : elle est constituée de 15 à 25 lobes irréguliers. Ces lobes sont enfouis dans du tissu graisseux et séparés par un tissu conjonctif dense. Chaque lobe est relié à un canal galactophore (ou canal de premier ordre) qui aboutit

à un orifice à la surface du mamelon. Ce canal galactophore se ramifie progressivement en profondeur du sein pour évoluer en canaux interlobulaires (ou canaux de second ordre), aboutissant chacun à un lobule. Les lobules sont séparés entre eux par un tissu conjonctif plus ou moins dense, et sont composés de nombreuses alvéoles ou acini. Les acini se présentent sous la forme d'une cavité arrondie : ils sont caractérisés par une lumière entourée de cellules épithéliales lactocytaires, elles-mêmes surplombées de cellules myoépithéliales. Les acini sont rattachés *via* un canalicule au canal intralobulaire (ou canal de troisième ordre) qui est lui-même connecté au canal interlobulaire (**Figure 1**).

La structure formée par un canal lobulaire et un lobule est appelée unité terminale ducto-lobulaire (UTDL) : cette UTDL est l'unité de base de la glande puisqu'elle est responsable de la production du lait. L'UTDL est très sensible aux variations hormonales, la rendant de cette façon propice au développement tumoral. En effet, bien que les différents types de cancers du sein aient été pendant longtemps distingués selon leur origine canalaire ou lobulaire, il est maintenant démontré que ce type de classification n'est pas valable car la grande majorité des cancers mammaires tiennent leur origine des UTDL (Wellings et Jensen, 1973).



**Figure 2. Histologie de la glande mammaire.**

*A gauche, coupe histologique de la glande mammaire. On distingue les structures constitutives que sont les lobules (eux-mêmes composés d'acini) et les canaux, ainsi que le tissu conjonctif mammaire comprenant le stroma interlobulaire. A droite, grossissement d'un lobule où l'on peut distinguer dans chaque acinus les cellules épithéliales glandulaires responsables de la sécrétion de lait maternel, et les cellules myoépithéliales en surplomb. (Adapté de [www.proteinatlas.org](http://www.proteinatlas.org)).*



Au niveau histologique, on retrouve au niveau de l'UTDL deux principaux types cellulaires : une couche luminale interne composée de cellules épithéliales appelées lactocytes qui sécréteront le lait, et une couche basale externe composée de cellules myoépithéliales. Ce sont ces cellules myoépithéliales qui, par leur contraction suite au stimulus de succion lors de l'allaitement, permettront l'éjection du lait vers les canaux galactophores. L'UTDL repose sur un tissu conjonctif mammaire composé de laminine et de collagène IV. Ce tissu conjonctif contiendrait également des cellules souches mammaires bipotentes : leur présence pourrait expliquer les capacités de renouvellement et de transformation singulières des tissus mammaires (Visvader, 2009). Le tissu conjonctif mammaire est lâche et richement vascularisé par les circulations sanguine et lymphatique, mais on y retrouve également des fibres nerveuses (**Figure 2**). Ce tissu peut être divisé en 2 catégories : le stroma interlobulaire, qui entoure les UTDL et qui est plus dense que le stroma intralobulaire, qui entoure les acini. On retrouve dans ce stroma intralobulaire différents types cellulaires, comme des adipocytes, des fibroblastes, des lymphocytes ou encore des macrophages (Arendt *et al.*, 2010).

## B- Développement de la glande mammaire

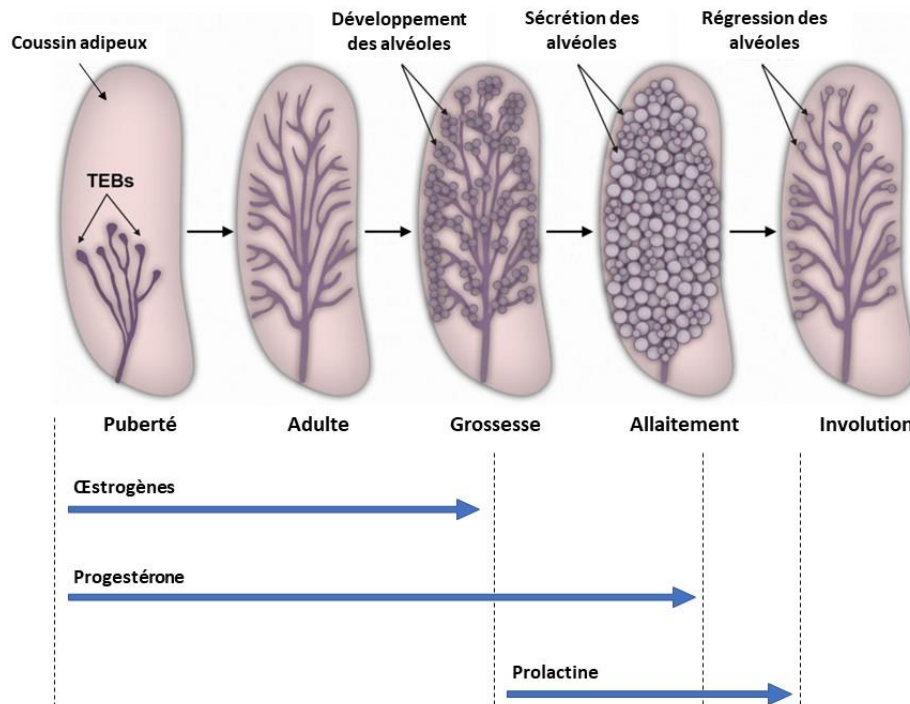
La glande mammaire est un des rares organes qui atteint sa forme mature bien après la naissance, puisqu'elle continue à se développer tout au long de la vie (Gjorevski et Nelson, 2011; Watson et Khaled, 2008). En effet, son développement est régi par trois périodes précises au cours de la vie de l'individu : le développement embryonnaire, la puberté et la reproduction. La majorité des connaissances actuelles proviennent de l'étude de la glande mammaire chez la souris étendue par analogie à l'homme. En effet, même s'il existe des différences structurales et hormonales entre les modèles humain et murin, la grande majorité des gènes de ces 2 espèces (75 à 80%) présentent une relation orthologue. De plus, la glande mammaire de la souris est propice aux expériences *in vivo* et *in vitro*. Ceci a permis de mettre en évidence les mécanismes sous-jacents principaux du développement de la glande mammaire, notamment les interactions épithélium-mésenchyme, le contrôle de la régulation hormonale et les communications intercellulaires.

Pendant la 4<sup>ème</sup> semaine du développement embryonnaire, un épaissement de l'ectoderme prend forme à partir de la future aisselle jusqu'à la future aine : c'est la crête mammaire (ou ligne lactéale). Le long de cette crête vont apparaître de petits épaissements

symétriques appelés bourgeons mammaires primitifs. Les bourgeons mammaires subsisteront à la 6<sup>ème</sup> semaine de développement, au contraire de la crête mammaire qui disparaîtra. A partir du 5<sup>ème</sup> mois de développement, les bourgeons mammaires vont émettre des prolongements dans le mésoderme qui vont ensuite se ramifier et se dilater à leur extrémité. Ces prolongements vont se creuser, faisant apparaître une lumière en leur centre : ce sont les futurs canaux galactophores. Ainsi, à la naissance, la même structure rudimentaire de glande mammaire est présente à la fois chez l'homme et chez la femme. Chez la femme, le développement de la glande mammaire se poursuivra au moment de la puberté puis plus tard au cours des futures grossesses, alors que chez l'homme sa croissance sera modeste et restera à ce stade (Russo et Russo, 2004).

A la naissance, la glande mammaire n'est constituée que d'une simple structure épithéliale canalaire dans un pseudo-coussin adipeux. Son développement sera très lent. A la puberté, l'apparition des cycles menstruels va permettre l'action d'hormones de croissance et des hormones sexuelles (œstrogènes, progestérone). La prolifération des cellules épithéliales mammaires sera stimulée, entraînant une expansion rapide du réseau canalaire et l'apparition à l'extrémité des canaux de bourgeons terminaux (Brisken et O'Malley, 2010). Les bourgeons terminaux sont des structures dynamiques permettant l'élongation des canaux et la formation de leur lumière centrale (**Figure 3**). Cette élongation permettra la ramification des canaux et la structuration du coussin adipeux mammaire, qui acquerra progressivement les caractéristiques de la glande mammaire adulte. De plus, à ce stade, le volume du sein va augmenter du fait de l'accumulation des dépôts lipidiques. Une pigmentation accompagnée d'une saillie de l'aréole et du mamelon se produisent également.

Les structures internes de la glande mammaire comme les alvéoles ne se développent pleinement qu'à la gestation. En effet, la grossesse provoque une forte concentration en progestérone, en œstrogènes et en prolactine placentaire. La progestérone et les œstrogènes permettent la production de facteurs de croissance comme le TGF $\alpha$  (*transforming growth factor  $\alpha$* ), le MDGF-1 (*mammary derived growth factor 1*), l'IGF (*insulin growth factor*) et l'EGF (*epidermal growth factor*). Sous l'effet de ces facteurs, les acini se différencient et les canaux se développent pour prendre progressivement la place du tissu adipeux mammaire. Cette phase de prolifération et de différenciation se produit principalement pendant les vingt premières semaines de grossesse.



**Figure 3. Evolution de la glande mammaire au cours de la vie de la femme.**

*A la puberté, les structures canales se développent et se ramifient sous l'action des cycles menstruels et de la sécrétion des hormones sexuelles. Au moment de la grossesse, les acini se développent, se différencient et prennent progressivement la place du tissu adipeux mammaire. Lors de l'allaitement, grâce à la sécrétion de prolactine, les acini produisent et sécrètent le lait dans le canal galactophore. Enfin, la glande mammaire retournera à son état basal par involution. (Adapté de Shore et Rosen, 2014).*

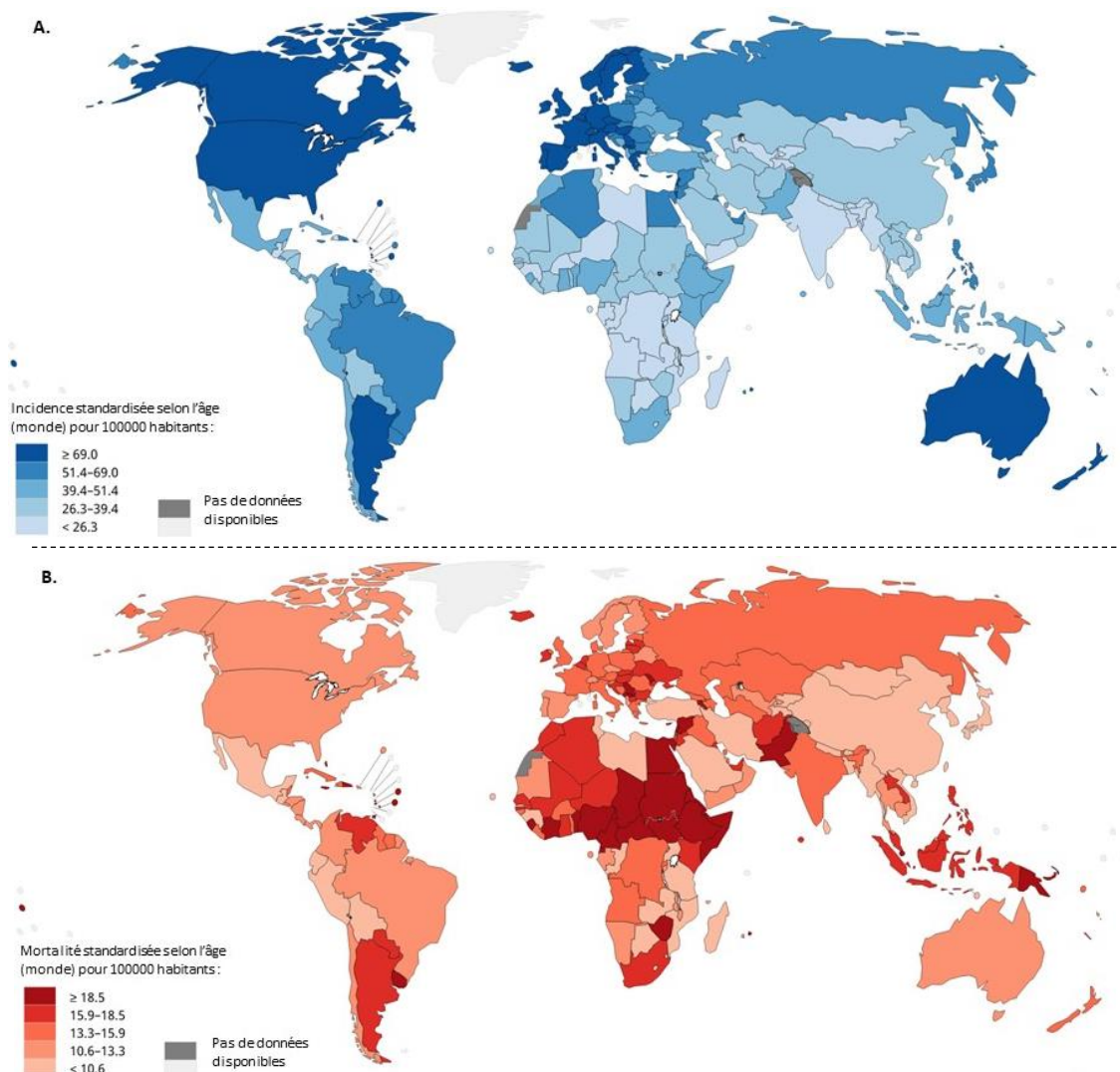
Pendant la grossesse et le développement de la glande mammaire, la production et la sécrétion de lait sont inhibées car l'expression de la progestérone bloque la prolactine. Lors de l'accouchement, le placenta est éliminé, ce qui provoque une modification de la balance d'expression des différentes hormones, et notamment de la balance progestérone/prolactine. La prolactine n'est plus inhibée et permet la production du lait maternel. Enfin, après la période d'allaitement, la glande mammaire va progressivement involuer jusqu'à retrouver son état quiescent post-pubertaire. Les cellules épithéliales et myoépithéliales développées pendant les premières semaines de la grossesse entrent alors en apoptose (**Figure 3**).

A la ménopause, du fait de la forte diminution des niveaux d'œstrogènes et de progestérone, les acini involuent jusqu'à disparaître complètement. Les cellules épithéliales glandulaires et myoépithéliales s'atrophient, et la lame basale se rigidifie. Le tissu conjonctif mammaire subit également des modifications, puisque la matrice extracellulaire qui le compose est altérée. Le sein sera alors majoritairement constitué de tissu fibro-adipeux.

## II – Le cancer du sein

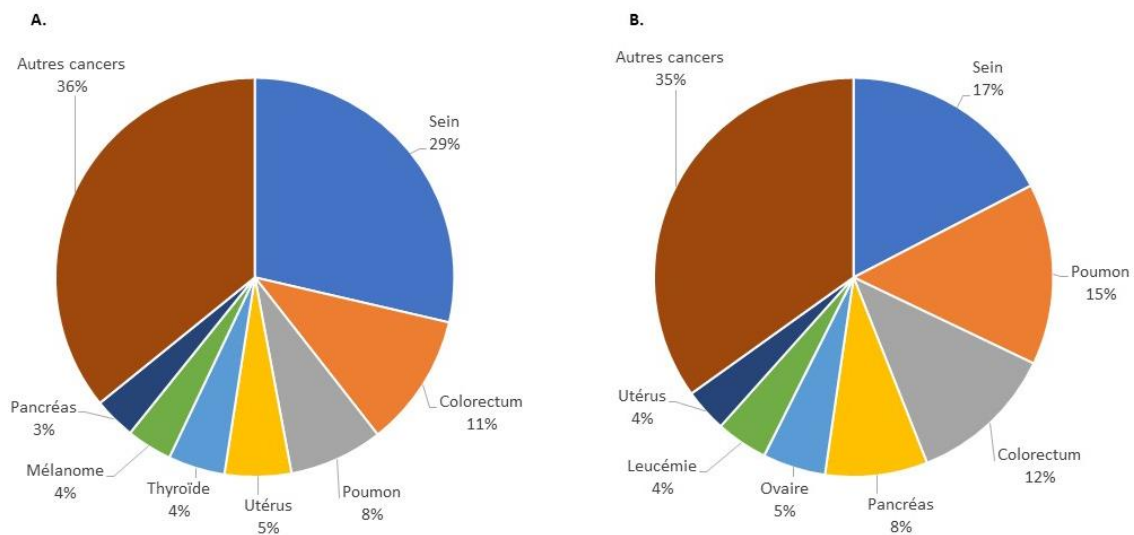
Malgré les récentes avancées thérapeutiques, le cancer du sein reste un enjeu médico-social majeur. Il s'agit d'une pathologie dans laquelle de nombreux facteurs sont impliqués, qu'il s'agisse de facteurs intrinsèques (génétiques, hormonaux) ou de facteurs environnementaux (habitudes de vie, pollution). Le cancer du sein se traduit par une perturbation du fonctionnement normal des cellules de la glande mammaire, qui aboutira à leur développement anarchique.

### A- Epidémiologie



**Figure 4. Données statistiques sur le cancer du sein chez les femmes dans le monde en 2018.**  
**A.** Estimation de l'incidence standardisée du cancer du sein chez les femmes selon l'âge dans le monde.  
**B.** Estimation de la mortalité standardisée du cancer du sein chez les femmes selon l'âge dans le monde.  
(Adapté de <http://qco.iarc.fr/today>)

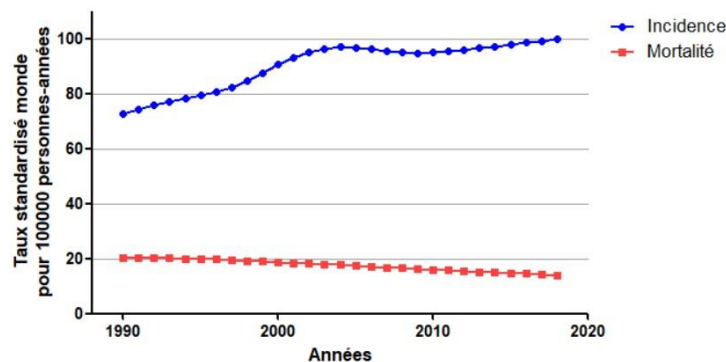
D'après l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), le cancer du sein est la 1<sup>ère</sup> cause de décès par cancer chez les femmes dans le monde (**Figure 4**). Selon les statistiques les plus récentes, on estime le nombre de nouveaux cas par année à plus de 2 millions (soit 24,2% de tous les cancers chez les femmes) et le nombre de décès à 620000 (soit 15% de tous les décès par cancer chez les femmes) en 2018 (GLOBOCAN (Global Cancer Observatory), 2018). En France, on recensait en 2018 près de 60000 nouveaux cas de cancer du sein, ce qui le positionne à la 2<sup>ème</sup> place des cancers les plus fréquents en France et à la 1<sup>ère</sup> place chez la femme, en France comme dans le monde (**Figure 5**). Il s'agit également du cancer ayant la plus grande mortalité chez la femme, avec plus de 13000 décès en France en 2018 soit 15 à 20% des décès féminins par cancer (Cowppli-Bony *et al.*, 2019).



**Figure 5. Données statistiques sur le cancer du sein chez les femmes en France en 2018.**  
**A.** Estimation du pourcentage de nouveaux cas par cancer chez les femmes en France en 2018.  
**B.** Estimation du pourcentage de mortalité par cancer chez les femmes en France en 2018.  
(Adapté de <http://qco.iarc.fr/today>)

Bien que la mortalité par cancer du sein chez les femmes soit en légère diminution en France, le nombre de nouveaux cas ne cesse d'augmenter chaque année (**Figure 6**). Ce phénomène peut en partie s'expliquer par la généralisation du dépistage organisé du cancer du sein en France depuis 2004. En effet, l'incidence du cancer du sein a connu une forte augmentation jusque 2005 (de 72,8 en 1990 à 97 en 2005), suivie d'une légère baisse (88) jusque 2012 (**Figure 6**). Cette baisse n'est pas exclusive à la France puisqu'elle a été rapportée dans plusieurs pays occidentaux. Elle concernerait les femmes de 50 à 69 ans (Molinié *et al.*, 2014). Parmi les éléments qui pourraient expliquer cette baisse, une hypothèse mettant en

avant à la fois le dépistage et l'arrêt progressif des traitements hormonaux de substitution (THS) a été émise. Les THS étaient prescrits pour remplacer les hormones œstrogéniques et progestatives qui ne sont plus produites physiologiquement par les ovaires après la ménopause. Les THS ont pour but de soulager les symptômes de la ménopause mais aussi de protéger les patientes contre la perte de densité osseuse (ostéoporose). Cependant, des effets carcinogènes ont été associés aux THS en 2002 (Rossouw *et al.*, 2002), ce qui a abouti à un classement de ces molécules comme carcinogènes par l'OMS en 2005 et à un arrêt de leur prescription.



**Figure 6. Evolution de l'incidence et de la mortalité par cancer du sein de 1990 à 2018 en France.** L'incidence et la mortalité sont exprimées en taux standardisés sur la population mondiale pour 100000 personnes par année. (Adapté de Santé Publique France, 2019).

Comme évoqué précédemment, le dépistage du cancer du sein a été généralisé en France, de façon à favoriser une détection et un diagnostic les plus précoces possibles. L'intérêt est de pouvoir intervenir plus facilement et de limiter les potentielles séquelles dues à certains traitements lourds. Dans le cadre de ce dépistage, un examen clinique (palpation des seins) par un professionnel de santé est recommandé tous les ans dès l'âge de 25 ans. En cas de risque plus élevé (âge, antécédents médicaux personnels ou familiaux, prédispositions génétiques), les modalités de dépistage sont adaptées selon le cas.

## B- Facteurs de risque

---

Le cancer du sein est une maladie multifactorielle (Lacey *et al.*, 2009). Elle touche majoritairement les femmes : en effet, on estime qu'une femme sur 8 développera un cancer du sein au cours de sa vie, alors que les hommes ne représentent qu'environ 1% des cas de cancer du sein. Les facteurs de risques sont très variés, cependant le risque d'apparition de la maladie augmente fortement avec l'âge. Environ 80% des cancers du sein concernent des

femmes âgées de plus de 50 ans. Pour autant, il existe de nombreux autres facteurs de risque pouvant être associés à l'apparition d'un cancer du sein. Ces facteurs de risques sont liés au statut hormonal, au mode de vie et à l'environnement, ainsi qu'aux contextes familial et génétique de la personne atteinte (Dieterich *et al.*, 2014; Nkondjock et Ghadirian, 2005) (**Tableau 1**).

Il existe ainsi des facteurs de risque liés à l'exposition aux hormones sexuelles endogènes, et ce quel que soit l'âge de l'individu (règles précoces, grossesse tardive, ménopause tardive). En lien avec ce facteur de risque, il est à noter qu'environ 2 cancers du sein sur 3 sont hormono-dépendants (Viale, 2012). Ces cancers présentent donc une dépendance aux hormones œstrogéniques et progestative. Les mécanismes responsables des effets carcinogènes des œstrogènes sont de 2 types (Yue *et al.*, 2013) : d'une part, leur signalisation active grâce aux récepteurs aux œstrogènes régule l'expression de certains gènes et augmente la prolifération cellulaire, ce qui pourrait conduire à une plus grande chance de mutations lors des phases de réplication de l'ADN nécessaires. D'autre part, un mécanisme indépendant de ces récepteurs lié au métabolisme des hormones oestrogéniques peut expliquer leurs effets carcinogènes. En effet, l'œstradiol, membre principal des hormones oestrogéniques, peut être métabolisé par des enzymes de type cytochrome P450 dans le tissu mammaire, aboutissant à la synthèse de catéchols. Ces catéchols peuvent ensuite être eux-mêmes métabolisés et former des quinones qui pourront provoquer des dommages au niveau de l'ADN et aboutir à des mutations (Cavalieri *et al.*, 2006). L'exposition aux hormones oestrogéniques constitue ainsi un facteur de risque important d'apparition de cancer du sein.

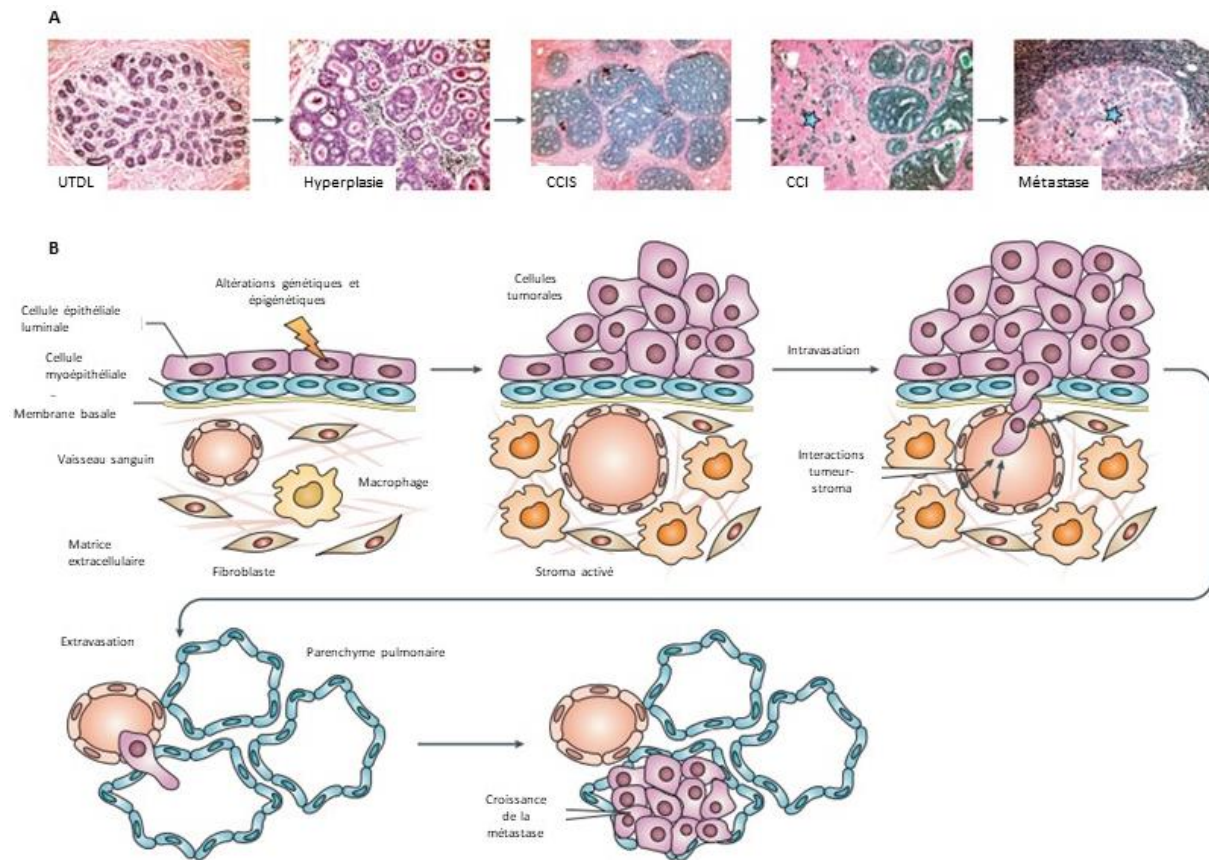
	Facteur de risque	Mécanisme(s) biologique(s) impliqué(s)
Augmentation du risque	Age avancé	Exposition prolongée au milieu hormonal
	Age précoce des premières règles (< 12 ans)	Exposition précoce et prolongée au milieu hormonal
	Ménopause tardive (après 55 ans)	Production prolongée des hormones ovariennes
	Alcool (au moins 1 boisson alcoolique par jour)	Augmentation des hormones sériques et de la production d'IGF
	Obésité (après la ménopause) et gain de poids (à partir de 18 ans)	Augmentation de la concentration d'œstradiol libre sérique
	Densité mammographique (> 50%)	Augmentation d'IGF avant la ménopause et de la prolactine après la ménopause
	Histoire familiale de cancer du sein	Même environnement et style de vie, fonds génétique commun
	Mutations génétiques ( <i>BRCA1/2</i> )	Augmentation de l'instabilité génomique
	Radiations ionisantes (avant 40 ans)	Domages de l'ADN et de ses constituants
	Contraceptifs oraux	Augmentation de l'exposition aux œstrogènes, suppression de la production d'œstradiol et de progestérone
Maladies bénignes du sein	Augmentation de l'hyperplasie des cellules épithéliales, diminution de la vitesse mitotique	
Diminution du risque	Multiparité	Accélération et différenciation des tissus mammaires, prolifération rapide de l'épithélium
	Allaitement (pendant au moins 25 mois)	Réduction de la production d'œstrogènes et du rétablissement de l'ovulation
	Activité physique régulière	Réduction de la production d'œstrogènes, maintien de l'équilibre énergétique
	Restriction énergétique (durant l'enfance et l'adolescence)	Recul de la date d'apparition des premières règles, diminution des œstrogènes et de l'IGF1

**Tableau 1. Principaux facteurs de risque d'apparition du cancer du sein chez la femme.**  
(Adapté de Nkondjock et Ghadirian, 2005).



## C- Développement d'une tumeur mammaire

### 1) Etapes du développement d'une tumeur mammaire



**Figure 7. Etapes du développement d'une tumeur mammaire.**

**A.** Coupes histologiques d'un UTDL mammaire normal, d'une hyperplasie, d'un carcinome canalaire in situ (CCIS), d'un carcinome canalaire invasif (CCI) et d'une métastase pulmonaire. **B.** Représentation schématique du développement d'une tumeur mammaire. Les cellules constituant un épithélium de sein peuvent subir des altérations génétiques et/ou épigénétiques, entraînant leur prolifération anarchique jusqu'au stade hyperplasique. Les cellules se dédifférencient et poursuivent leur prolifération, ce qui aboutit à la formation d'un carcinome in situ. Progressivement, les cellules vont acquérir les caractéristiques des cellules cancéreuses, et leurs modifications phénotypiques leur permettront ainsi de franchir la membrane basale pour former un carcinome invasif puis métastatique. (Adapté de Vargo-Gogola et Rosen, 2007).

Le développement du cancer du sein s'effectue en plusieurs stades (Vargo-Gogola et Rosen, 2007) (**Figure 7**). A partir d'un UTDL normal, il peut survenir des altérations génétiques et/ou épigénétiques qui entraîneront la prolifération incontrôlée et accrue des cellules épithéliales canalaire luminales ou basales. Ceci entraîne un épaississement de l'épithélium canalaire, ainsi qu'une obstruction partielle du canal galactophore : c'est une hyperplasie. Il existe également un stade hyperplasique dit "atypique", qui est caractérisé par une

prolifération accrue des cellules luminales uniquement (ce stade hyperplasique atypique multiplie le risque d'apparition de cancer du sein d'un facteur 4 à 5). Par la suite, les cellules vont continuer à accumuler des anomalies structurelles et phénotypiques, qui sont spécifiques des cellules cancéreuses et qui vont conduire à la formation de lésions pré-cancéreuses puis d'un carcinome *in situ*. A ce stade, les cellules restent localisées au niveau de la lésion, l'intégrité de la membrane basale est maintenue, aucune invasion dans le tissu environnant n'est observée.

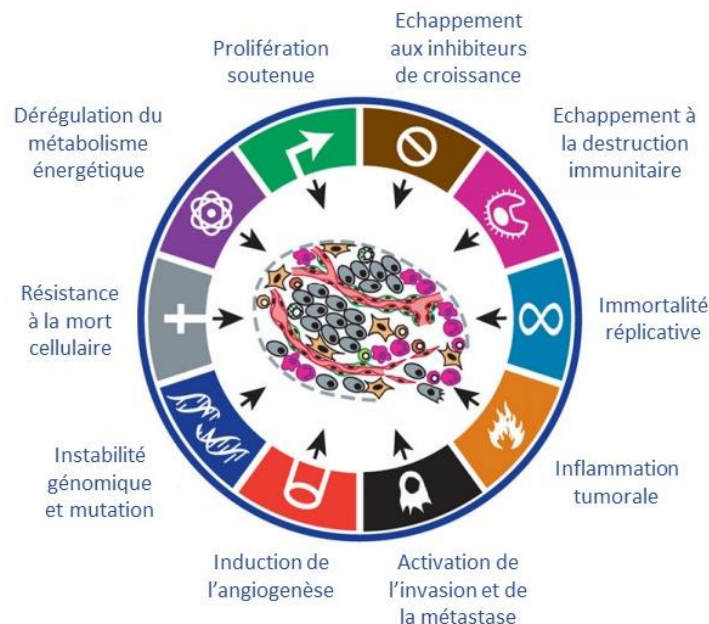
Au sein de la néo-tumeur, de nouvelles altérations génétiques peuvent entraîner la modification des capacités invasives et métastatiques des cellules. De cette façon, lorsque les cellules de la tumeur primaire deviennent capables d'altérer l'intégrité de la membrane basale et d'envahir le tissu conjonctif environnant, le carcinome devient "invasif". La rupture de la membrane basale est une étape critique dans la progression tumorale : cela signifie que les cellules cancéreuses sont capables d'envahir le stroma par perte d'adhérence, inhibition de contact et sécrétion de protéases, et peuvent induire l'angiogenèse. La dernière étape du développement tumorale est la plus agressive : à ce stade, les cellules peuvent atteindre les systèmes lymphatique et/ou sanguin pour y transiter de façon à coloniser différents organes dans l'organisme entier et y former une tumeur secondaire. Cette tumeur secondaire est appelée "métastase". Dans le cas du cancer du sein, les sites métastatiques principaux sont le foie, les poumons, les os et le cerveau.

## 2) Origine cellulaire du cancer du sein

Le cancer est une pathologie définie par la présence de cellules anormales, qui vont acquérir des spécificités au niveau génétique de façon à entre autres favoriser leur potentiel de prolifération, réduire la mort cellulaire programmée, voire même "tromper" la vigilance du système immunitaire. En 2000, Hanahan et Weinberg ont listé 6 comportements retrouvés chez les cellules cancéreuses et pouvant être considérés comme des caractéristiques spécifiques du cancer : la prolifération soutenue, l'échappement aux inhibiteurs de croissance, l'immortalité répliquative, l'activation de l'invasion et de la métastase, l'induction de l'angiogenèse et la résistance à la mort cellulaire (Hanahan et Weinberg, 2000).

Grâce aux progrès réalisés dans la recherche contre le cancer, l'idée selon laquelle les tumeurs ne sont pas uniquement des masses de cellules qui prolifèrent s'est progressivement développée. Les tumeurs doivent plutôt être considérées comme des structures hiérarchisées,

composées de types cellulaires différents qui interagissent non seulement les uns avec les autres mais aussi avec leur environnement. De cette façon, Hanahan et Weinberg ont ajouté par la suite 4 caractéristiques supplémentaires à leur liste initiale : l'échappement à la destruction immunitaire, la promotion de l'inflammation tumorale, l'instabilité génomique et la mutation, et la dérégulation du métabolisme énergétique cellulaire (Hanahan et Weinberg, 2011) (**Figure 8**). Toutes ces caractéristiques des cellules cancéreuses sont considérées comme étant à la fois distinctes et complémentaires. Combinées, elles permettent la croissance de la tumeur ainsi que sa dissémination métastatique. Cependant, les dernières publications tendent à simplifier ces caractéristiques. Les transformations nécessaires à l'acquisition de ces capacités pro-tumorales sont le résultat d'altérations génétiques et/ou épigénétiques ponctuelles, voire dans certains cas héréditaires (Zhang *et al.*, 2017).



**Figure 8. Les principales caractéristiques des cellules cancéreuses.**  
(Adapté de Hanahan et Weinberg, 2011).

La transformation d'une cellule normale en cellule cancéreuse nécessite plusieurs étapes-clés. Ces étapes prennent en compte les facteurs de risques énoncés précédemment, mais aussi d'autres éléments qui sont déterminants et qui peuvent varier d'une personne à l'autre. Parmi ces éléments, on retrouve les facteurs génétiques, les facteurs épigénétiques, et l'influence du micro-environnement tumoral.

Le terme "altération génétique" désigne l'ensemble des modifications de la séquence d'ADN, comprenant les mutations ponctuelles et les délétions. Ces altérations sont à dissocier

d'autres modifications dites "épigénétiques", qui concernent les modifications de l'expression des gènes sans modification de la séquence d'ADN (Karsli-Ceppioglu *et al.*, 2014; Mulligan, 2018; Virani *et al.*, 2012; Wu *et al.*, 2015). Les altérations génétiques/épigénétiques peuvent être sporadiques, ou plus rarement héréditaires (5 à 10% des cas de cancer du sein) (Apostolou et Fostira, 2013; Lerebours et Lidereau, 2002; Mavaddat *et al.*, 2010). En complément de ces altérations intrinsèques des cellules, la participation du micro-environnement tumoral va favoriser l'apparition des caractéristiques des cellules cancéreuses énoncées précédemment, en influençant à la fois l'instabilité génétique et épigénétique, mais aussi en "sur-activant" des processus biologiques propres à la tumorigenèse, et ce tout au long de la progression tumorale (Hanahan et Coussens, 2012; Soysal *et al.*, 2015).

L'ensemble de ces éléments va avoir un impact sur l'expression de gènes dits "déclencheurs de cancer", appelés oncogènes, mais aussi par leurs opposés que sont les gènes suppresseurs de tumeur (Spandidos, 2007).

#### a) Principales altérations génétiques

##### Activation de l'expression d'oncogènes

On appelle "oncogène" un gène dont l'activation participe à la progression tumorale. Dans le cas du cancer du sein, l'activation d'un oncogène peut être due à plusieurs types d'altérations génétiques, notamment les amplifications géniques, les mutations ponctuelles, la perte de régions régulatrices ou les translocations chromosomiques (Osborne *et al.*, 2004). La plupart des oncogènes sont impliqués dans le processus d'angiogenèse ou dans la dissémination métastatique. Leur rôle se situe le plus souvent dans la transduction des signaux de prolifération cellulaire (facteurs de croissance), dans l'activation du cycle cellulaire (cyclines), ou encore dans l'inhibition de l'apoptose. Trois oncogènes sont amplifiés dans plus de 15% des tumeurs mammaires : il s'agit des gènes *CCND1* (*cyclin D1*), *ERB-B2* (*erythroblastosis oncogene B2*) et *MYC* (*myelocytomatosis oncogene*).

Le gène *CCND1* est localisé sur le chromosome 11 en position p13. Il code pour la cycline D1, qui est un des régulateurs majeurs du cycle cellulaire : son action prend place dans les transitions G1/S et G2/M du cycle, mais elle possède aussi des activités de facteur de transcription. La cycline D1 est surexprimée dans 50% des carcinomes mammaires, alors que son amplification génique n'est retrouvée que dans 15% des cas (Arnold et Papanikolaou, 2005). Ceci peut être expliqué par le fait que l'expression de la cycline D1 peut être activée

par d'autres facteurs, comme les hormones œstrogéniques ou la protéine p53 (*via* son effet sur la protéine p21) (Roy et Thompson, 2006). La surexpression de la cycline D1 a également été associée à la résistance au tamoxifène, dans le cadre des traitements hormono-dépendants (Stendahl *et al.*, 2004).

Le gène *ERB-B2* est localisé sur le chromosome 17 en position q21-22. Il code pour la protéine HER2 (*human epidermal growth factor receptor 2*), qui est un récepteur à activité tyrosine kinase. Dans 25% des tumeurs mammaires, le gène *ERB-B2* est amplifié et la protéine HER2 est surexprimée : ceci conduit à l'homo- ou à l'hétérodimérisation de ce récepteur avec d'autres membres de la famille des récepteurs HER. HER2 est impliqué dans différents processus cellulaires tels que la prolifération, l'angiogenèse, la résistance à l'apoptose et l'induction de métastases (Moasser, 2007). Les tumeurs dites HER2+ sont considérées aujourd'hui comme un des sous-types de cancer du sein : elles sont associées à un phénotype invasif et à un mauvais pronostic (voir **paragraphe II-E-3**). En effet, ces tumeurs sont résistantes à l'hormonothérapie et à certaines chimiothérapies (Lee et Muller, 2010).

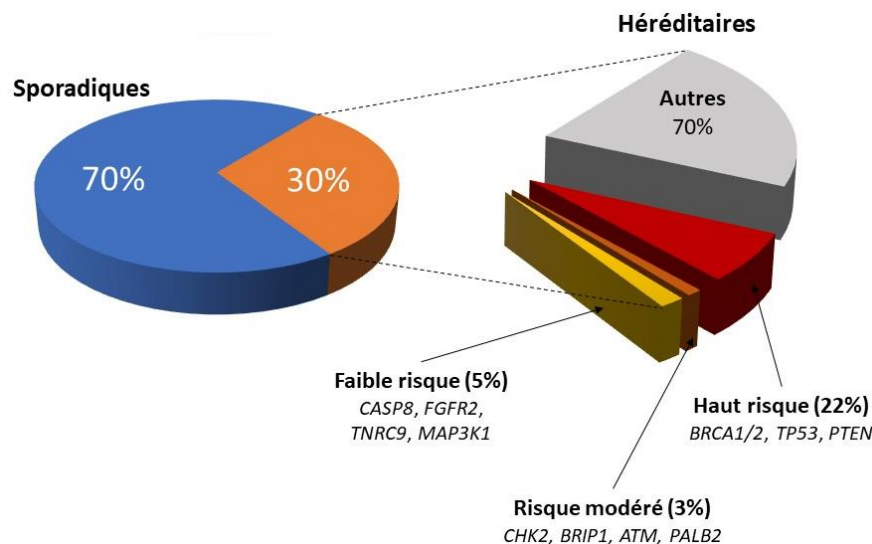
Le gène *MYC* est localisé sur le chromosome 8 en position q24. Il code pour la protéine nucléaire Myc, qui est un facteur de transcription régulant l'expression de nombreux gènes humains impliqués dans divers processus cellulaires comme la prolifération, la croissance, la différenciation et l'apoptose (Chen et Olopade, 2008). De la même façon que pour la cycline D1, Myc est surexprimé dans environ 40% des tumeurs mammaires, alors que son amplification génique n'est retrouvée que dans 15% des cas. Son expression est particulièrement corrélée avec les tumeurs de type "basal-like", le plus souvent de mauvais pronostic (Xu *et al.*, 2010b).

#### Inhibition de l'expression de gènes suppresseurs de tumeur

On appelle "gène suppresseur de tumeur" un gène dont la perte de fonction favorise le développement tumoral. Ces gènes sont divisés en plusieurs catégories : les gènes dits "gatekeepers" sont les gènes impliqués dans la régulation de la prolifération cellulaire, tels que la protéine RB (*retinoblastoma*), premier suppresseur de tumeur découvert, ainsi que la protéine p27 qui est un inhibiteur du cycle cellulaire (Osborne *et al.*, 2004) ; on retrouve également les gènes "caretakers" qui garantissent la stabilité du génome, tels que *TP53* (*tumor protein 53*) ou *BRCA*, impliqués tous deux dans la réparation de l'ADN.

La perte de fonction d'un gène suppresseur de tumeur est effective si les deux allèles

sont inactivés dans les cellules somatiques (Knudson, 1993). L'inactivation du gène peut également se produire dans la lignée germinale : elle contribue alors à l'hérédité du cancer du sein (Knudson, 2001) (**Figure 9**). C'est notamment le cas des gènes de prédisposition *BRCA1/2*, dont la mutation est associée à un risque élevé de développer un cancer du sein (60 à 70% pour *BRCA1*, 40 à 60% pour *BRCA2*) (Ellsworth *et al.*, 2010).



**Figure 9. Altérations génétiques dans le cancer du sein.**

La majorité (70%) des cas de cancer du sein sont considérés comme sporadiques : ils ne présentent pas d'origine familiale prouvée. Une partie des cancers du sein familiaux a été associée à des gènes dont les altérations sont synonymes de haut, moyen ou faible risque de développer un cancer du sein. (Adapté de Ellsworth *et al.*, 2010).

Dans le cancer du sein, les gènes suppresseurs de tumeur les plus fréquents sont les gènes précédemment cités *BRCA1/2*, *TP53* et *RB*.

Les gènes *BRCA1/2* sont des gènes de prédisposition au cancer du sein, de l'ovaire, du pancréas et de la prostate. Ils sont localisés respectivement sur les chromosomes 17q22 et 13q12-13. Les protéines BRCA, de par leur interaction avec les protéines Rad51, p53 et l'ADN polymérase, sont impliquées dans les mécanismes de réparation de l'ADN, dans la régulation du cycle cellulaire et dans la régulation de la transcription (Foulkes et Shuen, 2013; Venkitaraman, 2002). Les gènes *BRCA1/2* sont mutés dans 50% des cas familiaux de cancer du sein. Les femmes porteuses d'une mutation *BRCA1* ont un risque de développer un cancer du sein avant 70 ans de 65%, alors que ce risque est de 39% pour les femmes porteuses d'une mutation *BRCA2* (INCa, 2017). Les mutations *BRCA* sont rarement des mutations ponctuelles : il s'agit le plus souvent de délétions ou de duplications de grand domaine (entre 14 et 17 kb). Ces mutations sont généralement retrouvées associées aux tumeurs de haut grade et de

mauvais pronostic. On peut également noter que les mutations *BRCA2* sont plus spécifiques des cancers du sein chez l'homme puisqu'elles y sont retrouvées dans 10% des cas (Perou *et al.*, 2000; Thompson et Easton, 2001).

Le gène *TP53* est localisé sur le chromosome 17 en position p13.1. Il code pour une protéine impliquée dans de nombreux processus cellulaires, d'où son appellation de "plateforme de régulation cellulaire". En effet, à la suite de dommages de l'ADN, p53 active la transcription du gène *CDKN1A* (qui produit la protéine p21) pour induire un arrêt temporaire de la progression dans le cycle cellulaire, de façon à permettre la réparation de l'ADN. Si les dommages sont trop importants, p53, en activant la transcription du gène *BAX*, peut orienter la cellule vers la voie de l'apoptose, permettant ainsi d'éliminer les cellules présentant trop de dommages et potentiellement malignes pour l'organisme (Lacroix *et al.*, 2006). Par ses mécanismes d'action, la protéine p53 est considérée comme un "gardien du génome", assurant l'intégrité de l'ADN. Dans 25% des cancers du sein, p53 est mutée et est associée à un mauvais pronostic (Yang *et al.*, 2013).

Le gène *RB* est localisé sur le chromosome 13, en position q14.1. La protéine issue de ce gène intervient dans le blocage de la transition G1/S du cycle cellulaire. Lorsque RB est phosphorylée, elle régule négativement le facteur de transcription E2F1 ainsi que les protéines CDK (Fiore *et al.*, 2013). De cette façon, dans le cancer, si le gène *RB* est inactivé, les checkpoints du cycle cellulaire sont perdus, entraînant une prolifération anarchique des cellules et contribuant à l'agressivité des tumeurs. Une perte de l'hétérozygotie du gène *RB* est retrouvée dans 25 à 30% des cas de cancer du sein (Bosco et Knudsen, 2007).

#### b) Principales altérations épigénétiques

Comme expliqué précédemment, les altérations épigénétiques se définissent comme des modifications de l'expression génique sans altération de la séquence d'ADN. Même si pendant longtemps, la plupart des études portant sur les origines du cancer du sein se focalisaient sur les altérations du génome, les altérations épigénétiques se sont progressivement imposées comme des facteurs importants de la progression tumorale (Dworkin *et al.*, 2009; Pasculli *et al.*, 2018). Le contrôle de l'expression génique peut se faire selon 3 façons : la méthylation de l'ADN, le contrôle de la compaction de la chromatine, et l'intervention des ARNs non codants. Nous ne détaillerons dans cette partie que les

connaissances liées à la méthylation de l'ADN et à la compaction de la chromatine, puisque les ARNs non codants feront l'objet d'un chapitre particulier dans ce manuscrit.

### Méthylation de l'ADN

Le contrôle de l'expression génique par méthylation de l'ADN consiste en l'ajout d'un groupement méthyl (CH<sub>3</sub>) à partir d'une S-adénosylméthionine (SAM) sur une cytosine. Les DNA méthyltransférases (DNMT) sont les enzymes responsables de cette modification épigénétique, parmi lesquelles on retrouve les enzymes DNMT1, DNMT3A et DNMT3B. L'ajout d'un groupement méthyl se produit majoritairement au sein des îlots CpG, qui sont des régions spécifiques de l'ADN enrichies en dinucléotides cytosine-phosphate-guanine (CpG). Les îlots CpG sont souvent retrouvés au niveau des régions promotrices des gènes. Ainsi, leur méthylation va entraîner une régulation de l'expression génique (Dworkin *et al.*, 2009; Lo et Sukumar, 2008; Veeck et Esteller, 2010). En effet, dans les cellules cancéreuses, les îlots CpG situés à proximité des régions régulatrices de gènes suppresseurs de tumeurs ont tendance à être hyperméthylés pour réprimer leur expression potentielle. A l'inverse, certaines régions seront hypométhylées et permettront la transcription des oncogènes (Jovanovic *et al.*, 2010; Novak *et al.*, 2008).

De nombreuses études, menées à grande échelle sur le génome entier, ont permis de mettre en évidence la méthylation aberrante de l'ADN dans les cancers du sein (Cancer Genome Atlas Network, 2012). De cette façon, les auteurs ont pu montrer l'hyper- ou l'hypométhylation des promoteurs de gènes impliqués dans de nombreux processus cellulaires cruciaux. Quelques exemples de gènes dont le profil de méthylation est perturbé dans le cancer du sein sont listés dans le **Tableau 2**. Ainsi, il est possible d'associer un phénotype de cancer du sein au profil de méthylation constaté : une hypométhylation de l'ADN serait synonyme d'un phénotype basal et agressif, tandis qu'une hyperméthylation de l'ADN serait corrélée au sous-type luminal B (Cancer Genome Atlas Network, 2012; Holm *et al.*, 2010; Stefansson *et al.*, 2015) (voir **paragraphe II-E-3**). Un exemple intéressant est celui du gène *BRCA1*, dont le promoteur est hyperméthylé dans 13 à 40% des cancers du sein sporadiques : cette hyperméthylation est synonyme de cancer agressif (Esteller, 2000; Parrella, 2004; Stefansson *et al.*, 2011; Turner *et al.*, 2007).

Ces données permettent ainsi de mettre en œuvre des traitements spécifiques du cancer du sein, ciblant la méthylation de l'ADN. Parmi ces traitements spécifiques, on peut



noter l'utilisation des inhibiteurs de DNMTs : ces inhibiteurs vont former un pont covalent avec l'enzyme après incorporation dans l'ADN. Des essais précliniques de ces inhibiteurs dans le cancer du sein ont montré une activité antitumorale (Lustberg et Ramaswamy, 2011). Cependant, leur efficacité clinique reste encore à démontrer (Arce *et al.*, 2006; Connolly *et al.*, 2017).

	Nom du gène	Mécanisme(s) biologique(s) impliqué(s)	Référence bibliographique
Gènes hyperméthylés	<i>BCL2</i>	Régulation de l'apoptose	Loginov <i>et al.</i> , 2017
	<i>BRCA1</i>	Réparation de l'ADN	Dobrovic et Simpfendorfer, 1997
	<i>CCND2</i>	Régulation du cycle cellulaire	Evron <i>et al.</i> , 2001
	<i>TWIST</i>	Invasion et dissémination métastatique	Fackler <i>et al.</i> , 2003
Gènes hypométhylés	<i>CDH3</i>	Invasion	Paredes, 2005
	<i>FEN1</i>	Réparation de l'ADN, régulation de l'apoptose	Singh <i>et al.</i> , 2008
	<i>IL10</i>	Système immunitaire	Son <i>et al.</i> , 2010

**Tableau 2. Gènes dont le promoteur est hyper- ou hypométhylé dans le cancer du sein.**

### Contrôle de la condensation de la chromatine

La chromatine est la structure au sein de laquelle l'ADN est empaqueté et compacté dans le volume limité du noyau cellulaire. La chromatine est donc constituée d'une association d'ADN et de protéines particulières que sont les histones. On peut distinguer deux états de la chromatine, correspondant à des états de compaction différents : l'euchromatine, qui est une chromatine peu condensée et dans laquelle les gènes, plus accessibles aux facteurs de transcription, sont plus facilement exprimés ; l'hétérochromatine, qui est une chromatine très dense et où l'ADN est donc moins accessible. La transition entre euchromatine et hétérochromatine se fait par l'intermédiaire de modifications post-traductionnelles au niveau des queues N-terminales des histones. Parmi ces modifications, on peut retrouver des acétylations, des méthylations, des phosphorylations, des sumoylations ainsi que des ubiquitylations (Cortez et Jones, 2008; Kornberg, 1974; Luger *et al.*, 2012).

Dans le cancer du sein, les deux modifications post-traductionnelles des histones principalement retrouvées sont l'acétylation et la méthylation. L'acétylation est le transfert d'un groupement acétyl (COCH<sub>3</sub>) à partir de l'acétyl-CoA sur un groupement amine de résidu

lysine. L'acétylation modifie la structure de la chromatine en neutralisant les charges positives des histones, ce qui aura pour effet de favoriser la formation d'euchromatine (Mujtaba *et al.*, 2007; Tropberger et Schneider, 2013). L'ajout de groupement acétyl est catalysé par une histone acétyltransférase (HAT), et le processus inverse par une histone désacétylase (HDAC). La méthylation des histones diffère de la méthylation de l'ADN, dans le sens où un ou plusieurs groupements méthyl (mono-, di- ou triméthylation) peuvent être ajoutés sur les résidus arginine ou lysine des histones. A l'inverse de l'acétylation, la méthylation des histones peut favoriser la formation d'euchromatine ou d'hétérochromatine, selon le résidu d'histone concerné. Ainsi, la mono- ou la triméthylation de la lysine 4 de l'histone H3 (H3K4me1 et H3K4me3) et la triméthylation de la lysine 36 de l'histone H3 (H3K36me3) sont associées à la formation d'euchromatine (Heintzman *et al.*, 2007, 2009). En revanche, la triméthylation des lysines 9 et 27 de l'histone H3 (H3K9me3 et H3K27me3) est associée à la formation d'hétérochromatine (Kouzarides, 2007). L'ajout d'un groupement méthyl est catalysé par une histone méthyltransférase (HMT), et le processus inverse par une histone déméthylase (HDMT).

Plusieurs études ont montré que la diminution globale des modifications post-traductionnelles des histones est spécifique des cancers du sein. En ce sens, il a été mis en évidence que plus les niveaux de ces modifications sont faibles, plus le cancer est de phénotype basal et de mauvais pronostic (Elsheikh *et al.*, 2009; Suzuki *et al.*, 2009; Zhao *et al.*, 2016) (voir **paragraphe II-E-3**). Certaines modifications post-traductionnelles ont d'ailleurs été associées au processus de dissémination métastatique, comme la marque H3K4me3 (Messier *et al.*, 2016). D'autres études ont également souligné l'importance de la régulation des enzymes impliquées dans la mise en place de ces marques par rapport à la progression du cancer et au sous-type tumoral. De cette façon, l'histone acétyltransférase HMOF est sous-exprimée dans le cancer du sein (Arun *et al.*, 2016), alors que l'histone déméthylase LSD1 et les histones désacétylases 2 et 3 sont surexprimées dans cancer du sein et corrélées à un sous-type plus agressif (Lim *et al.*, 2010; Müller *et al.*, 2013). De la même façon que pour la méthylation de l'ADN, ces études permettent de mettre en place des thérapies ciblant spécifiquement les modifications post-traductionnelles des histones dans le cancer du sein, en particulier par l'utilisation d'inhibiteurs d'histone désacétylases. Des études précliniques montrant une activité antitumorale de ces inhibiteurs sont en cours, ce qui a permis le lancement d'essais cliniques (Damaskos *et al.*, 2017; Yardley *et al.*, 2013).

### 3) Influence du micro-environnement tumoral

Nous avons vu que l'apparition d'une tumeur mammaire résulte d'une accumulation d'altérations génétiques et épigénétiques, conduisant à la transformation d'une cellule normale en une cellule cancéreuse. Cependant, dans les cancers, les mutations des cellules épithéliales ne conduisent pas à elles seules à l'apparition de la tumeur. Aujourd'hui, l'idée selon laquelle le micro-environnement tumoral subit également des altérations nécessaires au développement de la tumeur prend de plus en plus d'ampleur. De plus, plusieurs altérations cellulaires essentielles à la tumorigenèse sont influencées par ce micro-environnement tumoral (Hanahan et Coussens, 2012).

L'épithélium mammaire évolue dans un micro-environnement complexe et riche, qui comprend une matrice extra-cellulaire ainsi que de nombreux types cellulaires différents : des adipocytes (majoritaires), des fibroblastes, des lymphocytes et des cellules endothéliales. Tous ces éléments combinés forment un ensemble cohérent permettant de maintenir l'homéostasie tissulaire de la glande mammaire. L'homéostasie est notamment permise grâce aux communications dynamiques entre les différents éléments, par la sécrétion de chimiokines, de cytokines, d'hormones et de facteurs de croissance. Ainsi, le micro-environnement sain permet de réguler la prolifération anarchique à l'origine de l'initiation tumorale (Bissell et Hines, 2011).

Lors de la tumorigenèse, les cellules tumorales mammaires vont donc devoir modifier ce micro-environnement et perturber sa régulation, de façon à faciliter leur prolifération, leur survie, leurs capacités invasives, l'angiogenèse, le remodelage de la chromatine mais aussi leur échappement au système immunitaire. De cette façon, de nombreuses études décrivent l'existence d'un stroma réactif, fortement impliqué dans la tumorigenèse et qui sera remodelé grâce à des modifications de la matrice extracellulaire et de la membrane basale. En complément de ces modifications, on pourra également constater une infiltration des cellules immunitaires, une augmentation de la vascularisation et une accumulation de fibroblastes activés (Place *et al.*, 2011). En effet, les cellules tumorales sont capables de recruter les fibroblastes du micro-environnement pour les convertir en fibroblastes associés au cancer (CAF, *cancer-associated fibroblasts*). Une fois activés, ces CAFs sécrètent un grand nombre de molécules, notamment des composants de la matrice extracellulaire, des cytokines, des protéases, mais aussi des facteurs de croissance de façon à favoriser la progression tumorale

(Elenbaas et Weinberg, 2001; Kalluri et Zeisberg, 2006).

Les cellules tumorales vont également agir sur l'activation de cellules du système immunitaire. Plus particulièrement, les macrophages activés (TAM, *tumor-associated macrophages*) vont permettre la promotion de l'angiogenèse en sécrétant des facteurs inhibant la prolifération et l'activité des lymphocytes T (Carmeliet, 2003) : ils ont donc un rôle immunosuppresseur important en empêchant la réponse anti-tumorale normale (Lewis et Pollard, 2006). Les macrophages activés vont également sécréter des facteurs de croissance comme l'EGF qui seront capables de stimuler les cellules tumorales en retour et donc de favoriser leur prolifération et leurs capacités migratoires (Goswami *et al.*, 2005; Wyckoff *et al.*, 2004).

Enfin, les adipocytes, fortement représentés dans la glande mammaire, sont également capables de favoriser la croissance et la migration des cellules cancéreuses en sécrétant des facteurs de croissance (comme le HGF/SF), des adipokines (comme la leptine) ou encore des protéines de la matrice extracellulaire (comme le collagène) (Dirat *et al.*, 2011; Iyengar *et al.*, 2005; Vona-Davis et Rose, 2007; Walter *et al.*, 2009). Il est à noter que l'obésité, en plus d'être un facteur augmentant le risque d'apparition de cancer du sein, est corrélée à un mauvais pronostic et à un phénotype tumoral agressif (Rose et Vona-Davis, 2014).

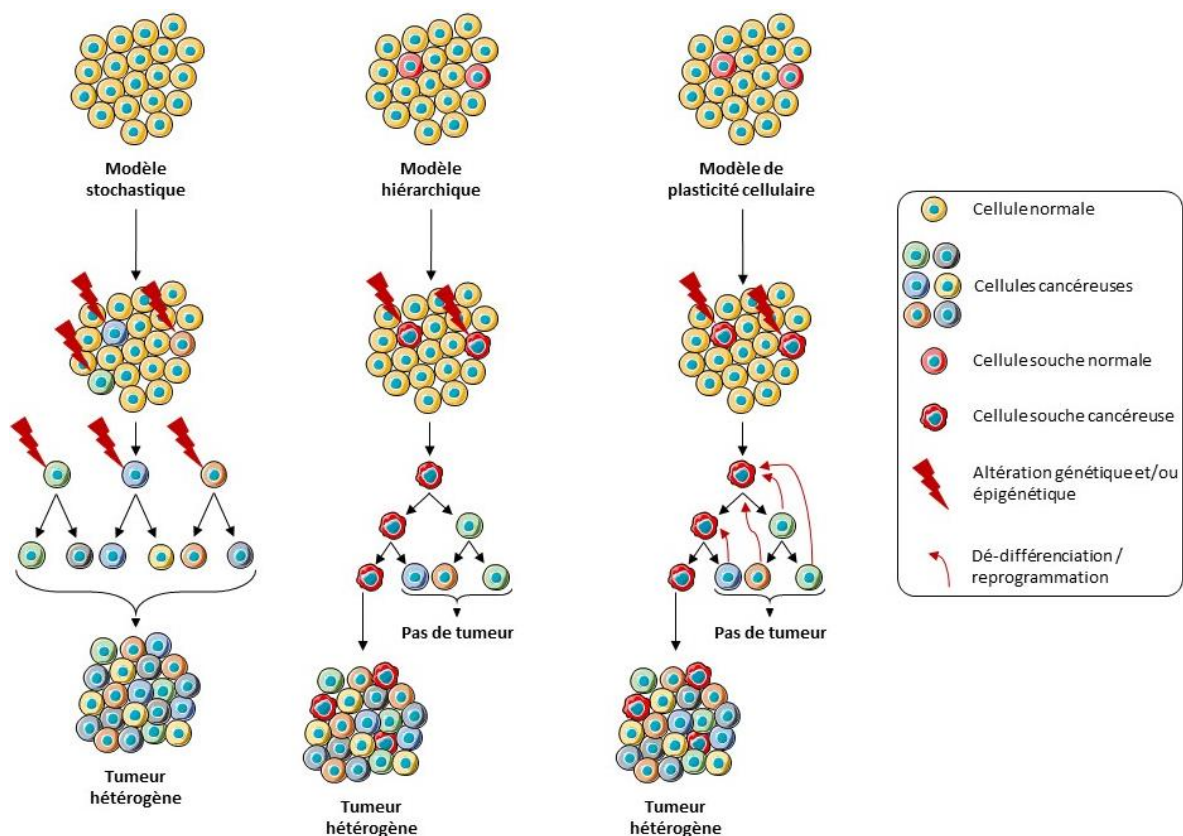
Pour renforcer l'idée d'homéostasie tissulaire au sein de la glande mammaire, des études ont montré que le micro-environnement, outre ses effets favorisant la progression tumorale, produit également des facteurs anti-tumoraux. Notre équipe a mis en évidence que les cellules épithéliales mammaires normales sécrètent de l'IGFBP-3 (*insulin-like growth factor binding protein 3*) et de la maspine, de façon à induire l'apoptose des cellules cancéreuses au sein du tissu (Toillon *et al.*, 2007). Ces cellules sont également à l'origine de la production de facteurs inhibiteurs de croissance tels que le TGF- $\beta$ 1, le TNF- $\alpha$ , le MDGI ou encore certaines interleukines et certains protéoglycanes (Bourhis *et al.*, 2000).

Au-delà de l'influence du micro-environnement, notre équipe a démontré que les cellules cancéreuses mammaires sont capables de sécréter de façon autocrine des facteurs de croissance particuliers que sont les neurotrophines. Parmi ces neurotrophines, on retrouve le NGF (*nerve growth factor*), le BDNF (*brain-derived neurotrophic factor*) et la NT4/5 (*neurotrophin-4/5*). La sécrétion de ces neurotrophines entraîne l'augmentation de la prolifération, de la survie et des capacités de migration/invasion des cellules cancéreuses mammaires (Demont *et al.*, 2012; Descamps *et al.*, 2001; Dollé *et al.*, 2003; Vanhecke *et al.*,

2011). De plus, nous avons montré que ces neurotrophines peuvent être ciblées en thérapie. En effet, des inhibiteurs du NGF, du BDNF et de NT4/5 sont capables de réduire la formation de tumeur mammaire dans des modèles de xénogreffe (Adriaenssens *et al.*, 2008; Aubert *et al.*, 2015; Vanhecke *et al.*, 2011).

## D- Origine du cancer du sein : le rôle des cellules souches cancéreuses

### 1) Modèles de développement tumoral



**Figure 10. Représentation des modèles théoriques de développement tumoral.**

Selon le modèle stochastique, l'accumulation de mutations dans n'importe quelle cellule au cours du temps peut lui conférer un pouvoir tumorigène. Selon le modèle hiérarchique, il existe une sous-population de cellules souches cancéreuses qui sont les seules à posséder un pouvoir tumorigène. Enfin, selon le modèle de plasticité cellulaire, les cellules cancéreuses possèdent une plasticité qui leur permet de se "dé-différencier" en cellules souches cancéreuses tumorigènes. (Adapté de Rich, 2016).

Comme nous venons de l'exposer, la vision actuelle de la tumorigénèse fait intervenir les altérations génétiques, les altérations épigénétiques et l'influence du micro-environnement tumoral. Pour autant, l'origine de l'hétérogénéité générée par ces facteurs, ainsi que la progression et les résistances thérapeutiques qui y sont associées, est sujette à controverse (Shackleton *et al.*, 2009). Actuellement, deux modèles de développement

tumoral ont été proposés pour expliquer cette hétérogénéité : le modèle stochastique et le modèle hiérarchique (**Figure 10**).

#### a) Modèle stochastique

Le modèle stochastique, ou modèle d'évolution clonale, suggère que n'importe quelle cellule normale, quel que soit son degré de différenciation, peut acquérir une série de mutations sporadiques pour donner une cellule cancéreuse, et que n'importe quel clone cellulaire ayant un avantage sélectif peut promouvoir la progression tumorale. De cette façon, la prolifération anarchique de ce clone permettra la formation de la masse tumorale (Polyak, 2007), et l'accumulation d'altérations, favorisées par l'instabilité chromosomique caractéristique des cellules cancéreuses, entraînerait l'émergence de sous-populations distinctes (Lengauer *et al.*, 1998). Selon ce modèle, il serait donc impossible de déterminer quelle cellule est à l'origine de la tumeur, puisque toutes les cellules du tissu sont potentiellement aptes à initier la tumorigenèse.

Le modèle stochastique peut sembler inadapté de nos jours : en effet, selon cette théorie, il n'y aurait pas ou peu de hiérarchisation cellulaire au sein de la tumeur. De plus, il semble difficile de comprendre et d'expliquer comment une série d'altérations sporadiques peut se produire spontanément dans une cellule différenciée qui, par définition, se divise très peu. Pour autant, dans le cas du cancer du sein, plusieurs études ont mis en évidence l'existence d'une diversité clonale pour une même patiente (Nakada *et al.*, 2017; Torres *et al.*, 2007).

#### b) Modèle hiérarchique

Le modèle hiérarchique, ou modèle des cellules souches cancéreuses (CSCs), suggère quant à lui que la croissance et la progression tumorale sont conduites uniquement par une petite sous-population tumorale de cellules souches cancéreuses : la tumeur ne serait donc qu'une caricature du développement tissulaire classique, où les cellules souches maintiennent une hiérarchie tissulaire normale (Dick, 2008).

Ce modèle expose donc l'idée que l'hétérogénéité tumorale est due aux capacités de différenciation des CSCs. En effet, lorsqu'on transplante ces CSCs en souris, elles régénèrent une masse tumorale présentant la même hétérogénéité phénotypique que la tumeur d'origine (Al-Hajj *et al.*, 2003). De plus, cette population particulière de CSCs serait à l'origine

de la dissémination métastatique et de la résistance aux thérapies, entraînant la récurrence après traitement (Campbell et Polyak, 2007). Dans le cas du cancer du sein, cette théorie expliquerait également l'hétérogénéité retrouvée entre les sous-types tumoraux, puisque le degré de différenciation de la cellule ayant subi à l'origine les premières mutations déterminerait le sous-type de cancer du sein (Morel *et al.*, 2017; Visvader, 2009).

### c) Modèle de plasticité cellulaire

Bien que les deux modèles stochastique et hiérarchique exposent des mécanismes différents, ils reposent tous deux sur le même principe général : au sein d'un tissu, une cellule va subir des altérations et acquérir des capacités de prolifération qui lui conféreront un avantage sélectif par rapport aux cellules avoisinantes. Cette cellule sera à l'origine de la formation d'une tumeur hétérogène. Pour autant, ces deux modèles présentent des limites. Le modèle stochastique n'apporte pas d'explication sur l'hétérogénéité retrouvée dans les tumeurs mammaires, et le modèle hiérarchique sous-entend que le potentiel d'auto-renouvellement des cellules souches est limité, puisqu'elles doivent se différencier pour initier la tumorigenèse.

Pour répondre à ces problématiques, un troisième modèle a été proposé (**Figure 10**). Ce modèle s'appuie sur la notion de plasticité cellulaire et propose que les cellules cancéreuses non-souches (non-CSCs) sont capables de se "dé-différencier" en CSCs : il s'agit du phénomène de reprogrammation (Chaffer *et al.*, 2011; Iliopoulos *et al.*, 2011; Marjanovic *et al.*, 2013). De nombreux stimuli sont impliqués dans la reprogrammation de non-CSCs en CSCs, comme la sécrétion d'IL-6 (Iliopoulos *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2014) ou l'expression de marqueurs mésenchymateux par mise en place de l'EMT (*epithelial-to-mesenchymal transition*) (Mani *et al.*, 2008; Morel *et al.*, 2008), phénomène transitoire et réversible considéré comme un processus clé de l'agressivité tumorale et de la dissémination métastatique.

Quel que soit le cas, la priorité reste d'associer le modèle de développement tumoral approprié aux caractéristiques cliniques de la tumeur, de façon à identifier les facteurs de l'hétérogénéité tumorale, pouvoir cibler de façon efficace les populations cellulaires les plus abondantes et ainsi éviter les récurrences.

## 2) Généralités sur les cellules souches cancéreuses (CSCs)

La première preuve de l'existence des CSCs a été démontrée dans la leucémie myéloïde aigüe en 1997 (Bonnet et Dick, 1997), puis dans les tumeurs solides en 2003 (Al-Hajj *et al.*, 2003). Il s'agit d'une sous-population cellulaire rare (Ishizawa *et al.*, 2010) caractérisée par un potentiel d'auto-renouvellement illimité, et la capacité de produire à la fois des cellules progénitrices et des cellules différenciées possédant un potentiel tumorigénique (Kreso et Dick, 2014). Comme nous l'avons vu précédemment, les CSCs sont à l'origine de l'établissement du modèle de développement tumoral hiérarchique (Reya *et al.*, 2001).

Du fait de leur potentiel de division illimité, les CSCs sont plus fortement exposées que les cellules différenciées au risque d'accumuler des mutations, menant à la transformation cellulaire et à la formation de tumeurs (Sugihara et Saya, 2013). Même si l'origine des CSCs reste encore sujette à débat, ceci renforce l'hypothèse selon laquelle les CSCs sont dérivées des cellules souches normales (Magee *et al.*, 2012). De plus, il a été montré que les CSCs sont plus résistantes aux thérapies, et contribuent à la récurrence du cancer. En effet, la chimiothérapie comme la radiothérapie contribueraient à favoriser l'auto-renouvellement des CSCs, notamment à travers la production de cytokines et la stimulation des mécanismes de réparation de l'ADN (Li *et al.*, 2008b; Maugeri-Sacca *et al.*, 2012; Phillips *et al.*, 2006).

De la même façon que pour les cellules souches "normales", le maintien de la pluripotence et l'auto-renouvellement des CSCs sont régulés par plusieurs facteurs et voies de signalisation. De façon générale, beaucoup de mécanismes et de comportements cellulaires sont communs entre cellules souches normales et CSCs : ainsi, beaucoup de parallèles seront faits entre ces deux populations dans ce manuscrit.

### a) Potentiel d'auto-renouvellement

Le potentiel d'auto-renouvellement illimité des CSCs constitue une de leurs caractéristiques principales. Ce potentiel leur permet de proliférer et de se maintenir dans un tissu donné, de façon indéfinie, tout en conservant leur potentialité. La division d'une CSC peut ainsi produire une (dans le cas d'une division asymétrique) ou deux (dans le cas d'une division symétrique) cellules filles possédant la capacité d'auto-renouvellement. Dans la division asymétrique, la cellule la plus différenciée est appelée cellule progénitrice, et possède des potentialités restreintes. Ainsi, un pool constant de CSCs est conservé dans le tissu.



L'auto-renouvellement des cellules souches est un processus strictement régulé : la perte de cette capacité est délétère pour la régénération tissulaire, alors qu'un auto-renouvellement trop actif peut être à l'origine du développement tumoral. Pour réguler cette balance, les cellules souches sont généralement dans un état de quiescence (Fuchs et Chen, 2013). La division asymétrique des cellules est prise en charge par des facteurs extrinsèques, qui entraîneront la ségrégation des deux cellules filles dans deux environnements distincts. Cette division asymétrique peut également être régulée par des facteurs intrinsèques exprimés différemment aux pôles de la cellule mère, mais aussi par la combinaison des facteurs intrinsèques et extrinsèques (Chen *et al.*, 2016).

#### b) Facteurs associés à la pluripotence

La pluripotence des CSCs est régulée par plusieurs facteurs de transcription tels que SOX2, OCT4 et NANOG (Boyer *et al.*, 2005).

SOX2 est capable d'interagir spécifiquement avec l'ADN grâce à un son domaine HMG (*high mobility group*). Son expression est essentielle pour le développement embryonnaire, puisque des mutants KO (*knock-out*) pour SOX2 ne sont pas viables (Avilion *et al.*, 2003). A l'âge adulte, l'expression de SOX2 est importante pour le maintien de l'homéostasie tissulaire. SOX2 est également retrouvé surexprimé dans un certain nombre de cancers, où il active des voies de signalisation comme Wnt, Notch ou Hedgehog (Liu *et al.*, 2013).

OCT4 est principalement exprimé dans les cellules souches embryonnaires. De la même façon que SOX2, OCT4 interagit avec l'ADN au niveau de motifs octamériques localisés dans les régions promotrices et/ou régulatrices de ses gènes cibles (Boyer *et al.*, 2005; Jin *et al.*, 2007). OCT4 peut également interagir avec des complexes de remodelage de la chromatine pour réprimer l'expression de gènes de différenciation (Fouse *et al.*, 2008). Enfin, OCT4 peut s'associer avec SOX2 pour former un hétérodimère responsable de la régulation du gène *NANOG* (Rodda *et al.*, 2005).

NANOG est impliqué dans le développement précoce et dans l'établissement de l'identité cellulaire. Il est capable de maintenir la pluripotence des cellules souches embryonnaires : dans un modèle murin où NANOG est invalidé, la masse interne du blastocyste se différencie et ne prolifère pas *in vitro* (Chambers *et al.*, 2003; Mitsui *et al.*, 2003).

D'autres facteurs comme c-Myc et KLF4 ont également un rôle dans la biologie des

cellules souches (Kim *et al.*, 2012; Varlakhanova *et al.*, 2010). Le rôle de tous ces facteurs a été démontré en 2006 : la seule transfection des facteurs OCT4, SOX2, KLF4 et c-Myc est suffisante pour induire la dé-différenciation de fibroblastes murins, ainsi que leur reprogrammation vers un état pluripotent (Takahashi et Yamanaka, 2006).

### c) Voies de signalisation impliquées dans la pluripotence

Plusieurs voies de signalisation ont été associées au développement et à l'homéostasie tissulaire. Leur activation peut être contrôlée par les facteurs de transcription cités précédemment.

La voie Wnt (*Wingless-type MMTV integration site*) est impliquée dans la régulation de l'embryogenèse, mais aussi chez l'adulte dans le maintien de l'homéostasie tissulaire. L'activation de cette voie se fait par liaison du ligand Wnt sur ses récepteurs LRP5/6 (*low-density lipoprotein-related receptor proteins*) et Frizzled, et aboutit à l'accumulation de la  $\beta$ -caténine et à sa translocation dans le noyau. La  $\beta$ -caténine pourra alors contrôler la transcription de gènes de pluripotence (Holland *et al.*, 2013). Pour autant, même si l'activation de la voie Wnt favorise l'auto-renouvellement des cellules, elle n'est pas indispensable au maintien des capacités de pluripotence : l'inhibition de la voie Wnt n'entraîne pas la différenciation cellulaire (Xu *et al.*, 2016).

La voie Notch est activée par la liaison d'un ligand transmembranaire DLL (*delta-like ligand*) ou Jagged d'une cellule voisine : elle intervient donc par l'intermédiaire des interactions intercellulaires. Notch sera alors clivé et la partie intracellulaire sera transloquée dans le noyau où elle agira comme facteur de transcription (Hori *et al.*, 2013). Selon le contexte, l'activation de la voie Notch aura un effet soit sur la différenciation cellulaire, soit sur la prolifération, soit sur la survie. Dans le cancer, il a été montré que Notch peut agir en tant qu'oncogène ou en tant que suppresseur de tumeur (South *et al.*, 2012). Notch peut également agir sur les capacités de pluripotence des cellules en régulant la transcription des familles de gènes HES (*hairy and enhancer of split*) et HEY (*hairy/enhancer of split related with YRPW motif protein 1*) (Iso *et al.*, 2003). De plus, l'étude du développement de la glande mammaire montre une implication de la voie Notch dans la modulation de la différenciation cellulaire : de cette façon, des altérations de la voie Notch peuvent contribuer à la tumorigenèse mammaire (Guo *et al.*, 2011).

La voie Hedgehog est principalement active pendant le développement embryonnaire.

Elle permet la mise en place de nombreux tissus, mais son activité est maintenue à l'âge adulte (Petrova et Joyner, 2014). Le rôle de la voie Hedgehog a d'abord été mis en évidence dans le maintien de la neurogenèse du système nerveux central (Petrova et Joyner, 2014). En revanche, les études tendent à montrer que cette voie n'est pas indispensable au développement de la glande mammaire. Pour autant, une perturbation de son activation entraîne des défauts de formation du bourgeon mammaire (Hatsell et Cowin, 2006).

Outre ces 3 voies principales, d'autres voies de signalisation sont impliquées dans la pluripotence et le maintien des CSCs, notamment le recrutement de STAT3 (Niwa *et al.*, 1998) ou l'activation de la voie MEK/ERK (*MAPK kinase*) par le FGF (Li *et al.*, 2007). Le FGF peut également activer la signalisation PKC (*protein kinase C*), favorisant cette fois-ci la différenciation cellulaire (Feng *et al.*, 2012). L'enchevêtrement des voies de signalisation mises en cause reflète bien la nécessité de l'existence de régulations fines et précises entre maintien du pool de cellules souches et différenciation.

### 3) Identification et étude des CSCs

Diverses méthodes d'identification et d'analyse des CSCs ont été décrites dans la littérature. Pour autant, un marqueur donné n'est pas retrouvé dans toutes les lignées cellulaires ou dans tous les sous-types tumoraux. Tous les marqueurs de CSCs décrits ne permettent pas *in fine* d'isoler une seule sous-population spécifique de CSCs : c'est la combinaison de plusieurs marqueurs qui permettra d'isoler plusieurs populations distinctes enrichies en CSCs.

#### a) Marqueurs de surface

La mise en évidence des premières CSCs a été permise grâce à l'expression de protéines membranaires, constituant des marqueurs de surface de ces CSCs (Bonnet et Dick, 1997). L'expression de ces marqueurs varie selon les tissus (**Tableau 3**).

Dans le cancer du sein en particulier, le phénotype CD44+/CD24<sup>-low</sup> (expression de la protéine CD44/expression de la protéine CD24 faible ou absente) est le plus utilisé pour isoler et identifier la population de CSCs possédant des capacités tumorigènes *in vitro* et *in vivo*. Cependant, selon la lignée cancéreuse mammaire étudiée, la proportion de cellules CD44+/CD24<sup>-low</sup> est très variable (de 0% dans les cellules luminales MCF-7 jusqu'à 100% dans les cellules triple négatives MDA-MB-231 ou SUM159PT). Ceci implique une variabilité de la

population cellulaire souche en fonction du sous-type tumoral mammaire (Fillmore et Kuperwasser, 2008).

Modèle cancéreux	Marqueurs de surface étudiés	Référence bibliographique
<i>Gliome</i>	CD133+	Singh <i>et al.</i> , 2003
<i>VADS</i>	CD44+	Prince <i>et al.</i> , 2007
<i>Poumon</i>	CD133+	Eramo <i>et al.</i> , 2008
<i>Sein</i>	ESA+/CD44+/CD24 <sup>-low</sup>	Al-Hajj <i>et al.</i> , 2003
<i>Estomac</i>	CD44+	Takaishi <i>et al.</i> , 2009
<i>Foie</i>	EpCAM	Yamashita <i>et al.</i> , 2009
	CD133+	Suetsugu <i>et al.</i> , 2006
<i>Pancréas</i>	CD133+ CXCR4+	Hermann <i>et al.</i> , 2007
<i>Colon</i>	CD133+	O'Brien <i>et al.</i> , 2007
<i>Ovaire</i>	CD44+/CD117+	Zhang <i>et al.</i> , 2008
<i>Prostate</i>	CD44+ $\alpha_2\beta_1^{\text{high}}$ CD133+	Collins <i>et al.</i> , 2005
<i>Mélanome</i>	CD20+	Fang <i>et al.</i> , 2005
	CD271+	Boiko <i>et al.</i> , 2010
<i>LAM</i>	CD34+/CD38-	Bonnet et Dick, 1997

**Tableau 3. Marqueurs de surface spécifiques des CSCs selon le type de cancer.**  
(Adapté de Takahashi *et al.*, 2011).

#### b) Activité enzymatique de l'ALDH

L'ALDH (aldéhyde déshydrogénase) est une enzyme responsable de l'oxydation des aldéhydes en acides carboxyliques. Elle est notamment impliquée dans le métabolisme oxydatif du rétinol en acide rétinoïque. Le niveau d'activité de cette enzyme a été utilisé pour identifier les cellules souches mammaires normales et les CSCs (Ginestier *et al.*, 2007). En effet, l'ALDH présente une activité accrue dans les cellules souches : grâce à l'utilisation d'un substrat qui devient fluorescent lorsqu'il est clivé par l'ALDH, il est possible de détecter et de quantifier cette activité.

Dans le cancer du sein, l'activité des isoformes ALDH1A1 et ALDH1A3 a été montrée comme étant spécifique des CSCs (Marcato *et al.*, 2011a, 2011b). Les CSCs ALDH+ présentent des capacités tumorigènes accrues, et l'inhibition de l'ALDH sensibilise les CSCs ALDH+/CD44+ à la chimiothérapie et à la radiothérapie (Crocker et Allan, 2012).

### c) Exclusion de colorants vitaux – Side population

Les CSCs sont également caractérisées par une activité accrue de pompes d'efflux de la famille ABC (*ATP binding cassette*) exprimées à leur membrane. Il est ainsi possible d'identifier la population de CSCs en cytométrie en flux par un test d'exclusion de colorants vitaux fluorescents comme le Hoechst 33342. Ces transporteurs membranaires sont également impliqués dans l'efflux de chimiothérapies, ce qui favorise la chimiorésistance des CSCs (Wu et Alman, 2008; Zhou *et al.*, 2001).

### d) Activité faible du protéasome

Le protéasome, dont la fonction principale est la dégradation des protéines, est associé à plusieurs mécanismes cellulaires tels que le contrôle du cycle cellulaire ou la réparation de l'ADN. Il a été montré que les CSCs présentent une faible activité du protéasome dans plusieurs modèles comme le cancer du sein, de la prostate, des poumons, du colon et dans les gliomes (Della Donna *et al.*, 2012; Lenos et Vermeulen, 2016; Munakata *et al.*, 2016; Pan *et al.*, 2010; Vlashi *et al.*, 2009). Les CSCs peuvent donc être isolées grâce à l'utilisation d'un rapporteur de l'activité du protéasome. De plus, l'élimination des cellules à faible activité protéasomale est associée à une régression tumorale *in vivo* (Vlashi *et al.*, 2009, 2013).

### e) Capacité de formation de sphères

Plusieurs tests fonctionnels ont été mis au point pour établir le phénotype souche d'une population cellulaire et compléter l'analyse de l'expression des marqueurs de surface. Le premier de ces tests fonctionnels repose sur la capacité des cellules souches à croître sans ancrage. Pour ce faire, les cellules sontensemencées à faible densité dans un milieu spécifique dépourvu de sérum et riche en facteurs de croissance, et en conditions non adhérentes. Le comptage des sphères formées permettra de définir un pourcentage de formation de sphères, ou capacité à former des sphères (SFC, *sphere-forming capacity*) (Lombardo *et al.*, 2015).

Il est intéressant de noter que la culture de sphères permet de sélectionner les cellules souches et progénitrices, mais aussi d'éliminer toutes les cellules différenciées. De plus, il est possible de cultiver des sphères sur plusieurs générations, ceci dans le but d'éliminer les cellules progénitrices.

#### f) Tumorigénicité *in vivo*

Le second test fonctionnel est le test de tumorigénicité *in vivo*. Ce test se base sur les capacités spécifiques des CSCs, c'est-à-dire l'auto-renouvellement et la différenciation. Les CSCs potentielles sont injectées en nombre limité chez la souris (jusqu'à 100 cellules contre plus d'un million en conditions classiques de xénotransplantation). La présence ou l'absence de développement tumoral définira le caractère souche de la population ainsi testée, ou du moins son enrichissement en CSCs. Un autre paramètre important est la capacité de ces cellules à générer des tumeurs "en série" après transplantation, en reproduisant l'hétérogénéité de la tumeur initiale.

Ce second test fonctionnel reste la meilleure méthode pour caractériser les cellules à l'origine de la tumeur, et permet également d'analyser les capacités de différenciation des cellules à travers l'hétérogénéité de la tumeur néo-formée (Visvader et Lindeman, 2008).

#### 4) Résistance aux thérapies et reprogrammation

De nombreuses études ont associé les CSCs à une importante résistance aux thérapies anti-cancéreuses conventionnelles. En plus de la tumorigénèse, les CSCs seraient donc également responsables des phénomènes de récurrence, puisqu'elles sont capables de survivre aux thérapies et de redonner une hétérogénéité tumorale (Chuthapisith *et al.*, 2010). De cette façon, une proportion élevée de cellules exprimant les marqueurs spécifiques des CSCs est corrélée à un mauvais pronostic et une faible réponse aux traitements (Ginestier *et al.*, 2007; Lagadec *et al.*, 2014). En complément, il a été montré que les radiations ionisantes ainsi que les chimiothérapies classiques entraînent un enrichissement de la tumeur en CSCs (Cole *et al.*, 2014; Hamilton et Olszewski, 2013; Li *et al.*, 2008; Yu *et al.*, 2007), ainsi que l'induction d'un phénotype de CSC dans des cellules initialement non-CSCs (Auffinger *et al.*, 2014; Ghisolfi *et al.*, 2012; Hu *et al.*, 2012; Lagadec *et al.*, 2012).

#### a) Chimiorésistance

De nombreuses études établies sur différents modèles cancéreux associent l'origine de la chimiorésistance observée cliniquement à l'existence d'un pool de CSCs au sein de la tumeur. Plus particulièrement, dans le cas des tumeurs mammaires triple négatives, des résistances aux chimiothérapies conventionnelles (utilisant des anthracyclines et des taxanes) sont très souvent observées (Dent *et al.*, 2007). Pour illustrer cela, une étude a utilisé un

modèle murin de tumeurs mutées *BRCA1/TP53*, qui présentent une résistance au cisplatine ainsi que des récives fortement enrichies en CSCs CD29<sup>high</sup>/CD24<sup>medium</sup> 2 à 3 mois post-traitement (Shafee *et al.*, 2008). Un autre modèle murin de tumeur triple négative utilisant des PDX (*patient-derived xenograft*) a permis de mettre en évidence l'existence d'une population tumorigène CD49f+ qui est enrichie du fait de l'acquisition de chimiorésistance. En l'absence de cette population cellulaire, la chimiosensibilité aux taxanes est restaurée (Gómez-Miragaya *et al.*, 2017).

### b) Radiorésistance

En complément de la chimiorésistance, les CSCs présentent une résistance aux radiothérapies. Dans le gliome, après irradiation, il a été observé une augmentation de la proportion de CSCs CD133+ associée à la radiorésistance (Bao *et al.*, 2006). La radiorésistance dans le cancer du sein a été démontrée par la mise en évidence de la population de CSCs CD44+/CD24<sup>-/low</sup> (Phillips *et al.*, 2006), puis l'implication des CSCs dans ce phénomène de résistance a progressivement été prouvée dans de nombreux modèles de cancer (Krause *et al.*, 2011).

Dans un modèle de cinétique post-irradiation, il a été montré que la proportion de CSCs augmente 72h après irradiation, et que la déplétion spécifique de ces cellules permet une régression tumorale (Vlashi *et al.*, 2009).

### c) Mécanismes de la résistance des CSCs

La résistance aux thérapies médiée par les CSCs peut s'expliquer par de nombreux mécanismes liés aux caractéristiques de ces cellules. Certains de ces mécanismes sont communs entre chimio- et radiorésistance.

#### *Surexpression de transporteurs d'efflux*

Comme expliqué dans le paragraphe II-D-3)c), le rôle des pompes d'efflux est d'éliminer les composés toxiques hors de la cellule. Dans le cas des CSC, l'activité des pompes d'efflux ABC est étudiée (Wang *et al.*, 2015). L'activité accrue de ces pompes permettra d'éjecter les drogues anticancéreuses hors des cellules, permettant ainsi une plus grande chimiorésistance (Chuthapisith *et al.*, 2010).

### Détoxification et inactivation de drogues

L'activité de l'enzyme ALDH est plus importante dans les CSCs (voir **paragraphe II-D-3)b**). Cette enzyme est notamment impliquée dans la catalyse des cyclophosphamides : elle peut donc participer à la chimiorésistance. De cette façon, une surexpression de l'ALDH1 est corrélée à une mauvaise réponse à la chimiothérapie (Tanei *et al.*, 2009). De plus, l'expression et l'activité de l'ALDH protègent les CSCs contre l'accumulation des ROS après traitement (Raha *et al.*, 2014).

### Diminution du stress oxydant

De nombreuses chimio- et radiothérapies agissent sur les cellules en induisant un stress oxydant *via* la production intracellulaire d'espèces réactives de l'oxygène (ROS). La radiothérapie s'appuie notamment sur la production de ces ROS, qui peuvent agir en induisant des dommages à l'ADN, menant à l'apoptose des cellules ciblées. Par conséquent, les CSCs dont les niveaux de ROS sont plus faibles présentent moins de dommages à l'ADN.

Dans ce contexte, le rôle anti-oxydant du glutathion a été mis en évidence : les gènes contrôlant sa biosynthèse sont surexprimés dans la population de CSCs. A l'inverse, une perte d'expression du glutathion provoque une radiosensibilisation des cellules. Le rôle du glutathion a également été démontré dans la résistance aux chimiothérapies (Lu *et al.*, 2015; Traverso *et al.*, 2013).

### Perturbation de la réponse aux dommages de l'ADN

Certaines drogues anticancéreuses comme le cisplatine ciblent et altèrent l'ADN, de façon à l'endommager et ainsi provoquer l'apoptose des cellules. Les voies de réponse aux dommages de l'ADN seront développées dans le paragraphe II-G.

Il a été montré que dans le colon, les CSCs CD133+ sont résistantes au cisplatine. Dans cette population, l'inhibition de la voie ATR/CHK1 entraîne une chimiosensibilisation des cellules, associée à une diminution de la population CD133+ (Gallmeier *et al.*, 2011). Le rôle de la voie DDR dans la radiorésistance a été démontré dans les populations de CSCs gliomales, où une réparation accrue et plus efficace des dommages de l'ADN a été observée (Bao *et al.*, 2006). Dans le cancer du sein, c'est plus particulièrement la voie ATM qui est augmentée dans les CSCs (Yin et Glass, 2011).



### Autres mécanismes

Certaines voies de signalisation peuvent être activées dans les CSCs en réponse aux thérapies. Notamment, les voies Notch, Hedgehog et Wnt décrites précédemment participent à cette résistance en maintenant le pool de CSCs (Steg *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2010; Woodward *et al.*, 2007). De cette façon, l'activation de la voie Wnt favorise l'expression des pompes d'efflux ABCG2 et permet ainsi la chimiorésistance des CSCs (Chau *et al.*, 2013). D'autres voies comme NF- $\kappa$ B, PI3K/AKT ou JAK/STAT sont également impliquées dans la mise en place de mécanismes de résistance au sein des CSCs (Zhao, 2016). Dans d'autres modèles comme le glioblastome, les CSCs CD133+ surexpriment en complément des protéines anti-apoptotiques comme BCL-2 (*B-cell lymphoma 2*) (Liu *et al.*, 2006). Enfin, les CSCs sont également caractérisées par leur quiescence, qui les protège des thérapies ciblant les cellules en division (Moore *et al.*, 2011).

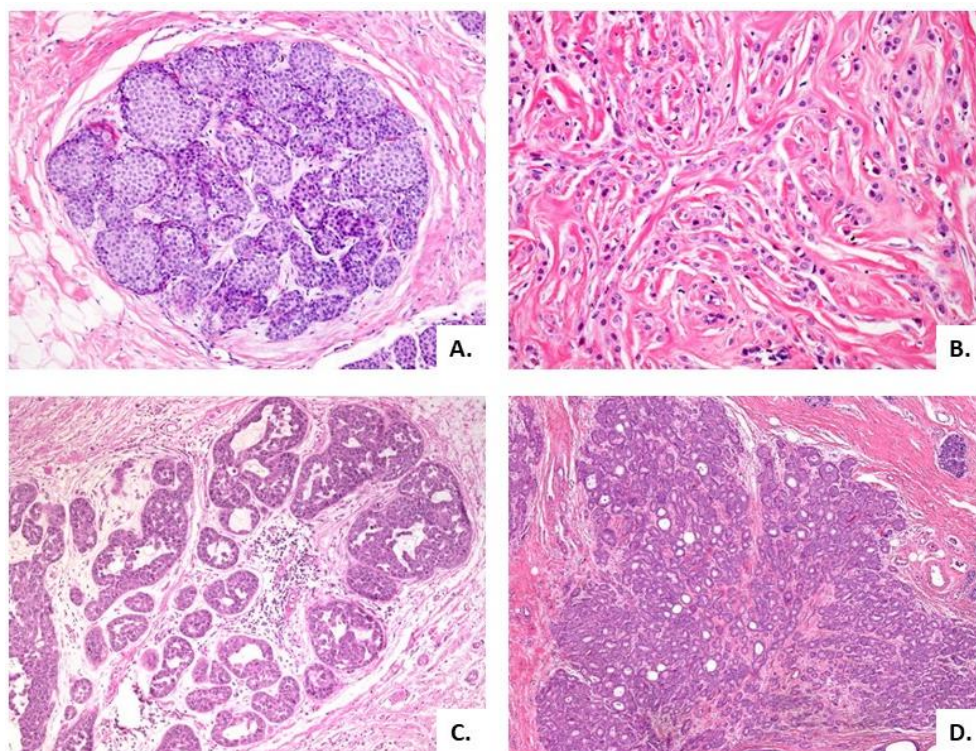
### E- Hétérogénéité des tumeurs mammaires

---

Le cancer du sein, même s'il est défini en tant qu'entité unique, représente un ensemble hétérogène de plusieurs modèles histologiques moléculairement et cliniquement différents, et ce d'un point de vue intra- comme inter-tumoral. Aujourd'hui, il est impossible de poser précisément les bases d'une évolution régulière et linéaire de la formation tumorale mammaire, tout comme il est impossible de caractériser un stade précoce ou un stade tardif de la tumeur mammaire. Comprendre et tenir compte de cette hétérogénéité est donc critique pour la mise au point de nouveaux moyens thérapeutiques efficaces (Polyak, 2007).

L'OMS a défini plusieurs types de cancers du sein, basés principalement sur des critères morphologiques. Selon leur diagnostic et leur évolution, les tumeurs mammaires peuvent être qualifiées de bénignes ou de malignes. Une tumeur est dite "bénigne" lorsque sa taille est bien délimitée et qu'elle est encapsulée dans la membrane basale. Il s'agit alors d'une masse tissulaire non cancéreuse, composée de cellules différenciées dont la croissance est lente et qui restent à proximité de leur origine tissulaire. Ces tumeurs ne forment donc aucune métastase, et après exérèse, aucune récurrence n'est observée. L'évolution d'une tumeur bénigne n'entraîne généralement pas la mort du patient. Parmi les tumeurs bénignes les plus fréquentes, on retrouve l'adénofibrome, qui est principalement observé chez les femmes de moins de 30 ans. A l'inverse, une tumeur est dite "maligne" lorsque ses contours sont

difficilement définis et qu'elle n'est pas encapsulée. Il s'agit alors d'une masse de cellules peu différenciées, qui prolifèrent rapidement et qui sont capables d'infiltrer les tissus adjacents à leur tissu d'origine. Ces tumeurs sont capables de former des métastases, et d'induire une récurrence après excision complète de la tumeur primaire. Environ 95% de ces tumeurs mammaires malignes sont des adénocarcinomes, c'est-à-dire des tumeurs ayant une origine épithéliale glandulaire, soit au niveau des canaux (cancer canalaire), soit au niveau des lobules (cancer lobulaire). En fonction de leurs capacités invasives, ces adénocarcinomes sont distingués en plusieurs sous-groupes. Des exemples de ces différents types d'adénocarcinomes sont illustrés en **Figure 11**.



**Figure 11. Représentation de variants histologiques d'adénocarcinomes du sein.**

*L'hétérogénéité des cancers du sein est visible au niveau histologique, parmi plusieurs tumeurs se trouvant au même stade de développement. A. Carcinome lobulaire in situ. B. Carcinome lobulaire invasif. C. Carcinome canalaire in situ. D. Carcinome canalaire invasif. (Adapté de [www.webpathology.com](http://www.webpathology.com)).*

De façon à créer des groupes homogènes sur le plan pronostic mais aussi sur le plan thérapeutique, plusieurs classifications des tumeurs mammaires ont été développées. Dans ce paragraphe, nous aborderons la classification anatomopathologique, qui repose sur plusieurs critères histologiques ; la classification clinique, qui repose sur les caractéristiques

macroscopiques (taille, capacités invasives) des tumeurs mammaires ; et la classification moléculaire, qui prend en compte les altérations génétiques au sein de la tumeur mammaire.

## 1) Classification histopathologique

### a) Les carcinomes *in situ*

Les carcinomes *in situ* représentent le type de tumeurs mammaires non invasives le plus fréquent. Ils sont divisés en 2 catégories : les carcinomes canaux *in situ* (CCIS) qui se développent au niveau des canaux, et les carcinomes lobulaires *in situ* (CLIS) qui se développent au niveau des lobules. Les carcinomes *in situ* comptent pour environ 15 à 20% des cas de cancer du sein, et parmi eux 85 à 90% sont des CCIS. Ils sont généralement de bon pronostic, avec 95% de survie globale à 10 ans, mais tout de même jusqu'à 13% de récurrence invasive en cas de chirurgie sans radiothérapie en France (INCa)

### b) Les carcinomes invasifs

Les carcinomes invasifs sont caractérisés par une membrane basale altérée et une invasion tumorale dans le tissu conjonctif environnant. Ils représentent la grande majorité des cas de cancer du sein puisqu'ils sont généralement diagnostiqués à ce stade. Comme pour les carcinomes *in situ*, on distingue 2 catégories : les carcinomes invasifs canaux (75% des cas de cancer du sein) et les carcinomes invasifs lobulaires (5 à 15% des cas de cancer du sein) (Ligue contre le cancer). D'autres formes plus rares de carcinomes invasifs ont été identifiées, comme les carcinomes tubuleux, mucineux, médullaires, papillaires, ou encore les carcinomes apocrines, neuro-endocrines et adénoïdes kystiques (Dieci *et al.*, 2014; Vuong *et al.*, 2014; Weigelt *et al.*, 2010).

## 2) Classification clinique

La classification clinique, ou classification TNM (*tumor/node/metastasis*), repose principalement sur l'analyse des critères anatomiques de la tumeur. Tout d'abord, le volume tumoral est mesuré, correspondant à un score T (de 0 à 4), une valeur plus élevée correspondant à un volume plus important. Ensuite, un score N (de 0 à 3) est défini en fonction de l'envahissement des ganglions, de la proximité de la tumeur, du nombre d'adénopathies, de leurs dimensions et de leur éventuelle fixation aux tissus environnants. Enfin, l'invasion métastatique est mesurée, correspondant à un score M (0 ou 1), la valeur M1 correspondant

à la présence de métastases, quels que soient leur nombre et localisation. La combinaison de ces 3 scores permet de déterminer un stade tumoral de 0 à IV : le stade 0 correspond à une tumeur *in situ* de petite taille, alors que le stade IV correspond à une tumeur de taille importante, avec envahissement ganglionnaire et dissémination métastatique (**Tableau 4**).

La classification TNM est régulièrement actualisée et améliorée. En janvier 2018, le Comité Américain Mixte sur le Cancer (AJCC, *American joint committee on cancer*) a mis à jour la 8<sup>ème</sup> et dernière édition de sa classification dans le but d'incorporer dans la détermination du stade tumoral le statut des récepteurs hormonaux œstrogéniques (ER) et progestatifs (PR), du récepteur HER2 ainsi que les niveaux d'expression d'un panel de gènes (Cserni *et al.*, 2018).

Stade	Tumeur	Ganglion	Métastases	Description
0	T0 ou Tis	N0	M0	Pas de tumeur primaire ou cancer <i>in situ</i>
I	T1	N0	M0	Tumeur inférieure à 2 cm, pas de ganglions lymphatiques atteints, pas de métastase
IIA	T0	N1	M0	Tumeur inférieure à 2 cm avec atteinte mineure des ganglions, ou tumeur de 2 à 5 cm sans atteinte ganglionnaire
	T1	N1		
IIB	T2	N0	M0	Tumeur de 2 à 5 cm avec atteinte mineure des ganglions, ou tumeur supérieure à 5 cm sans atteinte ganglionnaire
	T3	N1		
IIIA	T0/1/2/3	N1/2	M0	Tumeur de taille variable avec atteinte mineure ou modérée des ganglions
IIB	T4	N0/1/2	M0	Tumeur de taille variable avec extension à la poitrine ou la peau, atteinte ganglionnaire faible à modérée
IIIC	Tout T	N3	M0	Atteinte ganglionnaire importante
IV	Tout T	Tout N	M1	Présence de métastases distantes

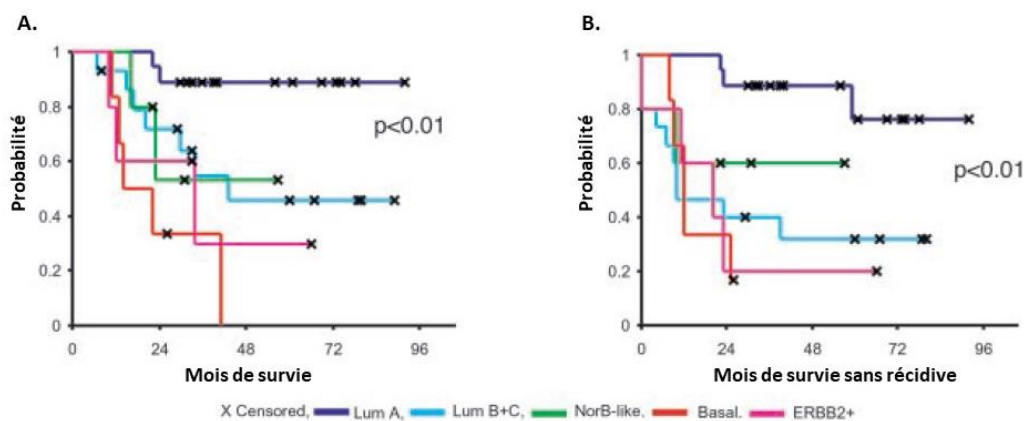
**Tableau 4. Stades cliniques du cancer du sein déterminés par la classification TNM.**

### 3) Classification moléculaire

Pendant longtemps, la classification des différents sous-types de cancer du sein a reposé sur les niveaux d'expression de marqueurs tels que les récepteurs hormonaux ER, PR, HER2 ou encore la protéine Ki67 (qui est un marqueur de prolifération cellulaire). Ces marqueurs sont encore conventionnellement utilisés en complément des classifications

histopathologiques pour la prise en charge et l'établissement du pronostic chez les patients (Cheang *et al.*, 2009; Vallejos *et al.*, 2010). Cependant, la variabilité de réponse aux traitements basée sur la seule classification histopathologique sous-entend une complexité et une hétérogénéité plus importantes qu'initialement envisagé (Bertos et Park, 2011). En 2000, les profils d'expression génique de 65 tumeurs mammaires obtenues à partir de 42 individus ont été analysés par microarray (Perou *et al.*, 2000). Parmi les 8102 gènes présents sur la puce, l'expression de 496 d'entre eux était significativement différente entre les tumeurs (avec une faible variation entre les tumeurs issues d'un même patient), et ont donc été retenus. L'étude de ces gènes a révélé que les tumeurs pouvaient être définies en 2 grands groupes : un groupe de tumeurs exprimant le récepteur aux œstrogènes (ER+), et un groupe n'exprimant pas le récepteur aux œstrogènes (ER-).

Une analyse plus détaillée de ces groupes a montré que les tumeurs ER+ expriment les récepteurs aux facteurs hormonaux (ER et PR), et les cytokératines ainsi que d'autres marqueurs spécifiques des cellules luminales : les tumeurs ER+ sont donc des tumeurs luminales. En complément, des marquages immunohistochimiques des récepteurs ER et PR, du récepteur HER2 et de la protéine Ki67 ont permis de mettre en évidence 2 sous-groupes de tumeurs luminales : les tumeurs luminal-A et luminal-B. Dans le groupe des tumeurs ER-, des différences ont été observées en lien avec l'expression du récepteur HER2 et des cytokératines spécifiques des différents types cellulaires. Parmi ces tumeurs, 3 sous-groupes ont ainsi été distingués : les tumeurs HER2+, les tumeurs basal-like et les tumeurs normal-like (Hu *et al.*, 2006; Sørlie *et al.*, 2001, 2003).



**Figure 12. Courbes de survie associées aux différents sous-types de cancer du sein.**

Les cas de cancer du sein inclus dans l'étude ont été distingués en 5 sous-types selon l'analyse des critères moléculaires exposés précédemment. **A.** Analyse de la survie selon le sous-type moléculaire. **B.** Analyse de la survie sans récurrence selon le sous-type moléculaire. Lum A : luminal-A ; Lum B+C : luminal-

B ; NorB-like : normal-like ; Basal : basal-like; ERBB2+ : HER2+. (Adapté de Sørli et al., 2001).

Les 5 sous-groupes tumoraux intrinsèques ainsi définis (luminal-A, luminal-B, HER2+, basal-like et normal-like) ont par la suite été validés par de nombreuses études complémentaires, et ont montré de bonnes valeurs pronostique et prédictive à la chimiothérapie (Prat *et al.*, 2015; Rouzier *et al.*, 2005). Les caractéristiques de ces sous-groupes sont détaillées dans le **Tableau 5**. L'analyse de la survie des patientes atteintes de cancer du sein et classées selon ces différents sous-types moléculaires montre que les profils luminal-A et luminal-B présentent la meilleure survie. Les tumeurs HER2+ et basal-like présentent au contraire une survie diminuée par rapport aux autres sous-types (Engstrøm *et al.*, 2013; Sørli *et al.*, 2001) (**Figure 12**).

Sous-type	ER/PR/HER	Fréquence	Marqueurs		Cluster de prolifération	Grade histologique	Pronostic
			basals	CK5/6, EGFR			
Normal-like	ER+/-, PR ?, HER2-	5-10%	+		Faible	I	Intermédiaire
Luminal-A	ER+, PR+, HER2-	50-60%	-		Faible	I ou II	Bon
Luminal-B	ER+/-, PR+/-, HER2+/-	10-20%	-		Elevé	I ou II	Intermédiaire
HER2+	ER-, PR-, HER2+	15-20%	+/-		Elevé	III	Défavorable
Basal-like	ER-, PR-, HER2-	10-20%	+		Elevé	III	Très défavorable
Molecular apocrine	ER-, PR-, HER2+/-		+/-, AR-		Elevé	II ou III	Intermédiaire
Claudin-low	ER-, PR-, HER2-	12-14%	+/-, CDH1- low/-, CLDN- low/-		Elevé	III	Défavorable

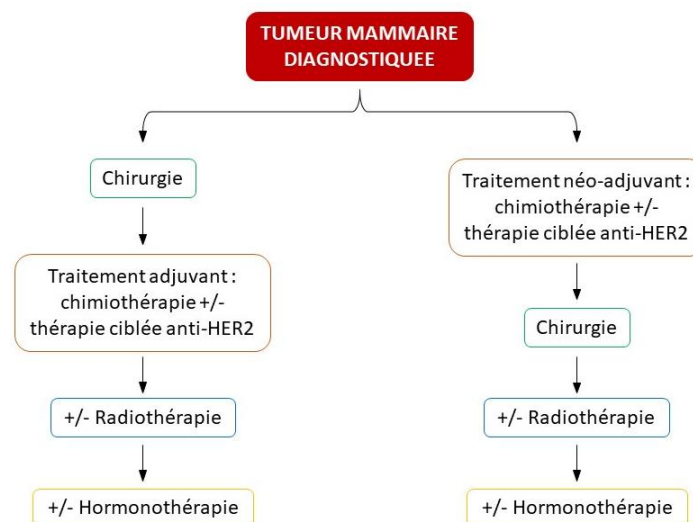
**Tableau 5. Classification moléculaire des sous-types de cancer du sein.**  
(Adapté de Eroles *et al.*, 2012 et Weigelt *et al.*, 2010).

Récemment, deux sous-types tumoraux supplémentaires ont été mis en évidence : les tumeurs “claudin-low”, définies par une faible expression des marqueurs de jonction cellulaire (Prat *et al.*, 2010), et les tumeurs “molecular apocrine”, définies par une activation

du récepteur aux androgènes (Farmer *et al.*, 2005) (**Tableau 5**). Les tumeurs de types basal-like, molecular apocrine et claudin-low peuvent être regroupées sous le nom de tumeurs triple négatives (TNBC, *triple negative breast cancer*). D'autres sous-types de tumeurs triple négatives ont été mis en évidence, ayant chacun leur signature génique propre, ce qui démontre et renforce l'hétérogénéité tumorale mammaire ainsi que la difficulté de trouver des traitements adaptés à chaque cas (Lehmann *et al.*, 2011).

## F- Traitements du cancer du sein

Comme nous l'avons exposé, le cancer du sein est une pathologie multifactorielle, avec une hétérogénéité intra- et inter-tumorale. Cette maladie complexe nécessite donc un traitement adapté associant la chirurgie, la radiothérapie, la chimiothérapie ou encore la mise en place de thérapies ciblées. Ces dernières années, la prise en charge et le traitement des cancers du sein évolue progressivement vers une médecine personnalisée, de façon à favoriser l'efficacité thérapeutique tout en limitant les effets secondaires indésirables (Abreu *et al.*, 2014). Le traitement du cancer du sein suit un schéma précis qui est mis en place selon le stade et le sous-type tumoral (**Figure 13**).



**Figure 13. Schéma de la prise en charge thérapeutique classique pour le traitement du cancer du sein non métastatique.**

Lorsque la tumeur mammaire est identifiée et caractérisée, la patiente peut dans un premier temps subir une mastectomie totale ou partielle, suivie d'un traitement adjuvant de chimiothérapie complété d'une thérapie ciblée anti-HER2 (trastuzumab) si la tumeur est classée HER2+. Une radiothérapie peut ensuite être prescrite à la patiente, suivie d'une hormonothérapie si la tumeur est classée ER+ et/ou PR+. La chimiothérapie complétée ou non d'une thérapie ciblée anti-HER2 peut également constituer un traitement néo-adjuvant en amont de l'acte chirurgical, de façon à réduire la taille de la tumeur.

## 1) Chirurgie

Quel que soit le type de cancer mammaire, la chirurgie est requise. Dans le cas d'un volume tumoral réduit par rapport au volume mammaire, une mastectomie partielle est réalisée, mais si le volume tumoral est trop important (T3 ou T4, voir **Tableau 4**), la mastectomie totale du sein est préconisée. En complément, une évaluation ganglionnaire est réalisée, soit par prélèvement au niveau du ganglion sentinelle, soit par curage axillaire. Le curage axillaire est indiqué lorsque l'examen anatomopathologique du ganglion sentinelle est positif (présence de macro-métastases), ou en cas de ganglion suspect confirmé par biopsie avant le geste chirurgical (cliniquement, ou en échographie axillaire).

En complément de la chirurgie et selon le type de cancer mammaire, un traitement par radiothérapie ou par chimiothérapie peut éventuellement être prescrit, l'objectif étant d'éviter une éventuelle récurrence loco-régionale ou à distance (Maughan *et al.*, 2010).

## 2) Radiothérapie

À la suite de la mastectomie partielle et/ou en cas d'atteinte ganglionnaire, la plupart des patientes vont être traitées par radiothérapie. La radiothérapie peut également être prescrite après une mastectomie totale, selon le sous-type tumoral et le stade. La radiothérapie utilise l'émission de rayons X ou de faisceaux d'électrons pour endommager l'ADN des cellules ciblées, de façon à éliminer spécifiquement les cellules cancéreuses. L'effet de la radiothérapie sur l'ADN des cellules ciblées sera détaillé dans le paragraphe II-F-2)a).

La radiothérapie peut être mise en place de deux façons : la radiothérapie "externe", où les rayons sont produits à l'extérieur du corps par un appareil, et la radiothérapie "interne", où de fins tubes contenant la source des rayons sont implantés temporairement au niveau du sein atteint. Les rayons utilisés pour la radiothérapie sont dirigés vers une zone spécifique du sein : les effets secondaires (irritations) sont donc limités à un niveau local dans la plupart des cas. Pour autant, une période prolongée de radiothérapie peut être à l'origine d'une fatigue générale de la patiente, ou d'un gonflement du sein irradié. Ainsi, de nouvelles techniques de radiothérapie sont mises au point, notamment la protonthérapie qui, contrairement à la radiothérapie conventionnelle, focalise un faisceau de protons directement sur la lésion, ce qui minimise les effets sur les tissus voisins mais assure l'homogénéité de l'irradiation dans la tumeur (Orecchia *et al.*, 2015).



La radiothérapie est mise en place dans le traitement de la plupart des stades de cancer du sein, car elle est très efficace pour diminuer la récurrence (Clarke *et al.*, 2005). Moins fréquemment, la radiothérapie peut être indiquée pour réduire le volume tumoral, si celui-ci est trop important, avant l'acte chirurgical.

### 3) Chimiothérapie

La chimiothérapie est la thérapie conventionnelle administrée aux patientes présentant une atteinte ganglionnaire, ou une tumeur de plus d'un centimètre. C'est également la stratégie de traitement adoptée pour les cancers invasifs comme les tumeurs triple négatives, pour lesquelles aucune thérapie ciblée n'est disponible. La chimiothérapie regroupe plusieurs types de drogues, dont l'effet principal est de détruire préférentiellement les cellules cancéreuses de façon systémique. A l'inverse de la chirurgie et de la radiothérapie, la chimiothérapie n'est donc pas un traitement loco-régional car elle agit sur l'ensemble de l'organisme. Les drogues utilisées auront pour but de cibler la prolifération et la division cellulaire à différents niveaux (Esposito *et al.*, 2014). Ainsi, les cellules cancéreuses étant par nature plus actives que les cellules saines, elles seront plus fortement touchées par la chimiothérapie. De plus, les drogues peuvent être utilisées en traitement seul, mais la plupart du temps elles sont combinées à d'autres drogues.

La chimiothérapie peut éventuellement être administrée avant la chirurgie, de façon à réduire le volume tumoral avant l'opération (thérapie néo-adjuvante), ou après la chirurgie (thérapie adjuvante). Dans les deux cas, les drogues utilisées sont des anthracyclines, potentialisées par des cyclophosphamides et des taxanes. Les anthracyclines altèrent la structure de l'ADN, empêchant sa réplication et entraînant ainsi l'apoptose. Les principales anthracyclines utilisées dans le traitement du cancer du sein sont la doxorubicine ainsi que son dérivé, l'épirubicine (Conte *et al.*, 2000). Les taxanes inhibent la formation des microtubules, bloquant la division cellulaire et entraînant l'apoptose de la cellule en division. Le paclitaxel fait partie des taxanes les plus utilisés (Nabholtz et Gligorov, 2005).

Il est important de souligner que du fait de leur action systémique, les chimiothérapies ne sont pas spécifiques des cellules cancéreuses. Elles sont ainsi à l'origine de nombreux effets secondaires chez les patientes.

#### 4) Thérapies ciblées

##### a) Hormonothérapie

Les hormonothérapies concernent les tumeurs de type luminal (A et B), qui surexpriment les récepteurs aux œstrogènes et/ou à la progestérone et qui représentent environ 60% des tumeurs mammaires. Ces hormonothérapies utilisent des inhibiteurs de l'activation des récepteurs aux œstrogènes comme le tamoxifène (Abreu *et al.*, 2014). Outre une action directe sur les récepteurs hormonaux, les hormonothérapies peuvent agir plus en amont : c'est le cas des inhibiteurs d'aromatase. L'aromatase est une enzyme qui catalyse la transformation de la testostérone en œstradiol, ensuite converti en œstrogène par d'autres enzymes. L'utilisation d'inhibiteurs d'aromatase va permettre de bloquer la production d'œstrogène, qui ne pourra alors plus interagir avec son récepteur : la prolifération cellulaire sera donc limitée (den Hollander *et al.*, 2013).

##### b) Tumeurs HER2+

Les tumeurs mammaires HER2+ sont caractérisées par une surexpression du récepteur HER2. La principale thérapie mise en place pour le traitement de ces tumeurs est l'utilisation du trastuzumab (ou Herceptine), qui est un anticorps monoclonal ciblant spécifiquement le récepteur HER2 (Figueroa-Magalhães *et al.*, 2014). La fixation de cet anticorps au niveau du domaine juxtamembranaire de HER2 va empêcher son activation et celle de ses signalisations en aval. Cependant, chez 50% des patientes traitées, une résistance *de novo* est observée, et une résistance acquise se développe chez la plupart d'entre elles. Ces résistances peuvent être dues à des sur-activations de voies de signalisation alternatives, à une efficacité partielle du trastuzumab due à l'expression tronquée du récepteur HER2, ou à l'induction de l'autophagie (Callahan et Hurvitz, 2011).

##### c) Tumeurs triple négatives

Les tumeurs mammaires triple négatives sont les plus agressives. Elles représentent 10 à 15% des cancers du sein. Il s'avère très difficile de définir un traitement de ces tumeurs, du fait de leur importante hétérogénéité mais aussi à cause de la diversité des gènes exprimés (voir **paragraphe II-E**). Le traitement actuel principal repose sur l'utilisation d'anthracyclines et de taxanes, mais dans certains cas ce traitement s'avère peu efficace.

Une fraction non négligeable des tumeurs triple négatives est mutée pour les gènes *BRCA1/2*, ce qui permet d'envisager une piste thérapeutique visant l'inhibition de la protéine PARP (*poly-ADP ribose polymerase*). En effet, les cellules présentant une mutation *BRCA1/2* sont caractérisées par un mauvais fonctionnement des mécanismes de réparation de l'ADN par recombinaison homologue, et reposent donc uniquement sur les mécanismes de réparation par jonction des extrémités non homologues (NHEJ, *non-homologous end joining*) et par excision de bases (BER, *base-excision repair*). Or, ces deux mécanismes de réparation nécessitent l'action de la protéine PARP : cette protéine est donc une cible de choix, car son inhibition entraîne l'instabilité de l'ADN et la mort cellulaire. Plusieurs molécules ont été développées en ce sens, et des essais cliniques sont en cours pour évaluer leur efficacité (Tomao *et al.*, 2015).

Les différents sous-types moléculaires des tumeurs mammaires permettent d'orienter les schémas thérapeutiques à mettre en place. Un récapitulatif des principales lignes thérapeutiques mises en place selon le sous-type de cancer du sein est présenté dans le **Tableau 6**.

<i>Luminal-like</i>	HER2+	Triple négative
<b>Tamoxifène</b>	Trastuzumab (anti-HER2)	Olaparib (inhibiteur de PARP)
<b>Inhibiteurs d'aromatase</b>	Lapatinib (inhibiteur de HER1 et HER2)	Iniparib (inhibiteur de PARP)
	Pertuzumab (anti-HER2)	Cetuximab (anti-EGFR)
	T-DM1 (anti-HER2) + taxane	Erlotinib (anti-EGFR)
	MM-121 (anti-HER3)	Lapatinib (anti-EGFR)
	MM-111 (anti-HER2/HER3)	
	Dalotuzumab (anti-IGF1R)	

*Chimiothérapies :*  
**Doxorubicine, Gemcitabine, Cisplatine, Paclitaxel, Docetaxel, Capecitabine**

*Inhibiteurs :*  
**Everolimus** (*inhibiteur de mTOR*)  
**Bevacizumab** (*inhibiteur de VEGF*)  
**Sunitinib** (*inhibiteur multi-kinase*)  
**Sorafenib** (*inhibiteur multi-kinase*)

**Tableau 6. Récapitulatif des principales stratégies thérapeutiques utilisées selon le sous-type de cancer du sein.**

Cependant, dans le cas d'une tumeur de stade IV avec dissémination métastatique, il peut s'avérer difficile de prédire la réponse à une ligne de traitement particulière. On peut en effet observer dans certains cas un recul de la maladie après administration du traitement de première intention, mais ce recul peut être temporaire et suivi d'une nouvelle progression de la maladie. Cette "rechute" est principalement due à la mise en place de mécanismes de résistances : une nouvelle ligne de traitement doit donc être proposée.

Ainsi, les études actuelles s'orientent vers des analyses complémentaires multi-domaines, notamment en protéomique, lipidomique et métabolomique, de façon à compléter les données de génomique initiales et ainsi mieux prédire la potentielle récurrence, mieux adapter les schémas thérapeutiques pour chaque patiente, et enfin comprendre les mécanismes de résistance aux traitements. De cette façon, l'immunothérapie représente une nouvelle opportunité de traitement, notamment dans le cancer du sein où plusieurs essais cliniques sont en cours (Polk *et al.*, 2018).

## G- Résistance aux traitements : focus sur la réparation des dommages de l'ADN

Parmi tous les mécanismes de résistance aux traitements anti-cancéreux qui ont été identifiés, le cas des dommages de l'ADN constitue un aspect intéressant. En effet, le contexte des altérations de l'ADN est double : il constitue d'une part un facteur de risque de développement cancéreux (voir **paragraphe II-B**) et de progression tumorale par inhibition de gènes suppresseurs de tumeurs (voir **paragraphe II-C-2a**)), mais l'induction de dommages de l'ADN constitue également une des principales thérapies actuelles (voir **paragraphe II-F**). Nous avons également exposé le fait que dans certains cas, les cellules cancéreuses (et notamment les CSCs) sont capables de stimuler les mécanismes impliqués dans la réparation des dommages de l'ADN, de façon à favoriser leur survie et leur résistance aux traitements.

Dans ce paragraphe, nous allons exposer les principaux mécanismes de réparation des dommages de l'ADN, ainsi que quelques exemples d'implication dans les cellules cancéreuses.

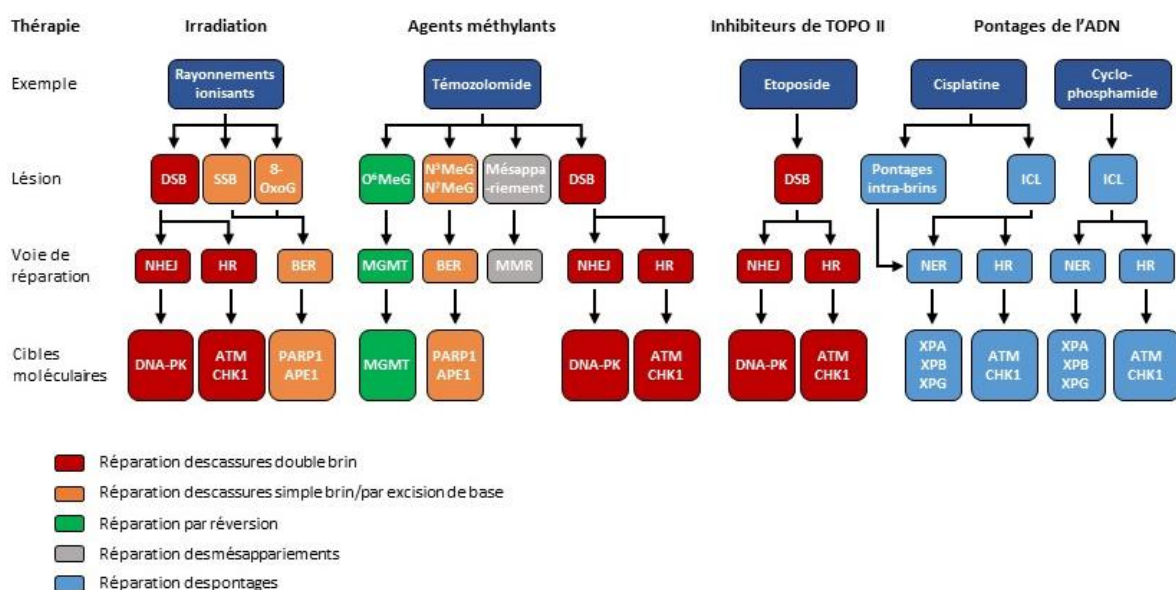
### 1) Induction de dommages de l'ADN

De façon générale, il est clair que la transmission conforme du matériel génétique de génération en génération nécessite le maintien d'un taux bas de mutations et d'altérations en tout genre. Les cellules ont besoin d'un génome intègre et fonctionnel, mais chaque gène peut être altéré par un changement dans sa séquence ou dans son niveau d'expression (ARNm,

protéine). Pourtant, il existe deux sources importantes de mutations, qui apparaissent de façon physiologique : les erreurs de réplication de l'ADN et les lésions chimiques du matériel génétique.

Les erreurs de réplication sont principalement dues à des erreurs d'incorporation de nucléotides par la machinerie enzymatique en charge de répliquer l'ADN (Cortez, 2019). En effet, chez les bactéries, l'ADN polymérase commet en moyenne une erreur toutes les 100000 insertions de nucléotide. Ces erreurs sont normalement évitées grâce à la fonction correction d'épreuve : le nucléotide incorrect sera clivé par l'activité exonucléase de la polymérase. Après la réplication, un second mécanisme permet de corriger les erreurs non détectées par le système de correction d'épreuve : ce sont la plupart du temps des mésappariements de nucléotides. Les nucléotides incorrects seront alors éliminés puis remplacés.

En complément, l'ADN étant une molécule organique complexe, fragile et de stabilité chimique limitée, il peut être sujet à des lésions induites par des agents physiques (radiations) ou chimiques (naturels ou artificiels) qui auront un impact sur sa structure ou sur la nature chimique des bases (**Figure 14**). Contrairement aux erreurs de réplication, les lésions dues à l'environnement sont inévitables. Par conséquent, la cellule devra disposer d'un système de réparation efficace pour contrer les effets de ces lésions. C'est notamment le cas des cellules cancéreuses résistantes aux thérapies conventionnelles, dont nous allons détailler les caractéristiques dans le paragraphe suivant. Les mécanismes de réparation des lésions de l'ADN seront développés par la suite.



**Figure 14. Lésions de l'ADN induites par les traitements anti-cancéreux et mécanismes de réparation.** Selon le traitement mis en place, les lésions de l'ADN seront différentes. La figure représente les lésions

induites par irradiation ou par différentes catégories d'agents chimiothérapeutiques, les voies moléculaires de réparation de ces lésions, et les facteurs moléculaires impliqués pouvant être ciblés pour augmenter l'efficacité des traitements. Chaque couleur représente un ou plusieurs mécanisme(s) de réparation. (Adapté de Goldstein et Kastan, 2015).

## 2) Dommmages induits par les traitements anti-cancéreux

### a) Radiothérapie

La radiothérapie est l'une des principales stratégies thérapeutiques mises en place dans le traitement des tumeurs solides, et plus particulièrement dans le traitement du cancer du sein. Comme nous l'avons vu précédemment (voir **paragraphe II-F-2**), le but de la radiothérapie est d'induire l'arrêt de la croissance et la mort des cellules ciblées : elle permet ainsi d'éliminer les cellules cancéreuses.

Les conséquences biologiques des rayonnements ionisants (X ou  $\gamma$ ) utilisés sont directement liées aux cassures (simple ou double brin) de l'ADN des cellules ciblées. En complément, les rayonnements ionisants peuvent agir sur d'autres molécules intracellulaires, en particulier les molécules d'oxygène (O<sub>2</sub>) pour générer des radicaux libres appelés espèces réactives de l'oxygène (ROS) : ces ROS seront à l'origine d'un stress oxydant dans la cellule, caractérisant un effet indirect des radiations sur l'intégrité de l'ADN. En effet, le stress oxydant peut être responsable de lésions au niveau de l'ADN (Hur et Yoon, 2017).

Un autre effet indirect des rayonnements ionisants consiste en l'action de l'irradiation sur des cellules distantes qui n'ont pas été irradiées : on parle d'effet *bystander*. Cet effet *bystander* des radiations ionisantes peut être régulé par certaines cytokines (Prise et O'Sullivan, 2009) ou par la production de vésicules extracellulaires induites par l'irradiation (Jella *et al.*, 2014; Szatmári *et al.*, 2017). De façon intéressante, il a été montré que le contenu ces vésicules induites par l'irradiation permettait d'en propager les effets aux cellules voisines : dans le contenu de ces vésicules, on retrouve diverses molécules et notamment des ARNs (Al-Mayah *et al.*, 2012; Jelonek *et al.*, 2016).

### b) Chimiothérapie

Nous avons vu précédemment que la chimiothérapie utilise des drogues dont l'effet global est de détruire préférentiellement les cellules cancéreuses de façon systémique. En effet, les chimiothérapies ciblent la prolifération et la division cellulaire (Esposito *et al.*, 2014). De cette façon, les cellules cancéreuses seront plus fortement impactées car elles sont par

nature plus actives que les cellules saines. Parmi les drogues utilisées en chimiothérapie, de nombreux composés ont un impact sur l'ADN : notamment, certaines molécules comme le témozolomide sont des agents méthylants. Ces drogues vont méthyler les guanines, ce qui induira une cytotoxicité par défaut de réplication (Roos *et al.*, 2004). Cependant, certaines tumeurs peuvent développer des mécanismes de résistance au témozolomide, notamment en surexprimant une enzyme particulière, la méthylguanine méthyltransférase (MGMT), qui retirera le groupement méthyl des guanines (Thomas *et al.*, 2017). Dans le cadre de ce manuscrit, nous nous intéresserons plus ici à une famille que nous avons déjà citée, à savoir les anthracyclines. Ces composés ont un impact sur l'ADN puisqu'ils vont directement modifier sa structure chimique, de façon à empêcher sa réplication et entraîner la mort des cellules. Les principales anthracyclines utilisées dans le traitement du cancer du sein sont la doxorubicine ainsi que son dérivé, l'épirubicine (Conte *et al.*, 2000).

Les anthracyclines sont des inhibiteurs de topoisomérases II. Les topoisomérases sont des protéines intervenant dans la décondensation de l'ADN, en clivant un seul brin (topoisomérases I) ou les deux (topoisomérases II). Ce clivage est suivi par le relâchement de l'ADN et la re-ligation des brins d'ADN. Ainsi, les anthracyclines vont agir en bloquant la dernière étape de re-ligation, de façon à laisser la molécule d'ADN ouverte : ceci mènera à l'accumulation progressive de cassures double brin de l'ADN. Les cassures induites par les anthracyclines diffèrent des cassures induites chimiquement car les topoisomérases inactivées restent liées de façon covalente au niveau du site de cassure : la réparation de la cassure nécessitera donc au préalable d'éliminer cette enzyme. En complément des anthracyclines, un traitement avec des inhibiteurs de molécules impliquées dans la réparation des cassures double brin (DNA-PK, ATM) permettra ainsi de sensibiliser les cellules cancéreuses et de favoriser leur élimination (Hickson *et al.*, 2004; Weber et Ryan, 2015; Willmore *et al.*, 2004) (**Figure 14**). En effet, la protéine ATM régule l'expression des topoisomérases II : il a été montré qu'une inhibition d'ATM entraîne une augmentation de l'expression de ces topoisomérases II, mais augmente également la sensibilité cellulaire à l'étoposide (Tamaichi *et al.*, 2013). Ceci est lié au fait que le niveau d'expression des topoisomérases est lié au nombre de cassures de l'ADN induites par les inhibiteurs de topoisomérases. Ainsi, des inhibiteurs d'ATM permettent de sensibiliser les cellules aux inhibiteurs de topoisomérases II non seulement en affectant la réponse cellulaire aux cassures double brin de l'ADN, mais aussi en augmentant l'expression des topoisomérases II : en effet,

on observera en conséquence une augmentation du nombre de cassures dues à un défaut d'activité des topoisomérases.

### 3) Mécanismes de réparation de l'ADN

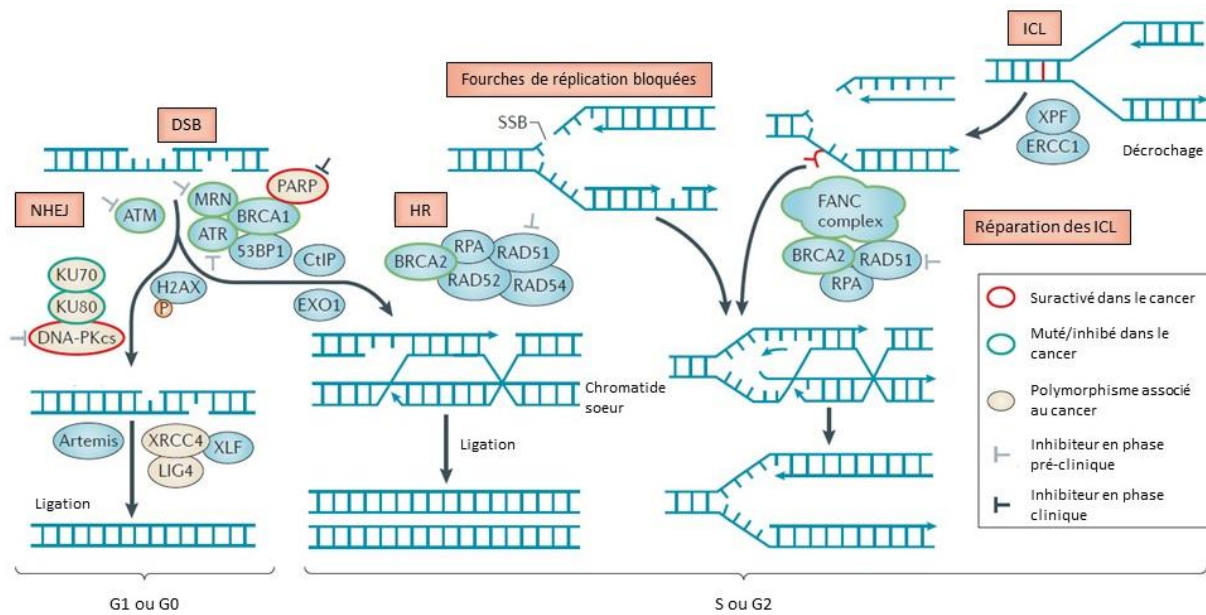
Au niveau de l'ADN, la majorité des lésions induites seront des cassures simple ou double brin. Les cassures simple brin sont considérées comme "sub-létales", car c'est leur accumulation qui peut induire la mort cellulaire. En revanche, les cassures double brin de l'ADN sont létales. Des mécanismes de réparation complexes et potentiellement croisés permettent de réparer ces lésions (Curtin, 2012). En complément, d'autres lésions de l'ADN peuvent être induites dans la cellule, comme des pontages inter- ou intra-brins d'ADN, mais aussi des pontages avec des protéines proches (Reisz *et al.*, 2014) (**Figure 14**).

La réparation des cassures double brin de l'ADN fait intervenir deux mécanismes principaux que sont la recombinaison homologue (HR, *homologous recombination*) ou la jonction des extrémités non homologues (NHEJ, *non-homologous end joining*). Ces voies de réparation sont détaillées dans la **figure 15**.

D'un point de vue général et simplifié, les cassures double brin de l'ADN entraînent l'activation des kinases ATM (*ataxia-telangiectasia mutated*) et ATR (*ataxia-telangiectasia and Rad3 related*). En parallèle, le variant d'histone H2AX est phosphorylé : la marque  $\gamma$ H2AX constitue ainsi un marqueur de dommages de l'ADN (Nagelkerke et Span, 2016; Rogakou *et al.*, 1998). En aval, les kinases CHK1 et CHK2 (*checkpoint kinase 1/2*) sont recrutées et régulent à leur tour de nombreux effecteurs, dont les suppresseurs de tumeur p53 et BRCA1/2, ainsi que des modulateurs du cycle cellulaire comme des phosphatases de la famille Cdc25.

Historiquement, il était admis que la voie ATM-CHK2 était principalement impliquée dans la réparation des cassures double brin de l'ADN, et que la voie ATR-CHK1 était associée à la réparation des cassures simple brin. Cependant, des études plus récentes ont montré des croisements entre ces deux voies (Smith *et al.*, 2010). Dans tous les cas, l'activation de ces voies mènera selon la gravité des lésions à différents phénotypes, allant du simple arrêt du cycle cellulaire jusqu'à l'apoptose en passant par la sénescence cellulaire (Ciccia et Elledge, 2010).





**Figure 15. Mécanismes de réparation des cassures de l'ADN.**

La réparation des cassures double brin de l'ADN (DSB) fait d'abord intervenir le recrutement du complexe MRN. Dans la réparation par NHEJ, la liaison entre l'hétérodimère Ku70-Ku80 et la sous-unité catalytique de la kinase DNA-PK (DNA-PKcs) permet la synthèse des extrémités d'ADN cassées. Ensuite, les extrémités libres sont prises en charge par Artemis, liguées par l'ADN ligase 4 (LIG4) et stabilisées par le complexe XRCC4/XLF. Dans la réparation par HR, les protéines BRCA1 et PARP permettent le recrutement du complexe MRN, qui va lui-même recruter la protéine ATM. ATM phosphoryle l'histone H2AX, qui permet alors le recrutement de 53BP1 et BRCA1. Les zones d'ADN simple brin sont rapidement recouvertes de protéines RPA, qui empêchent ainsi leur dégradation. Ceci permet le recrutement d'ATR et ATRIP, qui vont phosphoryler en aval CHK1 pour induire un arrêt du cycle entre la phase S et la phase G2. ATM et ATR phosphorylent BRCA1, ce qui stimule son activité E2 ubiquitine ligase. CHK1 va phosphoryler Rad51, qui va retirer les monomères de RPA pour former un filament nucléoprotéique capable d'interagir avec le duplex complémentaire, formant une jonction de Holliday. Le brin invasif est allongé par une ADN polymérase jusqu'au niveau de la cassure double brin, pour former un produit de réparation croisé ou non croisé. Les fourches de réplication bloquées entraînent l'activation d'ATR et du complexe FANCD1/ATRAX, qui va favoriser la réparation par HR (c'est également le cas pour les fourches bloquées du fait de pontages inter-brins). (Adapté de Curtin, 2012).

#### 4) Réparation de l'ADN & cancer

Comme nous l'avons vu, les cellules cancéreuses sont caractérisées par une grande instabilité de leur génome, puisqu'elles sont sujettes à de nombreuses altérations génétiques et/ou épigénétiques (Negrini *et al.*, 2010). De plus, bien qu'elles soient faibles en proportion, il existe des formes familiales héréditaires de cancer du sein. Dans ces formes héréditaires, l'une des mutations ayant la plus forte prévalence affecte les gènes *BRCA1/2*. En effet, des individus hétérozygotes porteurs d'une mutation *BRCA1* ou *BRCA2* ont un risque de 40 à 80% de développer un cancer du sein (Fackenthal et Olopade, 2007). De plus, les tumeurs mutées pour *BRCA1* ou *BRCA2* ont été associées avec une faible expression de 53BP1, ce qui signifie

que la mutation du gène *53BP1* pourrait favoriser la survie en l'absence des protéines BRCA1 et BRCA2 (Bouwman *et al.*, 2010). D'autres mutations des gènes *CHK2*, *ATM*, *NBS1* et *RAD50* ont également été associées avec un risque doublé d'apparition de cancer du sein : ceci met en évidence l'importance de la voie ATM au sein de la réparation des cassures double brin et de l'inhibition de la tumorigenèse mammaire (Walsh et King, 2007).

En revanche, dans le cas des cancers "sporadiques", il a été montré que l'accumulation de dommages de l'ADN permet de favoriser l'apparition de cellules cancéreuses. En effet, les stades précoces des tumeurs humaines sont caractérisés par de hauts niveaux de lésions de l'ADN (Bartek *et al.*, 2007). Ces lésions peuvent être dues à l'exposition à des carcinogènes, au raccourcissement des télomères, à l'augmentation du stress oxydatif, mais aussi à un stress réplicatif par l'activation d'oncogènes (Bartek *et al.*, 2007; Luo *et al.*, 2009; Pleasance *et al.*, 2010a, 2010b). Dans les conditions normales, l'activation de la réparation de l'ADN empêcherait la tumorigenèse en induisant la sénescence des cellules ou la mort des cellules tumorales. Cependant, des mutations de gènes impliqués dans les voies de réparation, comme *TP53* ou *ATM*, pourraient prédisposer certaines cellules à la formation de masses tumorales en évitant la sénescence ou l'apoptose pour au contraire favoriser la prolifération malgré l'accumulation de dommages de l'ADN (Luo *et al.*, 2009).

De cette façon, le comportement des cellules cancéreuses laisse à penser que l'induction de dommages au niveau de leur ADN par les chimio- ou radiothérapies actuelles pourrait selon le cas favoriser ou inhiber la progression tumorale. En effet, il est possible que ces lésions pourraient soit renforcer l'instabilité génétique des cellules cancéreuses, soit entraîner des cassures qui seront mal prises en charge du fait d'un système de réparation défectueux, favorisant ainsi l'apparition de nouvelles mutations.

**Malgré les stratégies thérapeutiques définies et le large panel de molécules disponibles, le cancer du sein reste la première cause de mortalité par cancer chez les femmes en France et dans le monde. Pour réduire cette mortalité, il est capital d'identifier tous les acteurs et mécanismes impliqués dans la progression tumorale mammaire, ainsi que dans la mise en place des voies de résistance aux traitements.**

### III – Les longs ARN non codants

Trente ans après l'identification du premier long ARN non codant (lncRNA) chez l'homme, nommé *H19*, le rôle et l'importance de ces ARNs particuliers dans tous les aspects de la physiologie cellulaire ne sont plus à démontrer. Pendant ces 3 décennies, notamment grâce aux avancées technologiques majeures telles que le séquençage haut débit et les nouveaux outils de biologie moléculaire, c'est tout un pan de la transcriptomique qui a été mis au jour.

Au début des années 2000, le projet ENCODE (Encyclopedia of DNA Elements) est initié, conçu comme étant la continuité du Projet sur le Génome Humain (HGP, *Human Genome Project*) (Dulbecco, 1986; International Human Genome Sequencing Consortium, 2001, 2004; The 1000 Genomes Project Consortium, 2010). Ce projet ENCODE a mis en évidence que près de 80% du génome humain est transcrit en ARNs fonctionnels, mais que seulement 2% du génome code pour des protéines (Kapranov *et al.*, 2007; Qu et Fang, 2013; The ENCODE Project Consortium, 2007). Il résulte ainsi de cette étude qu'il existe un "bruit de fond transcriptionnel", mais aussi des ARNs transcrits mais non traduits, appelés ARNs non codants (ncRNAs). Ces ncRNAs sont classés en plusieurs catégories selon leur longueur : les ncRNAs de moins de 200 nt sont appelés petits ARNs non codants, les ncRNAs de plus de 200 nt sont appelés longs ARNs non codants.

Comme nous allons l'exposer dans ce chapitre, les longs ARNs non codants sont impliqués dans de nombreux processus cellulaires tels que la prolifération, la migration, l'apoptose, le maintien de l'intégrité du génome, ou encore le maintien des cellules souches. Nous expliciterons l'ensemble des mécanismes mis en place par les lncRNAs dans le contrôle de ces différents phénotypes. Les petits ARNs non codants feront l'objet du chapitre suivant (voir **paragraphe IV**).

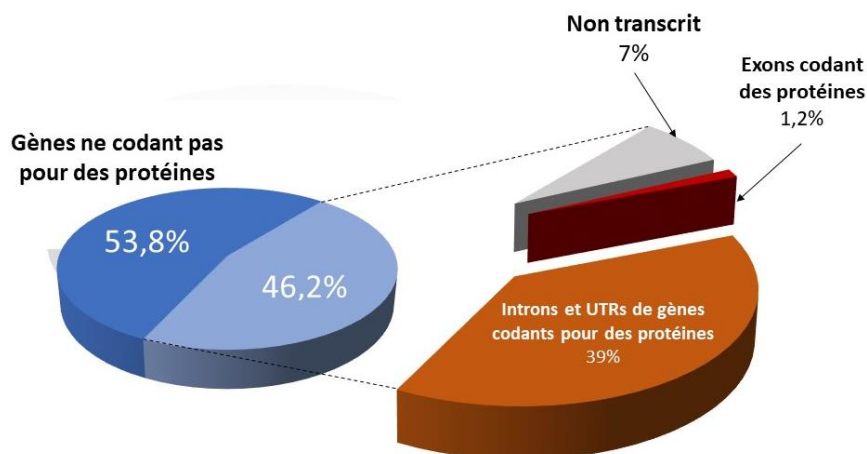
#### A- Généralités sur les longs ARNs non codants

---

##### 1) Découverte et historique

Dans les années 1950, des études ont montré que le génome de l'homme n'était pas aussi développé qu'on le pensait. En effet, le paradigme de l'époque énonçait que plus un organisme est développé, plus son génome doit être important. Or, des expériences portant

sur la C-value, c'est-à-dire la quantité d'ADN dans un génome haploïde ("taille" de l'ADN), n'ont pas montré de corrélation avec la taille de l'organisme ou le niveau de complexité de son développement (Gall, 1981; Mirsky et Ris, 1951). Ce paradoxe a remis en cause les certitudes scientifiques de l'époque, puisque le point de vue dominant était anthropocentrique, et stipulait que l'homme, espèce la plus complexe sur terre, nécessitait d'avoir le plus grand nombre de gènes possible. Dans les années 1970, des expériences d'hybridation ADN-ARN ont complété ces données et ont montré que l'homme possède entre 20000 et 30000 gènes codants. A l'époque, le reste du génome est alors qualifié "d'ADN poubelle" (« *junk DNA* ») du fait de sa contenance en transposons, pseudogènes et séquences répétées (Ohno, 1972; Thomas, 1971). Cependant, ces séquences non codantes suscitèrent l'intérêt quelques années plus tard, lorsqu'il fut démontré qu'elles étaient à l'origine d'éléments de régulation du génome, comme les ARNs ribosomaux ou les ARNs de transfert (Holmes *et al.*, 1972; Pierpont et Yunis, 1977), mais aussi d'éléments contrôlant l'expression des gènes ou la synthèse des ARNm matures.



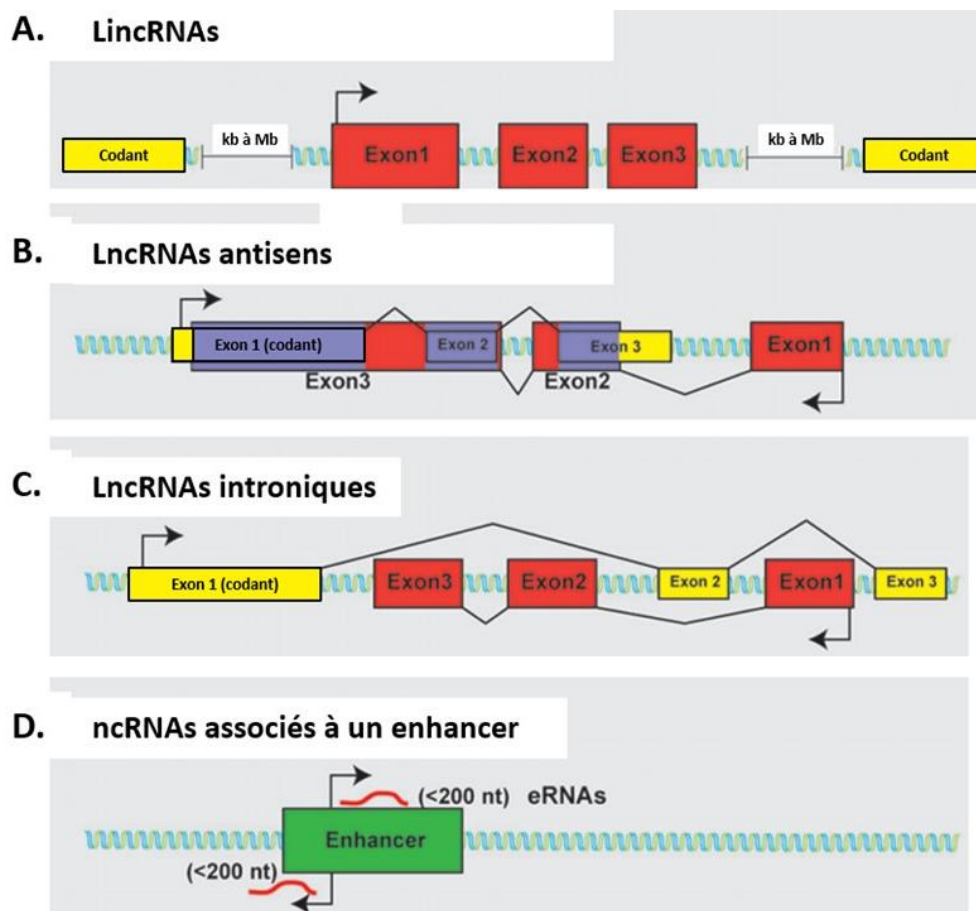
**Figure 16. Proportions des transcrits codants et non codants dans le génome humain.** (Adapté de Jarroux *et al.*, 2017).

Plus tard, dans les années 2000, le Projet Génome Humain a permis le séquençage du génome entier, et a mis en évidence la notion selon laquelle dans un organisme, le taux de séquences non codantes reflète sa complexité. Par la suite, le consortium ENCODE a compilé près de 1640 banques de données sur 147 lignées cellulaires différentes. Ceci a permis de montrer que 93% du génome est activement transcrit, et associé à au moins 1 transcrit primaire. Ces résultats ont également montré qu'environ 39% du génome est représenté par des gènes codant des protéines (définis à partir du promoteur jusqu'au signal polyA).

Cependant, 54% des transcrits ne sont pas associés à ces gènes (**Figure 16**). En effet, 9640 loci permettant l'expression de longs ARNs non codants ont été mis en évidence chez l'Homme (Derrien *et al.*, 2012). De nos jours, d'après la base de données LNCipedia 2.0, 183 lncRNAs ont été annotés sur la séquence du génome humain : pour la majorité d'entre eux, aucune fonction cellulaire n'a encore été associée.

Ces résultats montrent ainsi que la majorité du génome est transcrit, mais qu'une très faible proportion des ARNs produits est traduite en protéines. Ceci signifie que la majorité du génome humain est non codant. Des résultats similaires ont été obtenus chez la souris, et ont permis d'étendre la définition d'un gène au-delà de sa fonction codant pour une protéine.

## 2) Classification des longs ARN non codants



**Figure 17. Principales catégories de longs ARNs non codants (lncRNAs).**

Les lncRNAs sont classés selon leur origine dans le génome. **A.** Les longs ARNs intergéniques (lincRNAs) sont issus de fragments distants d'au moins 1 kb d'un gène codant pour une protéine. **B.** Les lncRNAs peuvent être transcrits en orientation antisens aux gènes codants. **C.** Lors de l'épissage des ARNm, les introns peuvent former des lncRNAs appelés lncRNAs introniques. **D.** Les lncRNAs peuvent également être transcrits à partir d'enhancers (eRNAs). (Adapté de Clark et Blackshaw, 2014).

Il existe de nombreuses méthodes de classification des longs ARNs non codants, selon le critère de discrimination utilisé (taille, structure, fonctions biologiques) (St Laurent *et al.*, 2015). L'une des méthodes les plus utilisées consiste à distinguer les lncRNAs selon l'origine de leur transcription dans le génome : il existe ainsi 5 catégories différentes.

#### a) LncRNAs intergéniques (lincRNAs)

Certains gènes codant des lncRNAs possèdent leur propre promoteur indépendant, sont transcrits par l'ARN polymérase II, polyadénylés et épissés : ce sont les lncRNAs intergéniques (lincRNAs, *large-intergenic non-coding RNAs*) (**Figure 17.A**). La séquence à partir de laquelle un lincRNA est transcrit est située entre deux gènes codants, mais sa transcription ne se superpose pas à celle de ces gènes. Les lincRNAs sont localisés le plus souvent à une distance de plus de 5 kb des séquences des gènes codants, et ont une taille supérieure à 1000 nt (Guttman *et al.*, 2009; Khalil *et al.*, 2009).

Parmi les lincRNAs les plus étudiés, nous pouvons citer les exemples de *Xist* (Brockdorff *et al.*; Brown *et al.*, 1992), *HOTAIR* (Rinn *et al.*, 2007), *MALAT1* (Ji *et al.*, 2003) ou encore *H19* (Brannan *et al.*, 1990).

#### b) LncRNAs antisens

Les lncRNAs peuvent également être transcrits en orientation antisens par rapport aux gènes codants (**Figure 17.B**). Dans ce cas, et contrairement aux lincRNAs, ils peuvent déborder partiellement ou entièrement sur les séquences des gènes codants. Les lncRNAs antisens sont principalement retrouvés au niveau de régions chromosomiques soumises à l'empreinte génomique. Certains de ces lncRNAs contrôlent l'établissement et le maintien de l'empreinte, comme ceux transcrits à partir des loci *Tsix/Xist* (Lee *et al.*, 1999), *Kcnq1/Kcnq1ot1* (Kanduri *et al.*, 2006) et *Igf2r/Air* (Lyle *et al.*, 2000). Un paragraphe sera consacré à la mise en place et à la régulation de l'empreinte génomique, ainsi que le rôle des lncRNAs dans ces mécanismes (voir **paragraphe V-A**).

#### c) LncRNAs introniques

Au cours du phénomène d'épissage des ARNm, certains introns éliminés peuvent former des lncRNAs (**Figure 17.C**). Ces lncRNAs ont une fonction similaire à celle de l'ARNm à partir duquel ils sont synthétisés. Par exemple, le lncRNA *COLDAIR*, transcrit à partir du locus

FLC (*flowering repressor locus*) aura tout comme l'expression du gène codant correspondant un rôle dans le phénomène de vernalisation des plantes (Heo et Sung, 2011).

#### d) ARNs enhancers (eRNAs)

Une autre classe d'ARNs non codants est constituée de transcrits peu abondants dans la cellule, et dont la fonction précise est méconnue : ce sont les ARNs enhancers (eRNAs) (**Figure 17.D**). Ces eRNAs sont synthétisés non loin des points d'initiation de la transcription des ARNm, mais aussi des ARNs antisens. Ils sont de petite taille (de 20 à 2500 nt), coiffés et polyadénylés. Leur transcription est probablement impliquée dans les mécanismes de décondensation de la chromatine, de façon à favoriser l'expression de gènes auxquels ils sont associés (Kim *et al.*, 2010).

Les eRNAs sont parfois associés au bruit de fond transcriptionnel, puisqu'ils sont générés par l'interaction du complexe d'initiation de la transcription avec les séquences enhancers ou à proximité des promoteurs.

#### e) LncRNAs issus de pseudogènes

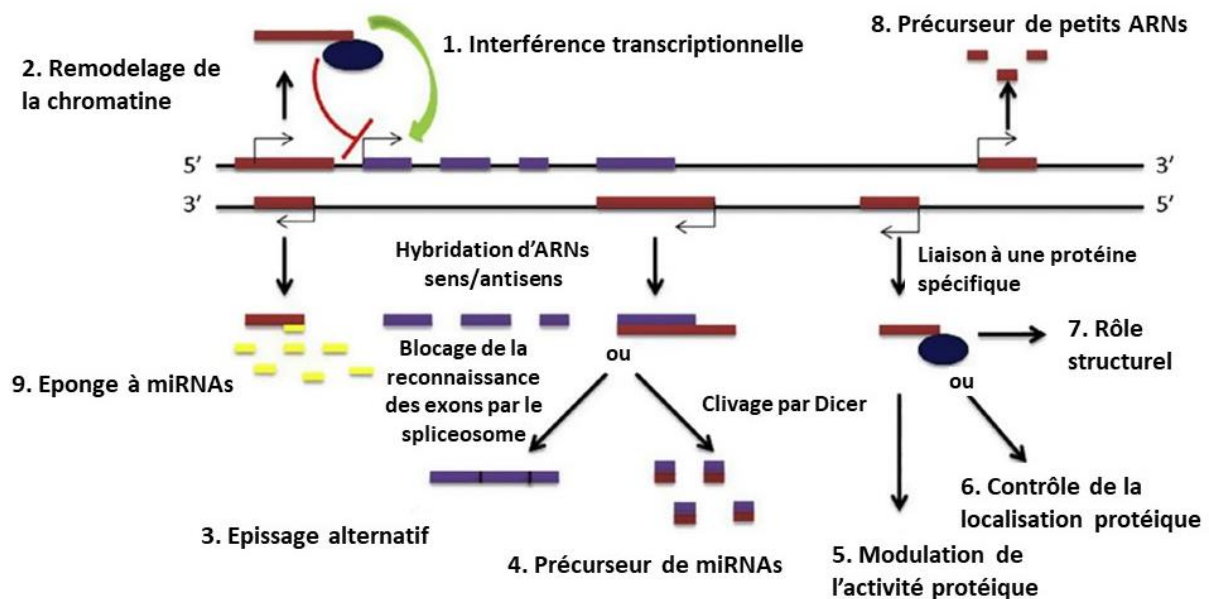
La dernière catégorie de LncRNAs regroupe ceux issus de pseudogènes. En effet, même si on considère généralement que les pseudogènes ne sont pas exprimés, certains d'entre eux (de 2 à 20% environ) peuvent tout de même être transcrits en LncRNAs du fait d'une mutation non-sens ou d'un décalage de la phase ouverte de lecture. Les pseudogènes ainsi exprimés sont considérés comme des intermédiaires dans le processus de "pseudogénéisation" complète (Harrison *et al.*, 2005), ou encore comme des pseudogènes dont l'expression a été ré-activée et qui ont ainsi acquis de nouvelles fonctions, notamment dans la régulation de post-transcriptionnelle de l'expression génique (Bekpen *et al.*, 2009).

### B- Modes d'action des longs ARNs non codants

---

Selon leur localisation au sein de la cellule, les LncRNAs auront des rôles différents et seront impliqués dans des phénotypes divers. Globalement, on considère que les LncRNAs peuvent agir au niveau transcriptionnel, au niveau post-transcriptionnel et au niveau post-translationnel : ils peuvent donc exercer leur action à la fois dans le noyau et dans le cytoplasme (Shi *et al.*, 2013) (**Figure 18**).

Un seul lncRNA peut ainsi avoir plusieurs modes d'action dans la cellule, tant dans le compartiment nucléaire que dans le compartiment cytoplasmique.



**Figure 18. Principales fonctions cellulaires des lncRNAs.**

D'un point de vue général, les lncRNAs (en rouge) peuvent réguler négativement (1) ou positivement (2) l'expression d'un gène codant (en violet) par interférence transcriptionnelle ou en modulant la condensation de la chromatine. De plus, des transcrits antisens peuvent s'apparier avec leur ARN sens spécifique, entraînant un épissage alternatif (3) ou la formation de microRNAs (4). Lorsqu'ils interagissent avec des protéines, les lncRNAs peuvent réguler leur activité (5), leur localisation (6) ou même interagir avec elles pour former des complexes ou des structures particulières (7). Les lncRNAs peuvent également être des précurseurs d'ARNs simple ou double brin qui agissent comme des miRNAs (8). Enfin, les lncRNAs peuvent agir en tant qu' "éponges à miRNAs" de façon à les séquestrer et empêcher leur action. (Adapté de Shi et al., 2013)

## 1) Fonctions des lncRNAs dans le noyau

### a) Formation de sous-structures nucléaires

Il a été montré que les lncRNAs peuvent influencer l'organisation de l'architecture du noyau. En effet, ces lncRNAs sont impliqués dans la formation de sous-structures nucléaires particulières appelés *paraspeckles* (Yamazaki et Hirose, 2015). Les *paraspeckles* sont des assemblages composés de protéines impliquées dans le transport des ARNm, de facteurs d'épissage, d'ARNm en cours de maturation et d'ARNs non codants. Ils sont principalement retrouvés dans les régions interchromosomiques, et leur formation dépend de l'activité de l'ARN polymérase II (Fox et al., 2002). Les *paraspeckles* sont des structures dynamiques ayant un rôle structural : elles régulent la ségrégation des protéines dans le nucléole.



Plusieurs études ont montré que le lncRNA *NEAT1* (*nuclear-enriched autosomal transcript 1*) joue un rôle essentiel dans la formation des *paraspeckles*. En effet, dans les cellules souches embryonnaires, où *NEAT1* n'est pas exprimé, les *paraspeckles* sont absents (Chen et Carmichael, 2009). A l'inverse, dans les cellules différenciées ou en cours de différenciation, l'augmentation de l'expression de *NEAT1* est corrélée à l'augmentation du nombre et de la taille des *paraspeckles* (Sunwoo *et al.*, 2009). De plus, des analyses complémentaires d'imagerie cellulaire dans un modèle d'expression inducible de *NEAT1* ont mis en évidence que la formation des *paraspeckles* a lieu uniquement lorsque *NEAT1* est transcrit (Mao *et al.*, 2011).

Un autre lncRNA appelé *MALAT1/NEAT2* (*metastasis-associated lung adenocarcinoma transcript 1*) a également été associé aux *paraspeckles*. Cependant, contrairement à *NEAT1*, son expression ne semble pas essentielle à la mise en place des *paraspeckles* (Bernard *et al.*, 2010; Nakagawa *et al.*, 2012; Tripathi *et al.*, 2010). Pour autant, *MALAT1/NEAT2* est conservé entre les espèces, ce qui lui suggère un rôle important dans la cellule. En effet, il a été mis en évidence que ce lncRNA est capable de se fixer sur les facteurs d'épissage SF, notamment la protéine SF2/ASF, pour en modifier la phosphorylation. De plus, il a été montré que l'expression de *MALAT1* est de mauvais pronostic dans le cancer. En revanche, des souris déplétées en *MALAT1* sont viables et ne possèdent pas de retard de croissance (Eißmann *et al.*, 2012) : ceci signifie que l'expression d'autres ARNs non codants permet d'assurer les fonctions de *MALAT1* dans la cellule.

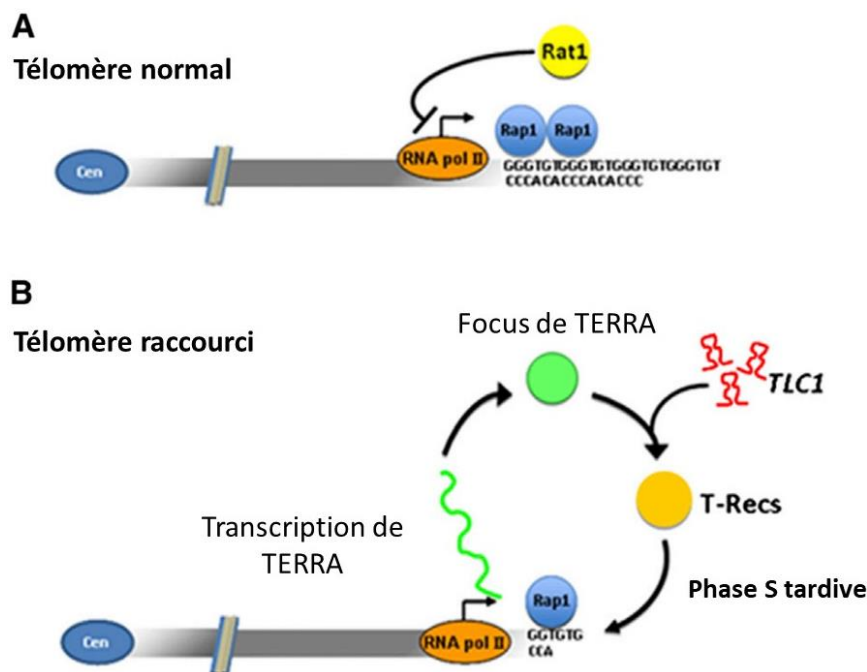
#### b) Stabilité des chromosomes

Toujours dans le compartiment nucléaire, il a été mis en évidence que les lncRNAs jouent un rôle dans la stabilité des chromosomes.

L'extrémité des chromosomes, ou télomère, est une région d'ADN extrêmement répétitive composée d'un motif TTAGGG répété n fois. Ce motif est reconnu par un complexe de protéines appelé *Shelterin* (composé des sous-unités TRF1, TRF2, TIN2, RAP1, TPP1 et POT1) : ce complexe va permettre la formation d'une boucle T au niveau de chaque télomère, protégeant ainsi les chromosomes de l'action des exonucléases (Artandi et DePinho, 2010). En effet, à chaque cycle de réplication de l'ADN, une partie des télomères est éliminée, du fait de l'absence de matrice à répliquer. Lorsque les télomères sont trop courts, la boucle T ne peut plus être formée : les extrémités chromosomiques sont alors reconnues comme des

cassures double brin de l'ADN, susceptibles d'être réséquées par les exonucléases. Une enzyme particulière, la télomérase, reconnaît ces télomères raccourcis et y ajoute une séquence nucléotidique répétée, permettant ainsi d'allonger les chromosomes et de les protéger de la dégradation (Biffi *et al.*, 2012; Porro *et al.*, 2014).

La télomérase est une enzyme composée de plusieurs sous-unités : la protéine TERT, qui réalise la transcription inverse des séquences télomériques ; et l'ARN non codant *TERC* (*telomerase RNA component*), qui sert de matrice à la télomérase. Une fois associée au télomère, la télomérase va agir en ajoutant des séquences répétées aux extrémités télomériques. Ces séquences seront reconnues par les protéines du complexe *Shelterin*, permettant ainsi la formation de la boucle T et la protection des chromosomes.



**Figure 19. Rôle des lncRNAs dans la stabilité chromosomique : exemple du lncRNA *TERRA*.**

**A.** Au niveau d'un télomère normal, l'expression de *TERRA* est réprimée par l'action combinée des facteurs associés à *Rap1* (complexe *Shelterin*) et de l'exonucléase *Rat1*. **B.** Au niveau d'un télomère raccourci, l'expression de *TERRA* est induite, menant à l'accumulation d'ARNs *TERRA* qui vont former un focus nucléaire. Pendant la phase S du cycle cellulaire, le focus de *TERRA* agit en interaction avec l'ARN *TLC1* (ou *TERC*) pour favoriser le recrutement de la télomérase grâce aux *T-recs* (telomerase recruitment clusters). (Adapté de Cusanelli *et al.*, 2013).

Dans ce phénomène de protection des extrémités chromosomiques, l'implication du lncRNA *TERRA* (*telomeric repeat containing RNA*) a été décrite (**Figure 19**) (Cusanelli *et al.*, 2013). Cet ARN non codant, de longueur variable (100 à 9000 nt), rarement polyadénylé (7% des cas) et localisé dans le noyau, est transcrit par l'ARN polymérase II à partir d'une région

subtélomérique riche en îlots CpG en direction de l'extrémité chromosomique et ce jusqu'à la séquence télomérique répétée, d'où la variabilité de sa longueur puisqu'elle dépend de la longueur des télomères (Azzalin *et al.*, 2007; Schoeftner et Blasco, 2008). Ainsi, lorsqu'il est transcrit, *TERRA* s'associe au télomère de son chromosome d'origine. Il a longtemps été admis que *TERRA* était en compétition avec la télomérase pour interagir avec les télomères (Artandi et DePinho, 2010; Feuerhahn *et al.*, 2010). Récemment, il a été montré que *TERRA* pouvait s'associer à la télomérase (TERT) ainsi qu'à l'ARN *TERC* (également appelé *TLC1*) (Cusanelli *et al.*, 2013; Pu *et al.*, 2015). De plus, l'association *TERRA*/télomère permettrait une mise en conformation de l'extrémité chromosomique permettant l'activité de la télomérase : ceci signifie que *TERRA* pourrait avoir un rôle intermédiaire de "scaffold", et que son association à la télomérase favoriserait son activité enzymatique et de ce fait la protection des extrémités chromosomiques.

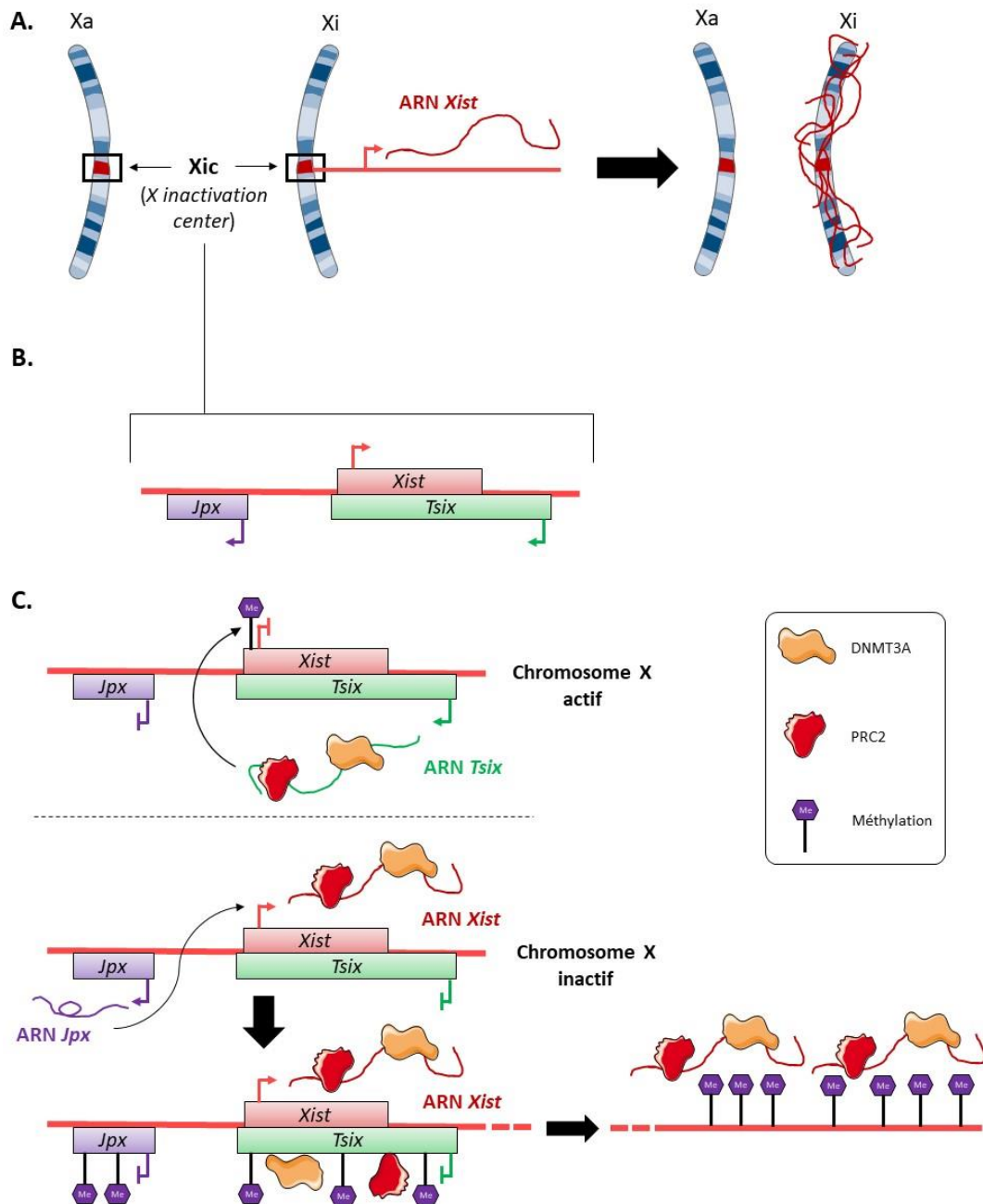
### c) Régulation de l'expression génique

De nombreuses études ont montré l'implication des lncRNAs dans le contrôle de l'expression des gènes. Dans la plupart des cas, il s'agit d'altérations épigénétiques (voir **paragraphe II-C-2)b**), mais des modulations de l'activité du complexe d'initiation de la transcription ont également été décrites.

#### *Inactivation du chromosome X*

Au cours de l'embryogenèse, de nombreux mécanismes épigénétiques sont mis en place pour permettre le bon développement de l'embryon. Parmi les plus notables, l'inactivation du chromosome X chez la femme constitue un phénomène très étudié et parmi les plus décrits (Avner et Heard, 2001).

Chez les mammifères, les femelles possèdent 2 chromosomes X, tandis que les mâles ont un seul chromosome X et un chromosome Y. En plus d'être à la base de la détermination sexuelle, cette différence pose un problème : du fait de la présence de 2 chromosomes X, un gène du chromosome X devrait être deux fois plus exprimé chez la femelle que chez le mâle. Ce déséquilibre pourrait potentiellement être à l'origine de perturbations de processus cellulaires. Pour éviter cela, il existe un phénomène de compensation de dosage qui consiste en l'inactivation d'un des deux chromosomes X chez la femelle. Aucun des gènes du chromosome X inactivé ne pourra alors être exprimé.



### Figure 20. Rôle des lncRNAs dans l'inactivation du chromosome X.

**A.** Modèle général du principe de l'inactivation d'un des deux chromosomes X chez la femme (Xa : chromosome X actif ; Xi : chromosome X inactif). **B.** Composition du centre d'inactivation du chromosome X (Xic). Les gènes présents dans cette région sont responsables de l'expression de plusieurs lncRNAs (*Xist*, *Tsix* et *Jpx*), eux-mêmes impliqués dans l'inactivation du chromosome X chez les mammifères. **C.** A partir du chromosome X actif, le gène *Tsix* est exprimé et le lncRNA correspondant recrute des partenaires comme DNMT3A et le complexe PRC2. Ces éléments sont responsables de la méthylation du promoteur de *Xist* sur cet allèle, et par conséquent du blocage de l'expression de ce gène. Le chromosome reste donc actif dans la cellule. Au niveau du chromosome inactif, l'expression de l'ARN non codant *Jpx* favorise l'expression de *Xist*, qui va alors recruter DNMT3A et PRC2 via son motif RepA et induire l'inactivation du chromosome. La méthylation se réalisera de proche en proche tout au long du chromosome X. (Adapté de Lee, 2012).

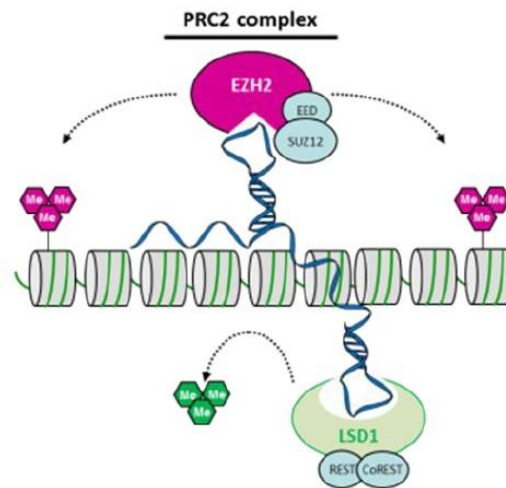
L'inactivation du chromosome X est le résultat de l'expression différentielle de trois lncRNAs : *Xist*, *Tsix* et *Jpx*. Le lncRNA *Xist* est l'un des premiers à avoir été identifié chez les mammifères (Brockdorff *et al.*; Brown *et al.*, 1992). D'une taille comprise entre 17 et 20 kb et régulé par le lncRNA *Tsix* (Lee *et al.*, 1999), son rôle principal a été décrit dans l'inactivation de l'un des deux chromosomes X chez la femme. Les deux lncRNAs *Xist* et *Tsix* sont transcrits à partir du même centre de régulation appelé centre d'inactivation du chromosome X (*Xic*, *X inactivation center*) (**Figure 20.A-B**), sur des brins opposés et en antisens. Lorsque *Tsix* est exprimé, il recrute des éléments capables de méthylater l'ADN comme la méthyltransférase DNMT3A ou le complexe de remodelage de la chromatine PRC2 : ceci entraînera la méthylation de la région promotrice du gène *Xist*, et donc la répression de son expression. Ainsi, le chromosome où *Tsix* est exprimé sera actif (**Figure 20.C**). A l'inverse, sur le second chromosome X, l'expression de *Jpx* active l'expression de *Xist* en *trans*. Une fois transcrit, c'est cette fois-ci *Xist* qui recrutera DNMT3A et PRC2 de façon à réaliser la méthylation qui sera responsable de l'inactivation du chromosome X (Brockdorff, 2013).

Des modifications épigénétiques de même nature ont été retrouvées lors de la mise en place de l'empreinte génomique (voir **paragraphe V-A-2**).

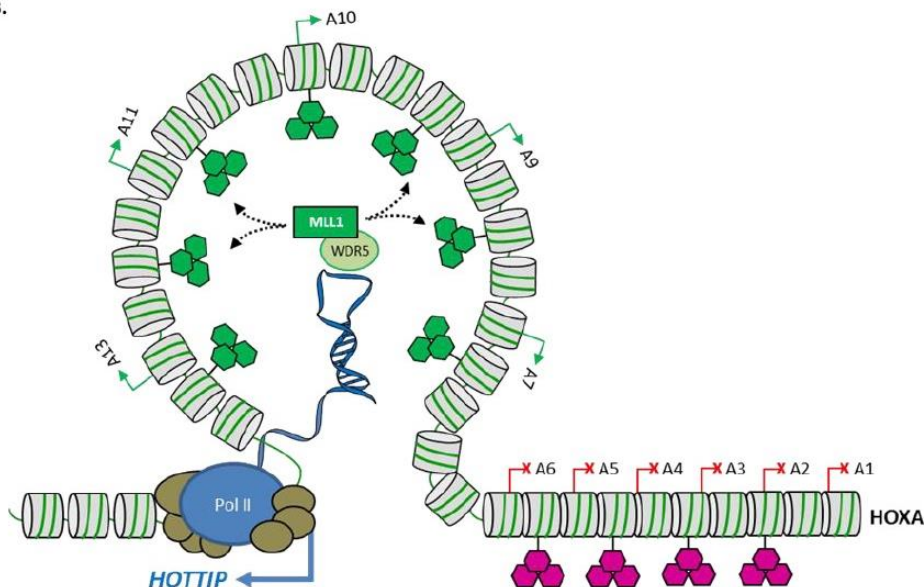
#### Régulation de l'expression des gènes HOX

Les lncRNAs peuvent également contrôler l'expression génique grâce à des modifications épigénétiques réalisées en *trans*. Parmi ceux impliqués dans ce mécanisme, le premier à avoir été identifié est *HOTAIR* (*HOX transcript antisense RNA*). Le lncRNA *HOTAIR* est transcrit à partir du locus HOX C situé sur le chromosome 12. Lorsque son ARN est produit, *HOTAIR* est capable d'interagir avec EZH2, la sous-unité catalytique du complexe PRC2, de façon à triméthylater la lysine 27 de l'histone H3 sur le locus HOX D. Cette modification post-traductionnelle constituant une marque répressive de la transcription, les gènes situés au niveau du locus HOX D ne seront ainsi pas exprimés (Bergmann et Spector, 2014; Brockdorff, 2013) (**Figure 21.A**). *HOTAIR* peut également recruter d'autres complexes de remodelage de la chromatine, comme le complexe REST. Par son interaction avec la sous-unité LSD1, qui est une déméthylase de la lysine 4 de l'histone H3 (marque activatrice de l'expression génique), *HOTAIR* pourra ainsi entériner la répression de l'expression du locus HOX D (Tsai *et al.*, 2010).

A.



B.



**Figure 21. Rôle des lncRNAs *HOTAIR* et *HOTTIP* dans la régulation de l'expression génique.**

**A.** Le lncRNA *HOTAIR*, transcrit à partir du locus *HOX C*, s'associe avec la sous-unité catalytique *EZH2* du complexe *PRC2* de façon à recruter ce complexe au niveau du locus *HOX D*. *HOTAIR* interagit également avec le complexe *LSD1/CoREST*. De cette façon, *HOTAIR* induit la triméthylation de la lysine 27 de l'histone H3, qui est une marque répressive de l'expression génique. **B.** Le lncRNA *HOTTIP*, transcrit par l'ARN polymérase II, interagit avec la protéine *MLL1* par l'intermédiaire de *WRD5* au niveau du locus *HOX A*. *MLL1* est une méthyltransférase de la lysine 4 de l'histone H3 : il s'agit d'une marque activatrice de l'expression génique. En vert : marques activatrices de l'expression génique ; en rose : marques répressives de l'expression génique. (Issu de Angrand et al., 2015).

De façon complémentaire, d'autres études ont mis en évidence un rôle des lncRNAs dans la promotion de l'expression génique. C'est notamment le cas du lncRNA *HOTTIP* (*HOXA transcript at the distal tip*), qui est exprimé à partir du locus *HOX A*. *HOTTIP* est capable d'interagir avec la protéine *MLL* (*Mixed-lineage leukemia*) via son motif répété *WD* (*WDR5*)

(Bergmann et Spector, 2014; Kanhere et Jenner, 2012). MLL est une méthyltransférase de la lysine 4 de l'histone H3, qui est une marque activatrice de l'expression génique. De plus, des expériences de capture de conformation de la chromatine (5C, *chromosome conformation capture-carbon copy*) ont mis en évidence que par son interaction avec MLL, *HOTTIP* permet la mise en place d'une conformation chromatiniennne favorable à l'expression des gènes situés à distance de l'unité de transcription *HOTTIP* (Wang *et al.*, 2011) (**Figure 21.B**). Cette conformation de la chromatine permet ainsi à MLL associée à *HOTTIP* de méthyle l'histone H3 : les gènes présents dans la boucle formée, notamment le locus *HOX A*, seront ainsi exprimés.

#### *LncRNAs et complexe d'initiation de la transcription*

Certains ARNs enhancers (eRNAs) ne sont ni épissés, ni polyadénylés : si tel est le cas, ils seront le plus souvent retrouvés empaquetés dans les exosomes (Batagov *et al.*, 2011; Pefanis *et al.*, 2015). Dans d'autres cas, les eRNAs peuvent être épissés et polyadénylés : il s'agit alors d'elncRNAs. Ces ARNs non codants vont agir positivement sur l'expression de gènes codants situés proches de leur locus d'expression. Dans les cellules cancéreuses mammaires, et plus particulièrement dans la lignée MCF-7, l'expression de plusieurs eRNAs comme *TFF1*, *FOXC12* ou *CA12* est activée par le 17- $\beta$ -œstradiol (Li *et al.*, 2013). Ces eRNAs vont eux-mêmes réguler en *cis* l'expression de gènes situés plus loin sur le même chromosome, en favorisant la formation d'une boucle d'interaction entre les *enhancers* d'expression et les promoteurs de ces gènes. Parmi les gènes cibles de ces eRNAs, le gène de la cohésine a été identifié. Une autre étude a montré que l'eRNA transcrit à partir du locus *MyoD1* favorise le recrutement de l'ARN polymérase II, de façon à activer l'expression des gènes de cette zone (Mousavi *et al.*, 2013).

Dans certains cas, la transcription d'un lncRNA peut empêcher celle d'un gène codant situé en aval. C'est notamment le cas du gène codant pour la déhydrofolate réductase (*DHFR*). En effet, ce gène est caractérisé par 2 promoteurs : un promoteur dit principal, qui permet l'expression du gène, et un promoteur dit secondaire, situé en amont. Dans les cellules qui ne cyclent pas, un transcrit court et non codant est exprimé à partir de ce promoteur secondaire. L'ARN non codant produit serait capable de se lier au facteur de transcription TFIIB et ainsi empêcher l'activation du promoteur principal. Pour autant, cet effet est labile, puisqu'une augmentation de la concentration en sérum dans le milieu de culture cellulaire entraîne une

diminution de l'expression de l'ARN non codant pour favoriser l'expression de la DHFR (Martianov *et al.*, 2007).

### Formation de triplex ARN/ADN/ADN

Les lncRNAs sont également capables de s'associer à la double hélice d'ADN, formant ainsi une structure tripartite ARN/ADN/ADN. La formation de ce triplex nécessite un appariement de type Hoogsteen, qui associe une uridine avec une adénosine. La formation de ce triplex oligonucléotidique pourrait être permise par la présence de protéines au niveau de l'ARN, comme c'est le cas pour le lncRNA *Xist*. En effet, lorsque *Xist* est exprimé, il se fixe sur son chromosome d'origine de façon à l'inactiver (voir précédemment). Pour ce faire, *Xist* doit d'abord interagir avec la protéine YY1, qui est un facteur de transcription en doigt de zinc (Jeon et Lee, 2011). En se fixant à la fois sur *Xist* et sur le chromosome X, YY1 permet la formation du triplex et par conséquent l'inactivation du chromosome.

Il existe d'autres cas où l'association ARN/protéine empêche la formation du triplex : l'ARN non codant *Jpx* peut par exemple interagir avec la protéine CTCF (*CCCTC-binding factor*), ce qui l'empêche d'activer la transcription de *Xist* (Sun *et al.*, 2013). Dans tous les cas, le processus de formation ainsi que le rôle de ces triplex oligonucléotidiques sont très controversés, et nécessitent des études supplémentaires pour mieux les caractériser.

## 2) Fonctions des lncRNAs dans le cytoplasme

### a) Précurseurs de petits ARNs

Lorsqu'ils sont présents dans le cytoplasme, les lncRNAs sont reconnus *via* leurs structures secondaires par des endonucléases spécifiques de type Dicer. Ils seront alors clivés, ce qui générera de petits ARNs non codants de type siRNAs, miRNAs ou encore ARNs de transfert dont les rôles et fonctions seront détaillés dans le chapitre suivant (voir **paragraphe IV**). De cette façon, les lncRNAs peuvent être précurseurs de petits ARNs, comme c'est notamment le cas de *linc-MD1*, qui génère 2 miRNAs miR-206 et miR-133b caractérisés dans les cellules musculaires différenciées et dans le développement de la dystrophie musculaire (Cesana *et al.*, 2011).

De la même façon, les lncRNAs peuvent être des précurseurs de siRNAs. Les lncRNAs *Xist* et *Tsix* vus précédemment sont par exemple capables de s'associer pour former un duplex, qui sera par la suite exporté dans le cytoplasme. Ce duplex est alors reconnu par l'enzyme



Dicer, qui générera par clivage un siRNA fonctionnel dans la cellule. Il a été montré que ce siRNA serait nécessaire à l'inactivation du chromosome X chez la femme (Ogawa *et al.*, 2008).

Enfin, un autre exemple est celui du lncRNA *MALAT1*, dont l'extrémité 3' est clivée par les RNases P et Z pour former un ARN de transfert. Les deux ARNs ainsi produits seront relocalisés vers le noyau, puisque leur expression est localisée au niveau des *paraspeckles* (Wilusz *et al.*, 2008).

#### b) Eponges à miRNAs

Un des mécanismes d'action les plus décrits des lncRNAs est leur hybridation avec des miRNAs, dans le but de les séquestrer et d'empêcher leur action : on parle d'éponges à miRNAs, ou ceRNAs (*competitive endogenous RNAs*). De cette façon, il a été montré que le lncRNA *RoR* (*regulator of reprogramming*) est impliqué dans la reprogrammation des cellules souches (Loewer *et al.*, 2010). Parmi les mécanismes d'action qui lui ont été associés, le lncRNA *RoR* est capable de fixer le miR-145. Ce miR-145 réprime l'expression de gènes responsables de la reprogrammation et du maintien des cellules souches comme *Sox2*, *Oct3/4* et *Nanog*. Ainsi, en interagissant avec le miR-145, *RoR* va inhiber son activité répressive et favoriser l'apparition et le maintien des cellules souches.

Un autre exemple est celui du lncRNA *PNUTS* (*phosphatase 1 nuclear targeting subunit*), qui est produit à partir d'un ARNm épissé. *PNUTS* est capable de fixer le miR-205 dans le cancer du sein. Cette interaction favorise l'expression de *ZEB1*, facteur impliqué dans la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) : de cette façon, l'inactivation du miR-205 par le lncRNA *PNUTS* va favoriser la progression tumorale, et plus particulièrement les capacités invasives des cellules cancéreuses mammaires (Grelet *et al.*, 2017).

Des études plus récentes ont montré qu'il existe des éponges à miRNAs plus stables : ce sont les *circular RNAs* (circRNAs). A l'inverse des ARNs linéaires, qui sont coiffés en 5' et polyadénylés en 3', les circRNAs sont présents dans la cellule sous une forme circulaire où les extrémités 5' et 3' sont liées ensemble, ce qui les protège de la dégradation par les RNases (Chen et Huang, 2018). Les circRNAs sont divisés en 2 grandes catégories, les ecircRNAs et les ciRNAs, qui sont toutes deux issues de l'épissage des exons. Les ecircRNAs peuvent être constitués d'exons et d'introns, alors que les ciRNAs ne contiennent que des introns. En effet, la formation des ecircRNAs est due à l'absence de queue polyA sur l'ARNm, alors que la formation des ciRNAs se fait grâce à la présence d'un site consensus en 5' du site d'épissage

(Zhang *et al.*, 2018b). De plus, les ecircRNAs exercent leur rôle d'éponge principalement dans le cytoplasme, alors que les ciRNAs sont plutôt nucléaires et modulent l'expression de leur propre gène. Par exemple, le ciRNA *Ankrd52* régule positivement l'expression du gène auquel il est associé en se fixant sur le complexe d'élongation de la transcription *via* l'ARN polymérase II (Zhang *et al.*, 2013b). A l'inverse, et de la même façon que les ceRNAs, les circRNAs interagissent avec des miRNAs pour empêcher leur activité dans la cellule, comme le circRNA *CDR1as* qui fixe le miR-7 pour l'inactiver (Hansen *et al.*, 2013; Memczak *et al.*, 2013).

D'autres catégories d'éponges à miRNAs ont été décrites dans la littérature, comme *PTENP1* qui est produit à partir d'un pseudogène situé en position 9p13.3. *PTENP1* présente une forte homologie avec l'ARNm du gène suppresseur de tumeur *PTEN* : ces deux ARNs sont ainsi en compétition pour les mêmes patterns d'interaction avec les miRNAs (miR-17, miR-21, miR-214, miR-19 et miR-26), puisque des sites de fixation sont présents sur les deux ARNs (Poliseno *et al.*, 2010). De cette façon, il a été mis en évidence une corrélation des expressions de *PTEN* et *PTENP1* dans plusieurs modèles tumoraux : une faible expression du pseudogène permet de restaurer l'expression de l'ARNm *PTEN* dans les tissus. De plus, le lncRNA *PTENP1*, par sa fonction d'éponge à miRNAs, possède un rôle suppresseur de tumeur qui complète la régulation exercée par *PTEN* seul (Poliseno *et al.*, 2010).

Un autre mécanisme d'action des lncRNAs pour inactiver les miRNAs est le masquage de leur site de fixation en interagissant avec l'ARNm ciblé. Ce mode d'action a été principalement décrit pour les lncRNAs transcrits en orientation antisens de gènes codants, comme le lncRNA *BACE-AS* (*Alzheimer-associated  $\beta$ -secretase 1*). En effet, ce lncRNA est capable de former un duplex ARN double brin en s'associant avec l'exon 6 de l'ARNm *BACE*. La formation de ce duplex permet ainsi de masquer le site de fixation du miR-485-5p présent sur l'ARNm *BACE*, et par conséquent la traduction de cet ARN et l'augmentation du niveau protéique de *BACE* dans la cellule. La protéine *BACE* est une enzyme impliquée dans le clivage de la protéine pré-amyloïde, qui permet la synthèse de peptide A $\beta$ 1-42. L'expression du lncRNA *BACE-AS* favorise donc la synthèse de ce peptide, qui va s'agréger en plaques amyloïdes dans le cerveau. Ainsi, l'expression du lncRNA *BACE-AS* est responsable de la formation de plaques amyloïdes caractéristiques de la maladie d'Alzheimer (Faghihi *et al.*, 2008, 2010).

### c) Interaction lncRNA/protéine

Une autre des principales fonctions des lncRNAs est leur capacité d'interagir physiquement avec des protéines. Nous avons déjà évoqué l'interaction des lncRNAs avec les complexes impliqués dans la transcription, comme le ciRNA *Ankrd52* qui régule positivement l'expression de son gène en fixant l'ARN polymérase II (Zhang et al., 2013b), mais aussi l'ARN non codant *Jpx* qui interagit avec CTCF pour empêcher la transcription de *Xist* (Sun et al., 2013). Dans la grande majorité des cas, un lncRNA interagit avec une protéine pour en moduler la fonction. Notamment, le lncRNA *gadd7*, induit par les rayons UVs, est capable de réguler la stabilité des ARNm cellulaires en se fixant sur la protéine TDP43 (*TAR DNA-binding protein 43*) (Liu et al., 2012) : en effet, cette protéine est impliquée dans l'épissage alternatif des ARNm, mais aussi dans le contrôle de leur stabilité. TDP43 joue un rôle dans le saut de l'exon 9 de l'ARNm de CFTR, ce qui se traduit par un phénotype de fibrose kystique. L'inactivation de TDP43 par *gadd7* permet donc de restaurer une protéine CFTR fonctionnelle (Ayala et al., 2006). TDP43 est également ciblée par *MALAT1*, qui va la séquestrer dans le noyau. Cibler TDP43 ou favoriser son interaction avec *gadd7* ou *MALAT1* pourrait donc avoir un intérêt thérapeutique chez les patients atteints de mucoviscidose.

Il existe d'autres cas où l'interaction lncRNA/protéine va favoriser l'action protéique. L'exemple du lncRNA *SRP* (*signal recognition particle*) illustre ce cas puisqu'il est capable de s'associer avec 6 protéines de façon à former un complexe ribonucléoprotéique (RNP) nécessaire à la mise en conformation des protéines lors de leur synthèse. Pour ce faire, *SRP* doit reconnaître le peptide naissant dans le cytoplasme : son inclusion dans le complexe RNP permet au peptide d'être conduit au réticulum endoplasmique, où sa maturation sera poursuivie (Grotwinkel et al., 2014). Un autre exemple est celui du complexe PRC2, qui est capable d'interagir avec plusieurs lncRNAs. Cette interaction permettra de cibler PRC2 au niveau de certains gènes de façon à réguler leur expression par remodelage de la chromatine (**Figure 21.A**).

### C- Longs ARNs non codants et glande mammaire

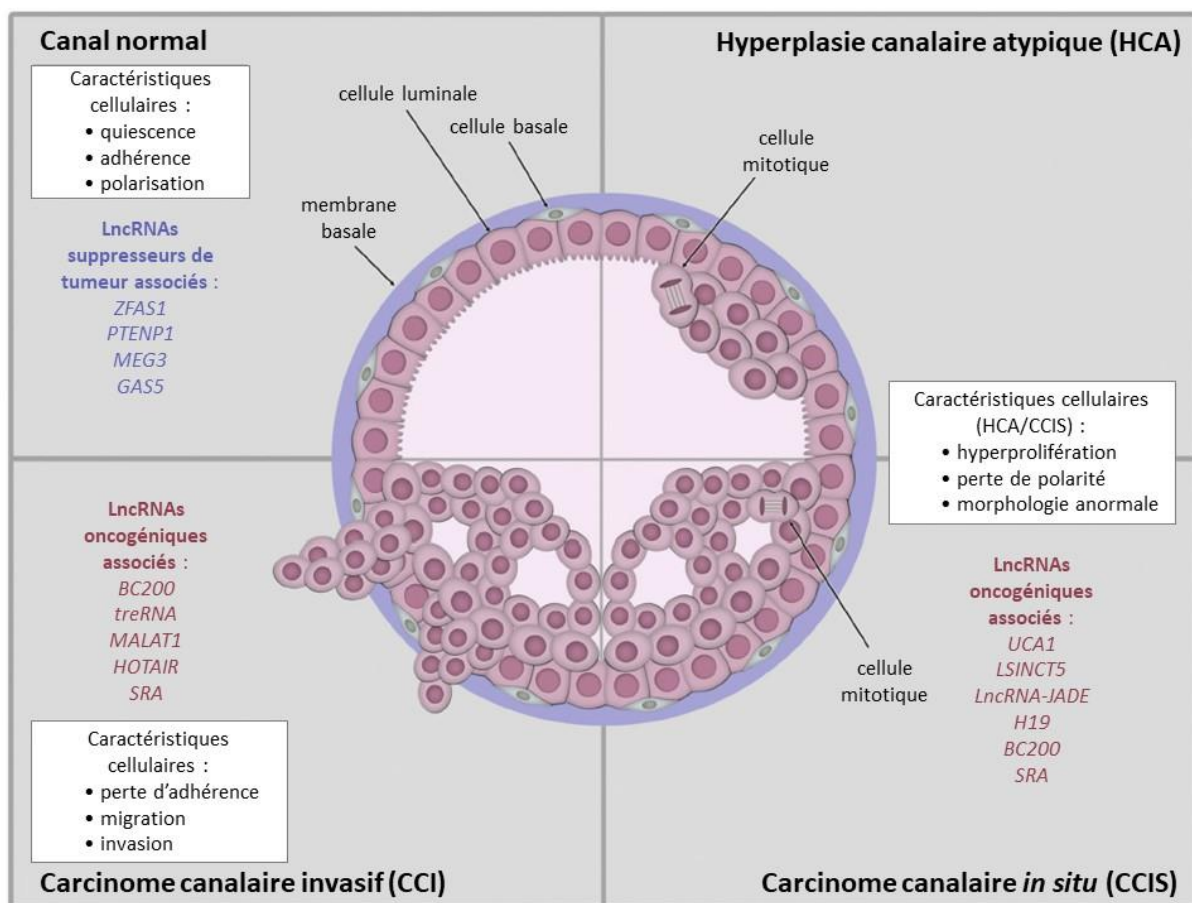
---

Comme nous l'avons exposé précédemment (voir **paragraphe I**), la glande mammaire est un organe en constante évolution chez la femme. Selon le rythme des grossesses, les différentes structures (alvéolaires, tubulaires) se développent et atteignent leur niveau de

différenciation total au moment de la lactation. Lorsque le sevrage est terminé, la glande mammaire involue : la modulation de ces potentiels de croissance et de différenciation est notamment permise par la présence d'un pool de cellules souches présent dans la glande mammaire (Visvader et Stingl, 2014).

Des études récentes de micro-array de la glande mammaire murine ont mis en évidence l'expression d'ARNs non codants (Shore et Rosen, 2014). Cette expression a également été retrouvée dans les tissus néoplasiques. Bien qu'ils ne soient pas envisagés comme des cibles de première intention, les ARNs non codants semblent toutefois avoir un rôle important dans la formation et la cancérisation du tissu mammaire.

### 1) LncRNAs et développement de la glande mammaire



**Figure 22. Rôle des lncRNAs dans la glande mammaire normale et cancéreuse.**

La figure décrit un canal mammaire divisé en 4 quadrants, représentant chacun une étape de la progression tumorale mammaire, du stade normal au carcinome canalaire invasif en passant par l'hyperplasie et le carcinome canalaire in situ. Les caractéristiques cellulaires et les lncRNAs putativement associés à chaque étape sont indiqués. (Adapté de Shore et Rosen, 2014).

Des études ont mis en évidence le rôle des lncRNAs dans le développement du sein, notamment dans la croissance et la différenciation des tissus mammaires pendant la grossesse (**Figure 22**). Ainsi, le lncRNA *SRA1* (*steroid receptor RNA activator 1*) favorise la prolifération cellulaire, le développement du réseau de canaux galactophores et la différenciation des cellules alvéolaires (Lanz *et al.*, 1999, 2003). L'implication de *SRA1* a également été montrée dans la différenciation d'autres tissus (Caretta *et al.*, 2006; Xu *et al.*, 2010a). Concernant la différenciation des alvéoles mammaires, deux lncRNAs ont été plus particulièrement étudiés. Le premier, *PINC* (*pregnancy-induced non-coding RNA*), est surexprimé lors de la grossesse dans les cellules alvéolaires (Hansji *et al.*, 2014). En revanche, son expression diminue à la naissance, ce qui permettra la différenciation des cellules épithéliales et la production de lait (Ginger *et al.*, 2001; Jiang *et al.*, 2016). Plus tard, lorsque les tissus mammaires involueront, l'expression de *PINC* ré-augmentera pour maintenir les cellules alvéolaires dans un état indifférencié et donc empêcher la lactation. Le deuxième lncRNA, *Zfas1*, a un mode d'action similaire à celui de *PINC* puisqu'il est exprimé dans les cellules alvéolaires lors de la grossesse et de l'involution, mais il est réprimé pendant la lactation (Askarian-Amiri *et al.*, 2011).

Notre équipe a également mis en évidence que le lncRNA *H19* participe à la prolifération des cellules alvéolaires mammaires pendant la grossesse (Adriaenssens *et al.*, 1999). L'implication du lncRNA *H19* dans la glande mammaire sera décrite ultérieurement dans ce manuscrit (**paragraphe V**).

## 2) [LncRNAs et cancer du sein](#)

Parmi les différents sous-types de cancer du sein décrits (voir **paragraphe II-E-1**), plusieurs études ont relevé une expression anormale de certains lncRNAs (**Figure 22**). Selon le cas, un rôle oncogène ou suppresseur de tumeur leur a été attribué. Nous allons décrire quelques exemples de ces lncRNAs dans le cas du cancer du sein.

### a) LncRNAs suppresseurs de tumeur

Certains lncRNAs sont dits suppresseurs de tumeur lorsque dans les tumeurs, leur expression est diminuée ou leur rôle est anti-tumoral, protégeant ainsi la glande mammaire de la tumorigenèse. Dans le cancer du sein, le lncRNA *MEG3* (*maternally expressed gene 3*) en est un bon exemple, puisqu'il est réprimé dans les tumeurs mammaires. De plus, une surexpression ectopique de *MEG3* diminue la prolifération cellulaire, l'angiogenèse et

augmente l'apoptose des cellules cancéreuses mammaires *via* l'activation de la protéine p53, laissant penser que *MEG3* a bien un rôle suppresseur de tumeur (Gordon *et al.*, 2010; Zhou *et al.*, 2007). De la même manière, l'expression du lncRNA *GAS5* (*growth arrest-specific transcript 5*) est diminuée dans le cancer du sein. *GAS5* interagit avec les récepteurs aux glucocorticoïdes *via* deux sites de fixation en forme de tige-boucle, de façon à bloquer l'interaction de ces récepteurs avec leurs cibles et ainsi empêcher leur activation (Kino *et al.*, 2010). Les récepteurs aux glucocorticoïdes sont impliqués dans la régulation de la croissance cellulaire, de la survie et du métabolisme. Ainsi, lorsque *GAS5* est surexprimé dans des cellules cancéreuses mammaires, leur prolifération diminue et une augmentation de l'apoptose est observée (Mourtada-Maarabouni *et al.*, 2010).

Nous avons déjà cité l'exemple du lncRNA *Zfas1* pour son rôle dans le développement de la glande mammaire. En effet, son action contre la prolifération et la différenciation cellulaire lui confère un rôle suppresseur de tumeur (Askarian-Amiri *et al.*, 2011). Une diminution de l'expression de *Zfas1* a également été décrite dans les carcinomes ductaux, ce qui confirme son rôle anti-tumoral.

#### b) LncRNAs oncogènes

A l'inverse d'un lncRNA suppresseur de tumeur, un lncRNA sera considéré comme oncogène s'il favorise la tumorigenèse et/ou la progression tumorale. De façon générale, les lncRNAs oncogènes sont plus souvent décrits que les précédents car ils induisent des modifications de comportements cellulaires facilement détectables, comme l'augmentation de la prolifération, la migration et l'invasion cellulaire. La plupart des lncRNAs oncogènes sont associés aux carcinomes *in situ* et invasifs (**Figure 22**).

De cette façon, l'expression du lncRNA *UCA1* (*urothelial carcinoma-associated 1*) est augmentée dans plusieurs cancers dont le cancer du sein. *UCA1* interagit avec la protéine hnRNP pour l'inactiver et ainsi diminuer en aval l'expression de la protéine p27, ce qui favorisera la prolifération cellulaire. En revanche, des cellules invalidées pour *UCA1* injectées en souris immunodéficientes prolifèrent moins et produisent des tumeurs plus petites (Huang *et al.*, 2014; Wang *et al.*, 2006). En complément, l'expression d'un lncRNA présentant une forte similitude avec *UCA1* a également été mise en évidence dans la résistance des carcinomes de cellules squameuses à la doxorubicine (Tsang *et al.*, 2007). Bien que ce mécanisme de résistance n'ait pas encore été décrit dans le cancer du sein, il reste cependant envisageable.

Un autre exemple est celui du lncRNA *HOTAIR*, dont la surexpression a été montrée dans les cancers du côlon, du foie et du sein (Geng *et al.*, 2011; Gupta *et al.*, 2010; Kogo *et al.*, 2011). Grâce à son association avec le complexe PRC2, *HOTAIR* entraîne des modifications des patterns d'expression génique, permettant ainsi la transformation de cellules normales en cellules cancéreuses (Gupta *et al.*, 2010; Song *et al.*, 2019; Zhang *et al.*, 2015). De la même façon, certains lncRNAs peuvent jouer un rôle oncogénique en altérant l'intégrité du noyau cellulaire : c'est notamment le cas de *MALAT1* dans les cancers du poumon et du sein, ou de *LINSCT5* (*long stress-induced non-coding transcript 5*) dans les cancers de l'ovaire et du sein. Ces deux lncRNAs sont impliqués dans la formation et le maintien des *paraspeckles* (voir **paragraphe III-B-1a**). Or, il a été montré que des cellules cancéreuses mammaires invalidées pour *LINSCT5* prolifèrent moins (Silva *et al.*, 2011). De façon complémentaire, lorsque *MALAT1* est réprimé, un défaut d'épissage au niveau de certains transcrits est observé (Lin *et al.*, 2011), associé à l'augmentation de l'expression des gènes voisins du locus de *MALAT1* (Zhang *et al.*, 2012).

D'autres lncRNAs oncogènes peuvent agir en favorisant la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT) des cellules, activant ainsi les mécanismes de migration et d'invasion permettant la dissémination métastatique. Parmi ceux-ci, on retrouve *treRNA* (*translational regulatory RNA*) qui active l'expression du gène *Snail*, un régulateur de l'EMT (Ørom *et al.*, 2010). *treRNA* est également capable de réprimer l'expression de l'E-cadhérine ainsi que celle d'autres marqueurs épithéliaux, permettant d'augmenter le taux de métastases pulmonaires après injection en souris immunodéficientes (Gumireddy *et al.*, 2013).

Dans les cancers mammaires, notre équipe a montré que le lncRNA *H19* joue un rôle oncogénique. Notamment, nous avons montré que *H19* favorise la transition G1/S du cycle cellulaire pour permettre la prolifération des cellules cancéreuses mammaires (Berteaux *et al.*, 2005). Le rôle du lncRNA *H19* dans la tumorigenèse et la progression tumorale sera décrit ultérieurement dans ce manuscrit (voir **paragraphe V-D**).

Enfin, certains lncRNAs sont impliqués dans la résistance des tumeurs aux thérapies anti-cancéreuses conventionnelles. C'est notamment le cas du lncRNA *ARA* (*adriamycin resistance associated*), dont l'expression a été associée aux tumeurs traitées à la doxorubicine (Jiang *et al.*, 2014). Ainsi, lorsqu'il est exprimé, *ARA* favorise la prolifération et la migration des cellules, de façon à augmenter les capacités métastatiques des cellules tumorales pour

échapper aux traitements.

**Les lncRNAs jouent ainsi un rôle capital dans la biologie normale et la physiopathologie, puisqu'ils sont impliqués dans le développement de la glande mammaire, mais aussi dans sa cancérisation et dans les phénomènes d'échappement tumoral aux traitements. Il s'avère donc nécessaire d'identifier l'expression de ces lncRNAs dans les cellules cancéreuses mais aussi les différents mécanismes qu'ils mettent en place pour favoriser la progression tumorale et la dissémination métastatique, de façon à définir de nouvelles stratégies thérapeutiques.**



## IV – Les petits ARNs non codants

On désigne par “petits ARNs non codants” les ARNs non codants de taille inférieure à 200 nt. De la même façon que pour les longs ARNs non codants, les petits ARNs non codants sont divisés en plusieurs catégories. Parmi celles-ci, on retrouve les ARNs de transfert (tRNAs), les microRNAs (miRNAs), les *small interfering* ARNs (siRNAs) ou encore les ARNs se fixant sur les protéines PIWI (piRNAs).

Ce chapitre sera principalement consacré à la découverte, la synthèse et l'étude des mécanismes d'action des miRNAs dans la cellule.

### A- Historique et généralités sur les microRNAs

---

#### 1) Découverte des miRNAs

Comme nous l'avons vu dans le paragraphe III-1-1), c'est à la fin des années 1990-début des années 2000 que les chercheurs se sont intéressés de plus près aux séquences non codantes du génome. Le premier miRNA a été découvert en 1993 chez le ver nématode *Caenorhabditis elegans* (Lee *et al.*, 1993). Ce miRNA, produit à partir du gène *lin-4*, interagit *via* une complémentarité de séquences avec l'UTR 3' de l'ARNm de *lin-14* et inhibe ainsi sa traduction. Ceci entraîne donc une inhibition de l'expression du gène *lin-14*, et par conséquent assure le développement normal de la larve de nématode. En effet, une diminution de l'expression de *lin-14* à la fin de la première étape du développement de la larve permet d'initier la seconde étape de développement (Olsen et Ambros, 1999; Wightman *et al.*, 1993).

Depuis cette découverte, le nombre de miRNAs identifiés n'a cessé d'augmenter. En 2018, la base de données miRBase répertoriait des séquences de 48860 miRNAs matures dans 271 organismes, dont 2654 chez l'homme, 469 chez *Drosophila melanogaster* et 437 chez *Caenorhabditis elegans* (Kozomara *et al.*, 2019).

#### 2) Nomenclature des miRNAs

Depuis leur découverte, les miRNAs étaient nommés selon le phénotype auquel ils étaient associés (*lin-14* ou *let-7* par exemple). Par la suite, les miRNAs identifiés par les techniques plus récentes de clonage ou de séquençage ont été nommés par un numéro (miR-21, miR-125, etc).

De la même façon que pour les protéines, il existe des familles de miRNAs. Les miRNAs

d'une même famille possèdent la même séquence minimale d'interaction avec l'ARNm cible, appelée *seed sequence*. Ces miRNAs sont alors distingués par l'ajout d'une lettre (miR-125a, miR-125b). Les miRNAs d'une même famille sont redondants puisqu'ils ciblent les mêmes ARNm. En 2014, on dénombrait 34 familles de miRNAs phylogénétiquement conservées entre *C. elegans* et l'homme, et 196 familles de miRNAs conservées entre les mammifères (Ha et Kim, 2014) : l'importance des miRNAs au fil de l'évolution est donc avérée.

De plus, un même miRNA peut être transcrit à partir de plusieurs loci différents. Dans ce cas, bien que les transcrits possèdent les mêmes cibles, ils seront différenciés par l'ajout d'un chiffre (miR-125b-1, miR-125b-2).

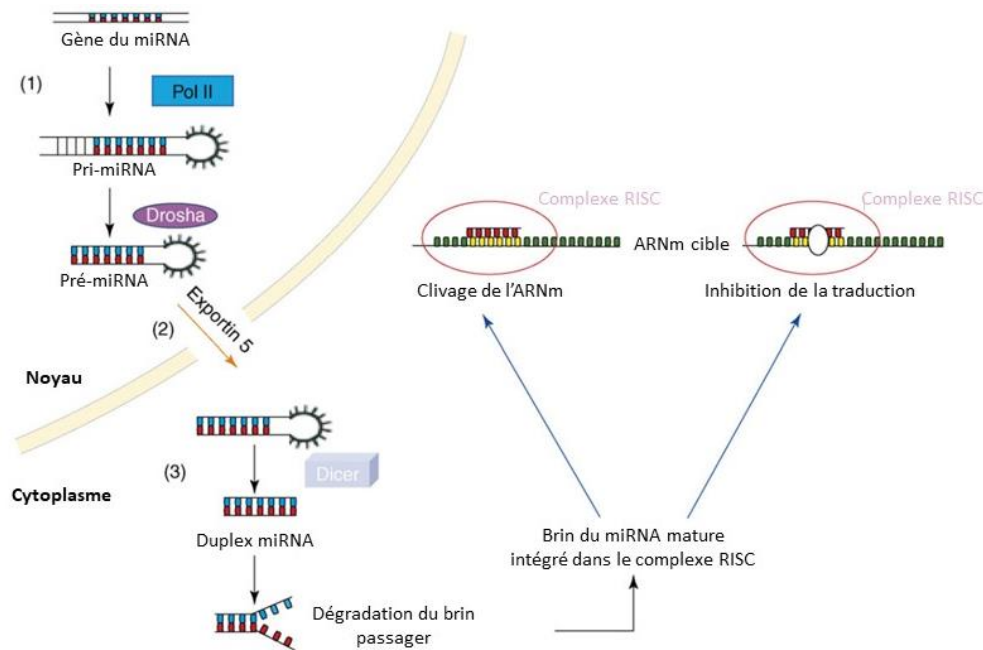
Généralement, un seul et même transcrit peut-être précurseur de plusieurs miRNAs : on parle alors d'unité polycistronique. Dans ce cas, les miRNAs issus d'une même unité polycistronique n'appartiennent pas à la même famille, ils ne partagent pas la même *seed sequence*. L'unité polycistronique considérée comme étant la plus conservée est constituée par le cluster impliqué dans le développement bilatéral des animaux : il s'agit du cluster miR-100/let-7/miR-125 (Ha et Kim, 2014).

Toujours concernant des notions de nomenclature, les gènes permettant la formation de miRNAs sont notés "mir-xxx", alors que les miRNAs matures sont notés "miR-xxx" (Tétreault et De Guire, 2013). Les miRNAs sont présents dans la cellule sous la forme d'un duplex d'ARN : au sein de ce duplex, le premier brin d'ARN est le brin guide (ou miR-xxx-5p), et le deuxième est le brin passager (ou miR-xxx-3p). Au cours de la maturation du miRNA, le brin passager est très souvent dégradé, mais dans certains cas assez rares il peut être fonctionnel et avoir des ARNm cibles. La biosynthèse des miRNAs sera détaillée dans le paragraphe suivant.

En 2006, on estimait qu'environ 30% des gènes codant pour une protéine pouvaient être régulés par un miRNA (Garzon *et al.*, 2006). En 2014, cette proportion est passée à 60% (Ha et Kim, 2014). Il est ainsi raisonnable de penser que cette proportion va encore augmenter dans les années à venir et ce proportionnellement à l'avancée de la recherche dans ce domaine. De plus, un seul miRNA peut réguler l'expression de plusieurs ARNm différents, et donc contrôler l'expression de plusieurs gènes. En revanche, pour la majorité des miRNAs, leur fonction précise au sein de la cellule reste encore à déterminer.

## B- Voies de synthèse des microRNAs

De façon générale, deux grandes voies de synthèse des miRNAs ont été décrites : une voie majoritaire, dite canonique (**Figure 23**), et d'autres voies minoritaires, dites non canoniques.



**Figure 23. Biosynthèse des miRNAs selon la voie canonique.**

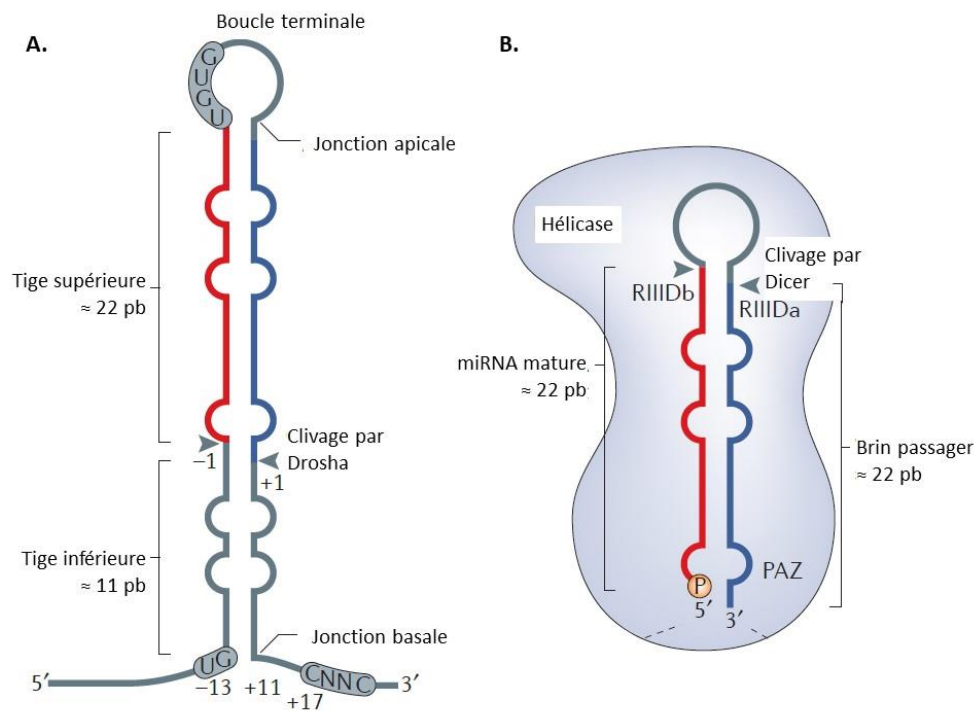
La transcription des miRNAs est réalisée par l'ARN polymérase II (Pol II) **(1)**, produisant de longs transcrits primaires de longueur variable appelés pri-miRNAs. Ces pri-miRNAs sont reconnus et clivés dans le noyau par l'enzyme Drosha (RNase III), de façon à former un précurseur en tige-boucle appelé pré-miRNA. Le pré-miRNA est ensuite exporté vers le cytoplasme **(2)** où il sera pris en charge par une autre enzyme appelée Dicer **(3)**. Ceci permettra la formation d'un duplex transitoire de 19 à 24 nt. Seul un des 2 brins du duplex (brin guide) sera incorporé dans un complexe protéique appelé RISC (RNA-induced silencing complex). Le brin mature guide le complexe RISC vers l'ARNm cible pour le cliver ou pour induire une répression de la traduction selon le degré de complémentarité entre le miRNA et sa cible. (Adapté de Garzon et al., 2006).

### 1) Voie canonique

Selon la voie canonique, un gène codant pour un miRNA est transcrit en un pri-miRNA, qui sera clivé pour former un pré-miRNA puis exporté dans le cytosol où il sera maturé et pourra agir sur ses cibles.

### a) Formation du pré-miRNA

La transcription des miRNAs est réalisée par l'ARN polymérase II, qui produit un transcrit primaire particulier appelé pri-miRNA. Ce pri-miRNA est de taille variable, qui est généralement d'environ 1 kb. Il contient une structure en tige-boucle dans laquelle la tige est composée de 30 à 35 nt. Le plus souvent, le pri-miRNA est porté par les introns des ARNm, par les ARNs non codants, ou plus rarement par les exons. Lorsque le pri-miRNA est transcrit, la tige-boucle est reconnue par la protéine Drosha, qui possède une activité RNase : en interaction avec une protéine stabilisatrice appelée DGCR8, elle va former le complexe microprocesseur (Denli *et al.*, 2004; Gregory *et al.*, 2004; Han *et al.*, 2004). Ce complexe va ainsi cliver le pri-miRNA de façon à générer un pré-miRNA.



**Figure 24. Représentation schématique des pri- et pré-miRNAs.**

**A.** Sur le pri-miRNA, les séquences UG et CNNC en 5' et 3' de la tige sont reconnues par le complexe microprocesseur constitué de l'enzyme Drosha et de son cofacteur DGCR8. Drosha clive la tige à 22 nt de l'extrémité apicale, de façon à générer un pré-miRNA possédant une extrémité 5' phosphorylée et une extrémité 3' débordante de 2 nt. **B.** Les extrémités 5' et 3' du pré-miRNA sont reconnues par l'enzyme Dicer et son cofacteur TRBP. La boucle du pré-miRNA sera clivée pour former un ARN double brin de 22 nt. Ce duplex constitue le miRNA immature comprenant le brin guide (rouge) et le brin passager (bleu). (Adapté de Ha et Kim, 2014).

Drosha est une endonucléase de 160 kDa spécifique des ARNs double brin. Elle est composée de 3 domaines structurels importants : une partie N-ter qui régule sa localisation nucléaire, une partie intermédiaire qui permet l'interaction avec la protéine DGCR8, et une partie C-ter qui contient un domaine RNase III en tandem (RIIIda et RIIIDb) ainsi qu'un domaine de liaison aux ARNs double brin.

Les domaines RIIDa et RIIDb de Drosha constituent la partie de l'enzyme contenant l'activité catalytique. Le domaine RIIDa va cliver le duplex d'ARNs au niveau de l'extrémité 3', et le domaine RIIDb va cliver au niveau de l'extrémité 5' (**Figure 24.A**). Le clivage par Drosha va ainsi générer une extrémité 5' phosphorylée et une extrémité 3' débordante de 2 nt (Blaszczyk *et al.*, 2001; Han *et al.*, 2004; Zeng *et al.*, 2005; Zhang *et al.*, 2004).

La protéine DGCR8 est un cofacteur essentiel pour la synthèse des miRNAs. Cette protéine est conservée entre les espèces (Pasha chez *D. melanogaster*, PASH-1 chez *C. elegans*). Elle est localisée dans le cytoplasme et possède plusieurs domaines importants pour sa fonction (Han *et al.*, 2006; Sohn *et al.*, 2007; Yeom *et al.*, 2006) : une partie N-ter contenant un signal de localisation nucléaire, une partie intermédiaire contenant un domaine de dimérisation et de fixation de l'hème, et une partie C-ter contenant un domaine de liaison à la protéine Drosha. DGCR8 possède également deux domaines de liaison aux duplex d'ARNs, ce qui lui permet de reconnaître les pri-miRNAs (Yeom *et al.*, 2006).

Des expériences d'inactivation de l'expression (KO, *knock-out*) pour Drosha ou DGCR8 ont montré une létalité au stade embryonnaire, ce qui révèle le rôle essentiel de ces protéines et par conséquent des miRNAs au cours du développement embryonnaire (Chong *et al.*, 2010; Wang *et al.*, 2007). De plus, il a été mis en évidence que des motifs nucléotidiques particuliers UG et CNNC, respectivement en N-ter et C-ter sur le pri-miRNA, permettent au complexe microprocesseur de reconnaître le duplex (Auyeung *et al.*, 2013) (**Figure 24.A**). De façon complémentaire, le facteur d'épissage SRp20 (également appelé SRSF3) reconnaît également le motif CNNC pour favoriser la fixation de Drosha sur le pri-miRNA (Kim *et al.*, 2018).

La synthèse du pré-miRNA n'affecte pas l'épissage de l'ARNm, puisqu'elle a lieu avant celui-ci (Kim et Kim, 2007). De plus, les miRNAs pouvant être portés par les séquences introniques, le pri-miRNA est reconnu lorsque l'ARNm est épissé. En revanche, la synthèse du miRNA peut affecter la stabilité de l'ARNm s'il est contenu dans un exon. Dans ce cas, le clivage de l'ARNm par Drosha induit sa dégradation. Ce phénomène se produit notamment dans le cas de la synthèse du miR-198, qui est contenu dans l'UTR 3' de *FSTL1* (Sundaram *et al.*, 2013).

### b) Export du pré-miRNA dans le cytoplasme

Une fois que le complexe microprocesseur a clivé le pri-miRNA, le pré-miRNA formé sera exporté dans le cytoplasme. Ce transit est réalisé par une protéine appelée exportine 5 (**Figure 23**), qui va former un complexe avec la protéine nucléaire RanGTP et le pré-miRNA (Bohnsack *et al.*, 2004; Lund *et al.*, 2004). Une fois au niveau du pore nucléaire, le GTP sera hydrolysé et le complexe pourra se dissocier pour libérer le pré-miRNA dans le cytoplasme.

Il a été observé que l'export des pré-miRNAs est plus important à la suite de dommages à l'ADN ATM-dépendants (Melo *et al.*, 2010; Wan *et al.*, 2013). Par exemple, une irradiation ou une émission d'UVs induisent des cassures double brin de l'ADN, qui entraîneront l'activation de la voie de réparation ATM-dépendante. La protéine ATM, une fois phosphorylée, va activer à son tour la protéine ATR, qui va phosphoryler la nucléoporine NUP153. NUP153 phosphorylée pourra interagir avec l'exportine 5, permettant ainsi d'augmenter l'export des pré-miRNAs dans le cytoplasme.

### c) Maturation du pré-miRNA

Une fois dans le cytoplasme, le pré-miRNA va être clivé par une seconde endonucléase appelée Dicer. Par son action, cette enzyme va générer un duplex de miRNAs de 22 nt qui sera alors pris en charge par le complexe RISC (*RNA-induced silencing complex*) (Bernstein *et al.*, 2001; Grishok *et al.*, 2001; Hutvagner *et al.*, 2001; Ketting *et al.*, 2001; Knight et Bass, 2001) (**Figure 23**). Dicer est une endonucléase de 200 kDa qui possède comme Drosha une activité RNase III. Elle est composée de 3 domaines (Macrae *et al.*, 2006; Park *et al.*, 2011; Tian *et al.*, 2014; Tsutsumi *et al.*, 2011) (**Figure 24.B**) : une partie N-ter contenant une hélicase qui reconnaît et interagit avec la boucle du pré-miRNA, une partie intermédiaire contenant un domaine PAZ (PIWI/AGO/ZWILLE) qui interagit avec la partie C-ter du pré-miRNA, et une partie C-ter contenant un domaine RNase III en tandem qui constitue le centre catalytique de la protéine.

Grâce à son domaine PAZ, Dicer peut reconnaître à la fois l'extrémité 5' phosphorylée et l'extrémité 3' débordante du pré-miRNA (Zhang *et al.*, 2004). En se fixant sur ces deux extrémités, le domaine PAZ va former une poche dans laquelle le pré-miRNA sera piégé (**Figure 24.B**). Cette poche va rapprocher les deux autres domaines hélicase et RNase III de la protéine Dicer de la boucle du pré-miRNA : la distance entre les domaines PAZ et RNase III est ainsi considérée comme une "règle moléculaire". Dicer pourra alors cliver le pré-miRNA à la

base de la boucle, à une distance comprise entre 21 et 25 nt de chacune des extrémités du pré-miRNA, de façon à générer le duplex de miRNAs de 22 nt pour chaque brin (Park *et al.*, 2011; Tian *et al.*, 2014).

Chez *D. melanogaster*, il existe deux protéines Dicer 1 et 2. L'interaction se fera avec l'une ou l'autre de ces protéines selon la structure du pré-miRNA : Dicer 1 est associé aux miRNAs, alors que Dicer 2 est associé aux siRNAs (Lee *et al.*, 2004). Chez l'homme, il n'existe qu'une seule protéine Dicer qui prend en charge à la fois les miRNAs et les siRNAs. De plus, il a été montré qu'une invalidation de l'expression de Dicer par KO est létale chez la souris, ce qui prouve encore une fois l'importance des miRNAs dans le développement (Bernstein *et al.*, 2003).

De la même façon que Drosha, Dicer peut s'associer avec des cofacteurs comme TRBP (*TAR RNA binding protein*) et PACT (*double strand RNA binding domain*) (Chendrimada *et al.*, 2005; Haase *et al.*, 2005; Lee *et al.*, 2006). En revanche, la fonction de ces cofacteurs n'est pas encore clairement connue.

#### d) Maturation du duplex d'ARNs

Le duplex d'ARNs formé par Dicer sera ensuite pris en charge par une protéine de type Argonaute (AGO) de façon à former le complexe RISC (Hammond *et al.*, 2001; Mourelatos *et al.*, 2002; Tabara *et al.*, 1999). Au sein de ce complexe, le brin passager du duplex sera dégradé, permettant la maturation complète du miRNA.

Il existe plusieurs classes de protéines Argonaute : les protéines AGOs, PIWIs et WAGOs (*worm-specific AGOs*). Alors que les protéines PIWIs sont spécifiques des cellules germinales et principalement associées à la maturation des piRNAs, les protéines AGOs sont ubiquitaires. Elles sont impliquées dans la maturation des miRNAs mais aussi dans celle des siRNAs, de façon à permettre leur action sur les ARNm cibles. Les protéines AGOs sont constituées de plusieurs domaines contenus dans deux grands lobes (Ma *et al.*, 2005; Parker *et al.*, 2005; Song *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2008) : un lobe N-ter où l'on retrouve un domaine N-ter et un domaine PAZ ; un lobe C-ter contenant un domaine MID (*middle*) et un domaine PIWI. Ce domaine PIWI est structurellement similaire à la RNase H, et est responsable du clivage de l'ARNm cible entre les nucléotides 10 et 11 du miRNA (Liu *et al.*, 2004; Parker *et al.*, 2005; Song *et al.*, 2004).

Chez l'homme, on peut retrouver dans le complexe RISC 4 protéines AGO 1, 2, 3 et 4.

Le variant AGO2 est impliqué dans le clivage de l'ARNm cible, alors que les 3 autres variants empêchent sa traduction, ceci dans le but d'avoir une inhibition complète de l'expression du gène ciblé. De la même façon que pour les enzymes Drosha et Dicer, une invalidation de l'expression d'AGO2 est létale chez l'embryon (Liu *et al.*, 2004). De façon intéressante, on peut noter une différence d'action des variants protéiques AGOs selon les espèces. En effet, chez *D. melanogaster*, la protéine AGO1 prend en charge les miRNAs possédant un U en 5', et la protéine AGO2 prend en charge les siRNAs possédant un C en 5' (Förstemann *et al.*, 2007; Okamura *et al.*, 2004; Tomari *et al.*, 2007). En revanche, chez l'homme, les 4 variants AGOs sont capables de prendre en charge les miRNAs comme les siRNAs (Azuma-Mukai *et al.*, 2008; Dueck *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2004; Meister *et al.*, 2004; Su *et al.*, 2009; Yoda *et al.*, 2010). L'incorporation dans le complexe RISC est encore mal connue, mais il est possible que les protéines Dicer et TRBP y contribuent (Chendrimada *et al.*, 2005; Gregory *et al.*, 2005; MacRae *et al.*, 2008; Maniataki et Mourelatos, 2005; Miyoshi *et al.*, 2005). Pour autant, une invalidation de l'expression de Dicer par KO n'empêche pas l'association des siRNAs au complexe RISC : ceci signifie que Dicer n'est pas indispensable au chargement de ce complexe (Kanellopoulou *et al.*, 2005; Murchison *et al.*, 2005).

Pendant la maturation du duplex d'ARNs, le complexe RISC n'est pas encore mature : on parle alors de complexe pré-RISC. Après chargement de RISC, le brin passager du duplex sera éliminé. Tout potentiel mésappariement au centre du duplex sera pris en charge par l'endonucléase C3PO, qui clivera le brin passager pour générer un RISC mature (Diederichs et Haber, 2007; Leuschner *et al.*, 2006; Liu *et al.*, 2009; Matranga *et al.*, 2005; Miyoshi *et al.*, 2005; Rand *et al.*, 2005; Ye *et al.*, 2011). En effet, il peut éventuellement (mais assez rarement) arriver un mésappariement entre les nucléotides 2-8 et 12-15, entraînant un désassemblage du duplex d'ARNs (Tomari, 2004; Tomari *et al.*, 2007; Yoda *et al.*, 2010).

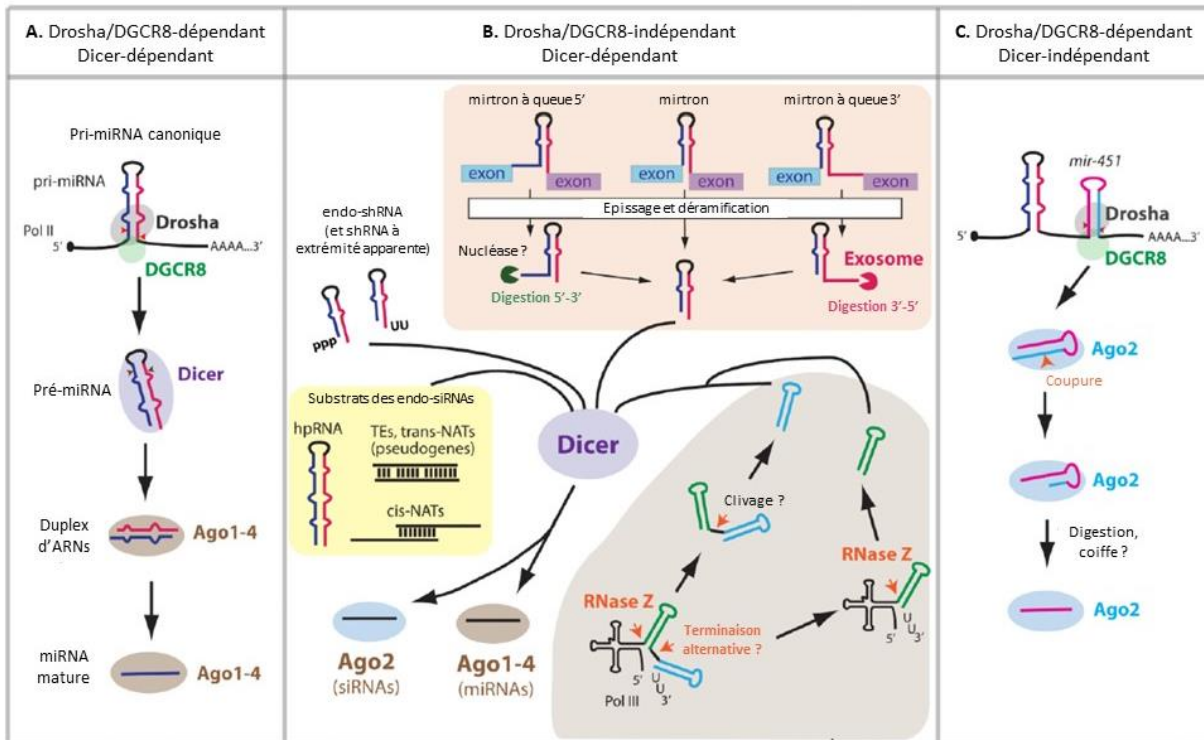
Dans le duplex d'ARNs, il n'existe aucune distinction entre le brin guide et le brin passager. Il est simplement connu que le brin possédant une extrémité 5' thermodynamiquement moins stable sera le brin guide du duplex ; l'autre brin sera le brin passager et sera donc éliminé (Khvorova *et al.*, 2003; Schwarz *et al.*, 2003). Le brin guide a également été caractérisé par la présence d'un U en N-ter (Ghildiyal *et al.*, 2010; Okamura *et al.*, 2004).

Après la dissociation du duplex, le complexe RISC est mature et va pouvoir "scanner" les ARNm cellulaires pour trouver les cibles du miRNA qu'il contient.



Comme nous l'avons mentionné, il existe certains cas rares où, même si le brin guide du duplex est prédominant dans la majorité des tissus, c'est le brin passager qui fait partie du complexe RISC. L'exemple le plus notoire est celui du miR-675-5p (brin guide), qui agit dans le côlon et le miR-675-3p (brin passager) agit dans le placenta (Keniry *et al.*, 2012; Tsang *et al.*, 2010). Ces 2 miRNAs sont issus du lncRNA *H19* (Cai et Cullen, 2007).

## 2) Voies non canoniques



**Figure 25. Voies de synthèse non canoniques des miRNAs.**

**A.** Voie de synthèse canonique. **B.** Voie indépendante de Drosha. Pendant l'épissage des ARNm, les introns peuvent être reconnus comme des pré-miRNAs particuliers appelés mirtrons. Ces mirtrons sont pris en charge par Dicer qui va générer des duplex d'ARNs. Dans certains cas, l'action d'une exonucléase 3'-5' ou 5'-3' peut être nécessaire. Après action de RNases Z et P, les ARNs de transfert peuvent également former des pré-miRNAs reconnus par Dicer. **B.** Voie indépendante de Dicer. Lorsque Drosha clive son substrat, elle génère un pré-miRNA de 18 nt qui ne peut pas être reconnu par Dicer. Ce pré-miRNA sera reconnu directement par le complexe RISC qui dégradera la structure en boucle pour permettre la maturation du miRNA. (Adapté de Yang et Lai, 2011).

Outre la voie de synthèse principale des miRNAs que nous venons d'exposer, il existe des voies alternatives dites "non canoniques" qui sont indépendantes de l'action de Drosha ou de Dicer. Même si elles sont moins fréquentes (chez les vertébrés, 1% des miRNAs sont synthétisés par ces voies), elles peuvent tout de même intervenir dans la biogenèse des miRNAs.

### a) Voie Drosha-indépendante

Après l'épissage des ARNm, qui a lieu dans le cytoplasme, les introns excisés peuvent parfois être reconnus par l'enzyme Dicer comme des pré-miRNAs (**Figure 25.B**). A partir de ces introns, appelés mirtrons, Dicer va ainsi produire un duplex d'ARNs qui sera ensuite intégré dans le complexe RISC pour y être mûré (Berezikov *et al.*, 2007; Ruby *et al.*, 2007). Cette voie de synthèse particulière ne fait donc pas intervenir l'enzyme Drosha, mais l'intervention de RNAses peut parfois être requise pour digérer les extrémités 5' et/ou 3' de l'intron épissé pour permettre sa reconnaissance par Dicer (Flynt *et al.*, 2010).

Les miRNAs peuvent également être issus d'ARNs de transfert (Babiarz *et al.*, 2008), qui constituent une catégorie de petits ARNs non codants transcrits par l'ARN polymérase III. Dans le cas présent, l'ARN de transfert à l'isoleucine (tRNA-Ile) peut être digéré par les RNAses P et Z respectivement aux extrémités 5' et 3'. Cette digestion va générer un substrat reconnu par Dicer, et qui permettra la synthèse du miR-1983 (Babiarz *et al.*, 2008).

Enfin, lors de la transcription par l'ARN polymérase III, certains petits ARNs possédant une structure secondaire en épingle à cheveux peuvent être produits et seront exportés dans le cytoplasme. Ces petits ARNs seront alors reconnus par Dicer qui clivera la boucle de l'épingle pour former un duplex d'ARNs (Ha et Kim, 2014).

### b) Voie Dicer-indépendante

La voie de synthèse non canonique indépendante de Dicer n'a pour l'instant été associée qu'à la synthèse du miR-451 (Cheloufi *et al.*, 2010; Cifuentes *et al.*, 2010) (**Figure 25.C**). Ce miRNA, sous sa forme pri-miR-451, est d'abord clivé par Drosha dans le noyau pour former un pré-miR-451 d'environ 18 nt. Ce pré-miRNA sera exporté dans le cytoplasme, mais du fait de sa trop petite taille il ne sera ni reconnu ni pris en charge par Dicer. Pour autant, il possède une taille suffisante pour être pris en charge directement par le complexe RISC : la boucle du pré-miR-451 sera alors clivée par la protéine AGO2 (qui possède une activité RNase) pour générer le miR-451 mature (Yoda *et al.*, 2013).

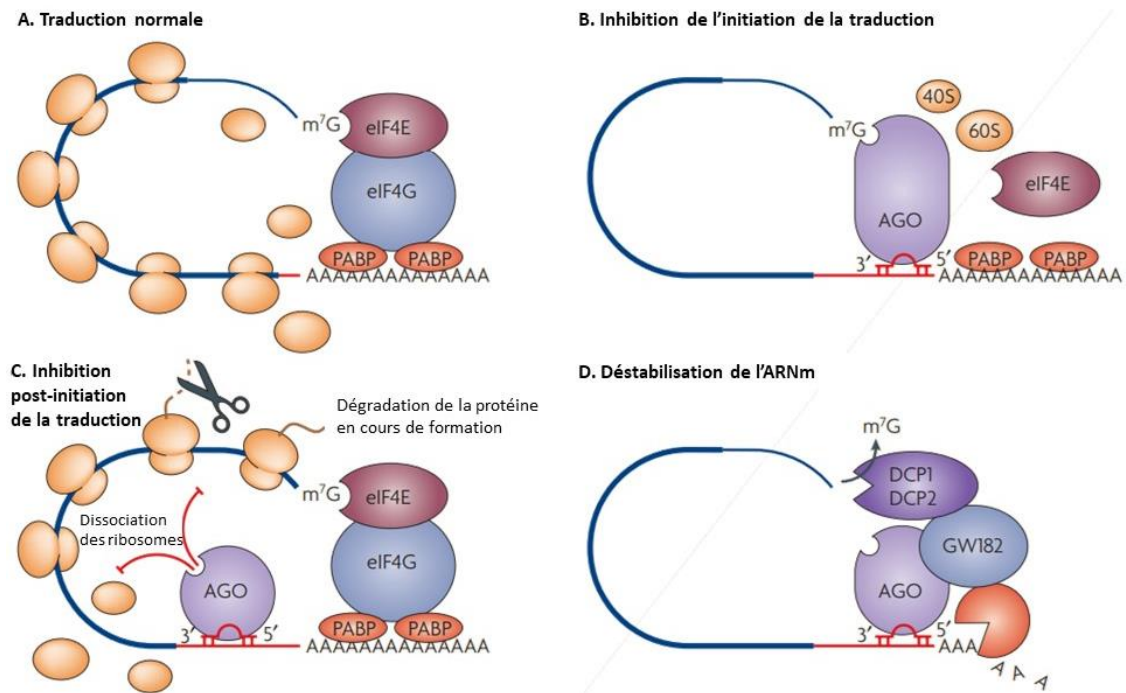
## C- Rôles des microRNAs

---

De plus en plus d'études se focalisent sur les fonctions cellulaires des miRNAs : en effet, il a été montré que les miRNAs sont impliqués dans des processus importants comme le développement embryonnaire, la prolifération cellulaire et la différenciation des tissus. Leur

action influence également des phénomènes comme la transduction des signaux intracellulaires, les voies de l'apoptose, mais aussi des processus pathologiques comme la tumorigenèse.

### 1) Modes d'action des miRNAs



**Figure 26. Modes d'action des miRNAs dans la régulation de l'expression génique.**

**A.** Mécanismes mis en jeu pendant la traduction des ARNm. **B.** Les miRNAs (en rouge) associés au complexe RISC se fixent sur l'UTR 3' de l'ARNm ciblé et interagissent avec la coiffe en 5'. Ceci empêche la fixation du complexe d'initiation de la traduction sur l'UTR 5', ainsi que la fixation des ribosomes sur l'ARNm. **C.** Au sein du complexe RISC, la protéine AGO2 peut empêcher la phase d'élongation de la traduction en dissociant les ribosomes de l'ARNm. La protéine en cours de synthèse sera dégradée. **D.** La protéine AGO2, en association avec les protéines GW182 et DCP1/2, permet de déstabiliser l'ARNm cible en dégradant la queue polyA et la coiffe en 5'. (Adapté de Stefani et Slack, 2008).

#### a) Régulations négatives

Comme nous l'avons exposé précédemment, les miRNAs exercent une répression de l'expression génique de façon post-transcriptionnelle en ciblant les ARNm pour les dégrader (**Figure 26**). Ce mode d'action est régulé par l'association avec le complexe RISC, avec certains cofacteurs et/ou par la présence de protéines spécifiques sur les ARNm. De plus, ce ciblage est également modulé par la complémentarité de séquence entre le miRNA et son ARNm cible : une complémentarité parfaite engendre une dégradation de l'ARNm (Hutvagner et Zamore, 2002; Martinez et Tuschl, 2004). Cette dégradation est réalisée par la protéine AGO2

grâce à son activité endonucléase : un clivage entre les nucléotides 10 et 11 entraînera la digestion complète de l'ARNm par l'action d'exonucléases 5' → 3' et 3' → 5'.

Si la complémentarité de séquence entre le miRNA et l'ARNm cible n'est pas parfaite (et plus particulièrement au niveau des nucléotides 10 et 11), l'ARNm ne sera pas dégradé. En revanche, il ne sera pas traduit, et une déadénylation ainsi qu'une perte de sa coiffe 5' entraîneront une modification de sa stabilité (Behm-Ansmant *et al.*, 2006; Standart et Jackson, 2007).

Les mécanismes précis qui permettent l'inhibition de la traduction de l'ARNm ciblé ne sont pas encore bien définis. Cependant, plusieurs études ont montré que l'association miRNA/complexe RISC peut empêcher la fixation du complexe d'initiation de la traduction, ou peut également empêcher l'élongation de la protéine en cours de synthèse (Maroney *et al.*, 2006; Nottrott *et al.*, 2006) (**Figure 26.B et C**). En effet, lorsque l'association miRNA-complexe RISC est fixée sur l'UTR 3' de l'ARNm cible, la protéine AGO2 peut interagir avec la coiffe en 5' : ceci empêche le recrutement de la protéine eIF4E, qui initie la traduction des ARNm (Humphreys *et al.*, 2005; Mathonnet *et al.*, 2007). En complément, AGO2 peut interagir avec certains cofacteurs comme les protéines GW182 ou DCP1/2, de façon à supprimer la coiffe en 5' la queue polyA en 3' de l'ARNm qui sera ensuite dégradé (Standart et Jackson, 2007) (**Figure 26.D**).

#### b) Régulations positives

Outre la régulation négative de l'expression génique, il a également été montré que les miRNAs peuvent avoir des effets positifs au niveau cellulaire. De cette façon, le miR-369-3p peut interagir avec des séquences riches en AU de l'ARNm *TNFα* pour réprimer sa traduction, et ainsi promouvoir la prolifération des cellules (Vasudevan et Steitz, 2007). De plus, lorsque les cellules sortent du cycle cellulaire et ne prolifèrent plus, l'ensemble miRNA-complexe RISC s'associe avec la protéine FXR1, qui est présente au niveau des séquences riches en AU, par l'intermédiaire de AGO2 : ceci est associé à une augmentation de la traduction de l'ARNm *TNFα*. Ainsi, lorsque les cellules ne cyclent plus, les miRNAs peuvent avoir un effet positif sur un ARNm cible (Vasudevan et Steitz, 2007).

Un autre exemple est celui du miR-10a, qui se fixe sur l'UTR 5' d'ARNm de protéines ribosomales (Ørom *et al.*, 2008). Le miR-10a peut également interagir avec l'UTR 3' de ces ARNm, entraînant leur dégradation. Or, la synthèse des protéines ribosomales est régulée par

des motifs 5'TOP qui sont sensibles aux signaux de stress cellulaire ainsi qu'au statut nutritif des cellules. Il a été montré que le miR-10a peut également interagir avec les ARNm par ces motifs : en l'absence de nutriments, la fixation du miR-10a a été associée à une augmentation de la traduction des protéines ribosomales. Ceci démontre bien l'effet positif du miR-10a (Ørom *et al.*, 2008).

### c) Autres modes de régulation

L'effet d'un miRNA sur son ARNm cible peut être modulé par l'interaction avec des cofacteurs protéiques. Nous en avons vu quelques exemples, mais il a été montré que certaines protéines peuvent empêcher totalement l'action d'un miRNA. De cette façon, lorsque la protéine DND1 interagit avec les ARNm *NANOS1* et *TDRD7*, elle bloque le site de fixation du miR-430, l'empêchant ainsi de dégrader ces ARNm (Kedde *et al.*, 2007; Mishima *et al.*, 2006).

Un autre exemple est celui de la protéine HuR, qui interagit avec l'UTR 3' de l'ARNm *CAT1* et empêche ainsi la fixation du miR-122 puisqu'elle va relocaliser l'ARNm vers le cytoplasme (Bhattacharyya *et al.*, 2006). A l'inverse, HuR peut avoir un effet négatif sur l'ARNm *MYC*, puisqu'elle agit en synergie avec *let-7* pour induire la dégradation de cet ARNm (Kim *et al.*, 2009). De plus, HuR est capable de réguler la synthèse des miRNAs puisqu'au cours du développement embryonnaire, son association avec le lncRNA *H19* empêche la formation du miR-675 (Keniry *et al.*, 2012).

## 2) Les miRNAs dans la tumorigenèse

De par leur mécanisme d'action, les miRNAs sont impliqués dans de nombreux processus cellulaires. De ce fait, une perturbation de leur expression peut être responsable de l'apparition de cancer. En 2005, une étude a mis en évidence qu'une trentaine de miRNAs environ sont dérégulés dans le cancer du sein (Iorio *et al.*, 2005). La combinaison des niveaux d'expression de certains de ces miRNAs permet même de mettre au point de nouvelles techniques de diagnostic et de prise en charge thérapeutique des patientes atteintes de cancer du sein (Nassar *et al.*, 2017; Shimomura *et al.*, 2016).

Tout comme nous l'avons exposé précédemment pour les gènes, les miRNAs peuvent avoir dans les cancers un rôle oncogène ou un rôle suppresseur de tumeur.

### a) miRNAs suppresseurs de tumeur

Les premiers miRNAs suppresseurs de tumeur ont été mis en évidence dans les leucémies lymphoïdes chroniques (LLC) (Garzon *et al.*, 2006) : ce sont les miR-15a et miR-16-1 (Calin *et al.*, 2002). En effet, ces deux miRNAs répriment l'expression du gène *BCL2* (*B-cell CLL/lymphoma 2*), qui est fréquemment surexprimé dans les LLC. Lors de la tumorigenèse, l'expression des miR-15a et miR-16-1 est réprimée par une délétion génique : le gène *BCL2* est donc exprimé, ce qui induit une prolifération accrue des cellules B matures.

Les miRNAs de la famille *let-7* agissent également en tant que suppresseurs de tumeur : une diminution de leur expression a été associée à plusieurs cancers, comme le cancer du sein ou le cancer des poumons (Balzeau *et al.*, 2017).

### b) miRNAs oncogènes

Le premier miRNA oncogène a également été mis en évidence dans les leucémies, plus particulièrement dans la maladie de Hodgkin, dans les lymphomes B diffus à larges cellules, les LLC à cellules B, mais aussi dans le cancer du poumon et le cancer du sein : il s'agit du miR-155. Le miR-155 est produit à partir du gène *BIC* et réprime l'expression de l'histone désacétylase 4 (HDAC4) (Sandhu *et al.*, 2012). HDAC4 réprimant l'expression de *BCL6* (*B-cell lymphoma 6*), l'action du miR-155 permet de ré-exprimer ce gène, entraînant l'augmentation de la prolifération et de la survie des cellules B.

### c) miRNAs oncogènes ou suppresseurs de tumeur ?

Si le rôle des miRNAs précédents (miR-15a, miR-16-1 et miR-155) est clairement défini dans les cancers, ce n'est pas le cas pour la plupart des autres miRNAs identifiés. En effet, dans certains cas particuliers comme celui du miR-146, l'expression peut être augmentée ou diminuée selon le modèle considéré. Dans les cancers du sein, de la prostate et des ovaires, le miR-146 est surexprimé (Dahiya *et al.*, 2008; Volinia *et al.*, 2006; Wang *et al.*, 2008), et dans le cas du cancer du sein, il réprime l'expression de *BRCA1* (Garcia *et al.*, 2011). Dans ce cas, le miR-146 a donc un rôle oncogène. En revanche, dans les cellules hématopoïétiques, une augmentation de la survie, de la prolifération et de la cancérisation des cellules a été associée à une diminution de l'expression du miR-146 (Boldin *et al.*, 2011). Dans ce modèle, le miR-146 cible l'expression des activateurs de la voie NF- $\kappa$ B pour les réprimer : il semblerait donc que le miR-146 ait dans ces cellules un rôle suppresseur de tumeur. En complément, il a été montré

que l'expression du miR-146 peut être activée par la voie NF- $\kappa$ B : il s'agit là d'une boucle de rétrocontrôle positive permettant de "doser" l'expression du miR-146 et ainsi favoriser soit son rôle oncogène, soit son rôle suppresseur de tumeur (Taganov *et al.*, 2006).

Il existe un autre exemple de double rôle pour les miRNAs (Kasinski et Slack, 2011) : selon le modèle considéré, le miR-29 n'a pas les mêmes fonctions. En effet, dans les leucémies myéloblastiques aiguës et dans le cancer du poumon, l'expression du miR-29 induit l'apoptose des cellules après xéno greffe en souris immunodéficientes, ce qui semble lui conférer un rôle suppresseur de tumeur (Fabbri *et al.*, 2007; Garzon *et al.*, 2009). En revanche, dans les LLC, le miR-29 semble avoir un rôle oncogène puisqu'il réprime l'expression de la protéine d'adhésion cellulaire PXDN (*peroxidasin homolog*) (Santanam *et al.*, 2010).

**Les miRNAs semblent donc nécessaires au bon développement de l'organisme, ainsi qu'au fonctionnement normal de nombreux processus cellulaires. Même si la majorité des effets qui leur sont associés décrivent une répression de l'expression génique par dégradation de l'ARNm, les miRNAs peuvent également avoir un effet positif sur certaines de leurs cibles. Pour autant, une dérégulation de leur expression peut favoriser la tumorigenèse et/ou la progression tumorale. Il s'avère donc nécessaire de caractériser les niveaux d'expression et l'action des miRNAs dans les différents modèles cancéreux, de façon à améliorer les techniques de diagnostic déjà initiées, mais aussi pour mettre en place de nouvelles stratégies thérapeutiques plus spécifiques.**

## V – Le long ARN non codant H19

Avant d'exposer les caractéristiques du long ARN non codant *H19*, nous allons en préambule établir quelques notions importantes concernant l'empreinte génomique parentale. Dans la suite de ce chapitre, nous verrons en détail les spécificités du locus *H19/IGF2*, avec notamment la mise en place de son empreinte, ainsi que la fonction du transcrit non codant *H19* dans les cellules normales et cancéreuses.

### A- L'empreinte génomique parentale

---

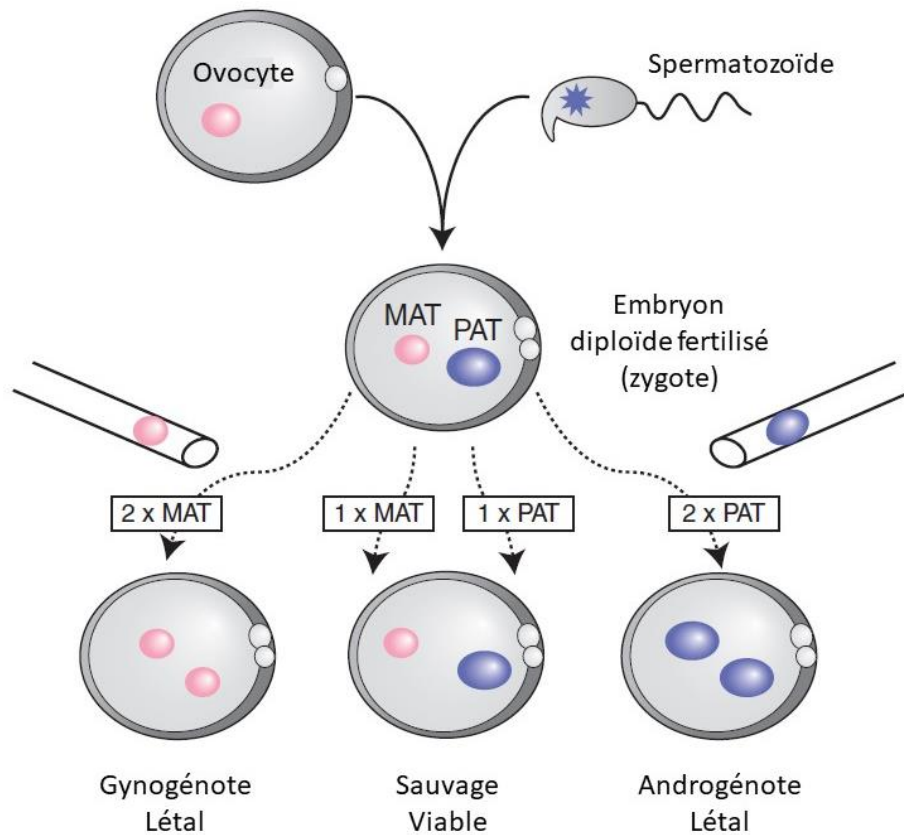
#### 1) Historique

Les mammifères sont des organismes diploïdes pour lesquels chaque paire de chromosomes est composée d'un chromosome d'origine maternelle et d'un chromosome d'origine paternelle. De cette façon, la majorité des gènes présents sur ces chromosomes ont une expression biallélique. Cependant, au début des années 1970, avec les découvertes sur la régulation du chromosome X arrive une nouvelle notion à propos du dosage de l'expression génique. Une "empreinte chromosomique" permettrait ainsi des niveaux d'expression génique identiques entre les individus mâles et femelles (Cooper *et al.*, 1971; Crouse *et al.*, 1971).

A la même époque, les premières expériences de translocations géniques sont réalisées, dans le but de mettre en évidence les régions chromosomiques nécessaires au développement embryonnaire. Certaines de ces translocations aboutissent à des souris non viables (Searle et Beechey, 1978) : ceci suggère que ces gènes transloqués ne peuvent être correctement exprimés qu'à partir de leur chromosome d'origine seulement. Ces observations préliminaires ont ensuite été complétées dans les années 1980. Des équipes ont réalisé des séries d'injections dans des ovocytes fécondés dépourvus de pro-nucléi : soit deux génomes maternels (gynogénètes), soit deux génomes paternels (androgénètes), soit un génome maternel et un génome paternel (condition normale) (McGrath et Solter, 1984a, 1984b; Surani *et al.*, 1984) (**Figure 27**). Il a résulté de cette expérience que les gynogénètes comme les androgénètes ne sont pas viables, et que seule la combinaison d'un génome maternel et d'un génome paternel permet d'obtenir des individus viables. Ainsi, il semblerait



que les génomes maternel et paternel contiennent tous deux des gènes spécifiques, non redondants et nécessaires au bon développement de l'embryon.



**Figure 27. Les génomes maternel et paternel sont tous deux requis pour la reproduction des mammifères.**

Dans un zygote fertilisé dépourvu de pro-nucléus, le génome maternel est injecté seul ou en association avec le génome paternel. En parallèle, le génome paternel est injecté seul ou en association avec le génome maternel. Seule la combinaison d'un génome maternel et d'un génome paternel permet d'obtenir un individu viable.

MAT : génome maternel ; PAT : génome paternel. (Adapté de Barlow et Bartolomei, 2014).

Les bases de l'empreinte génomique parentale ont été établies grâce à la découverte du premier gène soumis à ce mode de régulation : le gène *Igf2r* (*insulin-like growth factor type 2 receptor*) (Barlow *et al.*, 1991). En effet, il a été mis en évidence que ce gène est exprimé uniquement à partir de l'allèle maternel. Quelques mois plus tard, deux autres gènes appartenant au même locus ont également été identifiés comme soumis à l'empreinte génomique : les gènes *Igf2* et *H19* (Bartolomei *et al.*, 1991; DeChiara *et al.*, 1991; Ferguson-Smith *et al.*, 1991). Ces deux gènes sont respectivement exprimés à partir des allèles paternel et maternel.

L’empreinte génomique parentale constitue un mécanisme de régulation complexe, finement contrôlé et reposant principalement sur des modifications épigénétiques. Elle se définit comme l’expression exclusive d’un seul des deux allèles d’un gène selon son origine parentale, et qui résulte de modifications épigénétiques différentes sur chacun des allèles. Jusqu’à ce jour, plus de cent gènes ont été recensés comme soumis à l’empreinte génomique parentale. Ces gènes sont regroupés en clusters dont la taille varie de 100 à 4000 kpb. Un cluster contient 3 à 12 gènes, dont au minimum un gène produisant un ARN non codant. Le centre de régulation de l’empreinte, appelé IC (*imprinting control*) ou IR (*imprinting region*), est une zone riche en îlots CpG, que l’on appelle plus communément DMR (*differentially methylated region*).

De façon générale, il a été montré que les gènes soumis à l’empreinte génomique parentale possèdent un rôle important dans le développement embryonnaire ou placentaire. Il est admis que les gènes exprimés à partir de l’allèle paternel favorisent le développement embryonnaire (*Igf2, Peg3, Peg1, Rasgrf1, Dlk1*), alors que les gènes exprimés à partir de l’allèle maternel ont tendance à réprimer la croissance embryonnaire et/ou placentaire (*Igf2r, Gnas, Cdkn1c, H19, Grb10*) (Barlow et Bartolomei, 2014). De plus, des dérégulations de l’empreinte génomique parentale ont été associées à différents syndromes plus ou moins graves. En effet, la perte de l’empreinte génomique (LOI, *loss of imprinting*) induit généralement des problèmes de croissance de l’embryon, ainsi que des problèmes de développement neurologique ou des tératomes.

## 2) Mise en place et maintien

La mise en place de l’empreinte génomique nécessite dans un premier temps de pouvoir distinguer l’allèle maternel de l’allèle paternel chez l’embryon. Cette distinction doit avoir lieu avant la fécondation, puisque dans l’embryon, sans marque spécifique, il serait impossible de différencier les deux allèles. Par conséquent, la mise en place de l’empreinte génomique se met en place pendant la gamétogenèse.

L’empreinte génomique nécessite plusieurs pré-requis : elle doit être spécifique du gamète d’origine (maternel ou paternel), transmissible aux cellules filles du zygote lors des différentes mitoses, et labile dans les gamètes de l’embryon. Ce dernier point est primordial, puisque l’individu mâle ou femelle doit produire un seul type de gamètes (mâles ou femelles). Comme nous l’avons dit, l’empreinte génomique consiste en l’établissement de modifications

épigénétiques. Ainsi, les allèles maternel et paternel seront différenciés par leur niveau de méthylation : l'allèle maternel sera hyperméthylé, tandis que l'allèle paternel sera hypométhylé. Ces niveaux de méthylation seront maintenus dans les cellules somatiques de l'embryon et de l'individu adulte. En revanche, dans les cellules germinales, ces marques épigénétiques sont effacées à un stade précoce pour permettre l'établissement de nouvelles marques spécifiques du sexe de l'individu considéré. Ainsi, l'empreinte génomique pourra être transmise aux générations suivantes.

Plusieurs types de modifications épigénétiques sont responsables de l'empreinte génomique. Les deux modifications majoritaires sont la méthylation des cytosines et les modifications post-traductionnelles des histones.

#### a) Méthylation des cytosines

Dans le cadre de la mise en place de l'empreinte génomique, la méthylation des cytosines est la seule modification épigénétique qui se produit directement sur l'ADN. Cette méthylation a lieu au niveau des îlots CpG, et est catalysée chez l'homme par l'enzyme DNMT1 (*DNA methyltransferase 1*) (Bestor, 1988). DNMT1 est responsable du maintien de la méthylation de l'ADN lors des divisions cellulaires, et est nécessaire au développement normal puisqu'une délétion du gène *Dnmt1* est létale au stade embryonnaire chez la souris (Leonhardt *et al.*, 1992; Li *et al.*, 1992; Liu *et al.*, 1998). De façon complémentaire, d'autres méthyltransférases sont quant à elles impliquées dans une méthylation *de novo* de l'ADN, comme DNMT3A et DNMT3B (Okano *et al.*, 1998). D'autres méthyltransférases encore peuvent jouer le rôle de cofacteurs lors de la méthylation de l'ADN, comme DNMT3L, qui ne possède pas elle-même d'activité méthyltransférase. Cette enzyme contribue à la formation du complexe DNMT3A/DNMT3B, et permet l'interaction de ce complexe avec la chromatine.

Lorsque ces enzymes sont absentes, la méthylation des régions soumises à l'empreinte est modifiée : les gènes possèdent alors une expression biallélique, qui est caractéristique de syndromes pathologiques du développement. Cependant, dans certains cas particuliers, l'absence de méthylation induit une perte d'expression du gène : ceci suggère que la méthylation de l'ADN est impliquée à la fois dans la répression et dans l'activation de l'expression génique.

Dans l'embryon précoce, la méthylation générale des allèles est retirée, sauf au niveau des centres de contrôle de l'empreinte génomique (IC/IR). En effet, ces régions doivent

nécessairement conserver leur état de méthylation afin de perpétuer l’empreinte génomique parentale. Les îlots CpG méthylés sont reconnus par un certain nombre de protéines, notamment les protéines possédant un domaine de liaison au groupement méthyl (MBD, *methyl-binding domain*) comme MBD3 par exemple. En se fixant sur l’ADN méthylé, ces protéines empêchent sa déméthylation dans l’embryon : ainsi, l’empreinte génomique parentale est conservée au niveau des loci qui y sont sujets.

#### b) Modifications post-traductionnelles des histones

Outre la méthylation des îlots CpG, l’empreinte génomique parentale peut également être établie grâce aux modifications post-traductionnelles des histones, et plus particulièrement la méthylation, la désacétylation, la phosphorylation, la sumoylation ou encore l’ubiquitinylation des histones. L’établissement de ces modifications conduira à la modulation du niveau de compaction de la chromatine, et donc à la régulation de l’expression génique.

La méthylation des histones a déjà été abordée dans le paragraphe II-C-2)b). Dans le cadre de l’empreinte génomique parentale, la méthylation aura lieu au niveau de la lysine 27 de l’histone H3 (H3K27me3), ce qui constitue une marque répressive de l’expression génique. Cette méthylation est catalysée par le complexe PRC2, et sera reconnue par les protéines du complexe PRC1. PRC1 est notamment composé d’une lysine 119 histone H2A ubiquitine ligase E3 : il permet ainsi l’ubiquitinylation de ce résidu au niveau de l’histone H2A (Völkel et Angrand, 2007), ce qui entraînera la compaction de la chromatine au niveau de cette zone.

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

Plusieurs études ont mis en évidence un lien direct entre la méthylation de l’ADN et les modifications post-traductionnelles des histones. En effet, les DNMT1, 3A, 3B et 3L sont capables de recruter les enzymes HDACs ou encore la protéine EZH2 (Deplus *et al.*, 2002; Fuks, 2003; Fuks *et al.*, 2000, 2001; Viré *et al.*, 2006). De plus, la répression de l’expression génique apportée par les DNMTs est levée lorsque les cellules sont traitées avec un inhibiteur spécifique des HDACs. De cette façon, les enzymes impliquées dans les modifications

épigénétiques sont conjointement régulées et participent au verrouillage de la chromatine, et par conséquent à la répression de l'expression génique.

## B- Le locus *H19/IGF2*

---

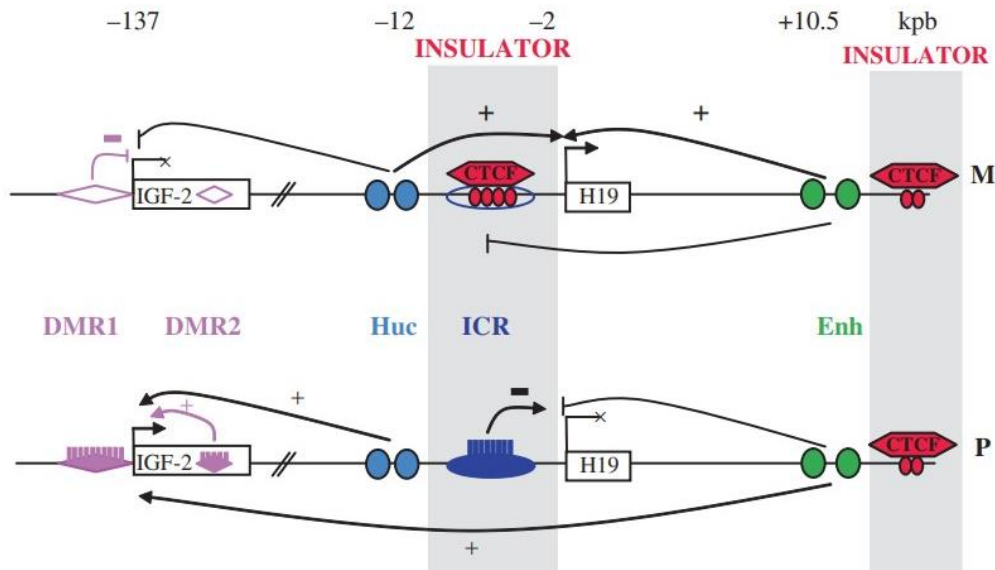
Le locus *H19/IGF2* est localisé sur le chromosome 11 en position p15. Il est soumis à l'empreinte génomique parentale et possède son propre centre de régulation de l'empreinte (**Figure 28**). Ce locus s'étend sur environ 140 kpb, et contient 2 gènes dont un ARN non codant : *IGF2* et *H19*.

Comme tous les gènes soumis à l'empreinte génomique, les gènes *H19* et *IGF2* sont fortement exprimés pendant le développement embryonnaire, et réprimés à partir de la naissance dans la majorité des tissus. Le gène *H19* est transcrit en un ARN non codant de 2,3 kb possédant un rôle anti-prolifératif pendant le développement embryonnaire (Brannan *et al.*, 1990; Hao *et al.*, 1993). Le gène *IGF2* code quant à lui pour un facteur de croissance (*insulin-like growth factor 2*) impliqué dans la croissance de l'embryon (DeChiara *et al.*, 1990).

### 1) Empreinte génomique parentale au locus *H19/IGF2*

L'empreinte génomique établie au niveau de ce locus est permise par la présence d'un ICR (DMR primaire) localisé 2 kpb en amont de la séquence du gène *H19* (Tremblay *et al.*, 1997) (**Figure 28**). Cet ICR contient 4 sites de fixation pour la protéine CTCF chez la souris et 7 sites chez l'homme (Hark *et al.*, 2000; Szabó *et al.*, 2000; Takai *et al.*, 2001). La protéine CTCF se fixe sur l'ICR uniquement lorsque ce dernier n'est pas méthylé. Elle y aura alors deux fonctions :

- elle empêche la méthylation *de novo* de cette région riche en îlots CpG
- elle joue un rôle "d'isolateur chromatinien" et permet la mise en place et le maintien de l'empreinte génomique



**Figure 28. Le locus *H19/IGF2* chez l'homme.**

L'expression des gènes *H19* et *IGF2* est contrôlée par le centre de régulation de l'empreinte génomique (ICR) ainsi que par deux sets d'enhancers (*Huc* et *Enh*). En l'absence de méthylation de l'ICR, la protéine CTCF se fixe sur celui-ci pour bloquer l'action des enhancers au niveau du promoteur d'*IGF2* (allèle maternel). De cette façon, à partir de l'allèle maternel, seul le gène *H19* est exprimé. A l'inverse, sur l'allèle paternel, la méthylation de l'ICR réprime l'expression de *H19* et empêche la fixation de CTCF. Les enhancers peuvent ainsi activer l'expression du gène *IGF2*. L'empreinte génomique parentale permet donc l'expression de *H19* à partir de l'allèle maternel, et l'expression d'*IGF2* à partir de l'allèle paternel. M : allèle maternel ; P : allèle paternel. (Issu de Berteaux et al., 2010).

L'expression des gènes du locus *H19/IGF2* est permise par deux sets d'enhancers d'origines mésodermique et endodermique, localisés respectivement à 12 kpb en amont du gène *H19* et 10,5 kpb en aval du même gène (Drewell et al., 2002; Ishihara et Sasaki, 2002) (**Figure 28**). L'action de ces enhancers est régulée par la méthylation de l'ICR et par la présence de CTCF. En effet, une région méthylée sur l'allèle paternel en amont du gène *H19* a été mise en évidence, montrant ainsi que la méthylation de l'ICR régule l'expression des gènes du locus (Hark et Tilghman, 1998).

De cette façon, comme l'ICR n'est pas méthylé sur l'allèle maternel, la protéine CTCF interagit avec cette région du locus pour empêcher l'action des enhancers sur le promoteur d'*IGF2*. Ainsi, seul le gène *H19* sera exprimé sur cet allèle (Hark et al., 2000). De plus, l'absence de méthylation au niveau des DMRs secondaires (DMR1, DMR2) localisées dans le promoteur et le gène *IGF2* sur ce même allèle réprime également l'expression d'*IGF2* (Constância et al., 2000) (**Figure 28**). De façon complémentaire, sur cet allèle, une acétylation des histones au niveau du promoteur de *H19* favorisant son expression a également été mise en évidence (Grandjean et al., 2001).

A l'inverse, la méthylation de l'ICR sur l'allèle paternel entraîne la répression de l'expression de *H19* (par hyperméthylation de son promoteur) et empêche la fixation de la protéine CTCF (Srivastava *et al.*, 2000). Les enhancers vont ainsi favoriser l'expression du gène *IGF2* à partir de cet allèle. De plus, la méthylation de l'ICR permet la méthylation des DMRs secondaires, qui vont alors activer l'expression d'*IGF2* sur cet allèle (Murrell *et al.*, 2001). Par conséquent, *H19* n'est exprimé qu'à partir de l'allèle maternel, tandis qu'*IGF2* ne l'est qu'à partir de l'allèle paternel (**Figure 28**).

Comme la grande majorité des gènes soumis à l'empreinte génomique parentale, les gènes *H19* et *IGF2* sont fortement exprimés et actifs pendant le développement embryonnaire. Plus précisément, leur expression a été localisée dans les tissus dérivés des trois feuilletts embryonnaires : les feuilletts endodermique, mésodermique et ectodermique (Hemberger *et al.*, 1998; Lustig *et al.*, 1994; Poirier *et al.*, 1991). Pendant le développement de l'embryon, ces gènes présentent un profil d'expression spatio-temporel identique puisqu'ils sont régulés par des enhancers communs (Ohlsson *et al.*, 1994). En revanche, à la naissance, ces gènes sont largement réprimés, excepté dans certains tissus où un niveau basal d'expression subsistera. En effet, l'expression du gène *H19* a été retrouvée dans le muscle squelettique (Leibovitch *et al.*, 1995; Milligan *et al.*, 2000; Pachnis *et al.*, 1984), ainsi que dans les poumons, le cœur, le thymus (Poirier *et al.*, 1991), la glande mammaire (Adriaenssens *et al.*, 1998; Dugimont *et al.*, 1995), les glandes surrénales (Liu *et al.*, 1995) et l'utérus (Ariel *et al.*, 1997). Pour autant, même à l'âge adulte, cette expression de *H19* reste exclusivement maternelle. En revanche, le gène *IGF2* est exprimé de façon biallélique dans le foie, le plexus choroïde et les leptoméniges (Feil *et al.*, 1994; Ohlsson *et al.*, 1994).

Ainsi, il existe une régulation spatio-temporelle de l'empreinte génomique parentale, ce qui prouve une fois de plus qu'il s'agit d'un mécanisme dynamique et finement régulé.

## 2) Modifications post-traductionnelles des histones au locus *H19/IGF2*

Des expériences de 3C (*chromosome conformation capture*) ont permis de montrer que la protéine CTCF joue un rôle dans l'organisation tridimensionnelle de la chromatine. En effet, CTCF est capable d'interagir avec plusieurs régions présentes au niveau du locus *H19/IGF2*, de façon à former des structures spatiales verrouillant l'expression de *H19* ou d'*IGF2* selon l'allèle considéré (Hagège *et al.*, 2007; Murrell *et al.*, 2004).

Dans le cadre de la mise en place de l'empreinte génomique parentale au locus

*H19/IGF2*, et en association avec la méthylation de l'ADN, des modifications épigénétiques ont également été mises en évidence. En effet, la protéine CTCF est capable de recruter la protéine SUZ12 (une sous-unité du complexe PRC2) au promoteur d'*IGF2* (Li *et al.*, 2008a; Zhang *et al.*, 2011). Ceci permettra d'induire la triméthylation de l'histone H3 (H3K27me3) à ce niveau, réprimant ainsi l'expression d'*IGF2* à partir de l'allèle maternel.

Par ailleurs, sur l'allèle paternel, la méthylation de l'ICR est reconnue par une protéine possédant un domaine MBD appelée MeCP2. Cette protéine, par l'intermédiaire d'un de ses domaines structuraux, est capable de recruter une HDAC et une histone méthyltransférase (HMT) (Drewell *et al.*, 2002b; Fuks *et al.*, 2003). Ces deux enzymes permettront ainsi de désacétyler puis de méthyler la lysine 9 de l'histone H3 (H3K9me3) au niveau du promoteur de *H19*, ce qui réprimera l'expression du gène.

Ainsi, la combinaison de la méthylation du promoteur par les DNMTs et de la désacétylation/méthylation des histones permet un "verrouillage chromatinien" réprimant l'expression du gène *H19* à partir de l'allèle paternel.

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

Des modifications de l'empreinte génomique au niveau du locus 11p15 ont été mises en évidence et associées à deux principaux syndromes développementaux : les syndromes de Beckwith-Wiedemann et de Silver-Russel. Ces deux pathologies, diagnostiquées pendant la grossesse ou à la naissance, sont caractérisées par des défauts de croissance de l'embryon.

Le syndrome de Beckwith-Wiedemann est diagnostiqué toutes les 12000 naissances environ. Il est caractérisé par un gigantisme du nouveau-né à la naissance, accompagné d'une viscéromégalie et d'une macroglossie pouvant entraîner des troubles de la nutrition, de l'élocution ainsi que des troubles du sommeil. De plus, ce syndrome est associé à une prédisposition de l'enfant atteint aux tumeurs rénales (tumeurs de Wilms) et aux rhabdomyosarcomes. Au niveau génétique, ce syndrome est causé par une expression biallélique du gène *IGF2* accompagnée d'une perte d'expression de *H19*. Cette perte d'expression est étendue à tous les gènes du locus 11p15 exprimés à partir de l'allèle maternel, qu'il s'agisse du locus *H19/IGF2* ou de son voisin *Kcnq1/Kcnq1ot1*. Pour autant, il est difficile d'associer ce syndrome à un seul de ces deux loci, puisque même s'ils sont indépendants, leur régulation semble avoir des points communs (Ideraabdullah *et al.*, 2008).

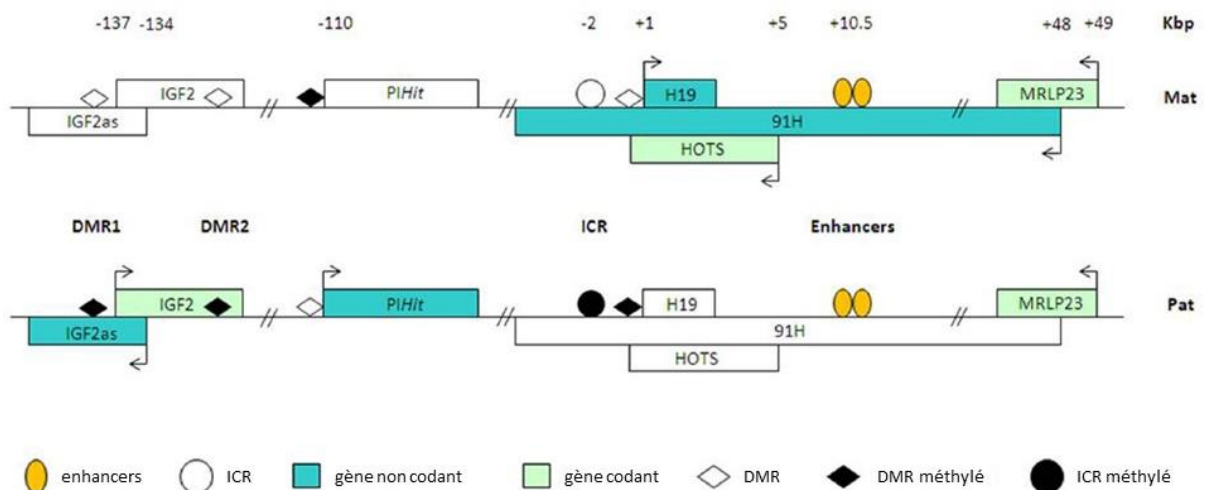
Le syndrome de Silver-Russell est plus rare, puisqu'il concerne 1 naissance sur 75000 à



100000. Il est caractérisé par un retard de croissance du nouveau-né, ainsi que par une dysmorphie faciale et une asymétrie corporelle dans 50 à 60% des cas. A l'inverse du syndrome de Beckwith-Wiedemann, le syndrome de Silver-Russell est causé par une perte d'expression d'*IGF2* associée à une expression biallélique du gène *H19*. Ce syndrome a également été associé à des mutations sur des gènes du chromosome 7.

#### 4) Autres transcrits produits au locus *H19/IGF2*

En plus des transcrits *H19* et *IGF2*, des transcrits supplémentaires ont été identifiés au niveau du locus *H19/IGF2* (**Figure 29**). Ces transcrits sont également soumis à l'empreinte génomique parentale : pour la majorité d'entre eux, il s'agit de transcrits antisens aux gènes *H19* et *IGF2*.



**Figure 29. Transcrits identifiés au locus *H19/IGF2*.**

Les transcrits non codants au locus *H19/IGF2* sont représentés en bleu lorsqu'ils sont exprimés. Les gènes codants sont représentés en vert lorsqu'ils sont exprimés. Les différences d'expression génique entre les allèles maternel et paternel sont représentées. Le statut de méthylation de l'ADN au niveau des éléments de régulation ICR et DMR est également indiqué.

Mat : allèle maternel ; Pat : allèle paternel. (Adapté de Angrand et al., 2015).

Le premier de ces transcrits a été identifié comme étant en orientation antisens par rapport au gène *IGF2* : il s'agit d'*IGF2as* (Okutsu et al., 2000). Ce gène est régulé de la même façon qu'*IGF2* et est exprimé à partir de l'allèle paternel (**Figure 29**), mais aucune phase ouverte de lecture n'y a été identifiée : le transcrit produit à partir de ce gène est donc un ARN non codant. Cet ARN n'a pas de fonction spécifique attribuée, mais son expression est un marqueur des tumeurs de Wilms. Pour autant, il a été mis en évidence que l'ARN *IGF2as* est exporté dans le cytoplasme pour y être associé aux polysomes : il est donc probable qu'une

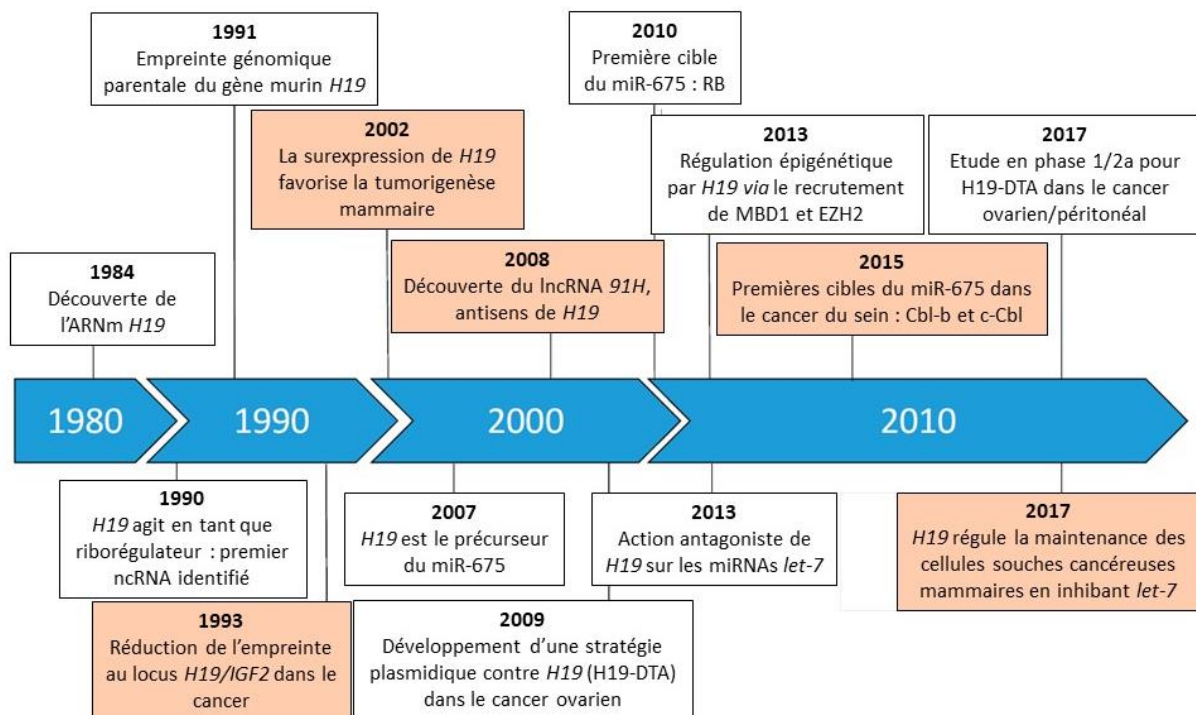
protéine soit produite à partir de cet ARN (Duart-Garcia et Braunschweig, 2013).

Plus récemment, notre équipe a démontré l'existence d'un gène transcrit à partir de l'allèle maternel et en orientation antisens par rapport au gène *H19* : nous l'avons nommé *91H* (Berteaux *et al.*, 2008). *91H* est un transcrit non codant de 120 kpb chez l'homme produit à partir d'un promoteur contenu dans l'intron 1 du gène *MRLP23*. Nous avons également mis en évidence que le lncRNA *91H* est surexprimé dans les cancers du sein, et qu'il y possède un rôle oncogène (Vennin *et al.*, 2017).

Un autre transcrit identifié au niveau du locus *H19/IGF2* est *PIHit* (*paternally-expressed IGF2/H19 intergenic transcript*) (Court *et al.*, 2011) (**Figure 29**). *PIhit* est transcrit à partir du gène du même nom, situé comme son nom l'indique au niveau de l'allèle paternel, en amont du gène *H19*.

## C- Le gène *H19*

### 1) Historique

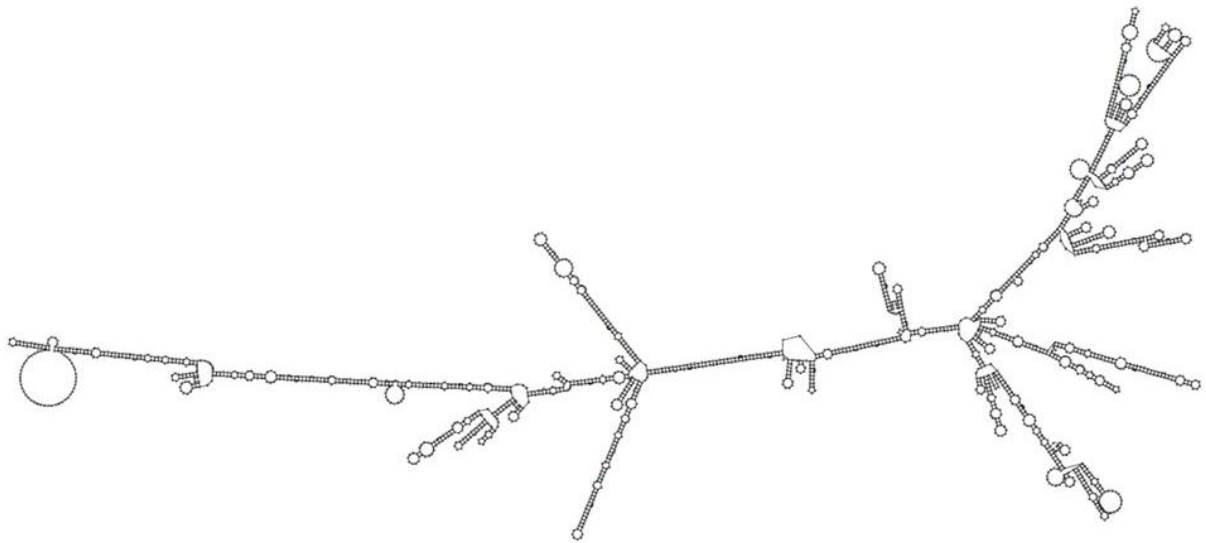


**Figure 30. Découvertes majeures concernant *H19* et son implication dans le cancer du sein.** Les informations concernant l'implication de *H19* dans le cancer du sein sont colorées en orange. (Adapté de Collette *et al.*, 2017).

Le gène *H19* a été identifié en 1984 dans le cadre d'une étude visant à identifier les gènes dont l'expression est contrôlée par les gènes *Rif* et *Raf*, qui régulent l'expression de l' $\alpha$ -

foetoprotéine après la naissance. Pour ce faire, une banque de données de foie foetal a été criblée chez la souris : le clone 19 de la ligne H fut identifié comme régulé par *Raf*, et nommé *H19* (Pachnis *et al.*, 1984, 1988). En 1991, il a été montré que chez la souris, le gène *H19* est soumis à l’empreinte génomique parentale (Bartolomei *et al.*, 1991). L’année suivante, le gène *H19* fut isolé chez l’homme, où il est également soumis à l’empreinte génomique (Zhang et Tycko, 1992). Les découvertes majeures sur le gène *H19* et les différentes fonctions qui lui ont été attribuées sont récapitulées dans la **Figure 30**.

Comme nous l’avons décrit dans le paragraphe précédent, le gène *H19* est exprimé uniquement à partir de l’allèle maternel. Il est constitué de 5 exons séparés par des introns très courts. Sa transcription est réalisée par l’ARN polymérase II, et produit un ARN de 2,3 kpb coiffé en 5’, épissé et polyadénylé en 3’, qui sera exporté dans le cytosol. L’ARN *H19* possède donc toutes les caractéristiques d’un ARNm classique : pourtant, il est admis que cet ARN a un rôle riborégulateur.



**Figure 31. Structure secondaire du lncRNA transcrit à partir du gène *H19*.**

La structure secondaire prédictive du lncRNA *H19* a été modélisée grâce au site <http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RFold.cgi>.

En effet, même si plusieurs codons d’initiation de la traduction ont été identifiés dans l’exon 1 de l’ARN *H19*, ils sont très rapidement suivis par des codons stop : les potentielles phases ouvertes de lecture (ORF, *open reading frame*) ainsi générées sont donc très courtes, et ne sont pas conservées entre les espèces (Brannan *et al.*, 1990). En revanche, les structures secondaires de l’ARN sont très conservées (Juan *et al.*, 2000). On retrouve ainsi 16 structures type épingle à cheveux conservées entre les mammifères (**Figure 31**).

Parmi les ORFs retrouvées dans la séquence de l'ARN *H19*, la plus grande permettrait la production théorique d'une protéine de 26 kDa. En 1996, il a été montré qu'il était possible d'obtenir cette protéine dans un système *in vitro* après délétion et/ou mutation ponctuelle de l'UTR 5' de *H19* (Joubel *et al.*, 1996). Cet UTR 5' réprime donc la traduction de l'ORF. En 1990, et ce pour la première fois, l'ARN *H19* est décrit comme un riborégulateur (Brannan *et al.*, 1990).

Nous avons également vu précédemment que l'expression du gène *H19* est impliquée dans la régulation de la croissance embryonnaire. Dans des souris où l'expression de *H19* a été diminuée (KD, *knock-down*), une augmentation de la taille et du poids d'environ 10% par rapport aux souris contrôles a été observée (Leighton *et al.*, 1995; Ripoche *et al.*, 1997). Pour autant, l'expression d'*IGF2* dans ces souris étant devenue biallélique, il est difficile de déterminer si l'effet observé sur le développement et la croissance est spécifique de *H19*. Plus tard, une étude a montré que la délétion d'inhibiteurs d'expression (*silencers*) spécifiques du gène *H19* permet son expression biallélique et entraîne la formation d'individus plus petits, alors que l'expression d'*IGF2* n'est pas modifiée (Drewell *et al.*, 2000). Ainsi, en conditions normales, le rôle de *H19* est de réduire la croissance de l'embryon.

## 2) [H19 et empreinte génomique](#)

Comme nous l'avons largement décrit dans le paragraphe précédent, l'expression du gène *H19* est soumise à l'empreinte génomique parentale. Son expression est donc exclusivement maternelle, et il est co-régulé avec le gène *IGF2*, qui lui est exprimé à partir de l'allèle paternel.

Il a été montré que *H19* peut agir sur son propre locus en régulant l'expression d'*IGF2* en *trans* (Lottin *et al.*, 2002; Wilkin *et al.*, 2000). En effet, ces deux gènes sont régulés par les mêmes sets d'enhancers, et sont donc en "compétition" pour ces derniers. De plus, une forte expression du gène *H19* est corrélée à une diminution de l'expression du gène *IGF2*, même si le mécanisme responsable de ce phénomène n'a pas encore été précisément décrit. De façon complémentaire, il a été montré que dans les cellules de choriocarcinome, l'ARN *H19* s'associe aux polysomes pour réprimer la traduction de l'ARNm *IGF2* (Li *et al.*, 1998), ce qui prouve que *H19* régule à la fois la transcription et la traduction d'*IGF2*.

Plus récemment, il a été montré que le lncRNA *H19* est capable de réguler l'expression de plusieurs gènes soumis à l'empreinte génomique parentale (Monnier *et al.*, 2013). En effet,

*H19* est capable d'interagir avec la protéine MBD1, qui contient un domaine MBD. Ainsi, en plus de se fixer sur les îlots CpG méthylés, MBD1 pourra recruter des HMTs, notamment Suv39 (Fujita *et al.*, 2003). L'association entre *H19* et MBD1 est nécessaire au maintien de l'empreinte génomique sur les gènes cibles, puisqu'elle va permettre le maintien de la marque répressive H3K9me3 catalysée par Suv39. Parmi les gènes ciblés par cette interaction, on retrouve *IGF2* : cette étude permet donc de révéler le mode d'action de *H19* pour réguler l'expression d'*IGF2*.

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

En plus de la régulation par l'empreinte génomique parentale, l'expression du gène *H19* est soumise à de nombreux facteurs, notamment les hormones, les facteurs de croissance ou encore certaines protéines.

#### a) Régulation hormonale

Dans la glande mammaire, notre équipe a mis en évidence un niveau basal d'expression du gène *H19* chez l'adulte (Adriaenssens *et al.*, 1998; Dugimont *et al.*, 1995). Pour autant, cette expression basale n'est retrouvée que dans certaines structures de la glande mammaire, et elle n'est pas constante au cours de son évolution (Adriaenssens *et al.*, 1999). Grâce à des expériences d'hybridation *in situ*, nous avons montré que l'expression de *H19* dans la glande mammaire est ubiquitaire durant le développement embryonnaire, mais qu'à la naissance *H19* est réprimé dans la majorité des cellules sauf dans les nouveaux bourgeons terminaux (à la puberté) et dans les cellules épithéliales des acini (pendant la grossesse). En revanche, pendant la lactation, *H19* n'est pas exprimé, mais son expression est retrouvée dans certaines cellules épithéliales pendant l'involution. Des variations du même ordre ont été retrouvées dans l'utérus : en effet, *H19* est fortement exprimé pendant les phases d'œstrus et de metœstrus, et il est réprimé pendant la phase de latence. Il semble donc que *H19* soit principalement exprimé dans les cellules épithéliales en prolifération. De façon complémentaire, notre équipe a montré que l'expression de *H19* est régulée positivement par le 17- $\beta$ -œstradiol et régulée négativement par la progestérone : l'expression de *H19* est donc corrélée aux variations hormonales de la glande mammaire.

## b) Régulation par les facteurs de croissance

Nous avons également montré que l'expression de *H19* est régulée positivement par plusieurs facteurs de croissance dans les cellules cancéreuses mammaires : les facteurs de croissance HGF/SF, EGF et FGF-2 (Adriaenssens *et al.*, 2002). Lorsqu'elles sont stimulées avec le HGF/SF, les cellules montrent non seulement une surexpression de *H19* mais aussi des capacités de prolifération et de migration augmentées. En complément, nous avons mis en évidence que ni le TNF- $\alpha$ , ni le TGF- $\beta$ 1, ni IGF2 ne sont capables de réguler l'expression de *H19* : ainsi, il n'existe pas de boucle de rétrocontrôle de l'expression de *H19* et *IGF2* dans les cellules mammaires.

De la même façon, nous avons montré que dans la prostate, l'expression de *H19* est régulée positivement par la prolactine (hormone peptidique impliquée dans le développement normal de la prostate et dans la fonction testiculaire), et négativement par la dihydrotestostérone (DHT, forme active de la testostérone) (Berteaux *et al.*, 2004). D'autres études ont montré que dans les glandes surrénales et les testicules, l'expression de *H19* est contrôlée par plusieurs facteurs : elle est activée par IGF-1, IGF-2 et l'acide rétinoïque, et elle est réprimée par le TGF $\beta$ , le TNF- $\alpha$  et l'INF $\gamma$  (Kopf *et al.*, 1998; Voutilainen *et al.*, 1994). Ainsi, selon le modèle considéré, les effets des hormones sur l'expression de *H19* peuvent être différents.

## c) Régulation par des protéines

Outre l'action des facteurs de croissance, il a également été montré que l'expression de *H19* est soumise à l'influence de certaines protéines ou de facteurs de transcription. Par exemple, nous avons identifié au niveau du promoteur de *H19* des éléments de réponse à la protéine p53 (Dugimont *et al.*, 1998). En effet, l'activité de la protéine p53 est associée à une diminution de l'expression de *H19*. A l'inverse, l'expression de *H19* peut être activée par des protéines comme E2F1 (Berteaux *et al.*, 2005). D'autres études ont montré que dans le cancer du sein et le cancer du poumon, l'expression de *H19* est également associée à l'action du facteur de transcription c-Myc, qui agit en formant un hétérodimère avec la protéine Max (Barsyte-Lovejoy *et al.*, 2006; Zhang *et al.*, 2016a). En effet, c-Myc est capable d'interagir avec des séquences spécifiques, appelées E-boxes, situées non loin de l'ICR du locus *H19/IGF2*. En recrutant des histones acétylases, c-Myc active la transcription du locus et augmente donc la production d'ARN *H19* : ces données suggèrent que *H19* participe aux effets oncogènes décrits

pour la protéine c-Myc. De façon similaire, la protéine oncogène YAP (*yes associated protein*) peut activer l'expression de *H19* dans le cancer de la vessie, et ainsi favoriser les capacités pro-tumorales de prolifération et de migration des cellules (Li *et al.*, 2015b).

Nous avons déjà exposé que l'expression de *H19* est corrélée à la surexpression du gène *Afp* codant l' $\alpha$ -foetoprotéine dans le foie fœtal (Pachnis *et al.*, 1984). En 2005, le locus contenant le gène *Afp* a été cartographié : ceci a permis d'identifier un autre gène appelé *Zhx*, orthologue du gène *Zhx2* chez l'homme (Perincheri *et al.*, 2005). Ce gène *Zhx* est régulé négativement par *H19* : en effet, chez des souris déficientes pour le gène *Zhx*, une forte expression du gène *H19* a été observée après la naissance. En complément, l'expression de *Zhx* est plus importante dans le foie adulte que dans le foie fœtal : l'expression de *Zhx* serait donc responsable de la répression de *H19* observée à la naissance.

#### d) Régulation par le micro-environnement tumoral

Nous avons vu que l'expression du gène *H19* peut être régulée par des facteurs intracellulaires variés. Dans une logique de contrôle complet et à plusieurs niveaux de l'expression génique, une influence du micro-environnement tumoral a également été observée. Nous avons notamment montré que dans la glande mammaire normale, *H19* est principalement exprimé au niveau des interactions entre l'épithélium et le mésenchyme (Adriaenssens *et al.*, 1999). De façon similaire, dans le cancer du sein, cette expression de *H19* est retrouvée au niveau des interactions entre l'épithélium mammaire et le stroma tumoral (Adriaenssens *et al.*, 1998; Dugimont *et al.*, 1995). De plus, lorsque les cellules épithéliales mammaires sont traitées avec un milieu conditionné de fibroblastes humains normaux (MRC-5), l'expression du gène *H19* augmente (Adriaenssens *et al.*, 2002). Ces cellules épithéliales mammaires montrent également des capacités de motilité et de morphogénèse accrues, qui sont des propriétés déjà connues pour ce milieu conditionné.

En fonction de leur distance par rapport à la circulation sanguine, les tumeurs sont constituées de zones plus ou moins hypoxiques. Il est communément admis que les zones hypoxiques sont responsables de la résistance aux chimiothérapies, puisqu'elles sont les plus éloignées des vaisseaux sanguins et donc pas ou peu accessibles aux drogues. Au sein des cellules contenues dans ces zones hypoxiques, deux voies sont majoritairement activées : la voie HIF-1 $\alpha$  et la voie p53. La voie HIF-1 $\alpha$  permettra aux cellules de s'adapter à leur nouvel environnement, tandis que l'activation de la voie p53 mène à la mort cellulaire. Il a été mis en

évidence que le facteur HIF-1 $\alpha$  active l'expression de *H19* uniquement lorsque la protéine p53 est mutée (Matouk *et al.*, 2010). Ceci est en accord avec les résultats obtenus par notre équipe, puisque nous avons montré que p53 réprime l'expression de *H19* (Dugimont *et al.*, 1998). Ainsi, en conditions hypoxiques, l'expression de *H19* favorise l'adaptation et la survie des cellules, ce qui leur confère un avantage sélectif de croissance.

#### e) Régulation post-transcriptionnelle

Jusqu'à présent, nous avons exposé de nombreux facteurs et évènements qui régulent l'expression du gène *H19*, constituant ainsi un mode de contrôle transcriptionnel. Il existe également des voies de régulation post-transcriptionnelle de *H19*, qui vont agir directement sur l'ARN. Par exemple, il a été montré que l'accumulation d'ARN *H19* dans les cellules musculaires de souris est due à sa stabilisation par une protéine inconnue (Milligan *et al.*, 2000). Ce mode de régulation avait déjà été décrit dans le foie fœtal (Jouvenot *et al.*, 1999). Dans les tumeurs de souris, d'autres études ont mis en évidence que l'association entre l'ARN *H19* et la protéine CRD-BP (*cMyc mRNA coding region instability determinant binding protein*) permet une stabilisation de l'ARN et sa relocalisation (Tessier *et al.*, 2004). Chez l'homme, un orthologue de la protéine CRD-BP appelé IMP1 (*IGF-2 mRNA binding protein 1*) possède des sites de fixation au niveau des exons 4-5 de l'ARN *H19*. IMP1 fait partie d'une famille de protéines dont l'expression est localisée dans les lamellipodes et les régions périnucléaires des fibroblastes (Nielsen *et al.*, 2001; Runge *et al.*, 2000). Plus tard, il a été montré que la protéine IMP3 se fixe sur l'ARN *H19 in vivo*, bien que l'inactivation de IMP3 n'affecte pas le niveau d'expression de *H19* (Liao *et al.*, 2005).

#### D- *H19* & cancer

---

De façon intéressante, il a été mis en évidence que les cellules embryonnaires et les cellules cancéreuses partagent des caractéristiques communes, notamment sur l'aspect de leur prolifération accrue, de leur plasticité ou encore de leurs profils d'expression génique. Toutes ces caractéristiques cellulaires sont régies et coordonnées par des voies de signalisation moléculaires et des mécanismes épigénétiques communs. Un des régulateurs communs entre le développement embryonnaire et la tumorigenèse est le lncRNA *H19*.

Dans le cadre de l'implication de *H19* dans la tumorigenèse et la progression tumorale,



j'ai rédigé une revue de la littérature qui a été publiée dans un journal soumis à comité de lecture (**Annexe 1**).

### 1) H19 : oncogène ou suppresseur de tumeur ?

Même si la grande majorité des études actuelles décrivent le lncRNA *H19* et son miR-675 comme étant des acteurs pro-oncogéniques, certaines publications ont mis en évidence un rôle suppresseur de tumeur pour *H19*. Cette ambiguïté peut être expliquée par l'étude assez complexe de *H19*, puisqu'aucune protéine associée à cet ARN n'a été identifiée, et qu'il est soumis à un système de régulation complexe. Pour autant, les premières études ont montré que l'absence d'expression du gène *H19* était associée au développement du syndrome de Beckwith-Wiedemann, ce qui lui suggère un rôle protecteur dans cette pathologie (Reik *et al.*, 1995). De façon complémentaire, cette absence d'expression de *H19* est également responsable de l'apparition de tumeurs de Wilms (tumeurs rénales) chez l'enfant (Rainier *et al.*, 1993).

Pour identifier le rôle de *H19* dans les cancers, une étude a été réalisée en 2008 sur des modèles murins transgéniques pour le locus *H19/IGF2*. Deux types de souris ont été utilisés :

- des souris *H19 $\Delta$ 3* (délétion du gène *H19* sur l'allèle maternel)
- des souris *H19 $\Delta$ Enh* (délétion des enhancers en aval du gène *H19* sur l'allèle maternel)

Ces souris ont ensuite été croisées avec des souris transgéniques formant des tumeurs spontanées chez l'embryon, mais aussi au niveau du côlon et du foie chez l'adulte (Yoshimizu *et al.*, 2008). Ceci a permis de mettre en évidence que l'absence d'expression de *H19* favorise l'apparition de tumeurs, et permet également l'obtention de tumeurs plus grosses pour les trois types de tumeurs étudiés (tératome, côlon et foie). Ces tumeurs ont été obtenues au stade embryonnaire ou 4 mois après la naissance, et une légère surexpression du gène *IGF2* y a été identifiée. Cependant, des résultats similaires ont été obtenus avec des souris où l'expression d'*IGF2* est invalidée (*IGF2<sup>-/-</sup>*) : ceci confirme que l'effet observé sur la tumorigenèse est bien lié à l'absence d'expression de *H19*. Ainsi, *H19* aurait donc un rôle suppresseur de tumeur pendant le développement embryonnaire et après la naissance.

Plus récemment, des études portant sur l'activité de la télomérase ont mis en évidence une implication de *H19*. En effet, dans un modèle de leucémie aigue promyélocytaire, *H19* inhibe l'activité de la télomérase en empêchant l'interaction TERT et *TERC* (El Hajj *et al.*, 2018).

Cependant, dans un contexte différent (cancer du foie), il a été montré que *H19* est capable de favoriser l'activité de la télomérase par un autre mécanisme (Pu *et al.*, 2015). Cet exemple illustre la complexité d'associer un rôle oncogénique ou suppresseur de tumeur à *H19*, bien que comme nous allons le voir dans les paragraphes suivants, la majorité des études associent *H19* à la tumorigenèse et la progression tumorale.

## 2) Surexpression de *H19* dans le cancer

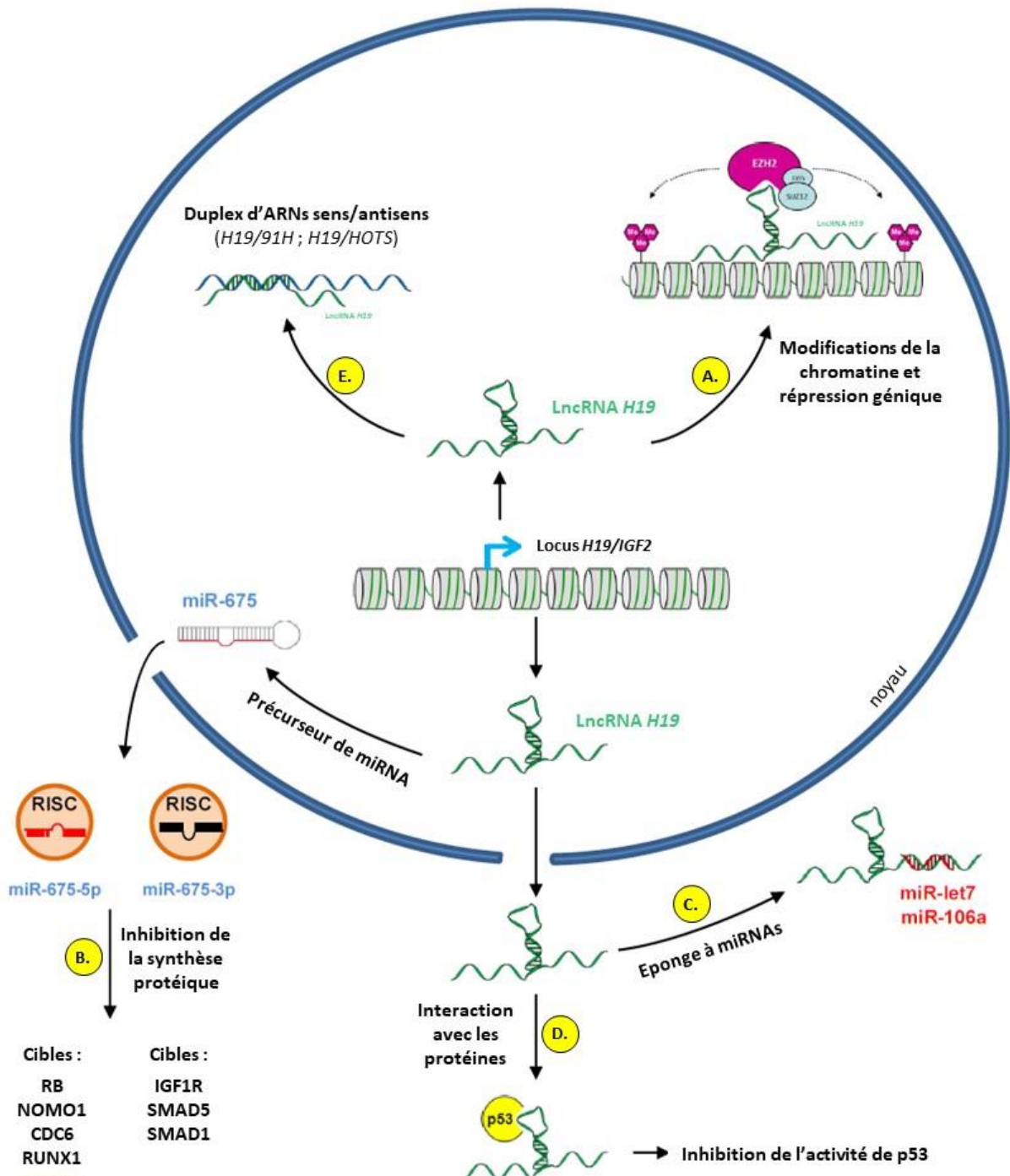
Comme nous l'avons exposé, *H19* est exprimé pendant le développement embryonnaire et réprimé à la naissance, excepté dans quelques tissus comme la glande mammaire et l'utérus. Pour autant, son expression *de novo* a été identifiée dans des tumeurs d'origines tissulaires variées, parmi lesquelles on retrouve des tumeurs mammaires, hépatiques, pulmonaires ou encore œsophagiennes (Adriaenssens *et al.*, 1998; Ariel *et al.*, 1998; Cooper *et al.*, 1996; Hibi *et al.*, 1996; Kondo *et al.*, 1995; Rainier *et al.*, 1993; Raveh *et al.*, 2015). Une méta-analyse basée sur l'étude de différents modèles cancéreux a également été réalisée, et a montré chez les patients une corrélation entre forte expression de *H19* et mauvais pronostic (Liu *et al.*, 2016b). Plus récemment, cette forte expression de *H19* a été corrélée avec un faible niveau de rémission et une survie moindre des patients atteints de leucémie myéloïde (Zhang *et al.*, 2018a).

Dans le cancer du sein, notre équipe a mis en évidence que le lncRNA *H19* est surexprimé dans plus de 70% des cas de cancer du sein (Adriaenssens *et al.*, 1998; Dugimont *et al.*, 1995). De plus en plus d'études mettent en évidence le rôle de *H19* comme marqueur de diagnostic de cancers du sein, de l'estomac ou encore du poumon (Luo *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2016b; Zhou *et al.*, 2015a). De façon complémentaire, nous avons montré que dans le cancer du sein, l'expression de *H19* est régulée positivement par le facteur E2F1, ce qui favorise la progression dans le cycle cellulaire ainsi que les propriétés tumorigènes des cellules cancéreuses mammaires (Berteaux *et al.*, 2005; Lottin *et al.*, 2002).

## 3) Modes d'action de *H19* dans le cancer

Au fur et à mesure de l'avancée de la recherche, de nombreux modes d'action pro-tumorigènes ont été associés au lncRNA *H19*. L'ensemble de ces mécanismes, combinés aux cibles du miR-675 dont il est le précurseur, favorisent la tumorigenèse et la progression tumorale. L'implication de *H19* a notamment été démontrée dans l'augmentation de la

prolifération, de la migration/invasion ou encore de la résistance des cellules cancéreuses (voir **Annexe 1**).



**Figure 32. Modes d'action du lncRNA H19 dans le cancer.**

Le lncRNA H19 contrôle l'expression du génome à de nombreux niveaux. H19 peut agir au niveau de l'organisation de la chromatine grâce au recrutement du complexe de remodelage de la chromatine PRC2 (A), mais aussi au niveau post-transcriptionnel en tant que précurseur des miR-675-5p et miR-675-3p (B) ou en tant qu'éponge à miRNAs (C). H19 peut également interagir directement avec certaines protéines comme p53 pour les inactiver (D). D'autres appariements sont possibles, comme

avec les transcrits antisens 91H et HOTS (**E**). (Adapté de Angrand et al., 2015).

Comme il a été décrit précédemment pour les lncRNAs en général (voir **paragraphe III-B**), *H19* possède de nombreux modes d'action à la fois dans le noyau et dans le cytoplasme des cellules. Notamment, *H19* est capable d'interagir avec le complexe PRC2 dans différents modèles comme le cancer de la vessie ou le cancer du sein, pour le guider jusqu'à ses gènes cibles et entraîner leur répression (Luo et al., 2013; Si et al., 2016). Le lncRNA *H19* peut également former des duplex d'ARNs avec les ARNs antisens transcrits à partir du locus *H19/IGF2*, comme *91H* ou *HOTS*. *H19* est aussi impliqué dans la régulation de l'expression génique, en tant que précurseur du miR-675, en tant qu'éponge à miRNAs, ou encore en tant qu'interactant protéique (**Figure 32**).

Nous avons déjà exposé les rôles de *H19* dans le contrôle de la condensation de la chromatine ainsi que l'hybridation avec les ARNs antisens du locus (**Figure 32.A et 32.E**), nous allons donc dans ce paragraphe nous focaliser sur ses autres mécanismes d'action.

#### a) Précurseur du miR-675

En 2007, il a été démontré que le lncRNA *H19* est un précurseur de miRNA : les miR-675-5p et miR-675-3p (Cai et Cullen, 2007) (**Figure 32.B**). Ces deux miRNAs sont produits à partir d'une structure en tige-boucle contenue dans l'exon 1 de *H19* et conservée entre les espèces. La synthèse de ces miRNAs se fait par la voie canonique : elle dépend donc des enzymes Drosha et Dicer (voir **paragraphe IV-B-1**). La première cible du miR-675 a été identifiée quelques années plus tard : il s'agit du gène suppresseur de tumeur *Rb*, dans les cellules cancéreuses de côlon. En effet, le miR-675-5p se fixe sur l'UTR 3' de l'ARNm de *Rb* pour réduire son expression. L'action du miR-675 est donc pro-oncogénique, tout comme l'est l'action de *H19* (Tsang et al., 2010).

Depuis, de nombreuses cibles du miR-675 ont été mises en évidence, dans le modèle cancéreux comme dans le modèle de développement normal. En effet, il a été montré que dans les cellules du placenta, le miR-675-3p réprime l'expression d'*IGF1R* en induisant la dégradation de son ARNm (Keniry et al., 2012). Cette étude met également en évidence que la synthèse du miR-675 n'est pas constante pendant le développement de l'embryon, bien que l'expression de *H19* le soit. L'expression du miR-675-3p n'est détectée qu'à partir du 11<sup>ème</sup> jour de développement embryonnaire, et ce dans les cellules du placenta uniquement, sans

variation du niveau d'expression de *H19*. Pour expliquer ce phénomène, il a été montré que l'expression du miR-675 est réprimée par la protéine HuR : cette protéine se fixe sur l'ARN *H19* en amont de la séquence du pri-miR-675 de façon à masquer le site de clivage. De cette façon, HuR empêche l'action de Drosha. Au 11<sup>ème</sup> jour de développement embryonnaire, l'expression de HuR diminuant fortement, la synthèse du miR-675 va augmenter et le miR-675 pourra interagir avec ses cibles dans le tissu. Cette régulation permettra une diminution de la croissance du placenta, qui représente une étape nécessaire à la préparation de l'accouchement.

Type de cancer	Cibles du miR-675	Fonction du gène ciblé	Référence
<i>Gliome</i>	Cadhérine 13	Cadhérine atypique sans domaine cytoplasmique	Shi <i>et al.</i> , 2014
<i>Cancer du sein</i>	Cbl-b, c-Cbl	Ubiquitine ligases E3	Vennin <i>et al.</i> , 2015; Wang <i>et al.</i> , 2017
<i>Cancer du poumon</i>	GRP55	Récepteur couplé aux protéines G	He <i>et al.</i> , 2015
<i>Carcinome épidermoïde œsophagien</i>	REPS2	Répresseur de la prolifération et de la migration cellulaire	Zhou <i>et al.</i> , 2016
<i>Cancer de l'estomac</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• FADD</li> <li>• RUNX1</li> <li>• CALN1</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Adaptateur apoptotique qui recrute la caspase 8 ou 10</li> <li>• Facteur de transcription</li> <li>• Protéine de liaison au calcium</li> </ul>	Yan <i>et al.</i> , 2017 Liu <i>et al.</i> , 2016b Li <i>et al.</i> , 2014
<i>Cancer du foie</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• HP1</li> <li>• RB</li> <li>• TWIST1</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Assembleur et régulateur de l'hétérochromatine</li> <li>• Suppresseur de tumeur</li> <li>• Facteur de transcription impliqué dans l'EMT</li> </ul>	Li <i>et al.</i> , 2015a Hernandez <i>et al.</i> , 2013 Hernandez <i>et al.</i> , 2013
<i>Cancer colorectal</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• RB</li> <li>• DDB2</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Suppresseur de tumeur</li> <li>• Répresseur transcriptionnel</li> </ul>	Tsang <i>et al.</i> , 2010 Costa <i>et al.</i> , 2017
<i>Cancer de l'ovaire</i>	Slug	Facteur de transcription impliqué dans l'EMT	Matouk <i>et al.</i> , 2014
<i>Ostéosarcome</i>	CALN1	Protéine de liaison au calcium	Gong <i>et al.</i> , 2018

**Tableau 7. Cibles connues du miR-675 dans le cancer.**  
(Adapté de Lecerf *et al.*, 2019).

Ainsi, le miR-675, généré par le lncRNA *H19*, contribue à la fois au développement de l'embryon, mais aussi à la progression tumorale, ce qui fait également de lui un régulateur commun entre les cellules embryonnaires et les cellules cancéreuses, au même titre que son précurseur *H19*. Dans la tumorigenèse, de nombreuses cibles du miR-675 ont été identifiées (**Tableau 7**). Ces cibles sont impliquées dans des processus variés, comme la prolifération cellulaire, la migration/invasion cellulaire (par régulation de l'EMT) ou encore l'apoptose.

#### b) Eponge à miRNAs

Le lncRNA *H19* a une relation double vis-à-vis des miRNAs : nous venons de voir qu'il est le précurseur du miR-675, mais *H19* a également une action négative sur les miRNAs. En effet, comme les autres lncRNAs, *H19* joue le rôle d'éponge en fixant les miRNAs de façon à les séquestrer et ainsi inhiber leur action (**Figure 32.C**). De cette façon, 4 sites de fixation pour les miRNAs de la famille *let-7*, qui sont impliqués dans la différenciation des cellules souches, ont été identifiés sur l'ARN *H19* (Kallen *et al.*, 2013). Son interaction avec *H19* empêche la fonction de *let-7*, puisque lorsque *H19* n'est pas exprimé, une augmentation de la différenciation des cellules musculaires est observée. *H19* régule donc la quantité de miRNA *let-7* ainsi que son activité dans un tissu, permettant l'expression de ses gènes cibles.

La fonction d'éponge à miRNAs du lncRNA *H19* a également été mise en évidence dans le cancer : dans les cellules cancéreuses ovariennes et dans les myoblastes, *H19* peut interagir avec le miR-106a puisque des éléments de réponse à ce miRNA ont été identifiés au niveau de l'exon 1 de *H19*. Cette interaction permet l'augmentation de l'expression des cibles du miR-106a, favorisant ainsi la prolifération cellulaire (Imig *et al.*, 2015). Par sa fonction d'éponge, *H19* favorise également la transition épithélio-mésenchymateuse des cellules cancéreuses : *H19* fixe le miR-138 et le miR-200a dans le cancer colorectal ainsi que le miR-141 dans le cancer gastrique, favorisant ainsi l'expression des protéines ZEB1 et ZEB2 (*zinc finger E-box-binding homeobox 1/2*), qui sont des facteurs de transcription activant l'expression de facteurs mésenchymateux (Liang *et al.*, 2015; Zhou *et al.*, 2015b). Ainsi, par sa fonction d'éponge, *H19* favorise la migration et l'invasion des cellules cancéreuses, et est donc impliqué dans la dissémination métastatique.

### c) Interactant protéique

Une autre fonction a été décrite pour le lncRNA *H19* : en effet, outre les miRNAs, *H19* est également capable de se fixer sur plusieurs protéines pour orienter leur fonction (**Figure 32.D**). Nous avons déjà cité le fait que *H19* est capable d'interagir avec la protéine EZH2, de façon à recruter le complexe de remodelage de la chromatine PRC2 pour le guider jusqu'à la séquence de ses gènes cibles. Par exemple, dans le cancer du sein, *H19* interagit avec EZH2 de façon à réprimer l'expression du gène *Bik* (*BCL2-interacting killer*) et ainsi augmenter la chimiorésistance des cellules (Si *et al.*, 2016). L'interaction entre *H19* et EZH2 a également été décrite dans le cancer de la vessie, où elle entraîne la répression de l'E-cadhérine et favorise ainsi l'EMT ainsi que la dissémination métastatique (Luo *et al.*, 2013).

Par ailleurs, d'autres études ont montré que le lncRNA *H19* est capable d'interagir avec d'autres protéines comme p53. Dans le cancer gastrique, l'association entre *H19* et p53 est corrélée à une augmentation de la prolifération cellulaire (Yang *et al.*, 2012). L'hypothèse émise stipule que la fixation de *H19* sur la protéine p53 entraîne une diminution de l'activité de cette dernière. En effet, comme nous l'avons vu précédemment (voir **paragraphe II-C-2**)), p53 est une protéine suppresseur de tumeur activée suite à l'endommagement de l'ADN. p53 pourra alors induire un arrêt du cycle si les dommages sont réparables, ou induire l'apoptose des cellules si les dommages sont trop importants. De cette façon, lorsque *H19* empêche la fonction de p53, il favoriserait l'instabilité génomique des cellules cancéreuses et par conséquent la progression tumorale.

**Même si l'action du lncRNA *H19* est sujette à débat dans certains modèles, tous ses modes d'action décrits tendent à favoriser la tumorigenèse et la progression tumorale. Du fait de sa forte expression dans le cancer du sein combinée à l'action oncogène du miR-675 dont il est le précurseur, il est nécessaire de décrypter tous les effets et partenaires moléculaires associés à *H19*, dans le but de pouvoir mettre au point des stratégies thérapeutiques adaptées.**





# **PRESENTATION DE LA THESE & OBJECTIFS**



## Présentation de la thèse & objectifs

---

Le cancer du sein reste, à ce jour, un problème de santé publique majeur en France et dans le monde. Le développement de nouvelles méthodes de diagnostic et la mise en place de stratégies thérapeutiques innovantes ont nettement contribué à améliorer la prise en charge des patientes atteintes d'un cancer du sein. Cependant, bien que la mortalité par cancer du sein chez les femmes soit en légère diminution en France, le nombre de nouveaux cas ne cesse d'augmenter chaque année. La compréhension des mécanismes impliqués dans la tumorigenèse et la progression tumorale mammaire s'avère nécessaire, afin de prévenir l'apparition du cancer du sein tout en améliorant la survie des patientes. Dans ce contexte, les lncRNAs sont impliqués dans de nombreux processus cellulaires grâce à leurs modes d'action variés. Leur action a été montrée dans la régulation de l'expression génique, mais aussi dans la régulation de l'activité protéique. Dans de nombreux cas, la dérégulation des lncRNAs est associée à des troubles pathologiques. Le premier lncRNA découvert, *H19*, est impliqué dans la tumorigenèse et la progression tumorale mammaire. En effet, notre équipe a montré que l'expression de *H19* augmente les capacités tumorigènes des cellules cancéreuses mammaires, mais les mécanismes mis en jeu restent peu précis.

Mon travail de thèse a ainsi consisté à **caractériser les mécanismes moléculaires de la tumorigenèse et de la progression tumorale régulés par le lncRNA *H19* dans les cellules cancéreuses mammaires.**

Pour répondre à cet objectif, j'ai dans un premier temps étudié les mécanismes de régulation de la protéine p53 par *H19*. En effet, des données préliminaires disponibles au laboratoire montraient une action répressive de *H19* sur p53. J'ai pu montrer que *H19* régule négativement p53 ainsi que ses phénotypes associés, de façon à favoriser l'instabilité génomique des cellules cancéreuses mammaires. Pour approfondir l'investigation sur cet aspect, j'ai ensuite étudié les mécanismes de réparation des dommages de l'ADN, en lien avec la répression de p53 dans notre modèle d'étude. J'ai mis en évidence que *H19* est impliqué dans la réponse aux dommages de l'ADN pour accélérer la réparation des cassures de l'ADN et ainsi favoriser la survie des cellules cancéreuses. Enfin, j'ai également travaillé sur un autre projet de l'équipe, consacré à la régulation des cellules souches cancéreuses mammaires et de la dissémination métastatique par *H19*, qui a permis de déterminer la contribution relative de *H19* et de son miR-675 dans la progression tumorale mammaire.



# **MATERIELS ET METHODES**



## I – Culture cellulaire

### A- Entretien des lignées

---

La lignée cancéreuse mammaire humaine MCF-7 (ATCC) est cultivée dans du milieu DMEM (Gibco) complémenté de 10% de SVF (sérum de veau fœtal) (Dutscher) et de ZellShield® (Clinisciences). Nous avons également utilisé d'autres lignées dérivées des MCF-7 natives : les MCF-7-pcDNA3.1-H19 surexprimant le long ARN non codant *H19* (Vennin *et al.*, 2015), les MCF-7-pDRGFP exprimant le vecteur pDRGFP rapporteur de la réparation de l'ADN par HR, les MCF-7-pimEJ5GFP exprimant le vecteur pimEJ5GFP rapporteur de la réparation de l'ADN par NHEJ, et les MCF-7-pEZH2-EGFP exprimant une protéine de fusion EZH2-EGFP.

La lignée cancéreuse mammaire humaine MDA-MB-231 (ATCC) est cultivée dans du milieu RPMI (Gibco) complémenté de 10% de SVF (Dutscher) et de ZellShield® (Clinisciences). Nous avons également utilisé d'autres lignées dérivées des MDA-MB-231 natives : les MDA-MB-231-pcDNA3.1-H19 surexprimant le long ARN non codant *H19* (Vennin *et al.*, 2015), et les MDA-MB-231-pEGFP-C1-miR-675 surexprimant le miR-675 (Vennin *et al.*, 2015).

La lignée cancéreuse humaine T-47D (ATCC) est cultivée dans du milieu RPMI (Gibco) complémenté de 10% de SVF (Dutscher) et de ZellShield® (Clinisciences). Nous avons également utilisé une lignée T-47D-pcDNA3.1-H19 surexprimant le long ARN non codant *H19* dérivée de la lignée native.

La lignée cancéreuse humaine SUM159PT (ATCC) est cultivée dans du milieu F12 (Gibco) complémenté de 10% de SVF (Dutscher), et pour 500 mL de milieu : 5 mL de HEPES (1 M, Gibco), 2 mL de Pénicilline-Streptomycine (Pénicilline : 10000 unités/mL, Streptomycine : 10 mg/mL ; Gibco), 500 µL d'insuline (#I9278, Sigma-Aldrich) et 27,8 µL d'hydrocortisone (50 µM, Sigma-Aldrich). Nous avons également utilisé une lignée SUM159PT-pH19-mCherry exprimant la protéine fluorescente mCherry sous contrôle du promoteur du gène *H19* (Peperstraete *et al.*, 2020) dérivée de la lignée native.

La lignée cancéreuse humaine Calu-6 (ATCC) est cultivée dans du milieu RPMI (Gibco) complémenté de 10% de SVF (Dutscher) et de 1% de ZellShield (Clinisciences). Nous avons également utilisé une lignée Calu-6-pcDNA3.1-H19 surexprimant le long ARN non codant *H19* dérivée de la lignée native.

La lignée animale CHO-K1 (ATCC) est cultivée dans du milieu F12 (Gibco) complémenté

de 10% de SVF (Dutscher) et de ZellShield® (Clinisciences). Nous avons également utilisé une lignée CHO-K1-pcDNA3.1-H19 surexprimant le long ARN non codant *H19* dérivée de la lignée native.

Les lignées MCF-7 et T-47D sont de type "luminal-like", elles expriment les récepteurs aux œstrogènes et à la progestérone mais pas le récepteur HER2. Les lignées MDA-MB-231 et SUM159PT sont de type "basal-like", elles n'expriment ni les récepteurs aux œstrogènes, ni le récepteur à la progestérone, ni le récepteur HER2. Les lignées MCF-7, MDA-MB-231 et T-47D proviennent de patientes atteintes d'un adénocarcinome métastatique du sein. La lignée SUM159PT provient d'une tumeur primaire de cancer du sein. La lignée Calu-6 provient d'un adénocarcinome métastatique pulmonaire. La lignée CHO-K1 provient de l'épithélium ovarien de hamster chinois. Les lignées MDA-MB-231, SUM159PT et Calu-6 sont mutées pour *TP53*. Les lignées SUM159PT et Calu-6 sont mutées pour *KRas*.

Chaque lignée est entretenue en flasque de 75 cm<sup>2</sup> maintenue sous atmosphère humide, à 37°C et 5% de CO<sub>2</sub>. À pré-confluence, les cellules sont dissociées avec de la trypsine/0,25% EDTA (Gibco) et réensemencées au dixième.

## B- Irradiation

---

Les cellules sont irradiées en monocouche, à température ambiante. Dix mille cellules sontensemencées la veille de l'irradiation par puits de chambre de culture Lab-Tek™ (Thermo Fisher Scientific). Toutes les irradiations ont été effectuées au Centre Oscar Lambret de Lille à l'aide d'un accélérateur de basse énergie (Clinac 23EX, Varian), par des photons de 20 MV, un collimateur de 150 mm et un débit dose de 2,63 Gy/min. Une dose de 2 Gy est délivrée en une seule fraction. L'analyse des cellules est réalisée à 0 min, 30 min, 1h, 2h, 3h et 4h après irradiation.

## C- Traitements

---

Les cellules sont traitées en boîte 100 mm<sup>2</sup>, en boîte 60 mm<sup>2</sup> ou en chambre de culture Lab-Tek™ (Thermo Fisher Scientific) selon le type d'analyse réalisé en aval. Les cellules sont traitées à la bléomycine (203401, Merck) 24h après ensemencement, à une concentration de 30 µg/mL pendant 2h à 37°C. L'arrêt du traitement est effectué après rinçage des cellules au PBS 1X puis changement du milieu de culture. Les cellules sont analysées à 0 min, 1h et 2h de traitement, ainsi qu'à 30 min, 1h, 2h, 3h et 4h après arrêt du traitement.



Les cellules sont traitées à la doxorubicine (D1515 ; Sigma-Aldrich) 24h après ensemencement, à une concentration de 0,2 µg/mL pendant 24h à 37°C. L'arrêt du traitement est effectué après rinçage des cellules au PBS 1X. Les cellules sont analysées immédiatement après l'arrêt du traitement.

## II – Transfections

### A- Mise au point des plasmides

---

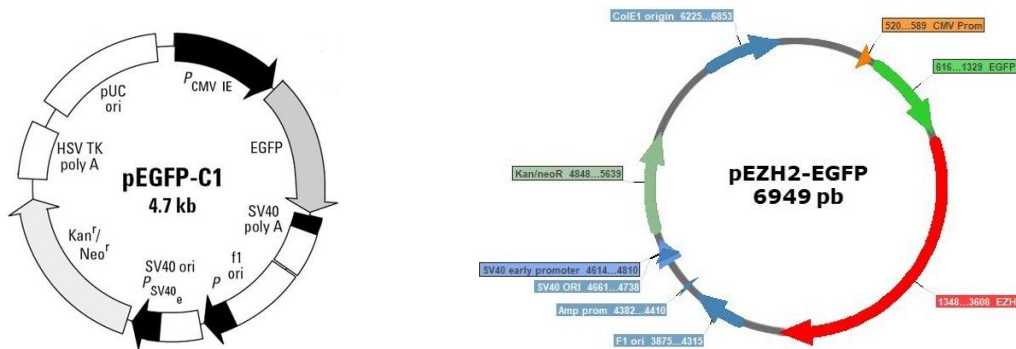
Les plasmides pcDNA3.1-H19 et pEGFP-C1-miR-675 étaient déjà disponibles au laboratoire. Les plasmides pDRGFP et pimeEJ5GFP ont été récupérés par notre collaboration avec l'équipe de Bruno Lefebvre (Canther UMR9020-UMR1277).

#### 1) Obtention du plasmide pEZH2-EGFP

La séquence nucléotidique du gène *ezh2* (NM\_004456.5) a d'abord été amplifiée par PCR avec les amorces EZH2\_cloning\_Bam et EZH2\_cloning\_Xho (**Tableau 8**) à partir d'un plasmide pcDNA3.1 (Invitrogen) contenant la séquence d'*ezh2* (**Figure 33**). Ces amorces spécifiques contiennent dans leur séquence les sites de restriction des enzymes *Bam*HI ou *Xho*I, permettant ainsi de les insérer aux extrémités de la séquence d'*ezh2*. L'amplicon (2256 nt) a ensuite été purifié sur gel d'agarose (MinElute® Gel Extraction kit, Qiagen) puis cloné dans un vecteur intermédiaire pCR®II-TOPO® (Invitrogen) par PCR. Une digestion enzymatique de ce vecteur est réalisée, en parallèle d'une linéarisation du vecteur pEGFP-C1 pour y cloner la séquence d'*ezh2* par restriction-ligation enzymatique. Le vecteur est ensuite amplifié dans des bactéries chimiocompétentes One Shot™ TOP10 (Thermo Fisher Scientific). Après criblage des colonies, la purification des plasmides est réalisée avec le kit Qiaprep Spin mini/midiprep (Qiagen). Les plasmides sont vérifiés par digestion enzymatique puis envoyés en séquençage (GATC Biotech).

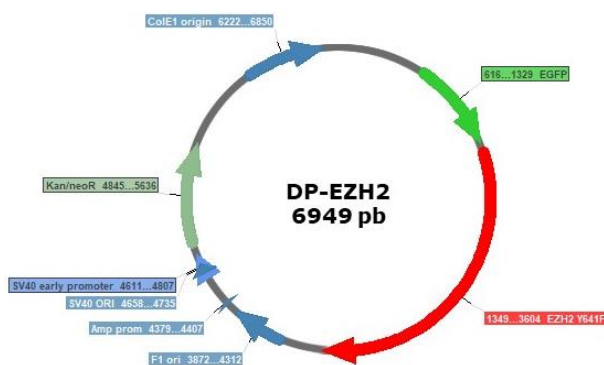
Nom	Séquence
<i>EZH2_cloning_Bam</i>	5'-TGGATCCTTCAAGGGATTTCATTTC-3'
<i>EZH2_cloning_Xho</i>	5'-ACTCGAGGTATGGGCCAGACTGGGAAG-3'

**Tableau 8. Séquences des amorces utilisées pour la création du plasmide pEZH2-EGFP.**



**Figure 33. Cartes des plasmides utilisés pour la création du plasmide pEZH2-EGFP.**

## 2) Obtention du plasmide DP-EZH2



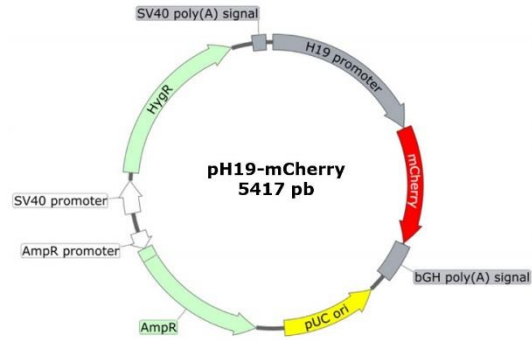
**Figure 34. Carte du plasmide DP-EZH2.**

La séquence nucléotidique du gène *ezh2* (NM\_004456.5) a d'abord été amplifiée par PCR avec les amorces EZH2\_cloning\_Bam et EZH2\_cloning\_Xho (**Tableau 8**) à partir d'un plasmide pcDNA3.1 (Invitrogen) contenant la séquence d'*ezh2*. Ces amorces spécifiques contiennent dans leur séquence les sites de restriction des enzymes *Bam*HI ou

*Xho*I, permettant ainsi de les insérer aux extrémités de la séquence d'*ezh2*. L'amplicon (2256 nt) a ensuite été purifié sur gel d'agarose (MinElute® Gel Extraction kit, Qiagen) puis cloné dans un vecteur intermédiaire PCR®II-TOPO® (Invitrogen) par PCR. Dans la séquence d'*ezh2*, la tyrosine en position 641 a été remplacée par une phénylalanine par mutation ponctuelle (nucléotide 3287, A > T ; Quikchange Site-Directed Mutagenesis Kit, Agilent Technologies). Un site de restriction proche a également été muté de la même façon (nucléotide 3282, A > T, site de restriction de l'enzyme *Dde*I) de façon à pouvoir différencier après amplification les vecteurs mutés des vecteurs sauvages. Une digestion enzymatique de ce vecteur est réalisée, en parallèle d'une linéarisation du vecteur pEGFP-C1 pour y cloner la séquence mutée d'*ezh2* par restriction-ligation enzymatique. Le vecteur est ensuite amplifié dans des bactéries chimiocompétentes One Shot™ TOP10 (Thermo Fisher Scientific). Après criblage des colonies, la purification des plasmides est réalisée avec le kit Qiaprep Spin mini/midiprep (Qiagen). Les plasmides sont vérifiés par digestion enzymatique puis envoyés en séquençage (GATC Biotech).

### 3) Obtention du plasmide pH19-mCherry

Le plasmide pH19-mCherry a été créé au laboratoire grâce à la technologie e-Zyvec. Cette technologie permet de créer des vecteurs en combinant des briques moléculaires issues de vecteurs divers. Le brevet de cette technologie (déposé en France en 2015 et à l'internationale en 2016 : PCT/FR2016/050305) n'est pas encore rendu public, cette technologie est donc confidentielle. L'expression de la protéine fluorescente mCherry est contrôlée par le promoteur minimum du gène *H19* (1000 pb), codé en aval de la séquence codante de la protéine (**Figure 35**).



**Figure 35. Carte du plasmide pH19-mCherry.**

### B- Transfections de plasmides

Les cellules ont été transfectées à l'aide du kit jetPEI® selon le protocole du fournisseur (Polyplus Transfection). Un million de cellules sont transfectées par condition. Pour établir nos modèles d'expression stable à partir des lignées natives MCF-7, T-47D, MDA-MB-231, SUM159PT, Calu-6 et CHO-K1, nous avons utilisé les vecteurs disponibles au laboratoire (pcDNA3.1-H19, pEZH2-EGFP, pDRGFP, pimEJ5GFP, pEGFP-C1-miR-675 et pH19-mCherry). Les cellules ayant intégré le vecteur ont été sélectionnées grâce à la généticine (1000 µg/mL pour les MCF-7, T-47D et CHO-K1, 700 µg/mL pour les MDA-MB-231 et 500 µg/mL pour les Calu-6) ou l'hygromycine B (600 µg/mL pour les SUM159PT).

### C- Transfections de siRNAs

Nom		Séquence
<i>siH19</i>	A	5'-CCCACAACAUGAAAGAAAU-3'
	B	5'-GCUAGAGGAACCAGACCUU-3'
<i>siP53</i>		5'-CGACUCCAGUGGUAUUCUACU-3'
<i>siMDM2</i>		5'-AUUCCAAGAUACCUCUUGACU-3'

**Tableau 9. Séquences des siRNAs utilisés.**

Les cellules ont été transfectées à l'aide du kit jetPRIME® selon le protocole du fournisseur (Polyplus Transfection). Les séquences sélectionnées ont été validées par un

”blast” sur l’ensemble du génome humain de façon à éviter toute inhibition non spécifique. Tous les siRNAs utilisés sont synthétisés par Eurogentech (**Tableau 9**). Un million de cellules sont transfectées par condition. Les cellules sont lysées 48h après la transfection.

#### D- Transfections de mimics/anti-miRs

---

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

**Tableau 10. Références des mimic et anti-miR utilisés.**

Les cellules ont été transfectées à l’aide du kit DharmaFECT™ Duo selon le protocole du fournisseur (Thermo Fisher Scientific Dharmacon). Les séquences du mimic, de l’antagomiR et de leurs contrôles respectifs ont été respectivement déterminées grâce à la miRIDIAN microRNA Mimic Library et la miRIDIAN microRNA Hairpin Inhibitor Library (Horizon) (**Tableau 10**). Cent mille cellules sontensemencées par condition. Les cellules sont lysées 48h après la transfection.

### III – Analyses d’expression

#### A- Profils d’expression géniques tumoraux

---

Les données brutes des profils d’expression tumoraux ont été récupérées à partir du projet “TCGA-BRCA” (*Breast Invasive Carcinoma*) du programme TCGA (*Cancer Genome Atlas Consortium*) (Weinstein *et al.*, 2013) avec le package “TCGAbiolinks” du logiciel R (Colaprico *et al.*, 2016). Ces données brutes sont normalisées selon les méthodes décrites dans la littérature (Risso *et al.*, 2011). La banque de données ainsi disponible (1095 échantillons) est utilisée pour évaluer la corrélation entre l’expression de *H19* et de *MDM2*. Cette banque de données est divisée selon les sous-types tumoraux qu’elle contient : basal (190 échantillons), Her2 (82 échantillons), LumA (566 échantillons), LumB (217 échantillons) et normal (40 échantillons).

Les échantillons sont ensuite triés : seuls ceux présents dans le 90<sup>ème</sup> percentile de l’expression de *H19* et/ou dans le 90<sup>ème</sup> percentile de l’expression de *MDM2* sont conservés.

De cette façon, 217 échantillons sont retenus, représentant 20% de la banque de données initiale. Le coefficient de corrélation de Pearson est utilisé pour l'analyse de corrélation et est calculé grâce au logiciel R. Un coefficient de Pearson négatif signifie une corrélation d'expression entre les 2 gènes.

## B- Extraction d'ARNs, rétro-transcription (RT) et RT-PCR en temps réel (qPCR)

Les ARN issus des cellules de lignées sont extraits et purifiés à l'aide du kit RNeasy (Qiagen). Pour détecter l'expression du miR-675, les ARNs issus des cellules de lignées sont extraits par la technique phénol (TRIzol reagent, Ambion)/chloroforme. Après centrifugation, la phase aqueuse de chaque condition est récupérée et incubée avec de l'isopropanol pendant 20 min à température ambiante. Les ARNs sont rincés plusieurs fois puis élués avec de l'eau RNase-free. Un traitement à la DNase est inclus dans le protocole pour éliminer l'ADN génomique. Ensuite, 1 µg d'ARN sont rétro-transcrits en cDNA par la SuperScript III (Invitrogen). Après une hybridation des amorces aléatoires pendant 5 min à 65°C, la rétro-transcription est réalisée selon un cycle de 10 min à 25°C, 50 min à 50°C puis 5 min à 85°C. En parallèle, des contrôles négatifs de chaque condition sont réalisés (sans l'enzyme). Enfin, la qPCR (PCR quantitative) est réalisée à l'aide du thermocycleur CFX96 Real Time System (Biorad) et en utilisant le kit Quantification SyBR Green master mix (Qiagen). Chaque condition est réalisée en triplicat.

Pour la détection du miR-675, 50 ng d'ARNs sont nécessaires pour la rétro-transcription à l'aide du kit miRCURY LNA Universal RT (Exiqon). Les échantillons sont incubés à 42°C pendant 60 min puis à 95°C pendant 5 min. Ensuite, la qPCR est réalisée grâce au kit Exilent SYBR Green master mix (Exiqon) ainsi que le hsa-miR-675-5p LNA PCR primer set, UniRT (Exiqon). L'ARN humain *U6* est utilisé comme contrôle.

Toutes les amorces oligonucléotidiques utilisées sont synthétisées par Eurogentech (**Tableau 11**). Le Ct de chaque condition est obtenu par régression linéaire grâce au logiciel CFX Manager (Biorad). Le  $\Delta\text{Ct}$  de chaque gène analysé est déterminé après normalisation par un gène de référence (*RPLP0*, *ribosomal protein lateral stalk subunit P0*). Le  $\Delta\Delta\text{Ct}$  est ensuite calculé en soustrayant le  $\Delta\text{Ct}$  de chaque condition au  $\Delta\text{Ct}$  de la condition contrôle. Enfin, la différence d'expression (*fold change*) correspond à  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ .

Nom		Séquence
<i>human ABCG2</i>	sens	CACCTTATTGGCCTCAGGAA
	antisens	CTTGCTTGGAAGGCTCTATG
<i>human ALDH1A1</i>	sens	GTTGAGCGGGCTAAGAAGTAT
	antisens	CCCACTCTCAATGAGGTCAAG
<i>human ALDH1A3</i>	sens	ACCATCCCCACAGATGACAAC
	antisens	ATAAAGGGCGGTGAGAGGTGTCT
<i>human BAX</i>	sens	TTTGCTTCAGGGTTTCATCC
	antisens	CAGTTGAAGTTGCCGTGAGA
<i>human DDX11</i>	sens	TGGAACTGGCCCTTACATGA
	antisens	CTGCACAAACTGAGTAACCCA
<i>human EZH2</i>	sens	ACAACCATTGCATCTTGGCTGTC
	antisens	GCTGCAAAGCCGTAATCCATATC
<i>human FIGL1</i>	sens	TACTTCGCAATTACATCTGGCAT
	antisens	GGGAAATCTCAGAGTTTGCC
<i>human H19</i>	sens	TGGCCATGAAGATGGAGTCG
	antisens	TACAACCACTGCACTACCTG
<i>human NANOG</i>	sens	GTGATTTGTGGGCTGAAGA
	antisens	ACACAGCTGGGTGGAAGAGA
<i>human NIPBL</i>	sens	ATGTCCCATTACTACTCTTGCG
	antisens	ACCTCTTCTGCTATTCGTGCAT
<i>human NOTCH1</i>	sens	CTGTGAGGAAAATATCGAC
	antisens	GTACTGACCTGTCCACTCT
<i>human OCT3/4</i>	sens	GAAGGATGTGGTCCGAGTGT
	antisens	GTGAAGTGAGGGCTCCATA
<i>human P21<sup>WAF1</sup></i>	sens	CACTCCAAACGCCGCTGATCC
	antisens	TGTAGAGCGGGCCTTTGAGGCCCTC
<i>human PUMA</i>	sens	AATGAGCCAAACGTGAACAC
	antisens	GCAGAGCACAGGATTCACAG
<i>human RECQL</i>	sens	GCGTCCGTTTCAGCTCTAACT
	antisens	TTGCCCGGCATCAGAATC
<i>human RIF1</i>	sens	AGGGCAGACTGACGCTTAC
	antisens	GCAGCACTACTCAGCTCCG
<i>human RPLP0</i>	sens	GTGATGTGCAGCTGATCAAGACT
	antisens	GATGACCAGCCCAAAGGAGA
<i>human SOX2</i>	sens	AACCCCAAGATGCACAACCTC
	antisens	CGGGGCCGGTATTTATAATC

<i>human TP53</i>	sens	GTGGAAGGAAATTTGCGTGT
	antisens	CCAGTGTGATGATGGTGAGC
<i>chinese hamster RPLPO</i>	sens	GCAGACAATGTGGGCTCAA
	antisens	GGTGAACACAAAGCCACAT

**Tableau 11. Séquences des amorces utilisées en qPCR.**

### C- Extraction de protéines

---

Les cellules sont lysées sur glace dans un tampon RIPA contenant des inhibiteurs de protéases et de phosphatases (*protease inhibitor P8340* ; *phosphatase inhibitor cocktail 2 P5726*, Sigma-Aldrich). Après incubation une nuit à -80°C, le lysat cellulaire est récupéré puis centrifugé (14000 rpm pendant 10 min à 4°C). Le surnageant contenant les protéines est dosé par la méthode BCA (*Bicinchonic acid* ; Sigma-Aldrich).

Pour l'extraction des protéines nucléaires, les cellules sont d'abord lysées dans un tampon hypotonique. Après incubation à 4°C et centrifugation, le surnageant récupéré correspond à la fraction enrichie en protéines cytosoliques. Le culot de cellules est resuspendu dans un tampon hypertonique. Après incubation à 4°C et centrifugation, le surnageant récupéré correspond à la fraction enrichie en protéines nucléaires. Les protéines récupérées sont quantifiées par la méthode BCA (Sigma-Aldrich).

### D- Western blot

---

Les échantillons protéiques sont resuspendus dans du NuPAGE LDS Sample buffer (Invitrogen) contenant du NuPAGE Reducing Agent (Invitrogen) à 70°C pendant 10 min. Les protéines sont séparées sur un gel SDS-PAGE 4-12% (Invitrogen) et transférées sur une membrane en polyfluorure de vinylidène (PVDF ; Millipore). Après saturation avec un tampon TBST + caséine 0,8%, la membrane est incubée avec l'anticorps primaire pendant une nuit à 4°C (**Tableau 12**). L'actine est utilisée comme témoin de charge. La membrane est lavée avec du tampon TBST + Tween 0,5% pendant 30 min puis incubées avec l'anticorps secondaire conjugué à la *Horseradish Peroxidase* (HRP) pendant 1h à température ambiante. La membrane est analysée par chimiluminescence (West Dura, Thermo Scientific) et le signal détecté grâce à un appareil de révélation (LAS-4000 ; Fujifilm). Le signal des bandes est quantifié grâce au logiciel ImageJ par rapport au signal de la bande contrôle (actine).

Nom	Référence	Tampon de saturation	Dilution
<i>β-caténine</i>	Cell Signaling #9782	TBST + Caséine 0,8%	1/1000 <sup>ème</sup>
<i>Actine</i>	Sigma A-2066	TBST + BSA 5%	1/10000 <sup>ème</sup>
<i>Bax</i>	Santa Cruz sc-493	TBST + BSA 5%	1/1000 <sup>ème</sup>
<i>DNA-PKcs</i>	Santa Cruz sc-390849	TBST + Caséine 0,8%	1/500 <sup>ème</sup>
<i>E-cadhérine</i>	Cell Signaling #9782	TBST + Lait 5%	1/1000 <sup>ème</sup>
<i>EZH2</i>	BD Biosciences 612667	TBST + Lait 5%	1/1000 <sup>ème</sup>
<i>HSC70</i>	Santa Cruz sc-7298	TBST + Caséine 0,8%	1/1000 <sup>ème</sup>
<i>I-SceI</i>	Abcam ab216263	TBST + Caséine 0,8%	1/1000 <sup>ème</sup>
<i>Ku70</i>	BD Biosciences 611892	TBST + Caséine 0,8%	1/1000 <sup>ème</sup>
<i>MDM2</i>	Santa Cruz sc-965	TBST + Caséine 0,8%	1/200 <sup>ème</sup>
<i>Mre11</i>	Cell Signaling #8344	TBST + Caséine 0,8%	1/1000 <sup>ème</sup>
<i>N-cadhérine</i>	Cell Signaling #9782	TBST + Caséine 0,8%	1/1000 <sup>ème</sup>
<i>p21<sup>WAF1/CIP1</sup></i>	Cell Signaling #2946	TBST + Lait 5%	1/2000 <sup>ème</sup>
<i>p53 (DO-1)</i>	Santa Cruz sc-126	TBST + Caséine 0,8%	1/1000 <sup>ème</sup>
<i>p95/Nbs1</i>	Cell Signaling #9344	TBST + Caséine 0,8%	1/1000 <sup>ème</sup>
<i>p-ATM S1981</i>	Cell Signaling #9947	TBST + Caséine 0,8%	1/500 <sup>ème</sup>
<i>p-ATR S428</i>	Cell Signaling #9947	TBST + Caséine 0,8%	1/500 <sup>ème</sup>
<i>p-Chk1 Ser345</i>	Cell Signaling #9947	TBST + Caséine 0,8%	1/1000 <sup>ème</sup>
<i>p-Chk2 Thr68</i>	Cell Signaling #9947	TBST + Caséine 0,8%	1/1000 <sup>ème</sup>
<i>p-H2AX Ser 139</i>	Millipore #05-636	TBST + Caséine 0,8%	1/500 <sup>ème</sup>
<i>p-Mre11</i>	Cell Signaling #8344	TBST + Caséine 0,8%	1/1000 <sup>ème</sup>
<i>p-p53 Ser15</i>	Cell Signaling #9947	TBST + Caséine 0,8%	1/1000 <sup>ème</sup>
<i>p-p95/Nbs1</i>	Cell Signaling #8344	TBST + Caséine 0,8%	1/1000 <sup>ème</sup>
<i>PUMA</i>	Cell Signaling #12450	TBST + BSA 5%	1/1000 <sup>ème</sup>
<i>Rad50</i>	Cell Signaling #8344	TBST + Caséine 0,8%	1/1000 <sup>ème</sup>
<i>Ras GAP</i>	Santa Cruz sc-63	TBST + Caséine 0,8%	1/1000 <sup>ème</sup>
<i>Snail</i>	Cell Signaling #9782	TBST + Caséine 0,8%	1/1000 <sup>ème</sup>
<i>TCF8/ZEB1</i>	Cell Signaling #9782	TBST + Caséine 0,8%	1/1000 <sup>ème</sup>
<i>Vimentine</i>	Cell Signaling #9782	TBST + Caséine 0,8%	1/1000 <sup>ème</sup>
<i>ZO1</i>	Cell Signaling #9782	TBST + Caséine 0,8%	1/1000 <sup>ème</sup>

**Tableau 12. Liste des anticorps utilisés en western blot.**



## E- Immunocytochimie

---

Les cellules sontensemencées sur des lames “coatées” au collagène. Le lendemain, les cellules sont traitées à la doxorubicine (voir **paragraphe “Traitements”**) pendant 6 à 24h. Les cellules sont ensuite fixées avec du paraformaldéhyde 4% puis perméabilisées avec du méthanol pendant 10 min à -20°C. Un blocage des cellules (Ultravision Protein Block TA-125-PBQ ; Thermo Fisher Scientific) est alors réalisé pendant 10 min à température ambiante. Les cellules sont ensuite incubées avec l’anticorps primaire sur la nuit à 4°C, rincées puis incubées avec l’anticorps secondaire dilué au 1/500<sup>ème</sup> (A211020 ; Invitrogen) pendant 1h à température ambiante. Les cellules sont marquées au DAPI (DI306 ; Invitrogen) pendant 5 min. Les marquages sont imagés au microscope à fluorescence (Axioplan2 ; ZEISS) et les photos sont traitées et analysées avec le logiciel ImageJ.

## F- Immunofluorescence

---

Les cellules sontensemencées dans une chambre de culture Lab-Tek™ (Thermo Fisher Scientific) puis fixées avec du paraformaldéhyde 4% et perméabilisées avec un tampon PBS/Triton X-100 0,5%. Après un blocage avec un tampon TBST + caséine 0,8%, les cellules sont incubées avec l’anticorps primaire dilué au 1/100<sup>ème</sup> ou au 1/200<sup>ème</sup> sur la nuit à 4°C sous agitation (**Tableau 13**). Après 2 rinçages au PBS 1X, les cellules sont incubées avec l’anticorps secondaire Alexa Fluor 488 (#4408 ; Cell Signaling) dilué dans le même tampon. Les cellules sont marquées au Hoechst 33258 1 mM, puis les lames sont montées avec le liquide de montage fluoro-mount (Dako). Les marquages sont imagés au microscope à fluorescence (Eclipse Ti-U ; Nikon) et les photos sont traitées et analysées avec le logiciel ImageJ.

<i>Nom</i>	Référence	Tampon de saturation	Dilution
<i>53BP1</i>	Novus Biologicals NBP2-25028SS	TBST + Caséine 0,8%	1/100 <sup>ème</sup>
<i>Ku70</i>	BD Biosciences 611892	TBST + Caséine 0,8%	1/100 <sup>ème</sup>
<i>p-H2AX Ser 139</i>	Millipore #05-636	TBST + Caséine 0,8%	1/200 <sup>ème</sup>
<i>Rad51</i>	Santa Cruz sc-398587	TBST + Caséine 0,8%	1/100 <sup>ème</sup>
<i>XRCC1</i>	Abcam ab134056	TBST + Caséine 0,8%	1/100 <sup>ème</sup>

**Tableau 13. Liste des anticorps utilisés en immunofluorescence.**

## IV – Mise en évidence des interactions

### A- Immunoprécipitation des ARNs

---

L'immunoprécipitation des ARN est réalisée grâce au kit RNA CHIP-IT (#53024, Active Motif). Les cellules sont d'abord fixées avec une solution contenant du formaldéhyde 37%, puis lysées dans un tampon contenant des inhibiteurs de protéases et de phosphatases (*protease inhibitor P8340* ; *phosphatase inhibitor cocktail 2 P5726*, Sigma-Aldrich) ainsi qu'un inhibiteur de RNase. Le lysat est ensuite centrifugé puis le surnageant est récupéré. Si l'interaction ARN-protéine étudiée a lieu dans le noyau, le surnageant est soniqué pour fragmenter la chromatine.

Le lysat ainsi obtenu est ensuite incubé avec une suspension de billes magnétiques préalablement saturées et hybridées avec l'anticorps d'intérêt. Les échantillons sont incubés sur la nuit à 4°C sous agitation. Ensuite, les billes sont rincées plusieurs fois puis les échantillons ARN-protéine sont élués. Les ARNs sont extraits au TRIzol reagent (Ambion)/chloroforme tel que décrit précédemment, puis les échantillons sont digérés à la DNase. Une RT-PCR en temps réel permettra de déterminer la quantité d'ARN selon les échantillons.

### B- Immunoprécipitation des protéines

---

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

## C- GST pull-down

---

Une protéine MDM2 sauvage taguée à la GST (glutathion S-transférase) et une protéine p53 taguée à l'histidine sont exprimées dans une souche *Escherichia coli* One Shot™ BL21 (Invitrogen). Les protéines p53 taguées à l'histidine sont purifiées avec le kit Ni-NTA fast start (Qiagen). Les protéines MDM2 sont purifiées grâce à des billes de sépharose 4B saturées en glutathion (Sigma-Aldrich). La GST couplée à la protéine MDM2 permettra ainsi d'hybrider les protéines sur les billes. L'ARN de *H19* a quant à lui été produit à l'aide du kit Riboprobe *in vitro* transcription systems (Promega) à partir du plasmide pcDNA3.1-H19 décrit précédemment. Un ARN contrôle *SRA* a également été produit.

Les protéines MDM2 taguées à la GST sont incubées avec les billes de sépharose pendant 1h à 4°C sous agitation. De cette façon, la GST couplée à la protéine MDM2 permet d'hybrider les protéines sur les billes pour pouvoir les récupérer. Les billes sont rincées, puis la protéine p53 est ajoutée à la suspension : pour permettre sa potentielle liaison à MDM2, la suspension est incubée pendant 1h à 4°C sous agitation. Par la suite, les ARNs synthétisés *in vitro* (*H19* ou *SRA*) sont ajoutés à la suspension. Après une incubation sur la nuit à 4°C et sous agitation, les billes sont rincées et les protéines sont réduites dans un tampon de Laemmli (63 mM Tris-HCl, 10% glycérol, 2% SDS, 5% de β-mercaptoéthanol, 0,025% de bleu de bromophénol, pH 6.8). Les protéines sont séparées par SDS-PAGE et p53 et MDM2 sont révélées par western blot comme décrit précédemment.

## V – Tests phénotypiques

### A- Test de clonogénicité

---

Les cellules sont comptées etensemencées dans des boîtes 100 cm<sup>2</sup> (10 mL/boîte, une boîte par condition) dans du milieu de culture à 10% de SVF. Le nombre de cellules par mL diffère selon le type cellulaire. De cette façon, les cellules MDA-MB-231 sontensemencées à 20 cellules par mL, les cellules MCF-7 sontensemencées à 50 cellules par mL, et les cellules SUM159PT sontensemencées à 100 cellules par mL. Les cellules sont ensuite incubées à 37°C pendant 15 jours, avec un changement de milieu de culture tous les 4 à 5 jours. L'arrêt de la croissance est effectué après rinçage des cellules au PBS 1X par un traitement au paraformaldéhyde 4% (10 min sous agitation). Les colonies sont ensuite mises en évidence par

un marquage au crystal violet 0,5% (10 min sous agitation). Les colonies sont comptées à l'œil nu (taille de la colonie > 50 cellules). L'analyse est effectuée avec un test t bilatéral.

## **B- Test de formation de sphères**

---

Les cellules sont cultivées dans un milieu spécifique DMEM-F12 sans phénol red (Gibco) contenant 0,4% de BSA (Sigma-Aldrich), 2% de supplément B27 (Invitrogen), 5 µg/mL d'insuline (Sigma-Aldrich), 4 µg/mL d'héparine (Sigma-Aldrich), et 20 ng/mL de facteur de croissance épidermal (EGF) et de facteur de croissance fibroblastique (FGF) (Biotechne). Les cellules sontensemencées en plaques 96 puits non adhésives, avec une concentration allant de 1024 cellules par puits à 1 cellule par puits. Le nombre de sphères par puits est déterminé après 4 jours d'incubation.

## **C- Tests de migration et d'invasion cellulaire**

---

La migration et l'invasion cellulaire sont déterminées par un test de Transwell. Pour l'analyse de la migration, 40000 cellules sontensemencées dans la partie supérieure d'inserts (0,8 µm, BD Biosciences) de plaques 12 puits "coatés" au collagène à une concentration de 0,045 mg/mL (Millipore). Après 8h d'incubation à 37°C, les cellules sont rincées au PBS 1X et fixées au méthanol glacé pendant 10 min à température ambiante. Les inserts sont ensuite rincés puis la face supérieure est grattée avec un coton tige afin d'enlever les cellules qui n'ont pas traversé la membrane. Les cellules qui ont migré de l'autre côté de la membrane sont marquées au Hoechst 33258 1 mM, puis les membranes sont découpées et montées entre lame et lamelle avec le liquide de montage Glycergel (Dako) de façon à pouvoir compter le nombre de cellules qui ont migré en microscopie.

Pour l'analyse de l'invasion, 40000 cellules sontensemencées sur des inserts (0,8 µm, BD Biosciences) de plaques 12 puits "coatés" au collagène à une concentration de 3 mg/mL (Millipore). Après 24h d'incubation, les cellules sont rincées au PBS 1X et fixées au méthanol glacé pendant 10 min à température ambiante. Les inserts sont ensuite rincés puis la face supérieure est grattée avec un coton tige afin d'enlever les cellules qui n'ont pas traversé la membrane. Les cellules invasives de l'autre côté de la membrane sont marquées au Hoechst 33258 1 mM, puis les membranes sont découpées et montées entre lame et lamelle avec le liquide de montage Glycergel (Dako) de façon à pouvoir compter le nombre de cellules invasives en microscopie.

## D- Essais comètes

---

Pour chaque condition, 2000 cellules sont resuspendues dans de l'agarose à 42°C. La suspension est immédiatement déposée sur une lame spécifique (CometAssay® kit, Trevigen), et l'agarose est solidifié par incubation à 4°C pendant 20 min. Les lames sont ensuite immergées dans une solution de lyse contenant un détergent (Triton) à pH 10. Après incubation pendant 90 min à 4°C et à l'obscurité, les lames sont transférées dans une cuve d'électrophorèse et immergées dans le tampon d'électrophorèse pendant 10 min pour équilibrer. De façon à visualiser à la fois les cassures simple brin et les cassures double brin de l'ADN, l'électrophorèse est réalisée à pH basique (pH = 12,3) pendant 2 min à 60V. Après la migration, les lames sont rincées dans un tampon de neutralisation puis marquées à la SYBR Green (X1000 ; Molecular Probes) selon le protocole du fournisseur. Les tail moments (= longueur de la queue \* ADN dans la queue / ADN total) sont mesurés avec le logiciel ImageJ. La quantification est ensuite analysée statistiquement sur le logiciel Prism (GraphPad) grâce à un test ANOVA à un facteur suivi d'un test à comparaisons multiples de Tukey.

## E- Détection du stress oxydant

---

Les cellules sontensemencées en plaques 96 puits opaques. Chaque condition estensemencée en triplicat. Le lendemain, une solution de sonde fluorescente H<sub>2</sub>DCFDA (D399, Invitrogen) à 5 µM est ajoutée dans chaque puits. Après 30 min d'incubation à 37°C, l'intensité de fluorescence est mesurée par lecture au fluorimètre (FLUOstar OPTIMA ; BMG Labtech), avec une longueur d'onde d'excitation de 485 nm (492-495) et une longueur d'onde d'émission de 520 nm (517-527).

## F- Test HPRT

---

La mise en évidence de la fréquence de mutation *Hprt* est réalisée en analysant la clonogénicité de cellules traitées au cisplatine, tel que décrit dans la littérature (Silva *et al.*, 2005). Les cellules CHO-K1 sont d'abord cultivées dans un milieu contenant du HAT (#H0262-10VL ; Sigma-Aldrich) pendant 5 jours de façon à éliminer les mutants *Hprt* pré-existants. Ensuite, 1,5 millions de cellules sontensemencés en flasque 75 cm<sup>2</sup>. Après 24h de culture, les cellules sont traitées ou non avec 15 µM de cisplatine (#C2210000 ; Sigma-Aldrich) pendant 1h. Pour déterminer l'effet potentiel de *H19* sur la formation de colonies indépendamment

de la mutation *Hprt*, 200 cellules de chaque condition sont ensemencées (12 boîtes par condition) et cultivées pendant 10 jours avant d'être révélées (voir **paragraphe "Test de clonogénicité"**). Les cellules restantes sont maintenues en culture pendant 8 jours de façon à permettre l'expression du phénotype mutant *Hprt*. Par la suite, 200000 cellules par condition sont ensemencées (20 boîtes par condition) puis traitées avec du milieu contenant 6 µg/mL de 6-thioguanine (6-TG, #A4882 ; Sigma-Aldrich) pour sélectionner les mutants *Hprt*. En parallèle, 200 cellules par conditions sont ensemencées (12 boîtes par condition) en milieu non sélectif. Après 10 jours de culture, les colonies formées dans les différentes conditions sont révélées et comptées (voir **paragraphe "Test de clonogénicité"**). L'efficacité de clonogénicité correspond au ratio entre le nombre de colonies formées et le nombre de cellules ensemencées pour une condition. La fréquence de mutation s'exprime comme le ratio entre l'efficacité de clonogénicité des mutants *Hprt* et celle des cellules cultivées en milieu non sélectif.

## G- Analyse du cycle

---

Les cellules sont ensemencées et synchronisées en phase G1/S avec 6 µM d'Aphidicoline (BML-CC101 ; Enzo Life Sciences) pendant 24h. Après rinçage, les cellules sont traitées à la doxorubicine (voir **paragraphe "Traitements"**) pendant 24h. Les cellules sont ensuite perméabilisées dans de l'éthanol 70% froid sur la nuit, rincées et marquées avec de l'iodure de propidium (1 µg/mL) et de la RNase A (1 mg/mL) (R6513 ; Sigma-Aldrich) pendant 30 min à 37°C. Le cycle cellulaire est analysé par cytométrie de flux grâce au CyAn™ ADP Analyser (Beckman Coulter), et les données sont traitées avec le logiciel MultiCycle AV (Phoenix Flow Systems).

Pour l'analyse de la population de cellules en phase sub-G1, les cellules sont traitées à la doxorubicine (voir **paragraphe "Traitements"**) pendant 6h, 12h, 18h ou 24h. Les cellules sont ensuite perméabilisées avec de l'éthanol 70% pendant 30 min à température ambiante puis rincées avec une solution de PBS contenant de l'iodure de propidium (1 µg/mL) et de la RNase A (1 mg/mL) (R6513, Sigma-Aldrich) pendant 30 min à 37°C. L'analyse de la population cellulaire est réalisée par cytométrie de flux (CytoFLEX S, Beckman Coulter) et les données sont traitées à l'aide du logiciel FlowJo.

## H- Analyse de la sénescence

---

Pour induire la sénescence, 25000 cellules sont traitées avec 0,067 µg/mL de doxorubicine pendant 72h. Les cellules sénescents sont détectées à l'aide du test SA-β-Gal : le substrat C<sub>12</sub>FDG, clivé par la β-galactosidase, une enzyme très active dans les cellules sénescents, génère un produit fluorescent intracellulaire. Les cellules sénescents sont ainsi marquées avec une sonde C<sub>12</sub>FDG (F2756 ; Sigma-Aldrich) tel que décrit dans la littérature (Goehe *et al.*, 2012). L'émission de fluorescence est analysée par cytométrie de flux grâce au CyAn™ ADP Analyser (Beckman Coulter).

## I- Analyse de la mort cellulaire

---

Pour induire l'apoptose, 2 millions de cellules par condition sont traitées à la doxorubicine (voir **paragraphe "Traitements"**) pendant 24h. Les cellules sont ensuite récupérées, centrifugées et resuspendues dans le tampon Annexin V Binding Buffer (640906 ; BioLegend) à raison d'1 million de cellules par mL. Cent mille cellules sont ensuite transférées en eppendorf, auxquelles sont ajoutés 5 µL de FITC-conjugated Annexin V (640906 ; BioLegend) et 10 µL d'iodure de propidium (#P4170 ; Sigma-Aldrich). La suspension est ensuite incubée pendant 15 min à température ambiante et à l'obscurité. Les échantillons sont ensuite redilués avec 400 µL de tampon Annexin V Binding Buffer puis analysés en cytométrie de flux (Annexin V-FITC : 488/518 nm ; IP : 535/617 nm ; CytoFLEX S ; Beckman Coulter). Les données sont ensuite traitées à l'aide du logiciel FlowJo.

## J- Test de résistance à l'anoïkis

---

Les cellules sont ensemencées en plaque 96 puits non adhésive "coatée" au poly-HEMA (P3932 ; Sigma-Aldrich), puis cultivées pendant un nombre de jours variable. La viabilité cellulaire est mesurée grâce à la résazurine selon le protocole du fournisseur (StemCell). La résazurine est un colorant dont la couleur passe du bleu au violet selon son niveau de réduction par les cellules viables. L'absorbance est mesurée à 2 longueurs d'onde différentes, correspondant à la forme oxydée (600 nm) ou réduite (570 nm) de la résazurine, grâce au spectrophotomètre MultiskanGo (Thermo Fisher Scientific). Le résultat est présenté comme le ratio entre ces 2 longueurs d'onde.

## VI – Expériences *in vivo*

### Xénogreffe en poisson zèbre transgénique

---

Les cellules SUM159PT-pH19-mCherry<sup>neg/high</sup> sontensemencées et incubées avec une solution de traceurs lipophiles (solution de marquage Vybrant Dil pour les mCherry<sup>high</sup>, solution de marquage Vybrant DiD pour les mCherry<sup>neg</sup>; Invitrogen) diluée dans du milieu de culture sans sérum pendant 20 min à 37°C. Les cellules sont ensuite dissociées avec une solution de trypsine/EDTA 0,25% (Gibco) et comptées. Un million de cellules de chaque condition sont centrifugées et resuspendues dans une solution de PBS/EDTA 5 mM.

En parallèle, à partir de la ponte, les poissons zèbres transgéniques (fli1:GFP) sont placés dans une solution de phénylthiourée (Sigma-Aldrich) jusqu'à 48h post-fertilisation. Les poissons sont anesthésiés avec de la tricaine (MS-222 ; Sigma-Aldrich), et les cellules mCherry<sup>high</sup> et mCherry<sup>neg</sup> sont co-injectées à l'aide d'un stéréomicroscope (M125 ; Leica) et d'un micro-injecteur (FemtoJET ; Eppendorf) dans le sac vitellin des poissons. Après l'injection, les poissons sont placés dans une solution de phénylthiourée contenant de la pénicilline-streptomycine renouvelée tous les 2 jours, à 28°C à l'obscurité. Pendant 48h, la température d'incubation des poissons varie (30°C à 24h, 32°C à 48h et jusqu'à 6 jours après l'injection) pour favoriser le développement des cellules. Les poissons sont fixés avec une solution de paraformaldéhyde 4% et placés dans une boîte de Pétri à fond en verre. Les photos sont prises à l'aide d'un logiciel d'acquisition d'image automatisée (ZEISS) *via* un microscope confocal à fluorescence (LSM 880 ; ZEISS).

## VII – Analyses statistiques

Tous les résultats présentés correspondent aux moyennes des répétitions. Toutes les expériences *in vitro* ont été réalisées au moins en triplicats biologiques. Le nombre de répétitions est indiqué dans la légende de chaque figure. Le test t bilatéral et le test ANOVA (*analysis of variance*) ont été utilisés. Le résultat est considéré comme significatif si la valeur p est inférieure à 0,05. Les barres d'erreur représentées correspondent à la SD (*standard deviation*).



# RESULTATS



# I – Le long ARN non codant *H19* inhibe p53 et favorise l’instabilité génomique

## A- Introduction

---

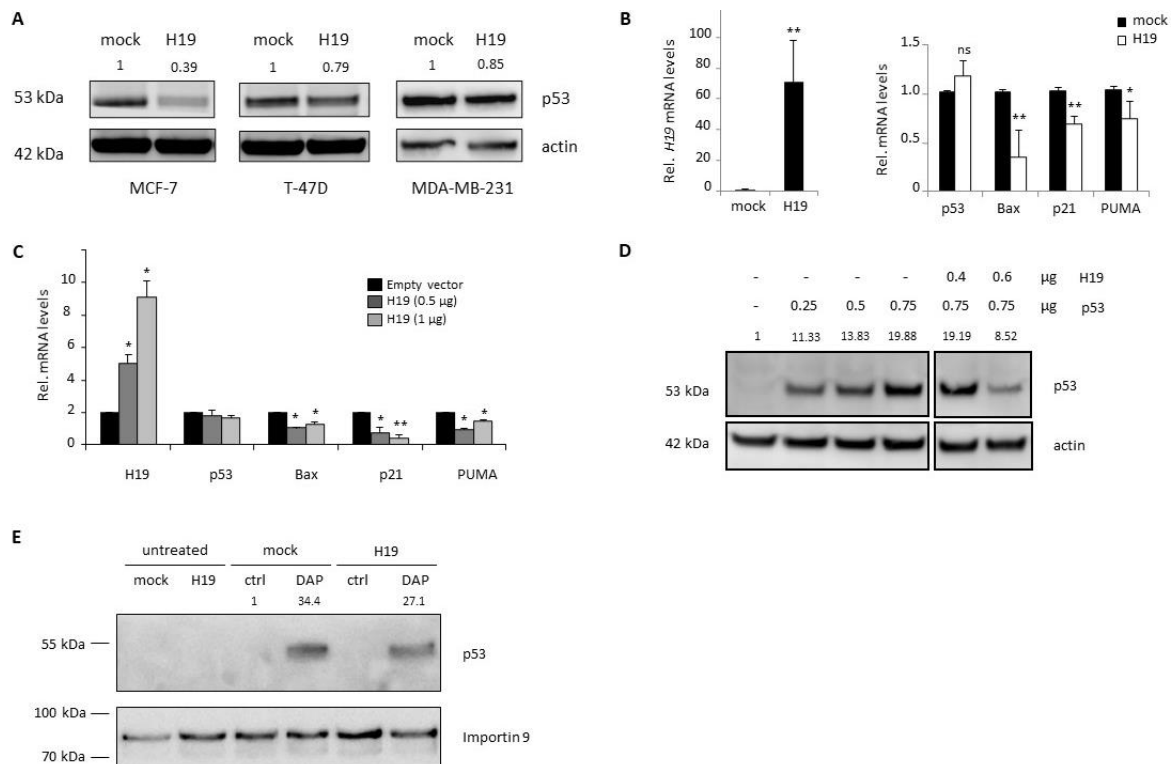
La protéine p53 a été découverte en 1979 (DeLeo *et al.*, 1979). Il s’agit d’un facteur de transcription de 53 kDa constitué de plusieurs domaines, dont un domaine transactivateur, un domaine de liaison à l’ADN et un domaine de tétramérisation (Dippold *et al.*, 1981; Rotter, 1983). Il a été montré que la protéine p53 est exprimée de façon constitutive dans les cellules, et qu’elle est dégradée en continu par le protéasome. Dans les cellules normales, en conditions physiologiques, p53 est associée *via* son domaine transactivateur à la protéine MDM2, qui possède une activité ubiquitine ligase E3. MDM2 va ainsi induire l’ubiquitinylation de p53 au niveau de son domaine C-ter : p53 sera ainsi reconnue par le protéasome et dégradée (Chao, 2015). En revanche, en conditions de stress comme après induction de dommages de l’ADN, irradiation ou stress génotoxique, les protéines ATM et ATR activées vont phosphoryler p53 et MDM2, de façon à les dissocier l’une de l’autre et permettre la translocation de p53 dans le noyau (Chao, 2015). Selon la gravité du stress cellulaire, p53 peut activer l’expression de gènes comme *cdkn1a*, qui entraînera un arrêt de la progression dans le cycle cellulaire, ou de *bax*, qui dirigera les cellules vers l’apoptose (Freeman et Espinosa, 2013). De cette façon, plus la quantité de dommages de l’ADN sera grande, plus la réponse cellulaire sera importante. Par sa fonction, la protéine p53 permet ainsi d’empêcher la transformation de cellules normales en cellules cancéreuses, d’où son appellation de “gardien du génome”.

## B- *H19* réprime la protéine p53 de façon post-traductionnelle

---

Nous avons montré précédemment que l’expression de *H19* est réprimée par p53 dans les cellules cancéreuses mammaires (Dugimont *et al.*, 1998). Dans le cancer gastrique, il a été mis en évidence que *H19* est capable d’interagir physiquement avec p53, et que cette association entraîne une inactivation partielle de p53 (Yang *et al.*, 2012). Cependant, les effets biologiques causés par cette interaction ne sont pas connus. De plus, nous savons que l’expression de *H19* favorise la progression dans le cycle cellulaire (Berteaux *et al.*, 2005). Pour déterminer le rôle de *H19* dans la régulation de l’action de p53, nous avons dans un premier temps analysé le niveau d’expression de p53 en conditions de surexpression stable de *H19*

(**Figure 36.A**). Nous avons pu constater que le niveau protéique de p53 diminue dans les cellules cancéreuses mammaires surexprimant stablement *H19*, et plus particulièrement dans les MCF-7 (qui possèdent une forme non mutée de p53), mais aussi dans une moindre mesure dans les T-47D et les MDA-MB-231 (qui possèdent toutes deux une forme mutée de p53). De façon intéressante, le niveau d'ARNm p53 quant à lui n'est pas modifié, alors que l'expression de plusieurs cibles de p53 comme *bax*, *cdkn1a* et *puma* diminuent dans les MCF-7 surexprimant stablement *H19* (**Figure 36.B**). Des résultats similaires ont été obtenus après expression transitoire de *H19* dans des MCF-7 natives (**Figure 36.C**). Ces résultats suggèrent que *H19* réprime la protéine p53 de façon post-traductionnelle, entraînant une diminution de l'expression des cibles de p53 en aval.



**Figure 36. *H19* réprime la protéine p53 dans les cellules cancéreuses mammaires.**

**A.** Expression de la protéine p53 dans des cellules MCF-7, T-47D et MDA-MB-231 contrôles (mock) ou surexprimant stablement *H19* (*H19*), déterminée par western blot. L'actine est utilisée comme témoin de charge. Les intensités de signaux relatives ont été quantifiées avec ImageJ et indiquées au-dessus de la bande correspondante. **B.** Expression relative de *H19*, *p53*, *Bax*, *p21* et *PUMA* dans des MCF-7 contrôles (mock) ou surexprimant stablement *H19* (*H19*) déterminée par qRT-PCR. **C.** Expression relative de *H19*, *p53*, *Bax*, *p21* et *PUMA* dans des MCF-7 natives transfectées avec des quantités croissantes de vecteur codant pour *H19*. **D.** Expression relative de *p53* dans des cellules *p53*-null (*Calu-6*) transfectées avec des vecteurs codant pour *p53* et/ou *H19*. L'expression de *p53* est déterminée par western blot et l'actine est utilisée comme témoin de charge. Les intensités de signaux relatives ont été quantifiées avec ImageJ et indiquées au-dessus de la bande correspondante. **E.** Des cellules *Calu-6* contrôles (mock) ou surexprimant stablement *H19* (*H19*) ont été traitées avec du DAP. La ré-expression

de p53 est déterminée par western blot. L'importine 9 est utilisée comme témoin de charge. Toutes les expériences ont été réalisées au moins 3 fois. Pour les graphiques, les données représentent la moyenne de 3 expériences indépendantes et les écarts-types associés.

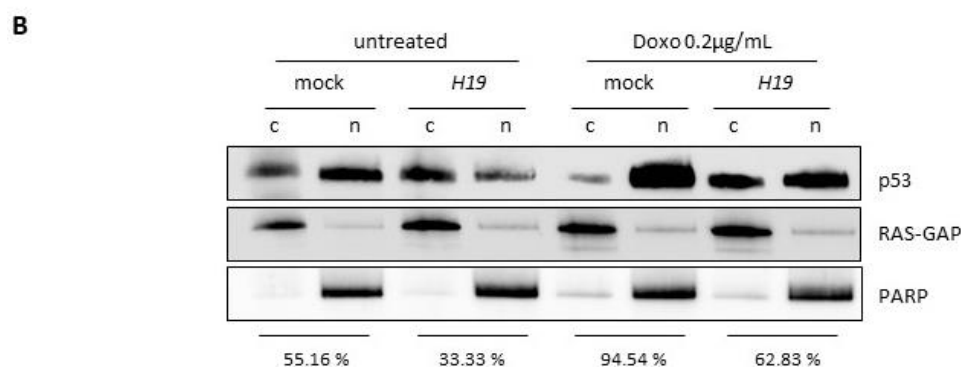
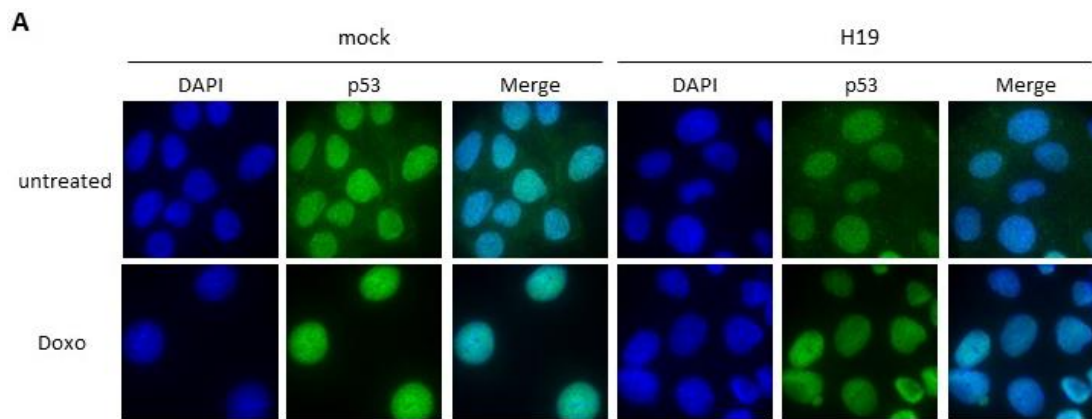
\* :  $p < 0,05$  ; \*\* :  $p < 0,01$  ; ns : non significatif.

Pour déterminer le mécanisme de la répression de p53 induite par *H19*, nous avons co-transfecté des cellules épithéliales Calu-6 (p53-null) avec des quantités croissantes de vecteurs codant pour p53 et/ou *H19* (**Figure 36.D**). Dans les deux cas, les gènes sont exprimés sous le contrôle de promoteurs forts. Les cellules transfectées avec le vecteur codant pour *H19* présentent des niveaux protéiques de p53 fortement diminués. Pour autant, nous n'avons pas constaté de variation de l'expression de l'ARNm p53 en qRT-PCR. Dans les cellules Calu-6, le gène *TP53* présente une mutation non-sens UGA, qui provoque une dégradation de l'ARNm par le système de dégradation des ARNm non-sens (NMD, *nonsense-mediated decay*). Nous avons montré que la 2,6-Diaminopurine (DAP) pouvait être utilisée pour corriger les mutations UGA non-sens (Trzaska *et al.*, 2020). Le traitement des Calu-6 avec du DAP induit une réexpression de la protéine p53, mais *H19* semble influencer négativement cette réexpression (**Figure 36.E**).

### C- *H19* séquestre p53 dans le cytoplasme

---

Pour jouer son rôle de facteur de transcription, p53 doit nécessairement pouvoir être transloqué du cytoplasme vers le noyau, de façon à induire l'expression de ses gènes cibles. Nous avons voulu déterminer si *H19* était impliqué dans ce mécanisme dans les cellules qui ont subi des dommages de l'ADN. Pour cela, nous avons traité des MCF-7 surexprimant stablement ou non *H19* avec 0,2 µg/mL de doxorubicine pendant 6 heures (**Figure 37**). Par immunofluorescence, nous avons constaté que le traitement à la doxorubicine induit une forte expression de p53 (en réponse au stress), qui est transloqué dans le noyau des cellules contrôles (**Figure 37.A, panel de gauche**). Dans les cellules surexprimant stablement *H19*, l'expression de p53 semble moins importante dans le noyau (**Figure 37.A, panel de droite**). Pour confirmer ces observations, nous avons analysé les expressions cytoplasmique et nucléaire de p53 par western blot (**Figure 37.B**). Le traitement à la doxorubicine induit bien l'expression de p53, mais lorsque *H19* est exprimé le niveau protéique de p53 dans le noyau diminue fortement, et ce avec ou sans traitement.



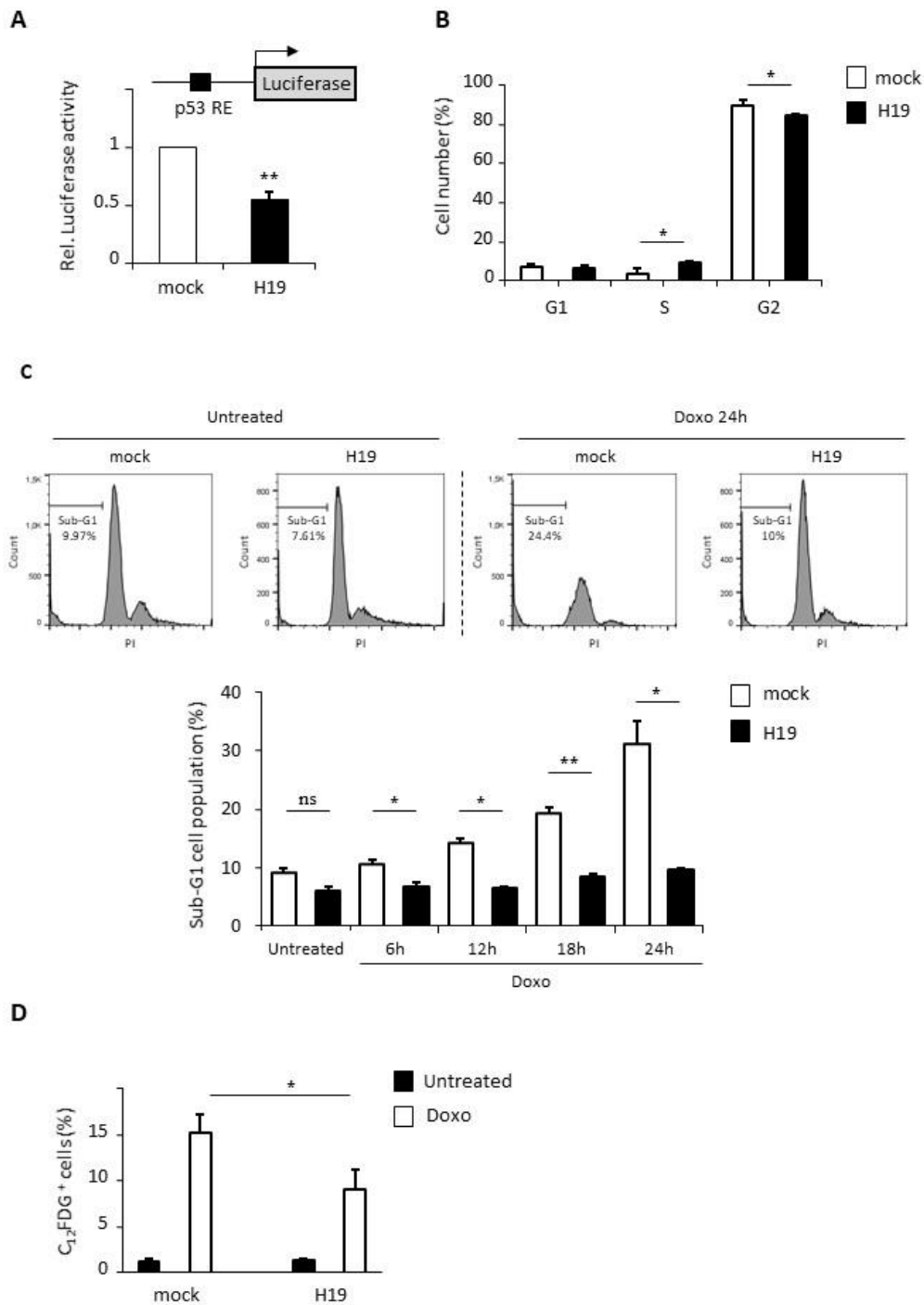
**Figure 37. H19 empêche la translocation nucléaire de p53 après traitement à la doxorubicine.**

**A.** Localisation de p53 déterminée par immunofluorescence dans des MCF-7 contrôles (mock) ou surexprimant H19 (H19). Les cellules sont traitées (+Doxo) ou non (-Doxo) avec 0,2 µg/mL de doxorubicine pendant 6 à 24h. **B.** Expression de p53 déterminée par western blot après fractionnement des cellules (c : cytoplasme ; n : noyau) dans des MCF-7 contrôles (mock) ou surexprimant stablement H19 (H19) traitées ou non à la doxorubicine (0,2 µg/mL) pendant 2h. Les protéines Ras-GAP et PARP sont utilisées comme témoins de charge cytoplasmique et nucléaire respectivement. Les intensités relatives des signaux ont été quantifiées par ImageJ et indiquées sous forme de ratio nucléaire en-dessous de la condition correspondante. Toutes les expériences ont été réalisées au moins 3 fois.

#### D- H19 perturbe les phénotypes associés à l'activité de p53

De façon à déterminer la conséquence fonctionnelle de la répression de p53 par H19 dans les cellules cancéreuses mammaires, nous avons dans un premier temps analysé l'activité transcriptionnelle de p53 grâce à l'utilisation d'un système rapporteur. Pour mettre au point ce système, le gène de la luciférase a été placé sous le contrôle d'un élément de réponse à p53 dans un vecteur pGL4.10[luc2] (**Figure 38.A**). Nous avons constaté que dans les cellules surexprimant stablement H19, l'activité luciférase relative diminue de moitié par rapport à la condition contrôle, révélant que l'activité transcriptionnelle de p53 est réprimée par H19.

Ensuite, nous avons étudié plusieurs phénotypes cellulaires connus pour être régulés par p53, comme l'arrêt du cycle cellulaire, l'induction de l'apoptose et la sénescence.



**Figure 38. H19 réprime l'activité de p53.**

**A.** Activité luciférase relative d'un plasmide rapporteur de l'activité de p53, dérivé d'un PGL4-luc dans des MCF-7 contrôles (mock) ou surexprimant stablement H19 (H19). **B.** Analyse de la répartition dans le cycle cellulaire de MCF-7 contrôles (mock) ou surexprimant stablement H19 (H19) traitées à la doxorubicine (0,2  $\mu$ M) après synchronisation pendant 24h avec de l'aphidicoline (6  $\mu$ M). **C.** Des MCF-7 contrôles (mock) ou surexprimant stablement H19 (H19) ont été marquées à l'iodure de propidium (PI) et analysées par cytométrie de flux pour étudier l'induction de l'apoptose après traitement à la doxorubicine (0,6  $\mu$ g/mL pendant 6h, 12h, 18h ou 24h). Le pourcentage de cellules en phase sub-G1 est

représenté pour chaque condition (expérience représentative). Les résultats présentés dans le graphique sont la moyenne de trois expériences indépendantes, ainsi que les écarts-types associés. **D.** Pourcentage de cellules  $C_{12}FDG$  positives dans des MCF-7 contrôles (mock) ou surexprimant stablement  $H19$  ( $H19$ ) traitées ou non à la doxorubicine ( $0,067 \mu M$  pendant 72h). Les résultats présentés dans le graphique sont la moyenne de trois expériences indépendantes, ainsi que les écarts-types associés. *p53 RE* : élément de réponse à *p53*. \* :  $p < 0,05$  ; \*\* :  $p < 0,01$  ; \*\*\* :  $p < 0,001$  ; ns : non significatif.

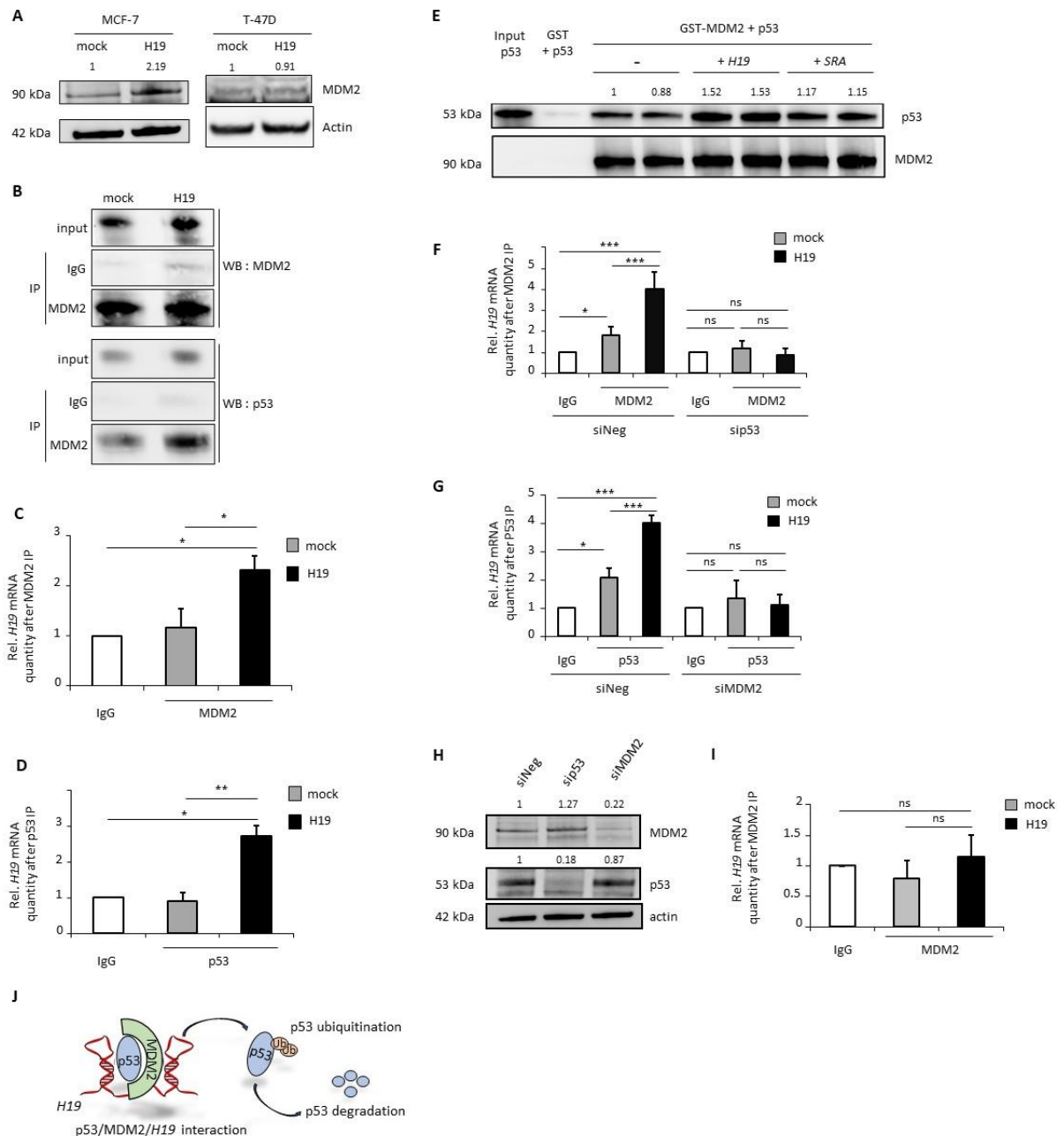
Pour ce faire, nous avons traité nos modèles cellulaires avec de la doxorubicine, qui est une drogue génotoxique. Pour analyser la répartition des cellules dans les phases du cycle cellulaire, nous avons synchronisé les cellules en G1 en utilisant de l'aphidicoline ( $6 \mu M$ , 24h), puis nous avons traité les cellules avec de la doxorubicine pendant 24h avant de les analyser en cytométrie de flux (**Figure 38.B**). Le traitement à la doxorubicine induit une accumulation de cellules en phase G2. De plus, en conditions de surexpression de  $H19$ , une augmentation faible mais significative du nombre de cellules en phase S accompagnée d'une diminution du nombre de cellules en phase G2 a été observée en comparaison à la condition contrôle. Ces résultats indiquent que la surexpression de  $H19$  limite l'arrêt du cycle cellulaire induit par le traitement. Pour déterminer le niveau d'apoptose au sein d'une population cellulaire, une des techniques les plus largement utilisées consiste à mesurer la quantité d'ADN fractionné. Par cytométrie de flux, les cellules marquées à l'iodure de propidium vont montrer une intensité plus faible ainsi qu'un pic juste avant le pic de la phase G1 et caractérisant les cellules en sub-G1. Ce pic en sub-G1 reflète la présence de fragments nucléaires et cellulaires, mais surtout de corps apoptotiques. Pour visualiser ce pic sub-G1 dans notre modèle, les cellules ont été traitées selon des durées variables (6h, 12h, 18h ou 24h) avec  $0,6 \mu g/mL$  de doxorubicine, avant d'être analysées par cytométrie de flux. Le traitement à la doxorubicine induit la formation d'un pic sub-G1 plus important dans les cellules contrôles ; cependant, dans les cellules surexprimant stablement  $H19$ , le pic sub-G1 est plus faible quelle que soit la durée du traitement (**Figure 38.C**). Ce résultat indique que l'expression de  $H19$  réprime la mort cellulaire. Concernant l'induction de la sénescence, les cellules ont été traitées avec une faible dose de doxorubicine ( $0,067 \mu g/mL$ ) pendant 3 jours. Les cellules sénescents ( $C_{12}FDG+$ ) sont détectées par cytométrie de flux (**Figure 38.D**). Parmi les cellules contrôles, 15% de cellules  $C_{12}FDG+$  sont détectées, alors que seulement 10% de cellules  $C_{12}FDG+$  sont détectées parmi les cellules surexprimant stablement  $H19$  :  $H19$  permet donc de réduire la sénescence des cellules induite par le traitement à la doxorubicine.

Ainsi, tous ces résultats indiquent que l'expression de  $H19$  réprime l'activité



transcriptionnelle de p53, mais impacte également des phénotypes tels que l'arrêt du cycle cellulaire, l'apoptose et l'induction de la sénescence, qui sont connus pour être régulés par p53 après endommagement de l'ADN.

## E- H19 interagit simultanément avec p53 et MDM2 pour induire la dégradation de p53



**Figure 39. Formation d'un complexe ternaire H19/p53/MDM2.**

**A.** Expression protéique de MDM2 dans des MCF-7 et T-47D contrôles (mock) ou surexprimant stablement H19 (H19) déterminée par western blot. L'actine est utilisée comme témoin de charge. Les intensités relatives des signaux ont été quantifiées par ImageJ et indiquées au-dessus de la bande correspondante. **B.** Co-immunoprécipitation de p53 et MDM2 dans des T-47D contrôles (mock) ou

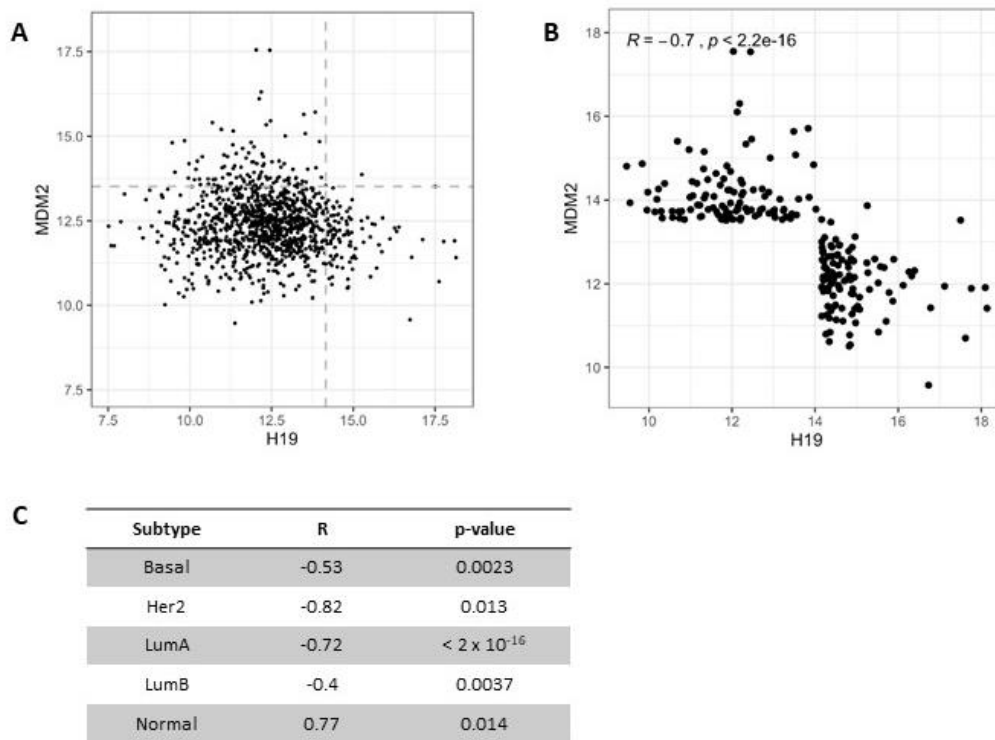
surexprimant stablement H19 (H19) traitées avec du MG132 pendant 6h. La détection des protéines immunoprécipitées est réalisée par western blot. **C.** La proportion d'ARN H19 associée aux protéines MDM2 est déterminée par qRT-PCR après immunoprécipitation de MDM2 dans des MCF-7 contrôles (mock) ou surexprimant stablement H19 (H19). La condition IgG est indexée à 1 et utilisée comme contrôle. **E.** Interaction p53/MDM2 in vitro. Des protéines p53-His ont été synthétisées par transcription/traduction couplée in vitro et incubées en présence de quantités équivalentes de GST ou de MDM2-GST en présence ou non de H19. L'ARN SRA est utilisé comme contrôle. Les complexes sont précipités grâce à des billes de sépharose contenant du glutathion, resuspendues dans du SDS-PAGE 12% et analysées par western blot avec des anticorps dirigés contre p53 ou MDM2. Des résultats de western blot représentatifs sont figurés. **F.** et **G.** Les proportions d'ARN H19 associées aux protéines MDM2 (**F.**) ou p53 (**G.**) sont déterminées par qRT-PCR après immunoprécipitation des protéines dans des MCF-7 contrôles (mock) ou surexprimant stablement H19 (H19) transfectées au préalable avec des siRNAs contrôle (siNeg) ou dirigés contre p53 (**F.**) ou MDM2 (**G.**). La condition IgG est indexée à 1 et utilisée comme contrôle. **H.** Expression de p53 et MDM2 après transfection de siRNAs analysée par western blot. L'actine est utilisée comme témoin de charge. Les intensités relatives des signaux ont été quantifiées par ImageJ et indiquées au-dessus de la bande correspondante. **I.** La proportion d'ARN H19 associée aux protéines MDM2 est déterminée par qRT-PCR après immunoprécipitation de MDM2 dans des Calu-6 contrôles (mock) ou surexprimant stablement H19 (H19). La condition IgG est indexée à 1 et utilisée comme contrôle. Toutes les expériences ont été réalisées au moins 3 fois. Pour les graphiques, les données représentent la moyenne de 3 expériences indépendantes et les écarts-types associés.  
 \* :  $p < 0,05$  ; \*\* :  $p < 0,01$  ; \*\*\* :  $p < 0,001$  ; ns : non significatif.

La diminution du niveau protéique de p53 dans les cellules exprimant H19 nous a incités à déterminer si H19 pouvait être impliqué dans la dégradation de p53. En effet, comme nous l'avons évoqué précédemment, p53 peut interagir *via* son domaine transactivateur avec l'ubiquitine ligase E3 MDM2, entraînant son ubiquitinylation et sa dégradation par la voie du protéasome.

Nous avons donc d'abord analysé les niveaux de MDM2 dans des MCF-7 surexprimant stablement ou non H19 (**Figure 39.A**). Dans les MCF-7 surexprimant stablement H19, la quantité de MDM2 semble plus importante. En revanche, dans les T-47D, aucune différence n'est visible : nous avons donc choisi cette lignée pour réaliser une co-immunoprécipitation de p53 et MDM2 (**Figure 39.B**). Dans des T-47D préalablement traitées avec du MG132 (un inhibiteur du protéasome), la co-immunoprécipitation révèle que l'association entre p53 et MDM2 est plus importante lorsque H19 est surexprimé. Ainsi, H19 semble capable de favoriser l'association de p53 avec son principal régulateur MDM2. Pour confirmer ce résultat, nous avons ensuite réalisé une immunoprécipitation des ARNs (RIP, *RNA immunoprecipitation*) de façon à mettre en évidence la potentielle interaction de H19 avec p53 ou MDM2. Nous avons constaté qu'en immunoprécipitant MDM2 (**Figure 39.C**) ou p53 (**Figure 39.D**), nous récupérons de plus grandes quantités d'ARN H19 : ceci signifie que H19 interagit à la fois avec p53 et MDM2. Pour déterminer si cette interaction a lieu de manière

directe ou indirecte, nous avons ensuite réalisé un GST *pull-down* en utilisant une protéine de fusion glutathion S-transférase (GST)-MDM2 immobilisée ainsi que des protéines His-p53 traduites *in vitro*, et ce en présence ou non d'ARN *H19* synthétisé *in vitro* (**Figure 39.E**). Les protéines His-p53 interagissent avec les protéines de fusion GST-MDM2, mais pas avec la GST seule. L'ajout de *H19* augmente l'association entre p53 et MDM2 comparé aux conditions sans ARN ou en présence de l'ARN contrôle *SRA* : ceci suggère donc une interaction directe entre *H19*, p53 et MDM2. Pour aller plus loin et déterminer si *H19* peut interagir avec une seule des deux protéines indépendamment de l'autre, nous avons réalisé des immunoprécipitations d'ARNs après invalidation de l'expression de p53 ou MDM2 par siRNA (**Figures 39.F, G et H**). L'efficacité de cette invalidation a été vérifiée par western blot (**Figure 39.H**). De façon intéressante, l'invalidation de p53 réprime l'interaction entre *H19* et MDM2 (**Figure 39.F**), et l'invalidation de MDM2 réprime l'interaction entre *H19* et p53 (**Figure 39.G**). De plus, l'immunoprécipitation des ARNs dans des Calu-6, qui sont naturellement dépourvues de protéines p53, ne montre pas d'enrichissement en ARN *H19* après précipitation de MDM2 (**Figure 39.I**). L'ensemble de ces résultats montre donc que *H19* interagit directement avec p53 et MDM2, formant un complexe tripartite (**Figure 39.J**) : cette interaction favorise la liaison entre p53 et MDM2, entraînant la dégradation de p53.

Comme *H19* et MDM2 semblent tous deux favoriser l'inhibition de l'expression protéique de p53, nous avons analysé la corrélation potentielle entre l'expression de *H19* et l'expression de MDM2 en utilisant les banques de données transcriptomiques de TCGA (**Figure 40.A**). Dans cette analyse, 1095 échantillons ont été utilisés, dont les sous-types sont distribués comme suit : Basal (190), Her2 (82), LumA (566), LumB (217) et Normal (40). Un total de 217 échantillons présents dans le 90<sup>ème</sup> centile de l'expression de chacun des deux gènes ont été sélectionnés, représentant 20% de la banque de données initiale (**Figure 40.B**). Le coefficient de corrélation de Pearson R a été calculé sur ces échantillons, et une corrélation négative a été mise en évidence entre les expressions de *H19* et MDM2 ( $R = -0,7$ ) dans les différents sous-types de cancer du sein, sauf dans le sous-type normal (**Figure 40.C**). Ces données semblent indiquer que les surexpressions de MDM2 et *H19* sont mutuellement exclusives, ce qui confirme le fait que *H19* et MDM2 ont le même effet sur p53.



**Figure 40. Corrélation d'expression entre *H19* et *MDM2* dans les échantillons BRCA de TCGA.**

**A.** Expression de *H19* et *MDM2* dans 1095 échantillons BRCA de TCGA. Les lignes en pointillés représentent le 90<sup>ème</sup> centile de l'expression de chacun des deux gènes. **B.** Expression de *H19* et *MDM2* dans les 217 échantillons BRCA de TCGA sélectionnés selon le 90<sup>ème</sup> centile de l'expression de chacun des deux gènes. Le coefficient de corrélation de Pearson *R* est calculé, montrant une corrélation négative. **C.** Analyse de la corrélation des échantillons sélectionnés selon le sous-type de cancer du sein.

L'ensemble de ces résultats montre donc pour la première fois une interaction entre le lncRNA *H19* et les protéines p53 et MDM2 dans les cellules cancéreuses mammaires. Cette interaction entraîne la dégradation de p53 et empêche son activation après induction de dommages de l'ADN. De plus, nous mettons en évidence que l'expression des gènes cibles de p53 comme *cdkn1a* ou *bax* est réprimée, ce qui favorise la progression dans le cycle cellulaire, et réduit l'apoptose des cellules. Enfin, nous montrons que par son action sur p53, *H19* favorise l'instabilité génomique. Ceci mènera probablement à l'accumulation de cellules mutées, et favorisera ainsi la tumorigenèse et la progression tumorale mammaire.

## II – Le long ARN non codant *H19* favorise la réparation de l'ADN des cellules cancéreuses mammaires

### A- Introduction

---

Comme nous venons de l'exposer, l'expression de *H19* dans les cellules cancéreuses mammaires favorise leur instabilité génomique. Il est bien connu dans la littérature que dès les premiers stades de la tumorigenèse, la dérégulation des oncogènes induit une première instabilité du génome (Negrini *et al.*, 2010). La nature et le taux des altérations génétiques qui émergent dans le modèle dépendent des mécanismes qui maintiennent l'intégrité du génome, et qui sont le plus souvent dérégulés dans la tumeur. Dans ce contexte, la réparation des altérations de l'ADN est l'un des mécanismes les plus étudiés (Jeggo *et al.*, 2016).

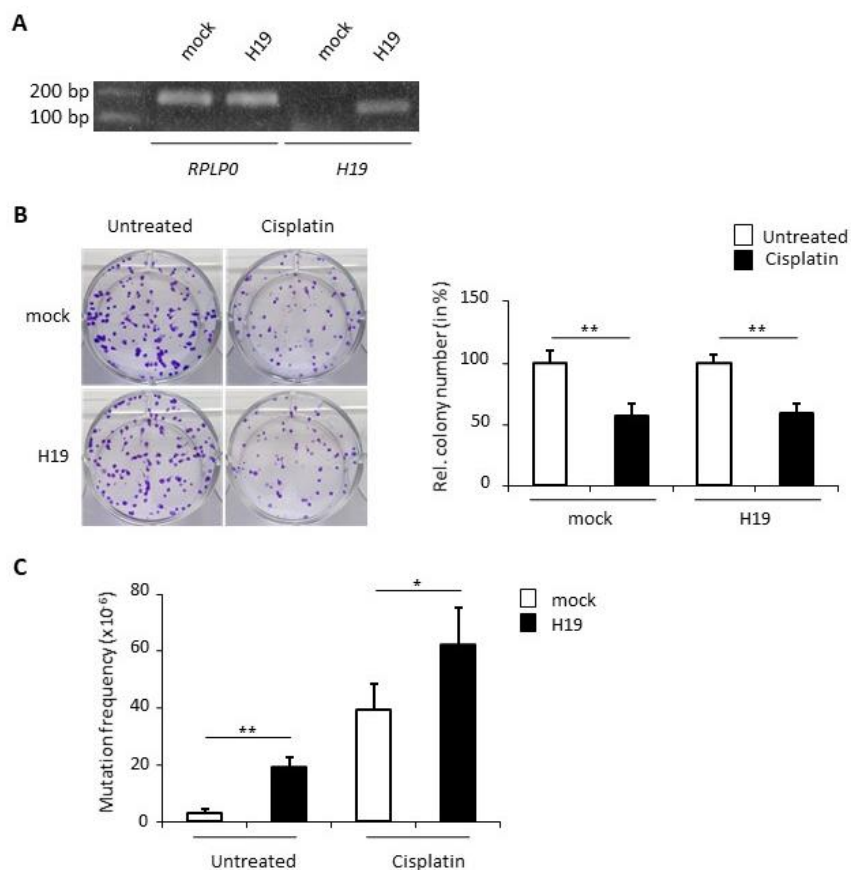
En effet, de nombreuses données de la littérature décrivent la réponse aux dommages de l'ADN comme étant un des mécanismes favorisant l'apparition de mutations dans le génome des cellules cancéreuses (Jackson et Bartek, 2009). Plus particulièrement, comme nous l'avons détaillé dans l'introduction de ce manuscrit, dans le cas des cancers du sein héréditaires, des mutations de gènes impliqués dans la réponse aux dommages de l'ADN comme *BRCA1/2* ou *53BP1* sont observées (Bouwman *et al.*, 2010; Fackenthal et Olopade, 2007). Les perturbations de cette réponse aux dommages de l'ADN pourront ainsi générer des erreurs de réplication, et donc des mutations. De façon complémentaire, le fait que plusieurs gènes de réponse aux dommages de l'ADN soient mutés ou inactivés pendant la progression tumorale renforce l'idée que ces gènes aient un rôle suppresseur de tumeur.

### B- *H19* favorise l'instabilité génomique

---

Pour évaluer les conséquences de la perturbation des phénotypes associés à p53 par *H19* sur la stabilité du génome, nous avons réalisé un test *Hprt* sur des cellules CHO-K1, qui possèdent seulement un allèle du gène *Hprt*. Les CHO-K1 ont été transfectées avec un vecteur codant pour *H19*, de façon à établir des lignées surexprimant stablement *H19* (**Figure 41.A**). Cette expression de *H19* n'a pas d'influence sur la formation de colonies lorsque les cellules sont traitées ou non au cisplatine, une drogue connue pour induire des dommages de l'ADN et des mutations génomiques (Silva *et al.*, 2005) (**Figure 41.B**). Les cellules ont ensuite été cultivées dans un milieu sélectif contenant du 6-TG, qui est métabolisé par l'enzyme HPRT

pour produire un dérivé toxique induisant la mort cellulaire. De cette façon, seules les cellules mutées pour le gène *Hprt* peuvent croître dans ce milieu. L'expression de *H19* pendant au moins 10 semaines induit une augmentation de la fréquence de mutation, même sans traitement au cisplatine (**Figure 41.C**). Comme prévu, le traitement au cisplatine augmente la fréquence de mutation : cette augmentation est plus importante dans les cellules qui surexpriment *H19*.



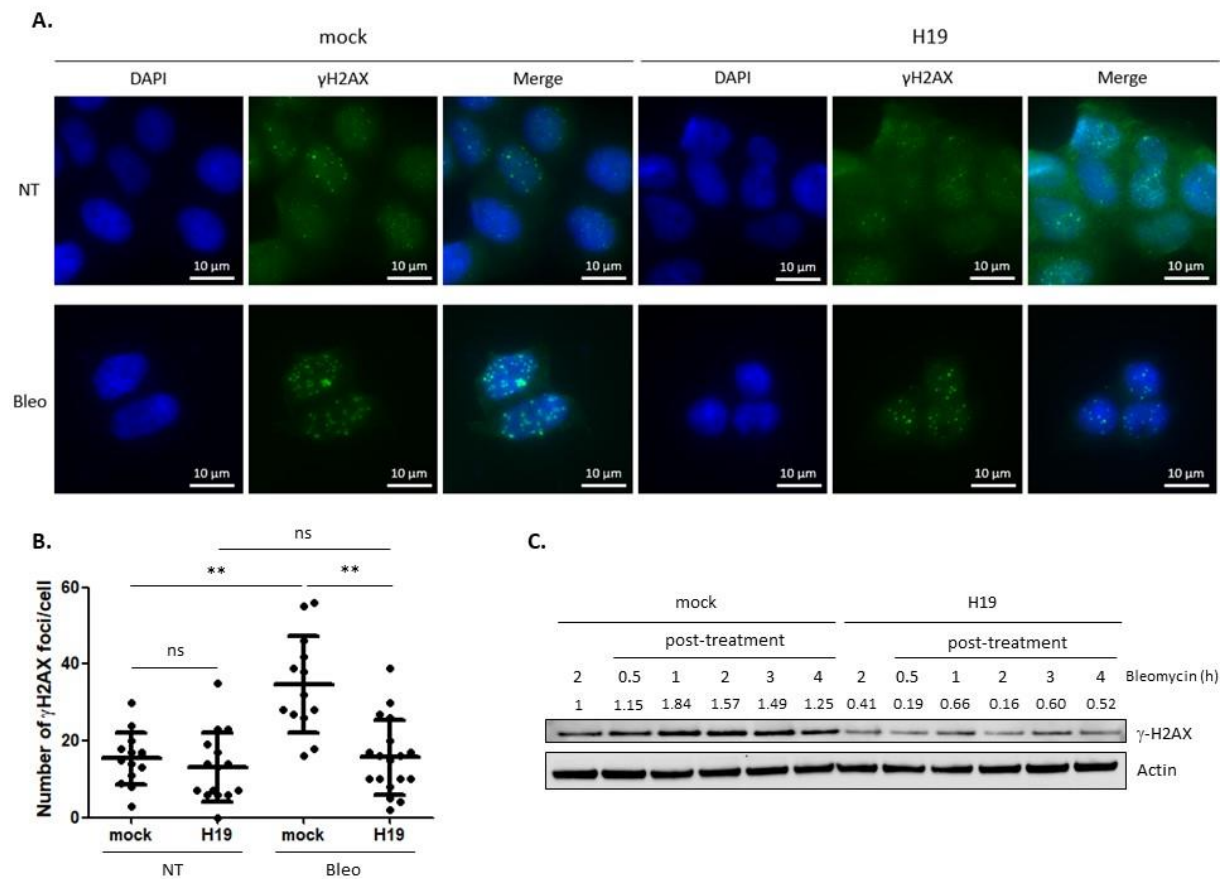
**Figure 41. *H19* augmente la fréquence de mutation des cellules.**

**A.** Expression de l'ARNm *H19* dans des cellules CHO-K1 contrôles (*mock*) ou surexprimant stablement *H19* (*H19*), déterminée par RT-PCR semi-quantitative. L'ARNm *RPLP0* est utilisé comme contrôle. **B.** Effet de la surexpression de *H19* sur la viabilité des CHO-K1 traitées ou non au cisplatine (15  $\mu$ M pendant 1h) mesuré par clonogénicité. Les photos sont issues d'une expérience représentative et le graphique représente la moyenne de 3 expériences indépendantes. **C.** Détermination de la fréquence de mutation après traitement au 6-TG de CHO-K1 contrôles (*mock*) ou surexprimant stablement *H19* (*H19*), traitées ou non au cisplatine (15  $\mu$ M pendant 1h). La fréquence de mutation est mesurée comme décrit dans la partie Matériels et Méthodes.

\* :  $p < 0,05$  ; \*\* :  $p < 0,01$  ; \*\*\* :  $p < 0,001$  ; ns : non significatif.

## C- L'expression de H19 diminue le nombre de foci de $\gamma$ H2AX

Un des marqueurs les plus largement utilisés pour la détection des dommages de l'ADN est la phosphorylation de l'histone H2AX (variant  $\gamma$ H2AX). En effet, l'histone H2AX est phosphorylée en réponse à l'activation des kinases ATM, ATR et DNA-PK, en conséquence de l'apparition de dommages de l'ADN (Nagelkerke et Span, 2016; Sharma *et al.*, 2012). Les foci de  $\gamma$ H2AX, formés au niveau des cassures, sont ainsi utilisés pour détecter les sites de dommages.



**Figure 42. L'expression de H19 réprime la phosphorylation de l'histone H2AX.**

**A.** Marquage par immunofluorescence des foci de  $\gamma$ H2AX dans des cellules MCF-7 surexprimant stablement ou non H19 et traitées ou non à la bléomycine (30  $\mu$ g/ $\mu$ L, 2h). **B.** Quantification du nombre de foci de  $\gamma$ H2AX par cellule selon les conditions. **C.** Analyse du niveau de phosphorylation de H2AX par western blot dans des cellules MCF-7 surexprimant stablement ou non H19 après traitement à la bléomycine (30  $\mu$ g/ $\mu$ L, 2h), ou 0,5h, 1h, 2h, 3h et 4h après arrêt du traitement. L'actine est utilisée comme témoin de charge. Les intensités relatives des signaux ont été quantifiées par ImageJ et indiquées au-dessus de la bande correspondante. Toutes les expériences ont été réalisées au moins 3 fois. Le graphique représente la combinaison de 3 expériences indépendantes. NT : non traitées ; \*\* :  $p < 0,01$ .

Dans un premier temps, nous avons traité nos cellules MCF-7 surexprimant stablement ou non *H19* à la bléomycine (agent génotoxique permettant d'induire des cassures de l'ADN). Suite à ce traitement, nous avons réalisé un marquage par immunofluorescence de façon à mettre en évidence les foci de  $\gamma$ H2AX formés. Dans les cellules MCF-7, le nombre de foci de  $\gamma$ H2AX est moins important lorsque *H19* est stablement surexprimé (**Figures 42.A et B**). Après traitement à la bléomycine, le nombre de foci augmente dans les deux conditions, mais il reste plus faible dans les MCF-7 surexprimant stablement *H19*. De façon complémentaire, nous avons analysé la phosphorylation de H2AX par western blot (**Figure 42.C**). Dans les cellules MCF-7 surexprimant stablement *H19*, le niveau de phosphorylation de H2AX est réduit après traitement à la bléomycine, mais également jusqu'à 4h après arrêt du traitement.

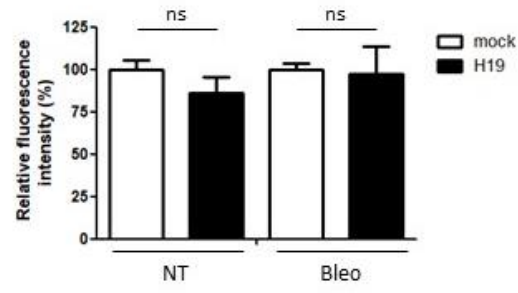
Ces résultats semblent donc indiquer que l'expression de *H19* diminue la signalisation des cassures de l'ADN en réduisant le nombre de foci de  $\gamma$ H2AX.

#### D- L'expression de *H19* est associée à une diminution des cassures de l'ADN

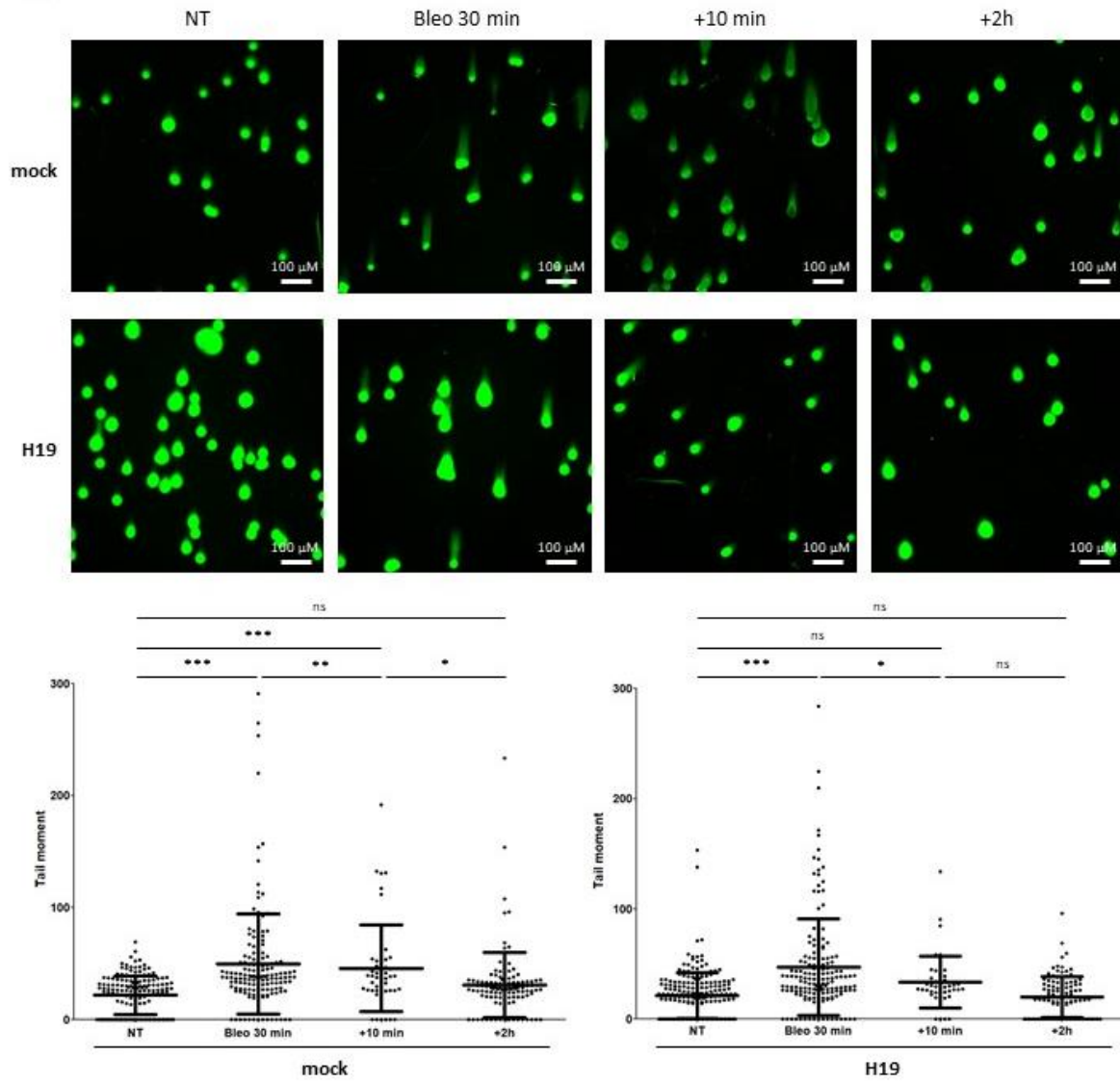
Suite à ces résultats, nous avons voulu étudier l'effet de l'expression de *H19* sur l'induction de cassures de l'ADN des cellules cancéreuses mammaires. Nous avons d'abord déterminé le niveau de stress oxydant dans notre modèle d'étude. En effet, une augmentation du niveau de ROS a été détectée dans de nombreux cancers, et pourrait être à l'origine de l'endommagement de l'ADN par stress répliatif (Moloney et Cotter, 2018). Nous avons utilisé une sonde H<sub>2</sub>DCFDA (Invitrogen) de façon à déterminer si la surexpression de *H19* a un impact sur le niveau de ROS intracellulaire (**Figure 43.A**). Dans des cellules MCF-7 surexprimant stablement ou non *H19*, le niveau de ROS ne varie pas, et ce avec ou sans traitement à la bléomycine.

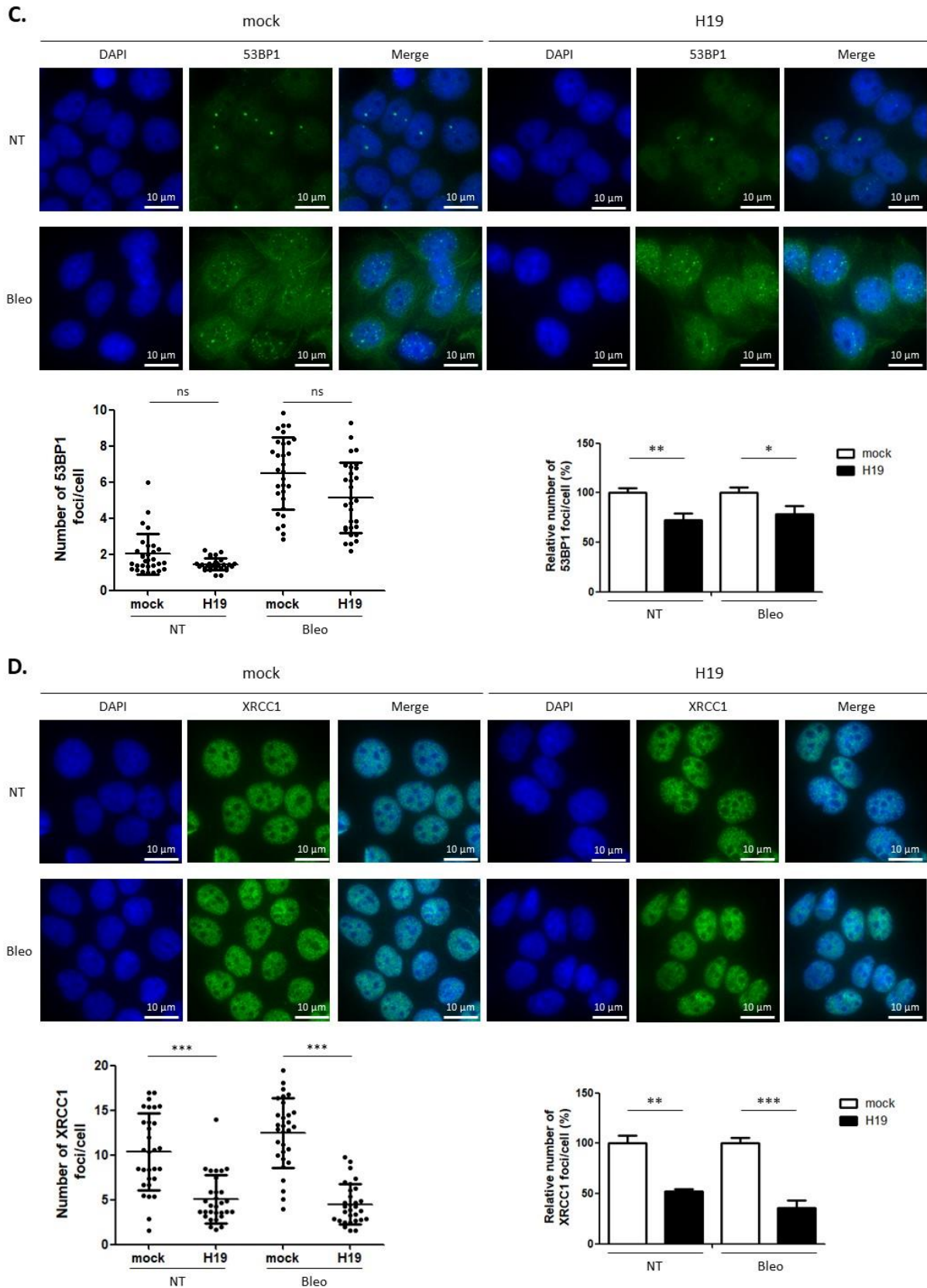


A.



B.





**Figure 43.** L'expression de *H19* diminue la proportion de cassures de l'ADN des cellules cancéreuses mammaires.

**A.** Analyse du niveau de ROS dans des cellules MCF-7 surexprimant stablement ou non *H19* et traitées ou non à la bléomycine (30 µg/µL, 2h). **B.** Des cellules MCF-7 surexprimant stablement ou non *H19* sont

traitées à la bléomycine (30 µg/µL, 30 min), puis des essais comètes sont réalisés juste après le traitement ou à différents temps (10 min, 2h) après le traitement. La quantification des essais comètes selon les conditions représente le "tail moment", qui correspond au calcul suivant : Tail moment = (intensité de la queue/intensité totale)\*longueur de la queue. **C.** Marquage par immunofluorescence des foci de 53BP1 dans des cellules MCF-7 surexprimant stablement ou non H19 et traitées ou non à la bléomycine (30 µg/µL, 2h). La quantification des marquages est représentée selon le nombre de foci de 53BP1 par cellule et selon le nombre relatif de foci de 53BP1 selon les conditions. **D.** Marquage par immunofluorescence des foci de XRCC1 dans des cellules MCF-7 surexprimant stablement ou non H19 et traitées ou non à la bléomycine (30 µg/µL, 2h). La quantification des marquages est représentée selon le nombre de foci de XRCC1 par cellule et selon le nombre relatif de foci de XRCC1 selon les conditions. Les graphiques représentent la combinaison de 3 expériences indépendantes. NT : non traitées ; \* :  $p < 0,05$  ; \*\* :  $p < 0,01$  ; \*\*\* :  $p < 0,001$  ; ns : non significatif.

Ensuite, nous avons réalisé des essais comètes sur nos lignées afin de déterminer l'influence de *H19* sur l'apparition de cassures de l'ADN proprement dites (**Figure 43.B**). Lors d'un essai comète, la présence de cassures de l'ADN est détectable après migration des cellules : si l'ADN n'a pas été endommagé, il sera révélé sous la forme d'une sphère compacte ("tête de la comète"), alors que si l'ADN a été endommagé, les fragments d'ADN plus légers migreront en-dehors de cette sphère, formant un halo ("queue de la comète") s'étirant dans le sens opposé à la migration. Dans des cellules MCF-7 surexprimant ou non *H19*, nous évaluons la proportion de cassures en calculant le "tail moment", qui prend en compte l'intensité lumineuse de la "queue", l'intensité lumineuse de la "tête" et la longueur de la "queue". Lorsque les cellules MCF-7 contrôles (mock) sont traitées à la bléomycine, on constate une forte augmentation du tail moment due à l'induction de cassures de l'ADN (**Figure 43.B**). Ce tail moment diminue progressivement jusqu'à revenir à un niveau comparable aux cellules non traitées, 2h après l'arrêt du traitement. Dans le cas des cellules MCF-7 surexprimant stablement *H19* (*H19*), le tail moment augmente fortement après le traitement à la bléomycine, mais on constate que ce tail moment diminue jusqu'à atteindre un niveau comparable à celui des cellules non traitées beaucoup plus rapidement (environ 10 min post-traitement) que pour les cellules contrôles. De façon complémentaire, nous avons réalisé des marquages par immunofluorescence des protéines 53BP1 et XRCC1, qui sont des marqueurs de cassures double et simple brin de l'ADN respectivement (**Figures 43.C et D**). Dans les deux cas, le traitement à la bléomycine augmente le nombre de foci par cellule dans toutes les conditions, mais dans les MCF-7 surexprimant stablement *H19*, le nombre de foci est toujours significativement plus faible.

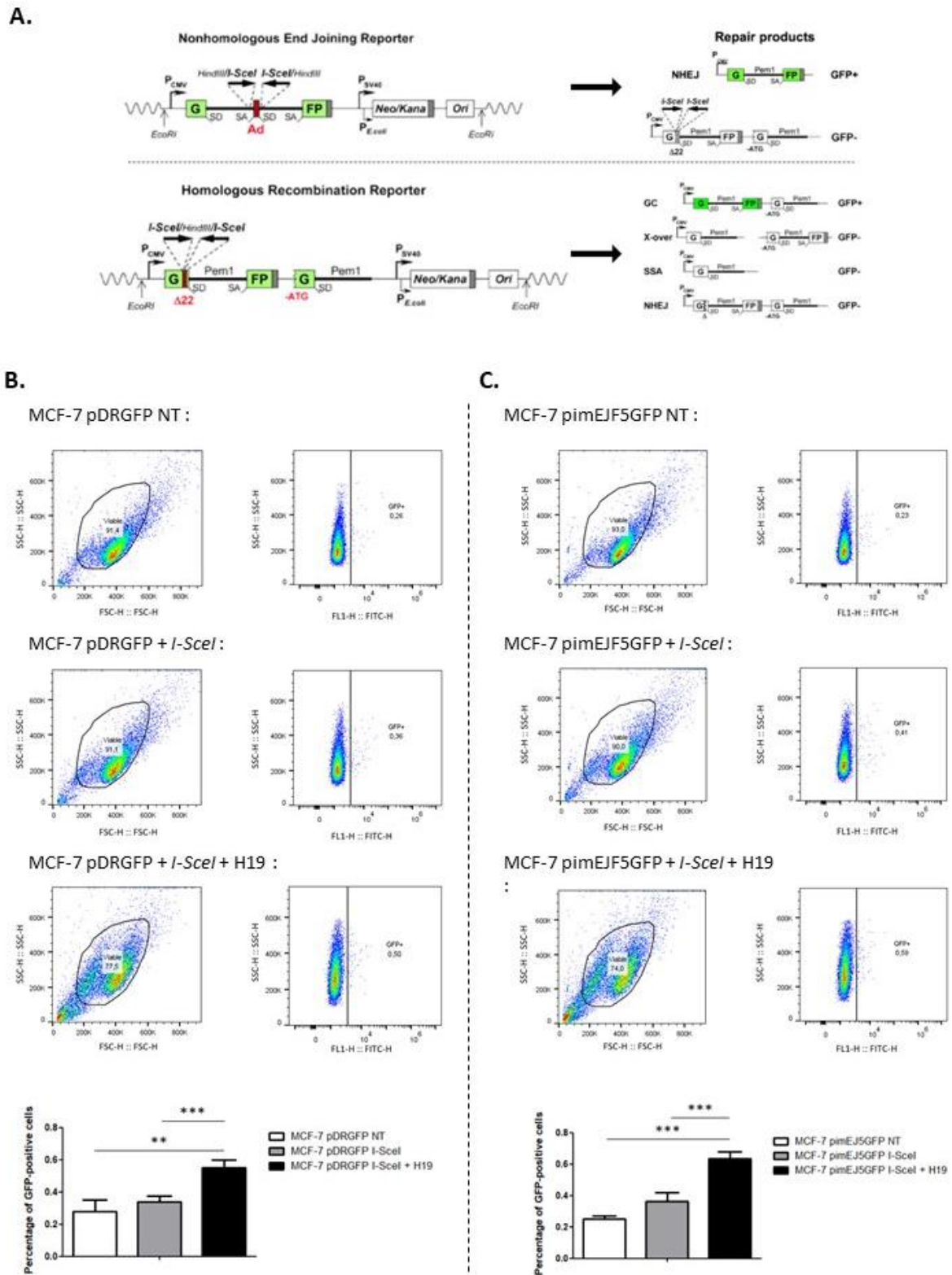
Ainsi, l'ensemble de ces résultats suggère que l'expression de *H19* a un effet protecteur

contre les cassures de l'ADN, de façon directe en empêchant l'apparition de cassures ou de façon indirecte en favorisant leur réparation.

### E- *H19* augmente l'activité des systèmes de réparation des cassures de l'ADN

Dans le but de caractériser l'action de *H19* sur les cassures de l'ADN, nous nous sommes intéressés aux mécanismes de réparation de l'ADN. La réparation des cassures de l'ADN est essentielle pour la survie de la cellule. Deux mécanismes principaux sont mis en place pour prendre en charge et réparer une cassure : la réparation par jonction des extrémités non homologues (NHEJ) et la réparation par recombinaison homologe (HR) (voir **paragraphe II-G-3**). Il est admis que l'efficacité de réparation de ces deux mécanismes diffère, puisque la réparation par HR génère un produit de réparation fidèle au brin matrice, alors que la réparation par NHEJ génère un produit de réparation moins fidèle pouvant générer des mutations (Ceccaldi *et al.*, 2016). Nous avons ainsi vérifié l'implication potentielle de *H19* dans ces mécanismes. Pour cela, nous avons transfecté deux systèmes rapporteurs pDRGFP et pimEJ5GFP dans des cellules MCF-7 de façon à générer des clones surexprimant stablement ces vecteurs (**Figure 44**).

Ces systèmes rapporteurs sont basés sur un gène de la GFP comportant plusieurs sites de coupure à l'enzyme de restriction *I-SceI* (**Figure 44.A**). En générant des coupures double brin de l'ADN, cette enzyme va permettre une réparation par HR ou par NHEJ selon le système rapporteur utilisé. De cette façon, l'émission de fluorescence GFP observée sera le témoin d'une cassure de l'ADN réparée. Dans notre modèle, une expression transitoire de *H19* par transfection d'un plasmide pcDNA3.1-H19 a permis de déterminer l'efficacité de réparation par HR ou NHEJ.



**Figure 44. H19 favorise la réparation des cassures de l'ADN par HR et NHEJ.**

**A.** Systèmes rapporteurs *pimEJ5GFP* et *pDRGFP* permettant la détection de la réparation de l'ADN par jonction des extrémités non homologues (NHEJ) et recombinaison homologue (HR) respectivement (adapté de Seluanov et al., 2010). **B.** Mesure de l'émission de fluorescence par cytométrie de flux de cellules MCF-7 surexprimant stablement le vecteur *pDRGFP* en présence ou non de H19 (expérience représentative). Les pourcentages de cellules GFP-positives sont indiqués et quantifiés selon les conditions. **C.** Mesure de l'émission de fluorescence par cytométrie de flux de cellules MCF-7

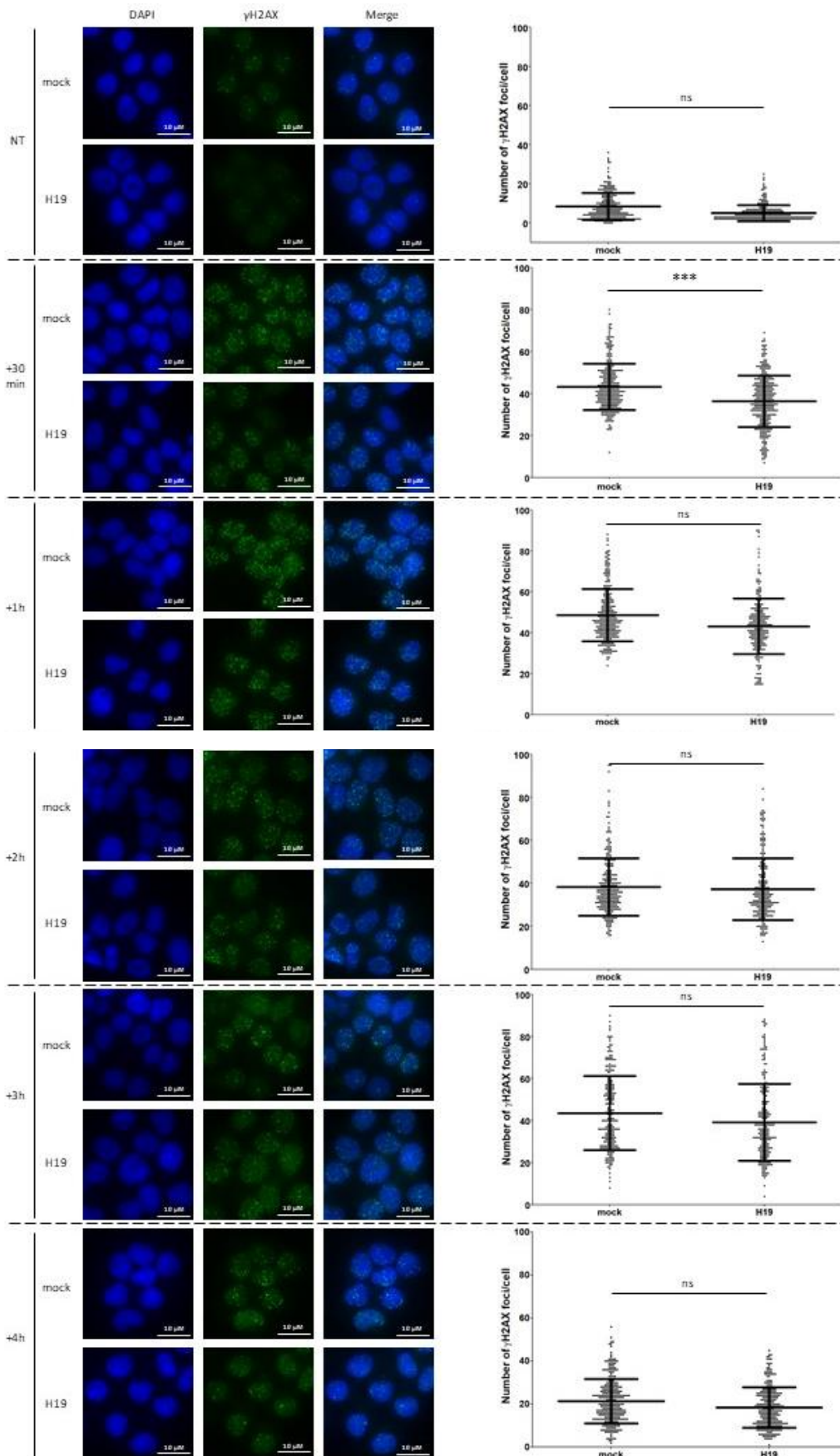
surexprimant stablement le vecteur *pimEJ5GFP* en présence ou non de *H19* (expérience représentative). Les pourcentages de cellules GFP-positives sont indiqués et quantifiés selon les conditions. Les résultats présentés dans les graphiques sont la moyenne de trois expériences indépendantes, ainsi que les écarts-types associés

NT : non transfectées ; \*\* :  $p < 0,01$  ; \*\*\* :  $p < 0,001$ .

L'activité de réparation par HR a été mesurée grâce au système rapporteur précédemment décrit, en présence ou non de *H19*. Cette activité a été mesurée dans des cellules MCF-7 par cytométrie de flux (**Figure 44.B**). Les résultats obtenus montrent qu'après transfection du vecteur pCBASceI (qui code l'enzyme *I-SceI*), les pourcentages de cellules GFP-positives sont plus importants en présence de *H19*. De façon similaire, l'activité de réparation par NHEJ a été mesurée grâce au système rapporteur précédemment décrit, en présence ou non de *H19*. Cette activité a été mesurée dans des cellules MCF-7 par cytométrie de flux (**Figure 44.C**). Les résultats obtenus montrent qu'après transfection du vecteur pCBASceI, les pourcentages de cellules GFP-positives sont également plus importants en présence de *H19*. Ainsi, ces résultats montrent que l'expression de *H19* favorise les mécanismes de réparation de l'ADN par HR et par NHEJ, ce qui pourrait expliquer la proportion moindre de cassures ainsi que la diminution du nombre de foci de  $\gamma$ H2AX en présence de *H19*.

#### F- *H19* favorise une réparation précoce des cassures de l'ADN

Les résultats obtenus grâce aux essais comètes et aux systèmes rapporteurs de la réparation semblent donc suggérer que l'expression de *H19* permet une réparation plus rapide des cassures de l'ADN dans les cellules cancéreuses mammaires. Pour décrire de façon plus précise cette différence d'activité, nous avons réalisé un test de cinétique de réparation sur des cellules MCF-7 surexprimant stablement ou non *H19* après irradiation. Un marquage de ces cellules par immunofluorescence a été réalisé, pour mettre en évidence les foci de  $\gamma$ H2AX et donc la présence de cassures de l'ADN ainsi que leur réparation progressive (**Figure 45**).



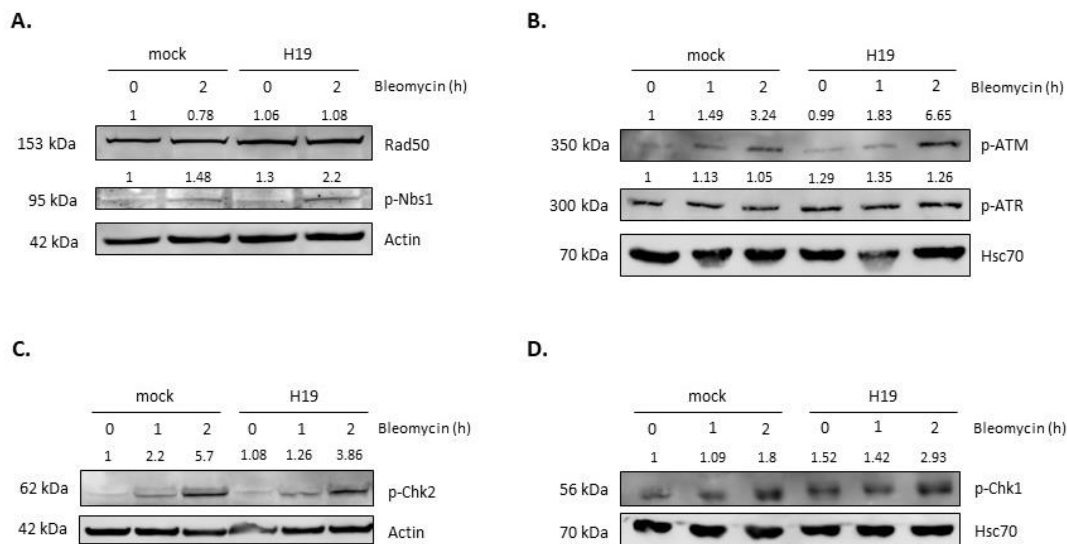
**Figure 45.** *H19* permet l'activation des mécanismes de réparation de l'ADN de façon plus précoce. Des cellules MCF-7 surexprimant stablement ou non *H19* sont irradiées (2 Gy). A 30min, 1h, 2h, 3h et

4h après irradiation, les cellules sont marquées par immunofluorescence pour révéler les foci de  $\gamma$ H2AX. La quantification représente le nombre de foci de  $\gamma$ H2AX par cellule. Les graphiques représentent la combinaison de 3 expériences indépendantes.

NT : non traitées ; \*\*\* :  $p < 0,001$ .

Pour évaluer la cinétique de réparation des cellules, nous avons choisi d'utiliser l'irradiation plutôt que le traitement à la bléomycine, de façon à éviter les biais causés par la durée du traitement. Les cellules ont été marquées par immunofluorescence 30 min, 1h, 2h, 3h et 4h après irradiation. Globalement, on constate que l'irradiation augmente fortement le nombre de foci de  $\gamma$ H2AX par cellule dans les deux conditions. De façon intéressante, on peut noter que cette augmentation est significativement réduite dans les cellules MCF-7 surexprimant stablement *H19* 30 min après l'irradiation. En revanche, de 1h à 4h après l'irradiation, la différence entre les conditions n'est pas significative, même si on observe une tendance à la diminution du nombre de foci dans les cellules surexprimant stablement *H19*. Ceci suggère que l'expression de *H19* permet la mise en place plus précoce des mécanismes de réparation des cassures de l'ADN.

De façon à confirmer cette hypothèse, nous avons ensuite étudié l'activation de différents senseurs et effecteurs de la voie de réponse aux dommages de l'ADN (DDR, *DNA damage response*) (**Figure 46**).



**Figure 46. L'expression de *H19* active la voie de réponse aux dommages de l'ADN.**

**A.** Analyse de l'expression de la protéine Rad50 et du niveau de phosphorylation de Nbs1 par western blot dans des cellules MCF-7 surexprimant stablement ou non *H19* après traitement à la bléomycine (30  $\mu$ g/ $\mu$ L, 2h). L'actine est utilisée comme témoin de charge. **B.** Analyse du niveau de phosphorylation de ATM et ATR par western blot dans des cellules MCF-7 surexprimant stablement ou non *H19* après traitement à la bléomycine (30  $\mu$ g/ $\mu$ L, 2h). La protéine Hsc70 est utilisée comme témoin de charge. **C.**



Analyse du niveau de phosphorylation de Chk2 par western blot dans des cellules MCF-7 surexprimant stablement ou non H19 après traitement à la bléomycine (30 µg/µL, 2h). L'actine est utilisée comme témoin de charge. **D.** Analyse du niveau de phosphorylation de Chk1 par western blot dans des cellules MCF-7 surexprimant stablement ou non H19 après traitement à la bléomycine (30 µg/µL, 2h). La protéine Hsc70 est utilisée comme témoin de charge. Les intensités relatives des signaux ont été quantifiées par ImageJ et indiquées au-dessus de la bande correspondante. Toutes les expériences ont été réalisées au moins 3 fois.

Lors de l'apparition d'une cassure de l'ADN, le complexe MRN est immédiatement recruté. Ce complexe est composé des protéines Rad50, Mre11 et Nbs1, qui est la sous-unité catalytique du complexe (He *et al.*, 2012). Nous constatons ici que dans les cellules MCF-7 surexprimant stablement H19, la protéine Rad50 est plus exprimée et la protéine Nbs1 est plus activée (**Figure 46.A**). Dans la voie de signalisation de réponse aux dommages de l'ADN, le complexe MRN active par phosphorylation les protéines ATM et ATR. Nous avons donc vérifié l'activation de ces protéines dans notre modèle (**Figure 46.B**). Après traitement à la bléomycine, dans les cellules MCF-7 surexprimant stablement H19, on observe une augmentation plus importante de la phosphorylation d'ATM par rapport aux cellules contrôles, accompagnée d'une légère augmentation de la phosphorylation d'ATR. Enfin, nous avons également étudié l'activation d'effecteurs plus en aval que sont les protéines Chk2 et Chk1 (**Figures 46.C et D**). Après traitement à la bléomycine, les niveaux de phosphorylation de Chk2 et Chk1 augmentent tous deux, mais cette augmentation est plus importante dans les cellules MCF-7 surexprimant stablement H19.

Ces résultats indiquent donc que l'expression de H19 favorise l'activation des effecteurs de la voie de réponse aux dommages de l'ADN. En complément des résultats précédents, ceci suggère que dans les cellules cancéreuses mammaires, H19 agit pour activer plus rapidement la réparation des dommages de l'ADN.

### G- H19 interagit avec EZH2 pour réprimer l'expression de *rif1*

Nous avons réalisé au laboratoire une étude transcriptomique par séquençage des ARNs (RNA-seq, *RNA sequencing*) afin de mesurer les changements d'expression génique dans nos lignées surexprimant stablement ou non H19. Cette étude permettra ainsi de mettre en évidence les gènes dont l'expression est régulée par H19. En couplant les résultats de cette étude avec une liste de gènes impliqués dans la réponse cellulaire à l'induction de dommages de l'ADN ([http://www.informatics.jax.org/vocab/gene\\_ontology/GO:0006974](http://www.informatics.jax.org/vocab/gene_ontology/GO:0006974)), nous avons

pu établir une liste de gènes cibles putatifs de *H19* (**Tableau 14**).

Parmi les données publiques disponibles, 2338 gènes sont annotés comme ayant un rôle dans la cellule en réponse aux dommages de l'ADN. Nous avons comparé ces gènes à nos données de RNA-seq : de ce croisement de données résulte une liste de 18 gènes différentiellement exprimés dans les cellules MCF-7 surexprimant stablement ou non *H19*. Globalement, nous pouvons constater que parmi ces gènes, la plupart de ceux favorisant la réparation de l'ADN sont régulés positivement par *H19*, ce qui confirme nos précédents résultats. Parmi ce panel, nous avons donc sélectionné les gènes impliqués dans la réparation de l'ADN pour mener des analyses plus approfondies.

<i>Symbole</i>	<i>Nom</i>	<i>Annotations</i>	<i>Régulation par H19</i>
<i>ACKR3</i>	<i>Atypical chemokine receptor 3</i>	Répression de la signalisation pro-apoptotique intrinsèque en réponse aux dommages de l'ADN	Sous-exprimé
<i>BACH1</i>	<i>BTB and CNC homology 1, basic leucine zipper transcription factor 1</i>	Réparation de l'ADN	Sur-exprimé
<i>BATF</i>	<i>Basic leucine zipper transcription factor, ATF-like</i>	Réponse aux dommages de l'ADN, transduction du signal induit par p53	Sur-exprimé
<i>CD44</i>	<i>CD44 antigen</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Répression de la réponse aux dommages de l'ADN, transduction du signal induit par p53</li> <li>• Répression de la signalisation pro-apoptotique intrinsèque en réponse aux dommages de l'ADN induite par p53</li> </ul>	Sur-exprimé
<i>CDKN1A</i>	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (P21)</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Réponse aux dommages de l'ADN, transduction du signal induit par p53 menant à un arrêt du cycle cellulaire</li> <li>• Médiation de la signalisation pro-apoptotique intrinsèque en réponse aux dommages de l'ADN induite par p53</li> </ul>	Sous-exprimé
<i>DDX11</i>	<i>DEAD/H (Asp-Glu-Ala-Asp/His) box helicase 11</i>	Activation de la réparation des cassures double brin de l'ADN	Sur-exprimé
<i>EPHA2</i>	<i>Eph receptor A2</i>	Médiation de la signalisation pro-apoptotique intrinsèque en réponse aux dommages de l'ADN	Sous-exprimé

EYA2	<i>EYA transcriptional coactivator and phosphatase 2</i>	Activation de la réparation de l'ADN	Sur-exprimé
FIGL1	<i>Fidgetin-like 1</i>	Régulation de la réparation des cassures double brin de l'ADN par HR	Sur-exprimé
NIPBL	<i>NIPBL cohesion loading factor</i>	Régulation de la réparation des cassures double brin de l'ADN lors de la réplication par échange entre chromatides sœurs	Sous-exprimé
PAK1	<i>P21 (RAC1) activated kinase 1</i>	Réponse cellulaire aux dommages de l'ADN	Sur-exprimé
PIF1	<i>PIF1 5'-to-3' DNA helicase</i>	Activation de la réparation de l'ADN	Sur-exprimé
RBM24	<i>RNA binding motif protein 24</i>	Réponse cellulaire aux dommages de l'ADN	Sous-exprimé
RECQL	<i>RecQ protein-like</i>	Réparation des cassures double brin de l'ADN par HR	Sur-exprimé
RIF1	<i>Replication timing regulatory factor</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Répression de la réparation des cassures double brin de l'ADN par HR</li> <li>• Activation de la réparation des cassures double brin de l'ADN par NHEJ</li> <li>• Maintenance des télomères en réponse aux dommages de l'ADN</li> </ul>	Sous-exprimé
SFN	<i>Stratifin</i>	Médiation de la signalisation pro-apoptotique intrinsèque en réponse aux dommages de l'ADN	Sur-exprimé
UVRAG	<i>UV radiation resistance associated gene</i>	Réparation des cassures double brin de l'ADN par NHEJ	Sous-exprimé
WDR70	<i>WD repeat domain 70</i>	Régulation de la réparation des cassures double brin de l'ADN	Sous-exprimé

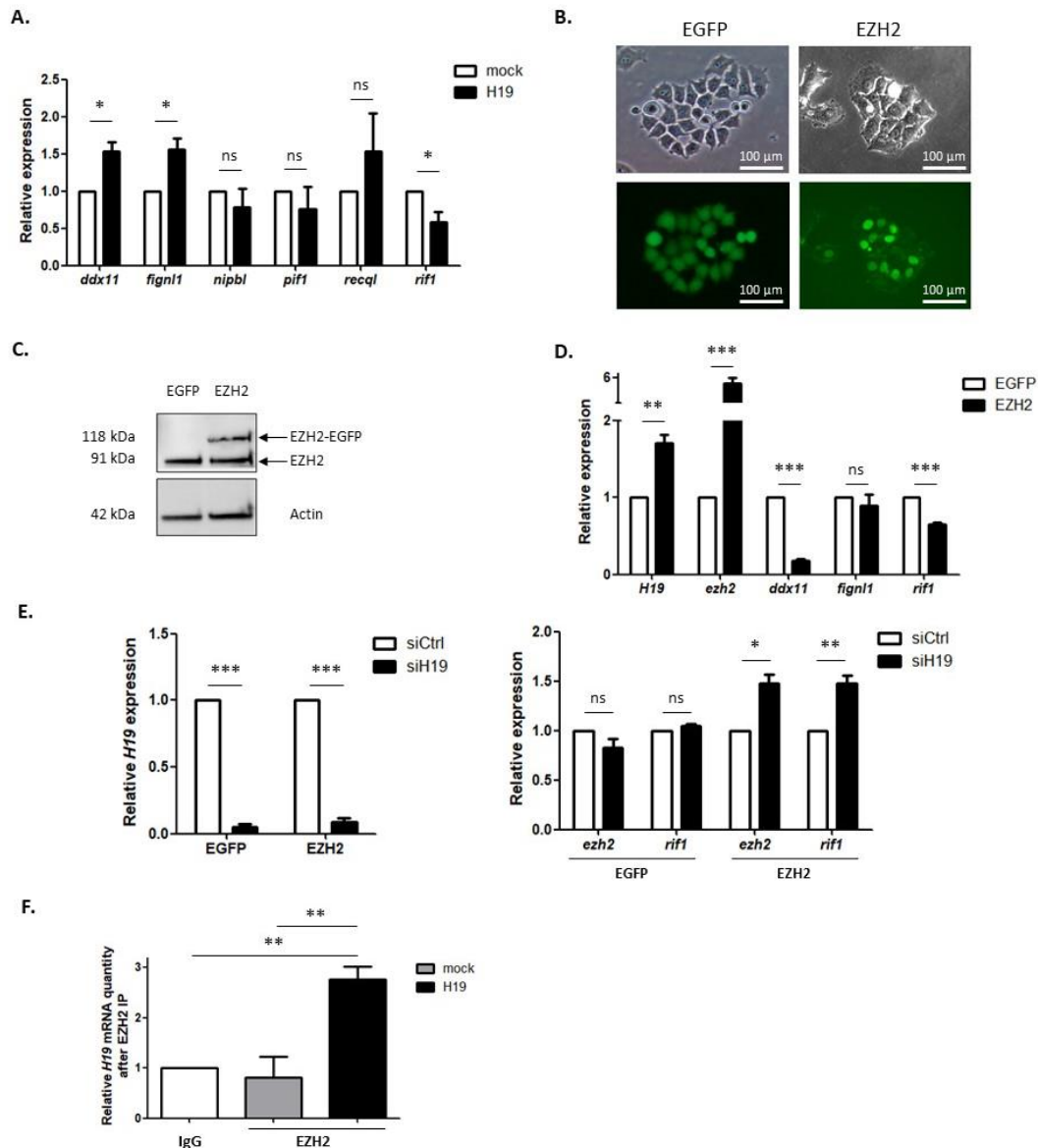
**Tableau 14.** Liste des gènes cibles putatifs de *H19* impliqués lors de la réponse aux dommages de l'ADN dans les cellules MCF-7.

Des résultats de RNA-seq sur des cellules MCF-7 surexprimant stablement ou non *H19* ont été croisés avec des données publiques de transcriptomique concernant des gènes impliqués lors de la réponse aux dommages de l'ADN.

Dans un premier temps, nous avons vérifié les résultats obtenus *in silico* dans nos modèles *in vitro*. Dans les cellules MCF-7 surexprimant stablement *H19*, les gènes *ddx11* et *figl1* sont sur-exprimés, et le gène *rif1* est réprimé (**Figure 47.A**). Concernant son mode

d'action transcriptionnel, il est bien établi dans la littérature que *H19* est capable d'interagir avec EZH2, la sous-unité du complexe PRC2, dans le contrôle de l'expression génique. Pour nos analyses suivantes, nous avons donc mis au point un modèle de surexpression stable de la protéine EZH2. Pour cela, nous avons transfecté des cellules MCF-7 avec un vecteur codant pour une protéine de fusion EZH2-EGFP. En parallèle, des cellules MCF-7 transfectées avec un vecteur codant pour l'EGFP sont utilisées comme contrôles. Les clones surexprimant ces protéines ont ensuite été sélectionnés puis triés sur la base de la fluorescence EGFP, de façon à obtenir des lignées MCF-7 surexprimant stablement la protéine de fusion EZH2-EGFP. L'expression de cette protéine est validée par microscopie (**Figure 47.B**), où on peut voir que les noyaux des cellules MCF-7 surexprimant stablement EZH2-EGFP apparaissent verts, alors que dans les MCF-7 contrôles c'est la cellule entière qui fluoresce en vert. Ces résultats sont confirmés en western blot, puisque dans les cellules MCF-7 surexprimant stablement EZH2, en plus de la bande correspondant à la protéine EZH2 endogène, nous observons une bande de plus haut poids moléculaire correspondant à la protéine de fusion EZH2-EGFP (**Figure 47.C**).

Dans ce modèle, nous avons ensuite analysé l'expression des gènes dont l'expression semble régulée par *H19* (*ddx11*, *figl1* et *rif1*). Nous constatons que l'expression des gènes *ddx11* et *rif1* est réprimée dans les cellules MCF-7 surexprimant stablement EZH2 (**Figure 47.D**). Pour des analyses complémentaires, nous avons choisi de nous focaliser sur l'expression du gène *rif1*. En effet, de nombreuses études ont montré l'implication de ce gène dans des phénomènes comme la réparation de l'ADN, la maintenance des télomères ainsi que la stabilité du génome des cellules (Chapman *et al.*, 2013; Mattarocci *et al.*, 2017; Mukherjee *et al.*, 2019). De façon à déterminer le mode de régulation de l'expression de *rif1*, nous avons transfecté dans des cellules MCF-7 surexprimant stablement EZH2 un siRNA ciblant spécifiquement *H19* (**Figure 47.E**). Nous pouvons constater que l'inhibition de l'expression de *H19* entraîne une ré-expression de *rif1* dans les MCF-7 surexprimant stablement EZH2, alors que cette ré-expression n'est pas retrouvée dans les cellules contrôles. Ceci suggère que la régulation de l'expression de *rif1* fait intervenir coopérativement *H19* et EZH2. Pour confirmer ces résultats, nous avons réalisé une immunoprécipitation des ARNs de façon à mettre en évidence la potentielle interaction entre *H19* et EZH2. Nous avons constaté qu'en immunoprécipitant EZH2, nous récupérons de plus grandes quantités d'ARN *H19* (**Figure 47.F**) : ceci suggère une interaction entre *H19* et EZH2, et confirme les résultats précédents.



**Figure 47. H19 réprime l'expression de *rif1* par l'intermédiaire de la protéine EZH2.**

**A.** Expression relative de *ddx11*, *fign1*, *nipbl*, *pif1*, *recql* et *rif1* dans des MCF-7 contrôles (mock) ou surexprimant stablement H19 (H19) déterminée par qRT-PCR. **B.** Des cellules MCF-7 ont été transfectées avec un vecteur contrôle codant pour l'EGFP (EGFP) ou un vecteur codant pour une protéine de fusion EZH2-EGFP (EZH2). Les clones surexprimant stablement l'une ou l'autre de ces deux protéines ont été sélectionnés puis triés sur la base de la fluorescence EGFP. **C.** Validation de l'expression de la protéine de fusion EZH2-EGFP par western blot. L'actine est utilisée comme témoin de charge. **D.** Expression relative de *H19*, *ezh2*, *ddx11*, *fign1*, *recql* et *rif1* dans des MCF-7 contrôles (EGFP) ou surexprimant stablement EZH2 (EZH2) déterminée par qRT-PCR. **E.** Des cellules MCF-7 contrôles (EGFP) ou surexprimant stablement EZH2 (EZH2) ont été transfectées avec un siRNA ciblant spécifiquement H19 (siH19). L'expression relative de *H19*, *ezh2* et *rif1* est déterminée par qRT-PCR après transfection du siH19. **F.** La proportion d'ARN H19 associée aux protéines EZH2 est déterminée par qRT-PCR après immunoprécipitation de EZH2 dans des MCF-7 contrôles (mock) ou surexprimant stablement H19 (H19). La condition IgG est indexée à 1 et utilisée comme contrôle. Toutes les expériences ont été réalisées au moins 3 fois. Pour les graphiques, les données représentent la moyenne de 3 expériences indépendantes et les écarts-types associés.

\* :  $p < 0,05$  ; \*\* :  $p < 0,01$  ; \*\*\* :  $p < 0,001$  ; ns : non significatif.

Collectivement, ces résultats montrent que *H19* interagit avec EZH2 pour réprimer l'expression du gène *rif1*, et ainsi moduler la réparation de l'ADN et la stabilité du génome des cellules cancéreuses mammaires.

**L'ensemble de ces résultats met donc en évidence un mode d'action inédit du lncRNA *H19* dans les cellules cancéreuses mammaires. En effet, nous montrons que *H19* augmente la fréquence de mutation des cellules, ce qui peut être expliqué par une réparation plus rapide des dommages de l'ADN. *H19* favorise l'activation notamment des mécanismes de réparation comme la recombinaison homologue ou la jonction des extrémités non-homologues, ainsi que les effecteurs impliqués dans la voie de réponse aux dommages de l'ADN. De plus, nous mettons en évidence une action de ce lncRNA à plusieurs niveaux puisque *H19* coopère avec EZH2, la sous-unité catalytique du complexe PRC2, dans la répression de l'expression de gènes comme *rif1*, permettant ainsi de moduler la mise en place des mécanismes de réparation de l'ADN. La réparation plus rapide des dommages de l'ADN permettra probablement une meilleure survie des cellules cancéreuses mammaires, ce qui pourrait expliquer leur résistance aux thérapies anti-cancéreuses conventionnelles.**

### III – Contributions relatives du long ARN non codant *H19* et de son miR-675 dans l’agressivité des cellules cancéreuses mammaires

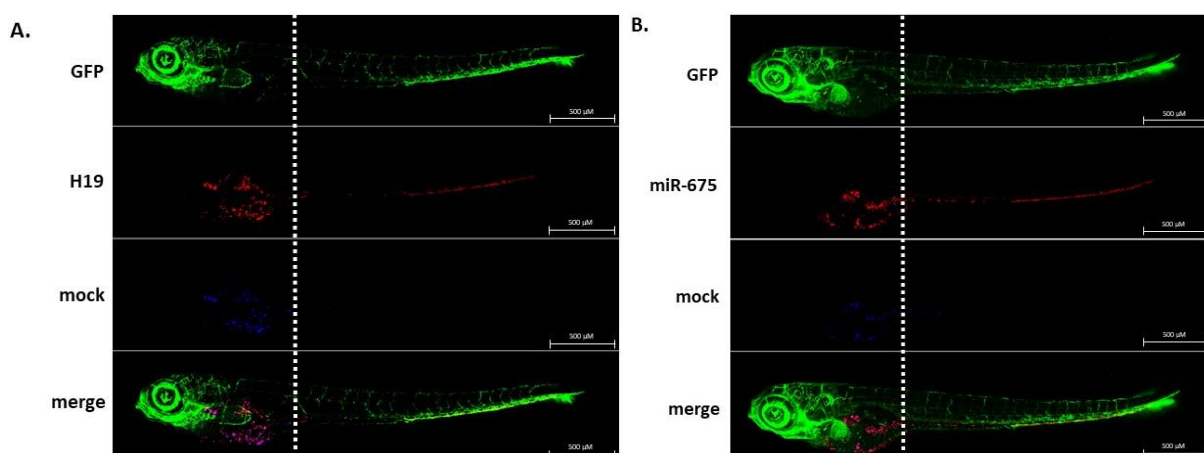
#### A- Introduction

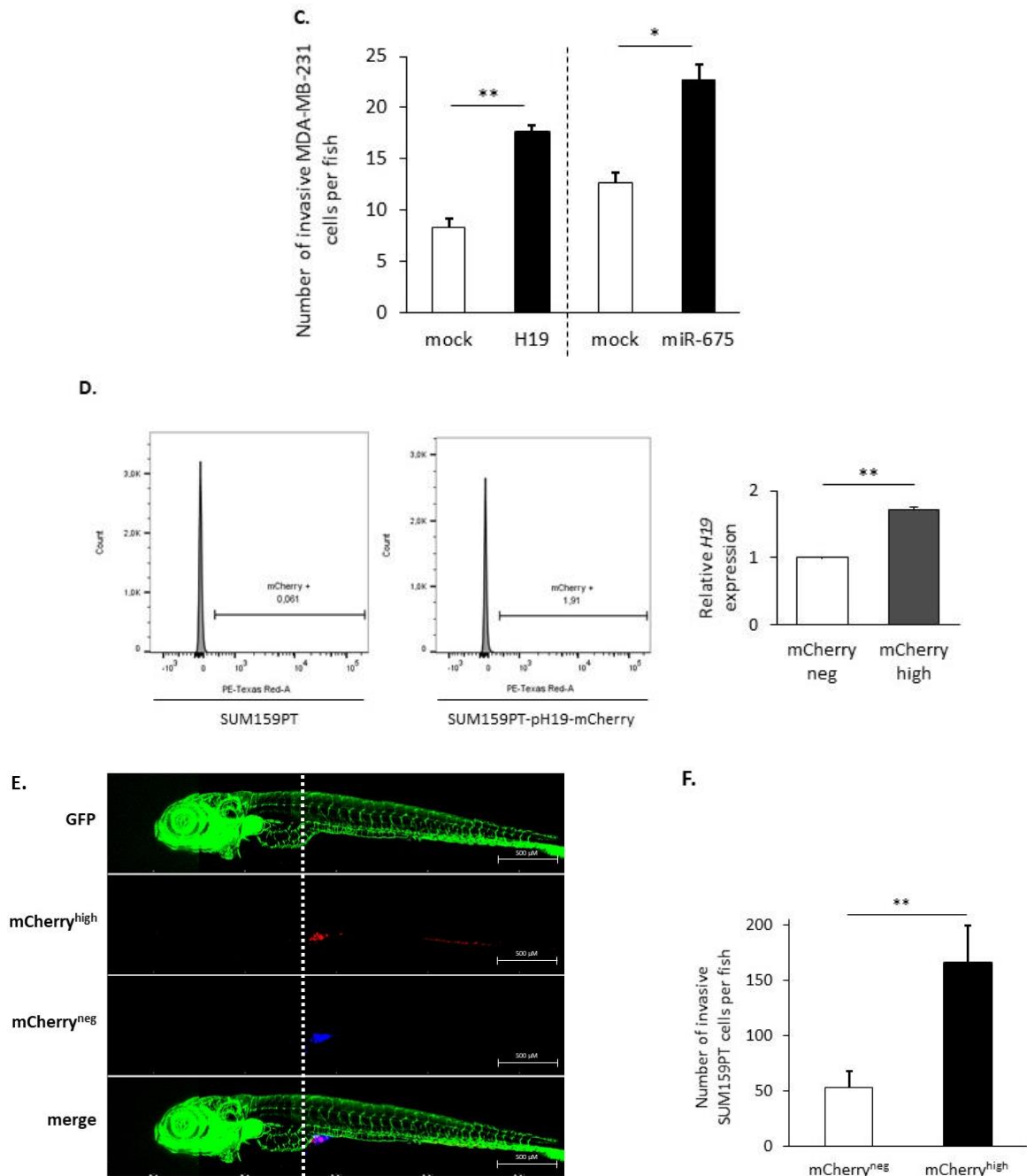
---

Dans ce manuscrit, nous avons déjà jusqu’à présent largement décrit les modes d’action du lncRNA *H19* contribuant à la progression tumorale des cellules cancéreuses mammaires. Dans une volonté de précision de ces mécanismes d’action, nous avons voulu étudier l’implication et la part relative de *H19* et de son miR-675 dans le développement et la progression des cancers du sein, et en particulier dans la dissémination métastatique. En effet, nous savons que *H19* favorise la migration, l’invasion et le développement de métastases dans le cancer du sein. De façon complémentaire, il a été montré que le miR-675 favorise la progression tumorale en ciblant l’expression de gènes suppresseurs de tumeur tels que *Rb*, *Twist1* ou encore *RUNX1* (Hernandez *et al.*, 2013; Tsang *et al.*, 2010; Zhuang *et al.*, 2014). Notre équipe a également identifié les ubiquitine ligases Cbl-b et c-Cbl comme étant des cibles du miR-675 dans le cancer du sein : leur inhibition entraîne une augmentation de la prolifération et de la migration des cellules cancéreuses mammaires (Vennin *et al.*, 2015).

#### B- *H19* et le miR-675 favorisent l’invasion des cellules cancéreuses mammaires *in vivo*

---





**Figure 48. H19 et le miR-675 favorisent tous deux l'invasion des cellules cancéreuses mammaires *in vivo*.**

**A.** Capacités invasives de cellules MDA-MB-231 surexprimant stablement H19 et leurs contrôles, marquées avec des traceurs lipophiles, dans des poissons zèbres transgéniques. Les photos en fluorescence ont été réalisées grâce à un logiciel d'acquisition d'image automatique. **B.** Capacités invasives de cellules MDA-MB-231 surexprimant stablement le miR-675 et leurs contrôles, marquées avec des traceurs lipophiles, dans des poissons zèbres transgéniques. Les photos en fluorescence ont été réalisées grâce à un logiciel d'acquisition d'image automatique. **C.** Quantification du nombre de cellules invasives par poisson zèbre. **D.** Fluorescence de la protéine mCherry dans des cellules SUM159PT transfectées ou non avec un plasmide pH19-mCherry. L'intensité de fluorescence est classée en sous-populations cellulaires mCherry<sup>neg</sup> et mCherry<sup>high</sup>. L'expression relative de H19 dans ces sous-populations est représentée. **E.** Capacités invasives des sous-populations mCherry<sup>neg</sup> et mCherry<sup>high</sup>, marquées avec des traceurs lipophiles, dans des poissons zèbres transgéniques. Les photos en



fluorescence ont été réalisées grâce à un logiciel d'acquisition d'image automatique. **F.** Quantification du nombre de cellules invasives par poisson zèbre. Toutes les expériences ont été réalisées au moins 3 fois. Pour les graphiques, les données représentent la moyenne de 3 expériences indépendantes et les écarts-types associés.

\* :  $p < 0,05$  ; \*\* :  $p < 0,01$  ; \*\*\* :  $p < 0,001$  ; ns : non significatif.

Pour étudier les contributions relatives de *H19* et de son miR-675 dans le processus métastatique *in vivo*, nous avons injecté des cellules cancéreuses mammaires, préalablement marquées avec des fluorophores liposolubles, dans le sac vitellin d'embryons de poissons zèbres transgéniques. L'invasion des cellules injectées a été analysée 3 jours après l'injection. Nous avons pu observer une augmentation de l'invasion de cellules MDA-MB-231 surexprimant stablement *H19* ou le miR-675 comparé aux cellules contrôles (**Figures 48.A à 48C**).

De façon à mettre en évidence le rôle de *H19* sans recourir à la surexpression ectopique, nous avons utilisé une lignée SUM159PT transfectée avec un vecteur permettant l'expression stable d'une protéine fluorescente rouge mCherry sous le contrôle du promoteur de *H19*. Ce système rapporteur permet ainsi de sélectionner les cellules surexprimant *H19* au sein d'une population totale, sans modifier son niveau d'expression. Comme nous nous y attendions, la fraction mCherry<sup>high</sup> est caractérisée par un plus grand niveau d'expression de *H19* comparé à la fraction mCherry<sup>neg</sup> (**Figure 48.D**), ce qui valide notre modèle cellulaire. Il est également à noter que le niveau d'expression de *H19* dans les cellules mCherry<sup>high</sup> peut varier selon les expériences (de 2 à 14 fois plus que dans la population mCherry<sup>neg</sup>). Dans tous les cas, nous sommes capables d'isoler les cellules surexprimant *H19* au sein d'une population totale hétérogène. Pour la suite des expériences, nous avons utilisé une population surexprimant *H19* d'un facteur 2.

Comme précédemment, les cellules SUM159PT pH19-mCherry<sup>neg/high</sup>, marquées avec des fluorophores liposolubles, ont été co-injectées dans le sac vitellin d'embryons de poissons zèbres transgéniques. En comparaison avec les cellules mCherry<sup>neg</sup>, les cellules mCherry<sup>high</sup> ont des capacités invasives plus importantes, puisqu'elles sont localisées plus loin vers l'extrémité caudale du poisson zèbre, à travers l'aorte dorsale, l'artère caudale puis la veine caudale (**Figure 48.E**). D'après la quantification réalisée (**Figure 48.F**), les cellules mCherry<sup>high</sup> sont trois fois plus invasives que les cellules mCherry<sup>neg</sup>, confirmant ainsi que les cellules surexprimant *H19* sont plus invasives.

Les capacités invasives des cellules cancéreuses mammaires surexprimant *H19* ou le

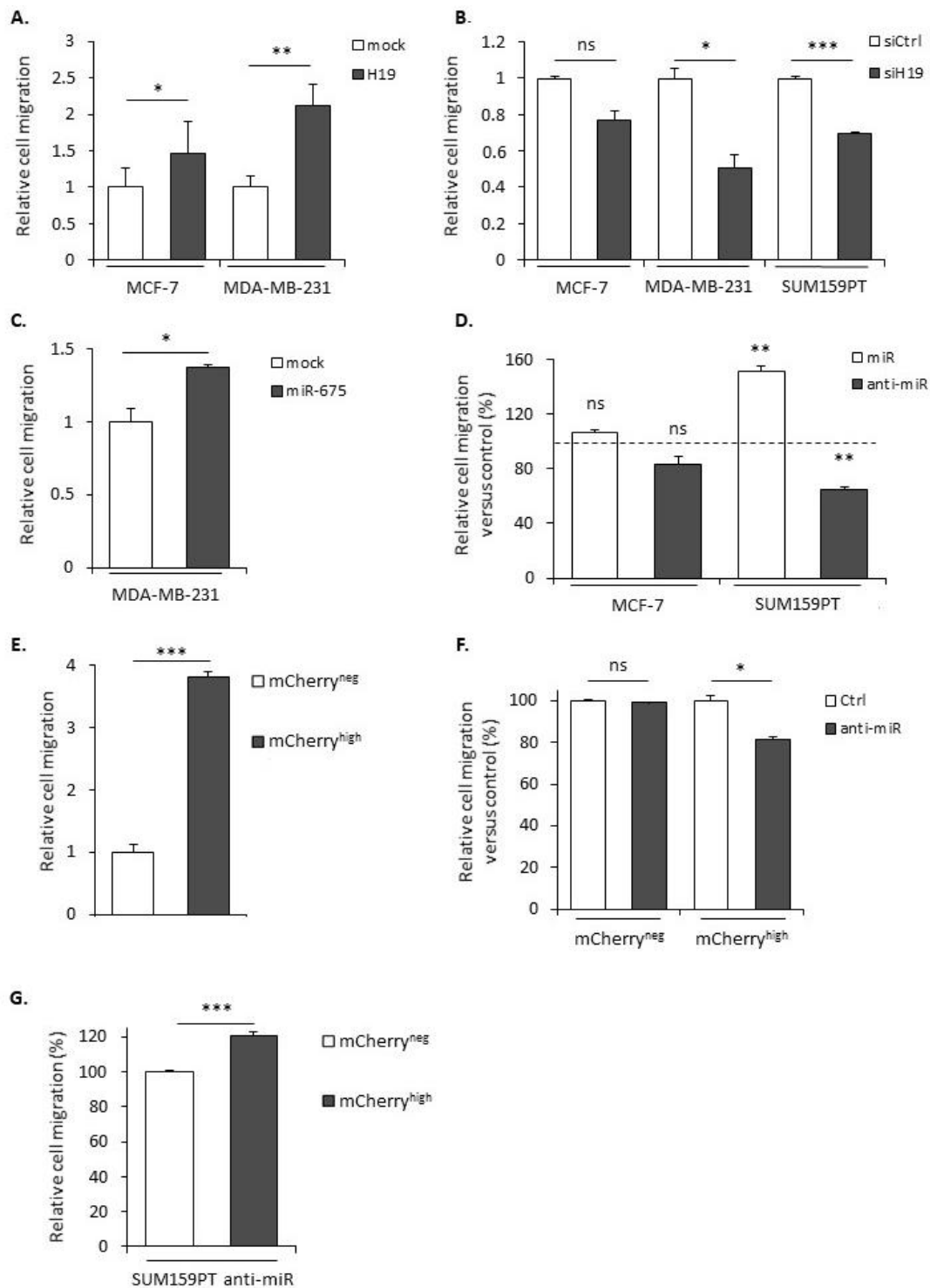
miR-675 *in vivo* nous ont incités à déterminer si et comment *H19* et le miR-675 peuvent influencer les cellules cancéreuses mammaires *in vitro* en termes de migration, d'invasion, d'EMT et de caractère souche, tous ces processus étant connus pour être impliqués dans l'invasion tumorale.

### C- *H19* et le miR-675 favorisent la migration et l'invasion des cellules cancéreuses mammaires *in vitro*

---

Les capacités migratoires des cellules cancéreuses mammaires surexprimant stablement ou non *H19* ou le miR-675 ont été déterminées par transwell. Dans un premier temps, nous avons observé que la migration de cellules MCF-7 ou MDA-MB-231 surexprimant stablement *H19* est plus importante (**Figure 49.A**). A l'inverse, les cellules MDA-MB-231 et SUM159PT natives transfectées avec un siRNA ciblant spécifiquement *H19* montrent des capacités de migration réduites (**Figure 49.B**). La migration de cellules MDA-MB-231 surexprimant stablement le miR-675 est également augmentée (**Figure 49.C**). De façon similaire, les cellules SUM159PT natives transfectées avec un anti-miR ciblant le miR-675 montrent des capacités de migration réduites (**Figure 49.D**).

Ensuite, la migration des deux populations cellulaires de notre modèle SUM159PT-pH19-mCherry a été analysée. Nous avons constaté une augmentation de la migration des cellules mCherry<sup>high</sup> comparé aux cellules mCherry<sup>neg</sup> (**Figure 49.E**). Après transfection d'un inhibiteur du miR-675 dans ces cellules, on peut constater que les capacités de migration des cellules mCherry<sup>high</sup> diminuent d'environ 20% comparé aux cellules contrôles (**Figure 49.F**). Cependant, lorsqu'on compare la migration des cellules mCherry<sup>neg</sup> et mCherry<sup>high</sup> après inhibition du miR-675, nous observons une augmentation de la migration des cellules mCherry<sup>high</sup> (**Figure 49.G**), suggérant que l'expression de *H19* à elle seule peut favoriser la migration cellulaire, indépendamment du miR-675.



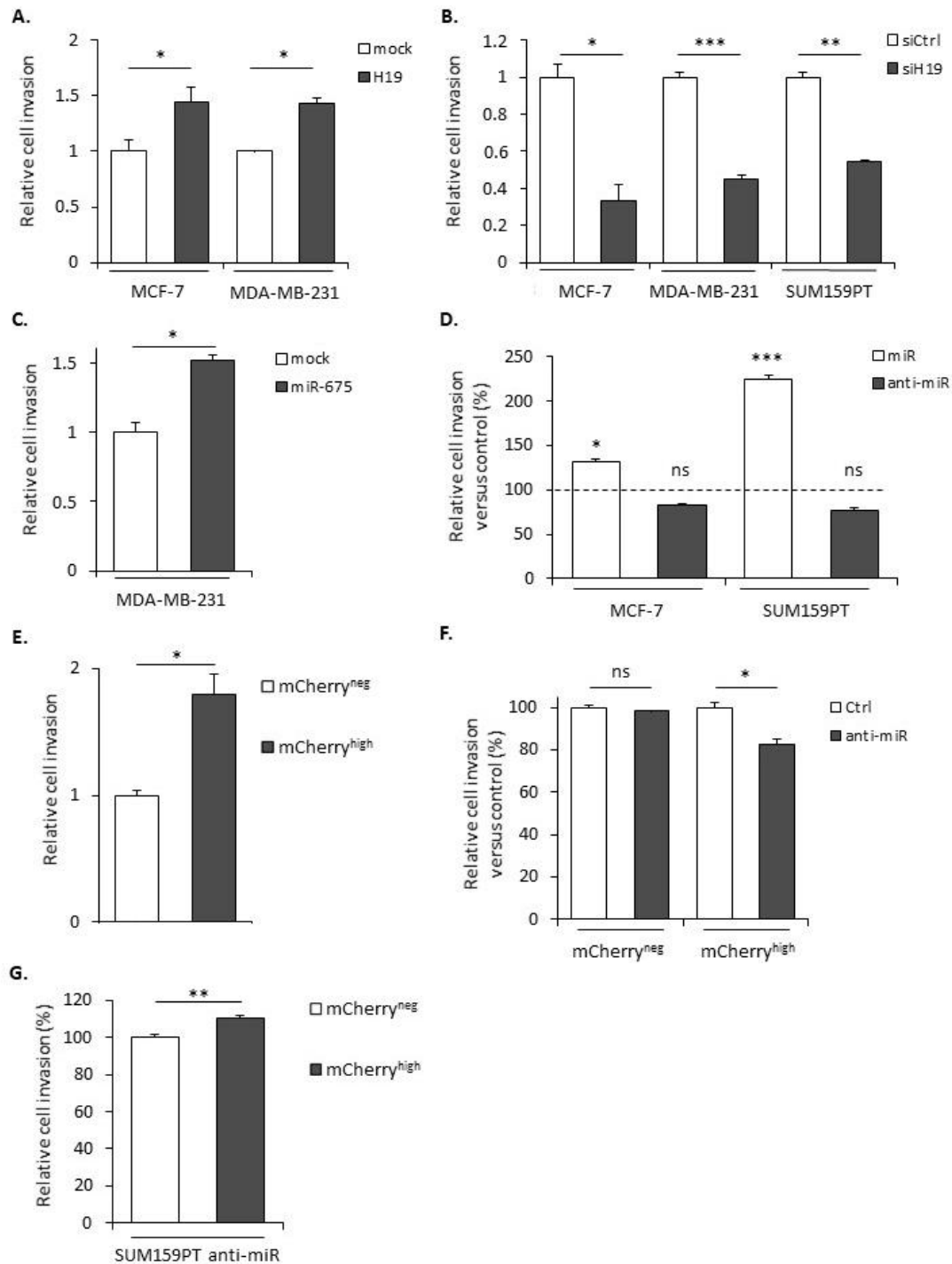
**Figure 49. H19 et le miR-675 favorisent tous deux la migration des cellules cancéreuses mammaires.**  
**A.** Des cellules contrôles (mock) ou surexprimant stablement H19 (H19) sont cultivées dans des transwells pendant 24h. Les cellules ayant migré sont colorées avec du Hoechst 33258 1 mM et comptées. **B.** Capacités migratoires de cellules contrôles (siCtrl) ou invalidées pour H19 (siH19) déterminées par transwell. **C.** Des cellules MDA-MB-231 contrôles (mock) ou surexprimant stablement le miR-675 (miR-675) sont cultivées dans des transwells pendant 24h. Les cellules ayant migré sont colorées avec du Hoechst 33258 1 mM et comptées. **D.** Capacités migratoires de cellules transfectées avec le miR-675 (miR) ou invalidées pour le miR-675 (anti-miR) déterminées par transwell. Les résultats sont présentés en pourcentage du contrôle. **E.** Capacités migratoires relatives de cellules SUM159PT-pH19-mCherry<sup>neg</sup> versus SUM159PT-pH19-mCherry<sup>high</sup> déterminées par transwell. **F.** Capacités

migratoires de cellules invalidées pour le miR-675 (anti-miR) déterminées par transwell. Les résultats sont présentés en pourcentage du contrôle. **G.** Capacités migratoires de cellules invalidées pour le miR-675 (anti-miR) déterminées par transwell. Les résultats sont présentés en pourcentage de la condition mCherry<sup>neg</sup>. Toutes les expériences ont été réalisées au moins 3 fois. Pour les graphiques, les données représentent la moyenne de 3 expériences indépendantes et les écarts-types associés.

\* :  $p < 0,05$  ; \*\* :  $p < 0,01$  ; \*\*\* :  $p < 0,001$  ; ns : non significatif.

Dans la continuité de cette étude, nous avons ensuite voulu déterminer le rôle de *H19* et de son miR-675 dans le processus d'invasion cellulaire, en utilisant des transwells "coatés" avec du collagène. Les capacités invasives de cellules MCF-7 et MDA-MB-231 surexprimant stablement *H19* sont augmentées par rapport aux cellules contrôles (**Figure 50.A**). De façon complémentaire, l'inactivation de l'expression de *H19* par siRNA réduit l'invasion des cellules MCF-7, MDA-MB-231 et SUM159PT natives (**Figure 50.B**). L'expression du miR-675 permet également d'augmenter l'invasion, comme nous le constatons dans les cellules MDA-MB-231 qui le surexpriment stablement (**Figure 50.C**) ou dans des cellules MCF-7 et SUM159PT transfectées avec un mimic miR-675 (**Figure 50.D**). L'invasion des cellules mCherry<sup>high</sup> est également plus importante, comparé aux cellules mCherry<sup>neg</sup> (**Figure 50.E**), et la transfection d'un anti-miR dirigé contre le miR-675 dans les cellules mCherry<sup>high</sup> diminue leurs capacités d'invasion, comparé aux cellules contrôles (**Figure 50.F**), mettant en évidence l'implication du miR-675 dans l'invasion induite par *H19*. Cependant, de la même manière que pour la migration cellulaire, l'invasion des mCherry<sup>high</sup> est plus importante lorsque le miR-675 est inhibé (**Figure 50.G**), indiquant que l'invasion induite par *H19* ne requiert pas l'action du miR-675.

L'ensemble de ces résultats permet donc de dire que *H19* comme le miR-675 sont capables de favoriser la migration et l'invasion des cellules cancéreuses mammaires.



**Figure 50. H19 et le miR-675 favorisent tous deux l'invasion des cellules cancéreuses mammaires.**

**A.** Des cellules contrôles (mock) ou surexprimant stablement H19 (H19) sont cultivées dans des transwells pendant 24h. Les cellules invasives sont colorées avec du Hoechst 33258 1 mM et comptées. **B.** Capacités invasives de cellules contrôles (siCtrl) ou invalidées pour H19 (siH19) déterminées par transwell. **C.** Des cellules MDA-MB-231 contrôles (mock) ou surexprimant stablement le miR-675 (miR-675) sont cultivées dans des transwells pendant 24h. Les cellules invasives sont colorées avec du Hoechst 33258 1 mM et comptées. **D.** Capacités invasives de cellules transfectées avec le miR-675 (miR) ou invalidées pour le miR-675 (anti-miR) déterminées par transwell. Les résultats sont présentés en pourcentage du contrôle. **E.** Capacités invasives relatives de cellules SUM159PT-pH19-mCherry<sup>neg</sup> versus SUM159PT-pH19-mCherry<sup>high</sup> déterminées par transwell. **F.** Capacités invasives de cellules invalidées pour le miR-675 (anti-miR) déterminées par transwell. Les résultats sont présentés en

pourcentage du contrôle. **G.** Capacités invasives de cellules invalidées pour le miR-675 (anti-miR) déterminées par transwell. Les résultats sont présentés en pourcentage de la condition mCherry<sup>neg</sup>. Toutes les expériences ont été réalisées au moins 3 fois. Pour les graphiques, les données représentent la moyenne de 3 expériences indépendantes et les écarts-types associés.

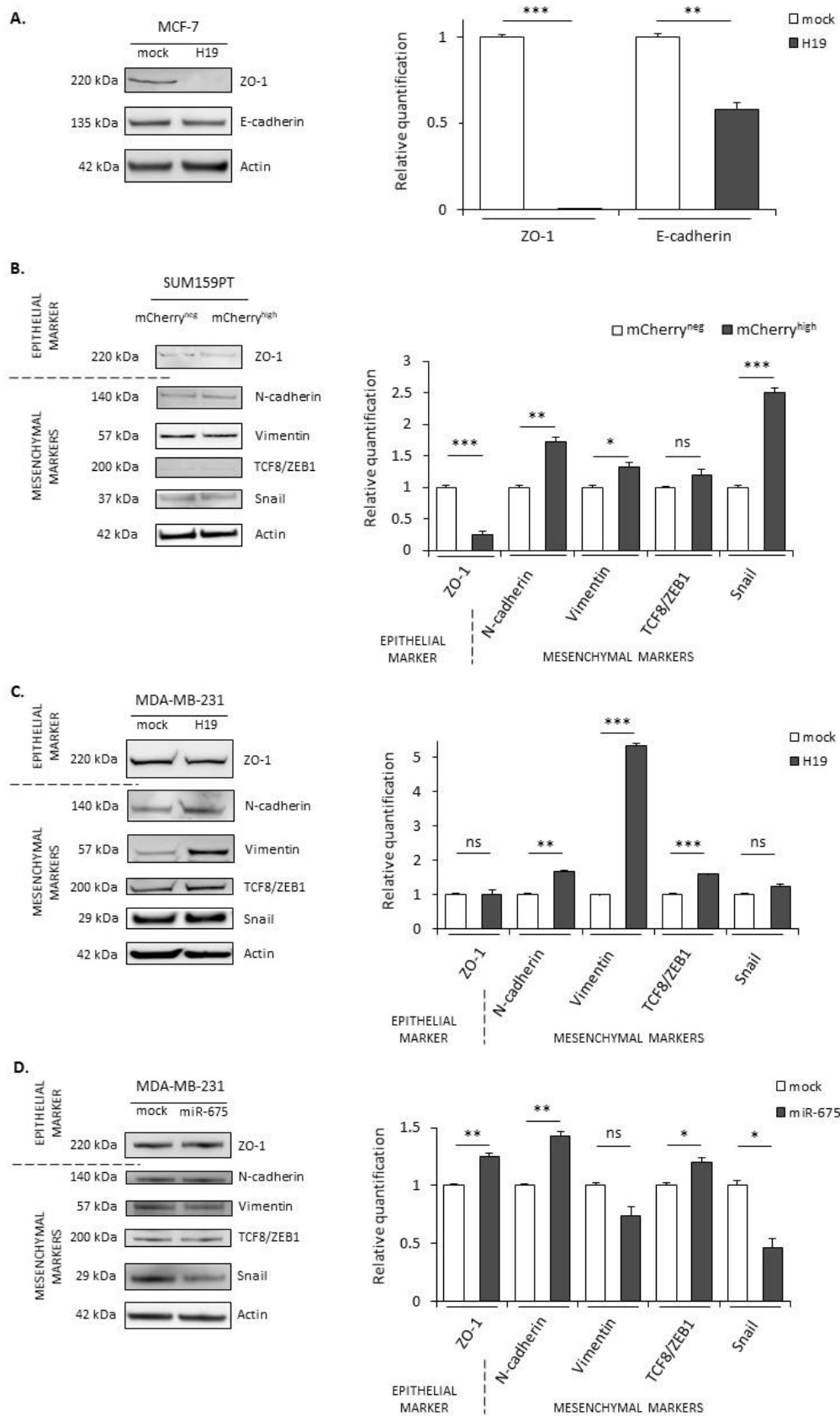
\* :  $p < 0,05$  ; \*\* :  $p < 0,01$  ; \*\*\* :  $p < 0,001$  ; ns : non significatif.

## D- H19 et le miR-675 régulent différemment l'expression des marqueurs épithéliaux et mésenchymateux

---

La motilité accrue et les capacités invasives sont des caractéristiques des cellules cancéreuses requises pour envahir les tissus environnants, et ainsi promouvoir le développement métastatique. Ces caractéristiques font partie des modifications phénotypiques entraînées par la transition épithélio-mésenchymateuse (EMT). L'EMT est un processus pendant lequel les cellules perdent leurs propriétés épithéliales pour acquérir de nouvelles caractéristiques mésenchymateuses. Pendant l'EMT, les cellules subissent des modifications moléculaires importantes, avec notamment la répression de l'expression des protéines de jonctions adhérentes et de jonctions serrées, et la surexpression de protéines spécifiques des cellules mésenchymateuses. L'expression de ces marqueurs est régulée par de nombreux facteurs de transcription. Dans une approche préliminaire de l'EMT, nous avons analysé par western blot l'expression des marqueurs moléculaires associés aux phénotypes épithélial ou mésenchymateux (**Figure 51**).

ZO-1 est une protéine impliquée dans la formation des jonctions serrées. Elle permet de lier les protéines transmembranaires au cytosquelette d'actine. L'E-cadhérine participe aux jonctions intramembranaires pour modifier la morphologie cellulaire en modulant la conformation du cytosquelette. TCF8/ZEB1 est un facteur de transcription qui régule négativement la formation des jonctions adhérentes en réprimant l'expression de l'E-cadhérine. Snail, un autre facteur de transcription, réprime quant à lui l'expression de ZO-1. La vimentine est une protéine mésenchymateuse qui module la structure et l'organisation des filaments intermédiaires.



**Figure 51. Effets de H19 et du miR-675 sur l'expression des marqueurs de l'EMT.**

**A.** Expression des marqueurs de l'EMT dans des cellules MCF-7 contrôles (mock) ou surexprimant

stablement H19 (H19), déterminée par western blot. L'actine est utilisée comme témoin de charge. Les intensités relatives des bandes ont été quantifiées par ImageJ. **B.** Expression des marqueurs de l'EMT dans des cellules SUM159PT-pH19-mCherry<sup>neg</sup> (mCherry<sup>neg</sup>) ou SUM159PT-pH19-mCherry<sup>high</sup> (mCherry<sup>high</sup>), déterminée par western blot. L'actine est utilisée comme témoin de charge. Les intensités relatives des bandes ont été quantifiées par ImageJ. **C.** Expression des marqueurs de l'EMT dans des cellules MDA-MB-231 contrôles (mock) ou surexprimant stablement H19 (H19), déterminée par western blot. L'actine est utilisée comme témoin de charge. Les intensités relatives des bandes ont été quantifiées par ImageJ. **D.** Expression des marqueurs de l'EMT dans des cellules MDA-MB-231 contrôles (mock) ou surexprimant stablement le miR-675 (miR-675), déterminée par western blot. L'actine est utilisée comme témoin de charge. Les intensités relatives des bandes ont été quantifiées par ImageJ. Toutes les expériences ont été réalisées au moins 3 fois. Pour les graphiques, les données représentent la moyenne de 3 expériences indépendantes et les écarts-types associés.

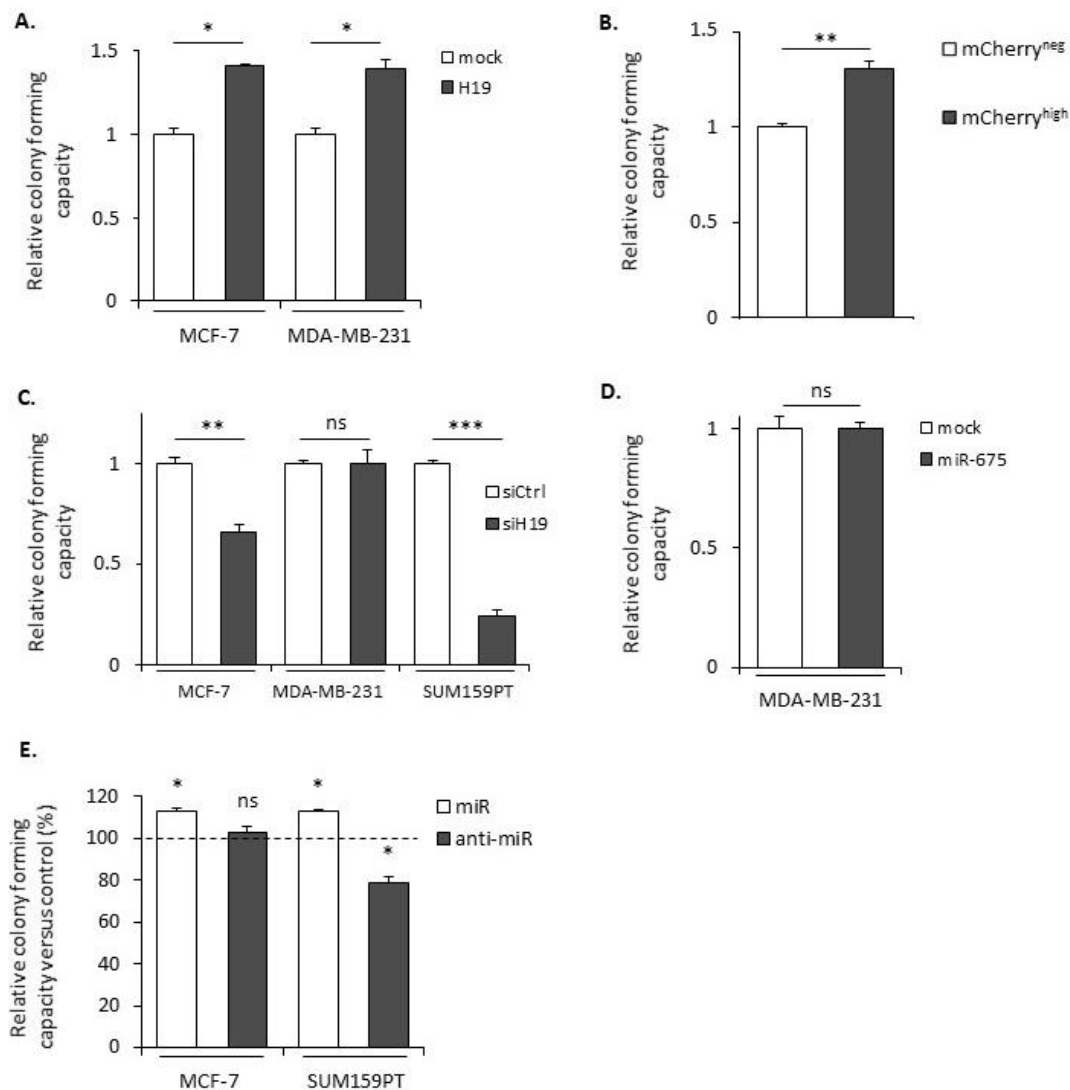
\* :  $p < 0,05$  ; \*\* :  $p < 0,01$  ; \*\*\* :  $p < 0,001$  ; ns : non significatif.

Dans les cellules MCF-7, qui expriment un phénotype épithélial, l'expression des marqueurs mésenchymateux n'est pas détectée, quel que soit le niveau d'expression de H19. En revanche, les protéines ZO-1 et E-cadhérine, qui sont des protéines épithéliales, sont moins exprimées dans les cellules MCF-7 surexprimant stablement H19 par rapport aux cellules contrôles (**Figure 51.A**). Concernant les cellules SUM159PT, qui présentent un phénotype moins épithélial que celui des MCF-7, on constate une diminution de l'expression de ZO-1 accompagnée d'une augmentation de l'expression de la N-cadhérine, de la vimentine et de Snail dans les cellules mCherry<sup>high</sup> comparé aux cellules mCherry<sup>neg</sup> (**Figure 51.B**). De plus, l'expression des marqueurs mésenchymateux (TCF8/ZEB1, N-cadhérine, vimentine, Snail) est encore plus augmentée dans les cellules MDA-MB-231 surexprimant stablement H19 (**Figure 51.C**). L'ensemble de ces résultats montre donc que quel que soit le phénotype cellulaire initial, l'expression de H19 agit en faveur de l'EMT en réprimant l'expression des marqueurs épithéliaux et/ou en surexprimant les marqueurs mésenchymateux.

Les profils d'expression des marqueurs de l'EMT dans les cellules MDA-MB-231 surexprimant stablement le miR-675 sont quant à eux assez inattendus, puisqu'on observe une augmentation de l'expression du marqueur épithélial ZO-1, mais aussi des marqueurs mésenchymateux TCF8/ZEB1 et N-cadhérine (**Figure 51.D**). L'expression de la vimentine n'est pas significativement modifiée, mais l'expression de Snail est réprimée. Ces modifications suggèrent la mise en place d'un phénotype "hybride" épithélio-mésenchymateux induit par l'expression du miR-675.



## E- H19 et le miR-675 favorisent la clonogénicité des cellules cancéreuses mammaires



**Figure 52. H19 et le miR-675 favorisent la formation de clones cancéreux mammaires.**

**A.** Clonogénicité de cellules contrôles (mock) ou surexprimant stablement H19 (H19). **B.** Clonogénicité relative de cellules SUM159PT-pH19-mCherry<sup>high</sup> versus SUM159PT-pH19-mCherry<sup>neg</sup>. **C.** Clonogénicité de cellules contrôles (siCtrl) ou invalidées pour H19 (siH19). **D.** Clonogénicité de cellules MDA-MB-231 contrôles (mock) ou surexprimant stablement le miR-675 (miR-675). **E.** Clonogénicité de cellules transfectées avec le miR-675 (miR) ou avec un inhibiteur du miR-675 (anti-miR). Les résultats sont présentés en pourcentage du contrôle. Toutes les expériences ont été réalisées au moins 3 fois. Pour les graphiques, les données représentent la moyenne de 3 expériences indépendantes et les écarts-types associés.

\* :  $p < 0,05$  ; \*\* :  $p < 0,01$  ; \*\*\* :  $p < 0,001$  ; ns : non significatif.

Le test de clonogénicité consiste en une analyse *in vitro* de la survie cellulaire basée sur la capacité d'une cellule unique à survivre, croître et se multiplier : le clone ainsi formé est le reflet du niveau d'agressivité de la cellule cancéreuse. Nous avons réalisé ces tests de

clonogénicité en utilisant nos modèles cellulaires exprimant différents niveaux de *H19* et du miR-675 (**Figure 52**). De cette façon, nous avons pu constater que les cellules MCF-7 et MDA-MB-231 surexprimant stablement *H19* forment plus de clones en comparaison à leurs contrôles respectifs (**Figure 52.A**). Des résultats similaires ont été obtenus avec les cellules SUM159PT-pH19-mCherry<sup>high</sup> en comparaison aux cellules mCherry<sup>neg</sup> (**Figure 52.B**). De plus, l'inactivation de *H19* par siRNA induit une diminution de la clonogénicité des cellules natives MCF-7 et SUM159PT (**Figure 52.C**). Ces résultats indiquent que *H19* permet l'augmentation de la clonogénicité des cellules cancéreuses mammaires.

Les effets du miR-675 sur la clonogénicité varient selon le modèle étudié : en effet, les cellules MDA-MB-231 surexprimant stablement le miR-675 montrent une formation de clones similaire à la condition contrôle (**Figure 52.D**). En revanche, l'expression transitoire du miR-675 augmente la clonogénicité des cellules MCF-7 et SUM159PT, et l'inhibition du miR-675 diminue le nombre de clones formés dans les cellules SUM159PT seulement (**Figure 52.E**).

## F- *H19* et le miR-675 sont tous deux impliqués dans l'acquisition d'un phénotype souche cancéreux

---

Pour aller plus loin dans l'étude de l'agressivité des cellules cancéreuses mammaires, nous nous sommes ensuite intéressés au phénotype cellulaire souche, qui est lié aux capacités cellulaires de migration et d'invasion. Une méta-analyse à partir de données de micro-array a été réalisée pour mettre en évidence l'expression du gène *H19* dans plus de 5000 échantillons de tumeurs de sein, et comparer parmi ces échantillons ceux qui expriment ou non les gènes impliqués dans le phénotype souche. Deux signatures géniques ont été utilisées : la première basée sur l'expression de l'isoforme ALDH1A1, et la seconde basée sur la combinaison d'une surexpression de CD44 et d'une sous-expression de CD24 (CD44+/CD24-). Les échantillons tumoraux ont ainsi été classés en catégories appelées *H19*<sup>high</sup> et *H19*<sup>low</sup> selon le niveau plus ou moins important d'expression de *H19* comparé à la médiane. Nous constatons ainsi une expression plus importante de *H19* dans les échantillons tumoraux exprimant les signatures géniques caractéristiques du phénotype souche, suggérant que *H19* pourrait avoir un rôle dans la biologie des cellules souches cancéreuses mammaires (**Figure 53.A**).

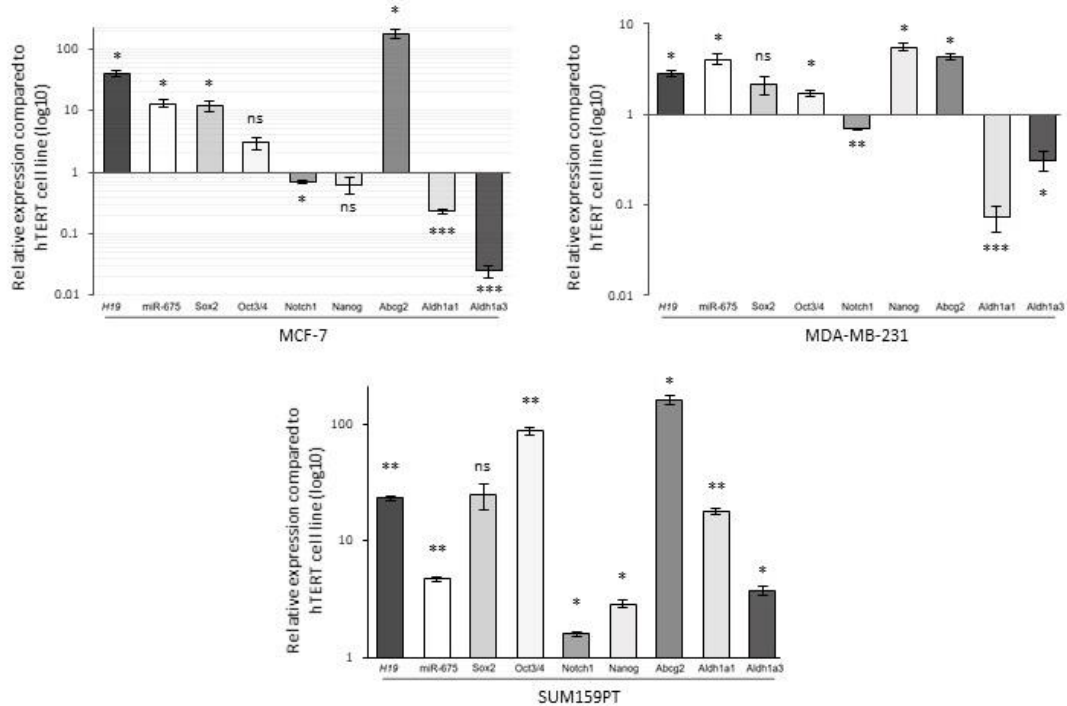
A.

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

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

B.



**Figure 53. Action de H19 et du miR-675 sur le phénotype souche des cellules cancéreuses mammaires.**

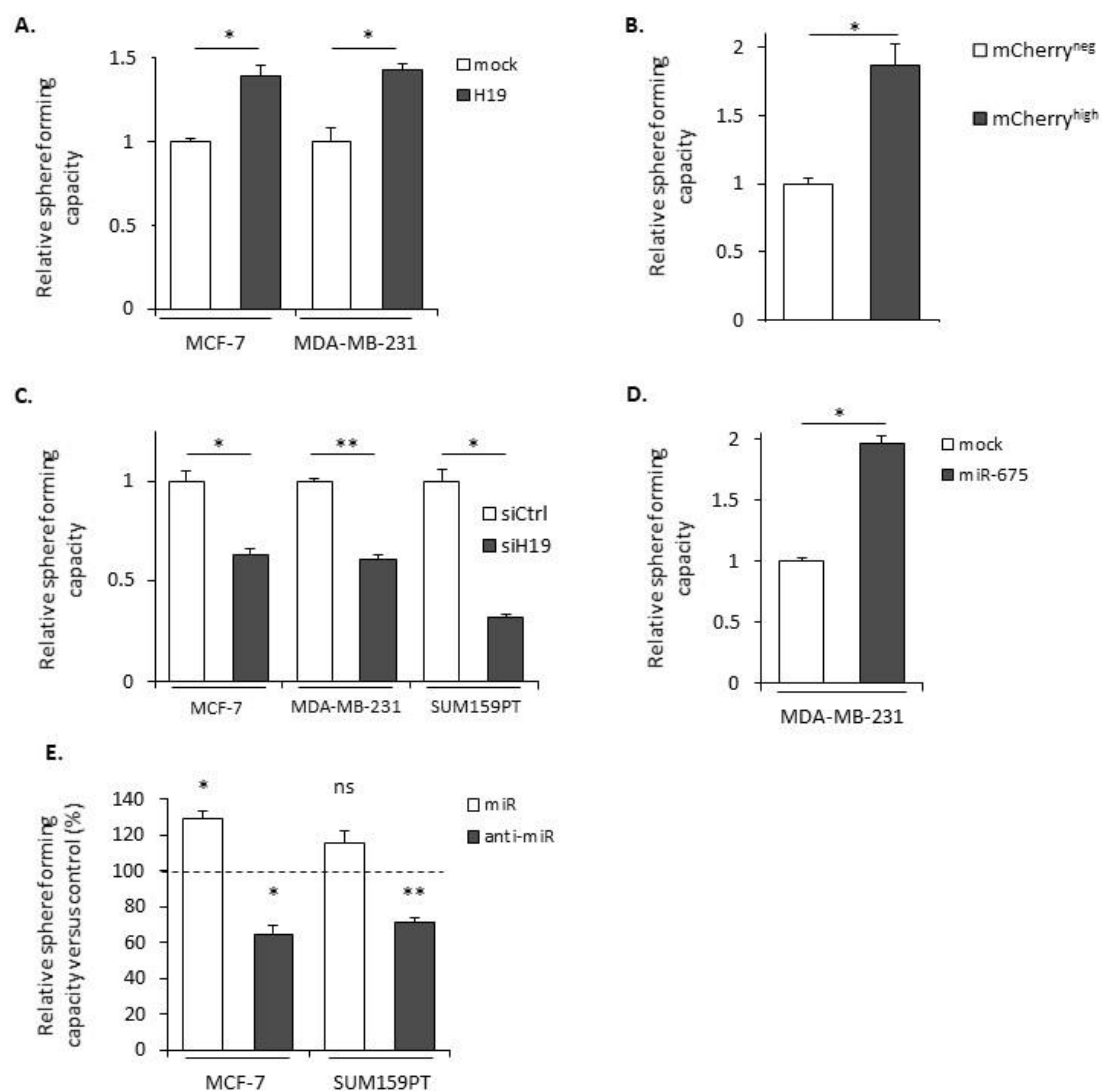
**A.** Expression du gène H19 dans des tumeurs mammaires exprimant ou non les signatures géniques du phénotype souche. Le tableau représente l'expression de H19 selon la signature génique des tumeurs. Deux signatures géniques ont été utilisées : une basée sur l'expression de l'isoforme ALDH1A1 et l'autre basée sur la combinaison CD44+/CD24-. **B.** Expression relative des gènes H19, sox2, oct3/4, notch1, nanog, abcg2, aldh1a1 et aldh1a3 ainsi que du miR-675 dans des cellules MCF-7, MDA-MB-231 et SUM159PT. Les niveaux d'expression sont rapportés aux niveaux d'expression dans des cellules hTERT indexés à 1.

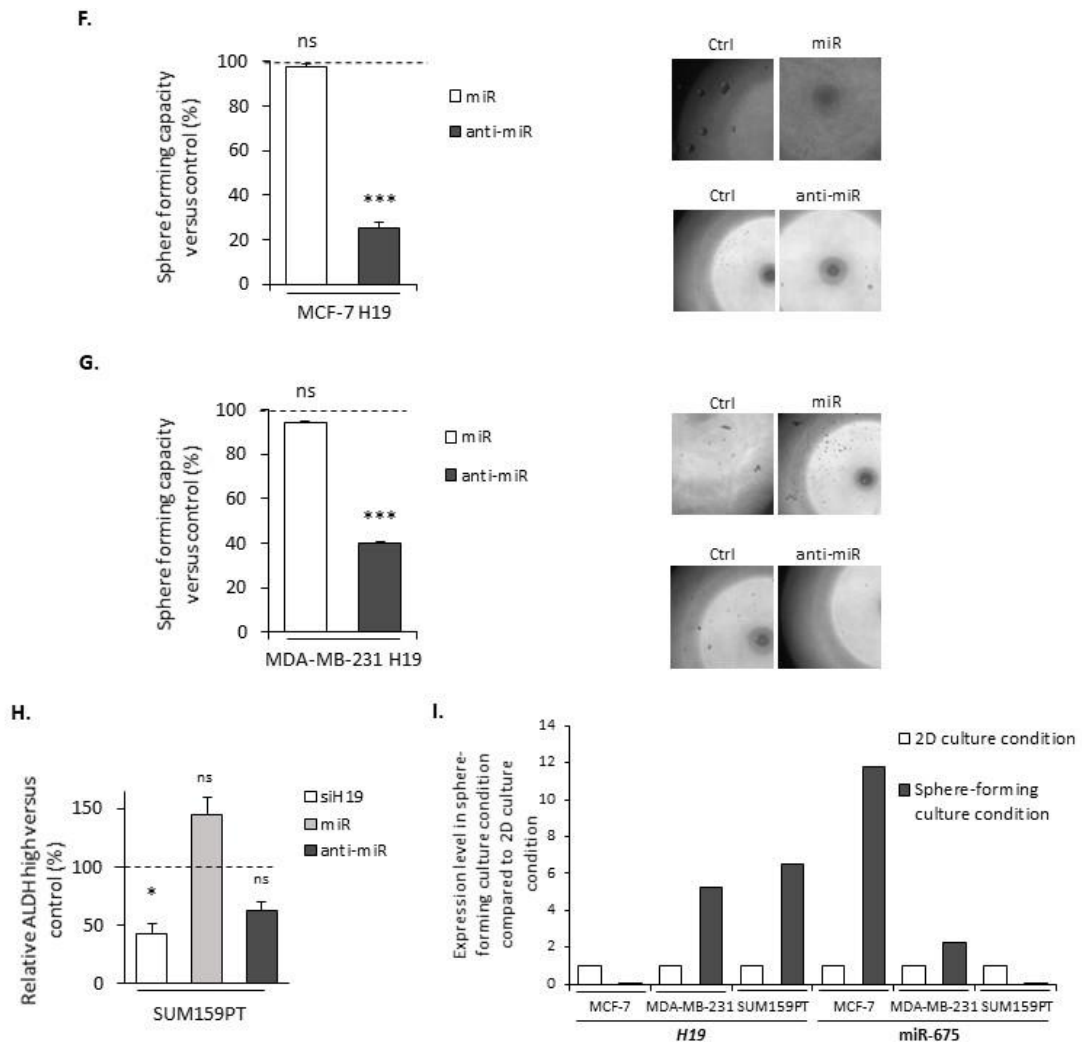
\* :  $p < 0,05$  ; \*\* :  $p < 0,01$  ; \*\*\* :  $p < 0,001$  ; ns : non significatif.

Nous avons ensuite analysé par qRT-PCR l'expression de différents marqueurs impliqués dans la biologie des cellules souches cancéreuses (*Sox2*, *Oct3/4*, *Notch1*, *Abcg2*, *Aldh1a1* et *Aldh1a3*). Comme attendu, une corrélation a été mise en évidence entre H19 et le miR-675. Il est à noter que bien que l'expression de H19 et du miR-675 sont généralement corrélées avec celles des marqueurs de cellules souches cancéreuses, quelques différences existent selon la lignée cellulaire considérée. Par exemple, une diminution de l'expression de *Notch1*, *Aldh1a1* et *Aldh1a3* est observée dans les cellules MCF-7 et MDA-MB-231, contrairement aux cellules SUM159PT. De la même manière, l'expression de *Nanog* est

augmentée dans les cellules MDA-MB-231 et SUM159PT, mais pas dans les cellules MCF-7 (Figure 53.B).

Dans la continuité de cette analyse, nous avons ensuite voulu étudier le rôle de *H19* et du miR-675 dans la capacité des cellules à former des mammosphères (Figure 54). Nous constatons ainsi que les cellules MCF-7 et MDA-MB-231 surexprimant stablement *H19* forment plus de sphères en comparaison à leurs contrôles respectifs (Figure 54.A). De la même façon, la capacité des cellules à former des sphères est également augmentée dans les cellules SUM159PT-pH19-mCherry<sup>high</sup> comparé aux cellules mCherry<sup>neg</sup> (Figure 54.B). Une diminution de cette capacité à former des sphères est observée dans les trois lignées MCF-7, MDA-MB-231 et SUM159PT natives lorsque l'expression de *H19* est invalidée par siRNA (Figure 54.C). Ces résultats indiquent que *H19* est impliqué dans la capacité des cellules cancéreuses mammaires à former des sphères.





**Figure 54. H19 et le miR-675 favorisent tous deux l'acquisition du phénotype cellulaire souche cancéreux mammaire.**

**A.** Capacités de formation de sphères de cellules contrôles (mock) ou surexprimant stablement H19 (H19). **B.** Capacité relative de formation de sphères de cellules SUM159PT-pH19-mCherry<sup>high</sup> versus SUM159PT-pH19-mCherry<sup>neg</sup>. **C.** Capacité de formation de sphères de cellules contrôles (siCtrl) ou invalidées pour H19 (siH19). **D.** Capacités de formation de sphères de cellules MDA-MB-231 contrôles (mock) ou surexprimant stablement le miR-675 (miR-675). **E.** Capacités de formation de sphères de cellules transfectées avec le miR-675 (miR) ou avec un inhibiteur du miR-675 (anti-miR). Les résultats sont présentés en pourcentage du contrôle. **F.** Capacités de formation de sphères de cellules MCF-7 surexprimant stablement H19 transfectées avec le miR-675 (miR) ou avec un inhibiteur du miR-675 (anti-miR). Les résultats sont présentés en pourcentage du contrôle. Des photos représentatives sont figurées pour chaque condition. **G.** Capacités de formation de sphères de cellules MDA-MB-231 surexprimant stablement H19 transfectées avec le miR-675 (miR) ou avec un inhibiteur du miR-675 (anti-miR). Les résultats sont présentés en pourcentage du contrôle. Des photos représentatives sont figurées pour chaque condition. **H.** Pourcentages de sous-populations cellulaires ALDEFLUOR-positives définis par test ALDEFLUOR dans des cellules invalidées pour H19 (siH19), transfectées avec le miR-675 (miR) ou invalidées pour le miR-675 (anti-miR). Toutes les expériences ont été réalisées au moins 3 fois. **I.** Niveaux d'expression de H19 et du miR-675 dans des lignées cellulaires cultivées en conditions de formation de sphère versus en conditions 2D. Pour les graphiques, les données représentent la moyenne de 3 expériences indépendantes et les écarts-types associés.

\* :  $p < 0,05$  ; \*\* :  $p < 0,01$  ; \*\*\* :  $p < 0,001$  ; ns : non significatif.

En parallèle, nous avons étudié l'impact du miR-675 sur ce phénotype : les cellules MDA-MB-231 surexprimant stablement le miR-675 forment plus de mammosphères (**Figure 54.D**). De la même façon, la transfection du miR-675 augmente la capacité des cellules MCF-7 et SUM159PT à former des sphères, alors que la transfection d'un inhibiteur du miR-675 réprime cette capacité (**Figure 54.E**). De façon intéressante, la transfection du miR-675 n'augmente pas la capacité à former des sphères dans des cellules MCF-7 et MDA-MB-231 surexprimant stablement *H19*. Cependant, lorsqu'on transfère un inhibiteur du miR-675 dans ces cellules, on observe une diminution de la capacité à former des sphères de 70% pour les cellules MCF-7 (**Figure 54.F**) et de 60% pour les cellules MDA-MB-231 (**Figure 54.G**). De façon complémentaire, nous avons réalisé un test ALDEFLUOR pour mettre en évidence les cellules viables après transfection d'un siRNA dirigé contre *H19*, du miR-675 ou d'un inhibiteur du miR-675. Nous avons constaté une diminution de la sous-population cellulaire ALDH<sup>high</sup> dans la condition siH19 comparé à la condition contrôle. Cependant, les différences observées dans les conditions miR et anti-miR par rapport aux conditions contrôles respectives ne sont pas significatives (**Figure 54.H**).

Enfin, l'augmentation de la capacité des cellules à former des sphères régulée par *H19* et le miR-675 nous a poussés à déterminer leur expression dans des cellules natives en conditions de culture favorisant la prolifération des cellules souches. En effet, lorsque les cellules souches sont cultivées dans des conditions définies, elles ont la capacité de croître sans ancrage de façon à former des sphères en suspension (Ishiguro *et al.*, 2017). Nous avons observé une augmentation de l'expression de *H19* dans les cellules MDA-MB-231 et SUM159PT et une augmentation de l'expression du miR-675 dans les cellules MCF-7 dans ces conditions, en comparaison aux mêmes lignées cultivées en monocouche (**Figure 54.I**).

L'ensemble de ces résultats met ainsi en évidence l'implication de *H19* et du miR-675 dans l'enrichissement des cellules souches cancéreuses mammaires.

**Collectivement, ces résultats permettent ainsi de mettre en évidence l'implication et les contributions relatives du lncRNA *H19* et de son miR-675 dans l'apparition et le développement des métastases mammaires. Dans la plupart des cas, *H19* et le miR-675 ont des effets similaires : en effet, nous montrons que *H19* comme le miR-675 participent dans**

la migration, l'invasion et l'acquisition du phénotype souche des cellules cancéreuses mammaires. Pour autant, le miR-675 n'a pas la même action que le lncRNA *H19* pendant l'EMT : leurs actions respectives semblent être séquentielles au cours du développement métastatique. Ces résultats inédits montrent ainsi la coopération entre un lncRNA et un miRNA dans la mise en place de l'EMT, qui devrait être prise en compte dans le diagnostic, le pronostic et la prise en charge thérapeutique des cancers du sein.





# **DISCUSSION & PERSPECTIVES**



## Conclusion

---

Les résultats obtenus au cours de ma thèse ont permis de caractériser de nouveaux mécanismes d'action du lncRNA *H19* et de son miR-675 dans les cancers du sein. Dans un premier temps, j'ai mis en évidence une interaction de *H19* avec les protéines p53 et MDM2 dans la formation d'un complexe tripartite : ceci entraînera alors la dégradation de p53. La régulation négative exercée par *H19* sur p53 entraîne la répression des phénotypes associés à cette protéine, tels que l'arrêt du cycle cellulaire, l'induction de l'apoptose et la sénescence cellulaire. De plus, j'ai mis en évidence que cette répression de p53 par *H19* favorise l'instabilité du génome des cellules, contribuant ainsi au rôle oncogénique de *H19* dans les cellules cancéreuses mammaires. Ensuite, j'ai poursuivi ces travaux et montré que l'expression de *H19* favorise la réparation de l'ADN des cellules cancéreuses après traitement. En effet, après traitement, *H19* permet une réparation plus rapide des fragments d'ADN endommagés, en favorisant notamment l'activation des voies de signalisation moléculaires en réponse aux dommages de l'ADN, entraînant l'augmentation de l'activité des systèmes de réparation par recombinaison homologue ou par jonction des extrémités non homologues. Ce phénomène pourrait ainsi expliquer l'association mise en évidence entre l'expression de *H19* et la chimio/radiorésistance des cellules aux traitements anti-cancéreux conventionnels, suggérant ainsi un rôle primordial pour *H19* dans la rechute des patientes atteintes de cancer du sein. Enfin, je me suis intéressé aux contributions relatives de *H19* et de son miR-675 dans la progression tumorale mammaire. Mes travaux ont contribué à mettre en évidence que *H19* et le miR-675 sont tous deux impliqués dans l'apparition et le développement de cancer du sein métastatique, notamment en favorisant la migration et l'invasion des cellules cancéreuses, ainsi que dans la régulation du pool de cellules souches cancéreuses mammaires. Pour autant, les résultats obtenus semblent indiquer que leur action dans le développement de métastases est séquentielle, constituant un phénomène jusqu'alors inédit.

L'ensemble de ces résultats permet donc une meilleure compréhension des mécanismes oncogéniques induits par le lncRNA *H19*. Cependant, ces données soulèvent également de nouvelles questions : en effet, la plupart des mécanismes mis en évidence par mes travaux de thèse étaient jusqu'à présent inconnus pour *H19*, ce qui amène à discuter de leur importance dans le cadre de la progression tumorale mammaire et de la résistance aux thérapies anti-cancéreuses conventionnelles. De plus, l'introduction de ces mécanismes de

régulation suggère une complexité grandissante quant aux rôles cellulaires de *H19*, de ses partenaires d'interaction et de ses intermédiaires. Notamment, l'implication de *H19* dans une signalisation aussi complexe que la voie de réponse aux dommages de l'ADN laisse supposer une action diversifiée et à de multiples niveaux. Mes travaux de thèse l'ont montré puisque nous avons pu constater une action de *H19* aux niveaux transcriptionnel et post-transcriptionnel. Cette idée est renforcée par les différents modes d'action possibles de *H19* : quel est alors le degré d'implication de ce lncRNA dans la régulation des phénotypes cellulaires cancéreux ? *H19* interagit-il avec d'autres partenaires protéiques ? Son action est-elle complémentaire de l'action du miR-675 comme nous l'avons montré pour la dissémination métastatique ? L'établissement de pistes de réponse à ces questions par la poursuite des travaux menés au laboratoire permettra d'ouvrir de nombreuses perspectives de thérapies ciblées dans le cadre des cancers mammaires.

## Discussion & perspectives

---

### I – L’expression de *H19* réprime la protéine p53 et perturbe les phénotypes associés

Etant donné l’importance de p53 dans de nombreux processus cellulaires, l’expression de cette protéine est contrôlée de façon stricte par plusieurs systèmes de régulation complexes. Parmi ceux-ci, la protéine MDM2 est le principal régulateur de l’expression p53 : elle est connue pour induire l’ubiquitylation et la dégradation de p53 par la voie du protéasome. Cependant, d’autres mécanismes peuvent participer au contrôle de l’expression de p53 : par exemple, dans les cellules cancéreuses gastriques, il a été montré que le lncRNA *H19* interagit avec p53, bien que les conséquences fonctionnelles de cette interaction n’aient pas été décrites (Yang *et al.*, 2012). De façon complémentaire, il a également été démontré que le miR-675, dérivé de *H19*, réprime l’expression de p53, favorisant ainsi la prolifération des cellules cancéreuses vésicales et pulmonaires (Liu *et al.*, 2016a; Zheng *et al.*, 2019). Mes travaux de thèse ont permis de mettre en évidence un nouveau mécanisme d’action de *H19* : pour la première fois, nous avons montré une association de *H19* avec p53 mais aussi avec MDM2 dans les cellules cancéreuses mammaires. Cette interaction favorise la dégradation de p53, et empêche l’activation de p53 après induction de dommages de l’ADN. De plus, nous avons montré que les gènes cibles de p53 comme *cdkn1a* ou *bax* sont également réprimés, entraînant une progression dans le cycle cellulaire, une diminution de l’induction de l’apoptose, et très probablement l’accumulation de cellules présentant des mutations génétiques. De cette façon, *H19* pourrait contribuer à la progression tumorale en augmentant la proportion d’altérations génétiques et en maintenant les systèmes de prolifération des cellules cancéreuses, malgré les mutations de leur ADN. Ainsi, l’interaction entre *H19* et p53 pourrait favoriser l’instabilité génomique chez des patients qui ne sont pas exposés aux drogues génotoxiques : des investigations plus poussées pourraient être menées de façon à déterminer si cette interaction existe également dans les cellules non cancéreuses.

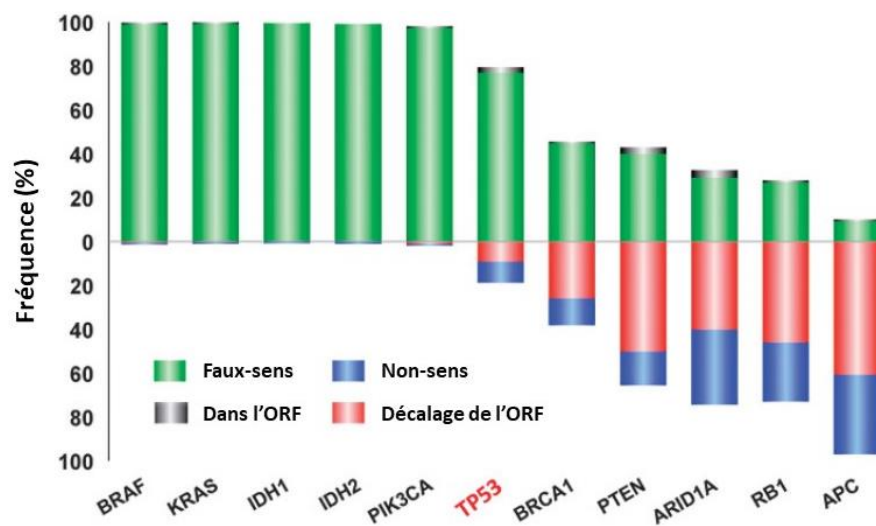
Avant ces résultats, notre équipe avait déjà mis en évidence que la surexpression de *H19* permet de faciliter la transition G1/S du cycle cellulaire (Berteaux *et al.*, 2005). Dans les cellules cancéreuses mammaires, l’expression du gène *H19* est activée par la fixation du facteur de transcription E2F1 (au niveau de deux sites consensus situés sur le promoteur de

*H19*) et réprimée par le suppresseur de tumeur RB. De façon intéressante, *H19* est capable de réprimer l'expression de RB par l'intermédiaire de son miR-675 dans les cancers hépatique et colorectal (Hernandez *et al.*, 2013; Tsang *et al.*, 2010), bien que ce phénomène n'ait pas été retrouvé dans notre modèle (Vennin *et al.*, 2015). En complément, il a également été montré que l'expression de *H19* est activée par l'oncogène c-Myc, ce qui entraîne une prolifération accrue des cellules cancéreuses pulmonaires et mammaires (Barsyte-Lovejoy *et al.*, 2006). En lien avec ces données, j'ai montré pendant ma thèse que *H19* est capable de réprimer p53 et donc d'entraîner malgré tout la progression dans le cycle cellulaire. Bien que la régulation de p53 par *H19* en lien avec la prolifération cellulaire avait été préalablement montrée dans le cancer gastrique (Yang *et al.*, 2012), notre équipe est la première à mettre en évidence ce phénomène dans le cancer du sein. Nous avons également montré que la protéine p53 réprime l'expression de *H19* dans les cancers du sein (Dugimont *et al.*, 1998) : bien que l'étape à laquelle intervient cette régulation n'est pas connue, nous savons que les mutations du gène *TP53* sont considérées comme un évènement précoce de la cancérisation (Milićević *et al.*, 2014). Ceci suggère que la mutation perte de fonction de p53 dans une cellule puisse à la fois initier la tumorigenèse, mais aussi favoriser l'expression du gène *H19* de façon à amplifier le processus. A l'inverse, la surexpression du gène *H19* dans une cellule possédant une version non altérée de p53 pourrait favoriser l'instabilité génomique et donc le processus de cancérisation.

Le suppresseur de tumeur p53 joue un rôle capital dans la préservation de l'ADN contre de multiples agressions, à travers la régulation des checkpoints du cycle cellulaire, la réparation de l'ADN, la sénescence et l'apoptose. Des défauts au niveau du gène *TP53* ont déjà été associés à des dérégulations du contrôle du cycle cellulaire menant à l'instabilité génomique (amplification génique, perte d'allèle, caryotypes anormaux) dans des lignées cellulaires murines et humaines, tout comme dans des carcinomes primaires mammaires humains (Eyfjörd *et al.*, 1995). De plus, le gène *TP53* est altéré dans plus de la moitié des cancers humains (Chao, 2015) : cette altération résulte de l'apparition de mutations ponctuelles, ou de la perte de l'hétérozygotie. En parallèle, nous savons que *H19* est surexprimé dans les carcinomes mammaires, indépendamment du sous-type moléculaire (Adriaenssens *et al.*, 1998). Les résultats obtenus pendant ma thèse, montrant que *H19* inhibe l'activité de p53 dans les cellules cancéreuses mammaires et que les expressions de *H19* et

*MDM2* semblent mutuellement exclusives dans les cancers du sein, suggèrent que la perte de l'activité de p53 serait un meilleur facteur pronostic que sa mutation seule.

En comparaison aux autres suppresseurs de tumeur, une des caractéristiques peu communes du gène *TP53* est son mode d'inactivation dans le cancer. En effet, contrairement à la plupart des gènes suppresseurs de tumeur qui sont inactivés par des mutations de type *indel* (insertion/délétion) ou non-sens (changement d'un nucléotide induisant un changement de codant, pour un codant qui sera un codon STOP), plus de 80% des mutations somatiques et germinales de *TP53* dans les cancers sont des mutations faux sens (changement d'un nucléotide induisant un changement de codant, pour un codant qui ne sera pas un codon STOP) conduisant à la production d'une protéine mutante stable qui s'accumule dans le noyau des cellules cancéreuses (Soussi et Wiman, 2015).



**Figure 55. Spectre de mutation de gènes fréquemment mutés dans les cancers humains.**

En vert : mutations faux-sens ; en gris : insertions et délétions ; en rouge : insertions et délétions entraînant un décalage du cadre de lecture ; en bleu : mutations non-sens. (Adapté de Soussi et Wiman, 2015).

De façon générale, il est possible de prédire la fonction oncogène ou suppresseur de tumeur d'un gène, puisqu'on estime que les gènes ayant un fort taux de mutations faux-sens dans les cancers sont des oncogènes (**Figure 55**). Pour autant, le gène *TP53* présente un profil de mutation plus proche des oncogènes que des gènes suppresseurs de tumeur. De nombreuses études ont démontré une sélection importante des mutations faux-sens de *TP53*, permettant l'expression d'une version mutée de la protéine p53 dans les tumeurs et donc un rôle majeur de cette protéine dans la transformation oncogénique (Milićević *et al.*, 2014;

Soussi et Wiman, 2015; Walerych *et al.*, 2012). En effet, de nombreux mutants de p53 vont non seulement perdre leur fonction de suppresseur de tumeur, mais aussi gagner de nouvelles fonctions oncogéniques. Ces mutants “gain de fonction” (GOF, *gain of function*) sont ainsi considérés comme des oncogènes majeurs. Dans les cancers du sein, ces mutants “gain de fonction” de p53 permettent par exemple la résistance des cellules cancéreuses à l’apoptose lorsqu’elles sont privées de sérum (Hui *et al.*, 2006). De cette façon, il existe de nombreux variants mutants de p53 du fait de nombreuses mutations possibles du gène *TP53*, pouvant acquérir de nouvelles fonctions oncogéniques. Notamment, ces mutants de p53 sont capables de reconnaître et d’interagir avec de nouveaux éléments de réponse sur l’ADN, bien qu’aucune séquence consensus ne soit précisément décrite (Bellazzo *et al.*, 2018). D’autres mutants peuvent interagir avec des facteurs de transcription comme E2F1 ou E2F4 pour activer l’expression d’oncogènes ou à l’inverse réprimer d’autres gènes impliqués dans la réparation de l’ADN, tout ceci dans le but de favoriser la tumorigenèse. Enfin, des mutants de p53 peuvent s’associer avec d’autres membres de la même famille protéique, comme p63 et p73, de façon à inhiber leur fonction suppresseur de tumeur (Bellazzo *et al.*, 2018).

Bien qu’il ait récemment été montré que le statut mutationnel de p53 influence la survie des patientes atteintes de cancer du sein (Ungerleider *et al.*, 2018), ce statut n’est actuellement pas utilisé par les cliniciens pour la prise en charge de cette pathologie. Les altérations génétiques de *TP53* sont communes dans le cancer du sein et sont associées avec les sous-types moléculaires tumoraux : 26% des tumeurs lumineales, 50% des tumeurs HER2+, et 88% des carcinomes *in situ* présentent des mutations de *TP53* (Bertheau *et al.*, 2013). L’intérêt pronostique et thérapeutique des altérations génétiques de *TP53* a fait l’objet de plusieurs études, dont les résultats semblent parfois contradictoires (Bykov et Wiman, 2014; Khoo *et al.*, 2014). Pour mettre en évidence ces altérations, deux méthodes sont majoritairement utilisées : le séquençage de l’ADN et l’immunohistochimie (IHC). Les mutations du gène *TP53* sont la plupart du temps associées à une protéine p53 non fonctionnelle possédant une demi-vie accrue (comparé à la protéine sauvage qui est rapidement dégradée dans les cellules normales) et qui s’accumule dans le noyau. Avec l’utilisation de l’IHC, un échantillon qui réagit positivement à un anticorps anti-p53 sera donc considéré comme possédant une version mutée de p53. L’IHC, méthode peu coûteuse et rapide, est ainsi fréquemment utilisée pour évaluer le statut mutationnel de p53 dans les échantillons tumoraux, mais des inconvénients de cette technique sont néanmoins à souligner



(Milićević *et al.*, 2014). Parmi ces inconvénients, nous pouvons citer la variabilité des résultats de marquage de p53 : selon les études, 20% à 60% des échantillons sont testés positifs pour p53. Ceci peut s'expliquer par l'utilisation d'anticorps différents, mais aussi par l'origine du matériel biologique analysé, ou encore par la méthode de classification des échantillons. Un autre inconvénient de l'IHC est que dans les cancers mammaires, la corrélation entre l'accumulation de p53 mesurée par IHC et les altérations génétiques de *TP53* mesurées par séquençage est inférieure à 75%. Une explication plausible de ce résultat est que toutes les mutations du gène *TP53* ne conduisent pas à la production d'une protéine stable. De plus, certaines mutations produisent des protéines p53 tronquées, qui peuvent ne pas être reconnues par IHC selon la spécificité de l'anticorps utilisé. Les résultats que j'ai obtenus pendant ma thèse rajoutent un niveau de complexité à ces phénomènes : en effet, nous montrons que dans un modèle cellulaire comportant une version non mutée (sauvage) du gène *TP53* (la lignée cellulaire MCF-7), la surexpression de *H19* réprime l'expression protéique de p53 et inhibe son activité. De cette façon, deux échantillons classés comme négatifs pour p53 par IHC (donc considérés comme possédant un gène *TP53* non muté et une protéine p53 fonctionnelle) pourraient ainsi refléter une activité protéique de p53 différente selon le niveau d'expression du gène *H19*. Par conséquent, les échantillons classés négatifs pour p53 par IHC mais où l'expression de *H19* est détectée seraient donc issues de tumeurs où la protéine p53 ne peut plus remplir son rôle de suppresseur de tumeur.

Les oncogènes sont souvent considérés comme des cibles d'intérêt pour le développement de stratégies thérapeutiques, puisqu'il s'agit la plupart du temps de variants (protéiques ou non) très actifs au niveau cellulaire. En revanche, peu d'approches visant à rétablir l'expression d'un gène suppresseur de tumeur sont envisagées. C'est pourtant le cas pour la protéine p53, car certaines thérapies ont été mises au point dans le but de rétablir l'expression ou l'activité de cette protéine dans les tumeurs où elle n'est pas ou plus fonctionnelle. Dans cette optique, plusieurs études cliniques ont évalué l'utilisation d'inhibiteurs spécifiques de MDM2 (peptides, anticorps, oligonucléotides antisens) pour cibler les tumeurs exprimant des versions fonctionnelles de p53 (Vassilev, 2007). Ces inhibiteurs ont toutefois de forts taux de toxicité pour les tissus environnants. Même si des études complémentaires sont nécessaires, les résultats obtenus pendant ma thèse suggèrent que des stratégies thérapeutiques alternatives ciblant *H19* peuvent être envisagées pour favoriser la fonction suppresseur de tumeur de p53, dans les tumeurs exprimant une version fonctionnelle

de cette protéine. De façon complémentaire, nous savons que la régulation de p53 n'est pas le seul mode d'action oncogénique de *H19* dans les cellules cancéreuses. Le gène *H19* étant surexprimé dans de nombreux cancers (Lecerf *et al.*, 2019), cibler ce gène pourrait être une piste de stratégie thérapeutique intéressante. De plus, *H19* n'est exprimé chez l'adulte que dans certains tissus et ne participe pas à des processus vitaux, contrairement à d'autres cibles thérapeutiques envisagées à ce jour. Les risques d'effets secondaires indésirables chez les patients seraient donc potentiellement limités. Ces données ont ainsi permis d'initier le développement d'une stratégie thérapeutique ciblant spécifiquement les cellules surexprimant *H19* dans un modèle de cancer vésical : un plasmide (H19-DTA ou BC-819) comprenant la séquence du gène codant la toxine diphtérique placée sous le contrôle du promoteur de *H19* a été développé. De cette façon, les cellules cancéreuses qui surexpriment *H19* seront éliminées (Ohana *et al.*, 2002). L'utilisation de cette stratégie plasmidique fait l'objet d'un essai clinique en phase 1/2a dans le cancer de l'ovaire, et de phase 2b dans le cancer de la vessie (Gofrit *et al.*, 2014; Lavie *et al.*, 2017). Cependant, la cohorte de patients étant trop faible, ces études doivent être approfondies. De plus, à l'heure actuelle, le plasmide H19-DTA n'a jamais été utilisé dans le cadre du traitement des cancers du sein.

Toujours dans l'objectif de bloquer l'action de *H19*, nous avons montré *in vitro* qu'il est assez simple d'utiliser une approche par ARN interférent (siRNA) de façon à réduire l'expression de *H19* et donc réduire ses effets. Néanmoins, cette même utilisation de siRNAs *in vivo* s'avère beaucoup plus complexe (Hu *et al.*, 2019). En effet, la demi-vie d'un siRNA quel qu'il soit dans la circulation sanguine n'excède pas 5 minutes : ceci est dû à la fois la présence de nombreuses nucléases dans le plasma, mais aussi à la clairance rénale. De plus, le passage du siRNA à travers la membrane plasmique des cellules pour ensuite être pris en charge par le complexe RISC constitue une difficulté supplémentaire. De cette façon, le développement de siRNAs modifiés pour augmenter leur stabilité, ainsi que la mise au point de systèmes de vectorisation sont devenus des enjeux majeurs pour l'établissement de nouvelles stratégies thérapeutiques et leur test en essai clinique. Parmi la trentaine de siRNAs testés depuis le début des années 2000, un seul a été retenu et approuvé par la FDA (*Food and Drug Administration*) et la commission européenne en 2018 : il s'agit du candidat médicament Patisiran (ONPATTRO™), première thérapie à base d'ARN interférent, qui permet le traitement de l'amylose et de la transthyrétine, qui sont toutes deux des maladies héréditaires. Le Patisiran fait actuellement l'objet d'un essai clinique de phase 3 (González-

Duarte *et al.*, 2020; Obici *et al.*, 2020; Rizk et Tüzmen, 2019). La poursuite du développement de siRNAs à visée thérapeutique pourrait ainsi dans les années futures permettre de cibler des oncogènes comme *H19* dans les cancers, de façon à réactiver la protéine p53 et ce faisant ralentir voire stopper la progression tumorale. De plus, le ciblage de *H19* pourrait être utilisé en tant que traitement préliminaire de façon à sensibiliser les cellules cancéreuses à d'autres thérapies complémentaires : en effet, il a été démontré que l'expression de *H19* augmente la chimiorésistance des cellules cancéreuses mammaires (Si *et al.*, 2016).

## II – Réparation des cassures de l'ADN par H19 et survie des cellules cancéreuses mammaires

La répression de p53 par *H19*, et plus largement l'implication de ce lncRNA dans l'instabilité génomique des cellules cancéreuses mammaires, nous ont incités à poursuivre les analyses sur ce phénomène. Notamment, l'utilisation du cisplatine, agent alkylant de l'ADN inhibant la réplication et entraînant par conséquent des cassures de l'ADN, nous a donné une piste de réflexion pour la poursuite de mes travaux de thèse.

Parmi les différentes lésions possibles de l'ADN, la détection et la réparation correcte des cassures de l'ADN est essentielle pour garantir l'intégrité du génome. Cette réparation est cruciale puisqu'une seule cassure non/mal réparée est suffisante pour être délétère pour la cellule (Bennett *et al.*, 1996; Huang *et al.*, 1996). Dans les cellules normales, la signalisation des dommages de l'ADN entraîne un arrêt de la prolifération, l'induction de la sénescence, ou l'apoptose si les dommages sont trop importants ou ne sont pas réparables. Pour pouvoir se maintenir et croître, les cellules cancéreuses, caractérisées par de nombreuses altérations génétiques ou épigénétiques, doivent s'adapter pour outrepasser l'effet anti-prolifératif des cassures de l'ADN, et poursuivre leur réplication en présence de ces dommages. Dans ce contexte, il a été montré que l'activation des oncogènes dans les tissus pré-cancéreux augmente le nombre de cassures double brin de l'ADN ainsi que l'instabilité du génome des cellules (Halazonetis *et al.*, 2008). Ces phénomènes seraient dus à une forte augmentation de la réplication de l'ADN, liée au haut potentiel prolifératif des cellules cancéreuses (Bartkova *et al.*, 2006; Di Micco *et al.*, 2006). En complément, des mutations de gènes impliqués dans la voie de réponse aux dommages de l'ADN et dans la réparation des cassures ont été mises en évidence. Ces mutations permettent d'augmenter davantage la proportion de cassures ou leur réparation peu fidèle, entraînant l'apparition de nouvelles mutations, une progression aberrante dans le cycle cellulaire, et favorisant l'accumulation d'altérations au fur et à mesure des divisions cellulaires et l'instabilité génomique : ceci constitue ainsi une des caractéristiques des cellules cancéreuses (Harper et Elledge, 2007). De cette façon, beaucoup de stratégies thérapeutiques anti-cancéreuses auront pour but de cibler les mécanismes intracellulaires associés à la signalisation et/ou à la réparation des cassures de l'ADN, d'augmenter le stress répliatif (et donc la fréquence de cassures), ou encore d'inhiber les checkpoints du cycle cellulaire qui facilitent la réparation des cassures. Parmi ces thérapies, on retrouve la

plupart du temps l'utilisation des rayons ionisants et des chimiothérapies, mais aussi, grâce à leur développement récent, d'agents moléculaires spécifiques ciblant des acteurs clés des différentes voies cellulaires de réponse aux dommages de l'ADN. Cependant, il n'y a à l'heure actuelle pas ou peu de biomarqueurs prédictifs de la réponse et/ou de la résistance des cellules cancéreuses à ces différents traitements.

Les résultats obtenus grâce à mes travaux de thèse mettent en évidence l'implication du lncRNA *H19* dans la réponse des cellules cancéreuses aux dommages de l'ADN, contribuant à l'instabilité génomique des cellules cancéreuses mammaires, et ce bien en amont de l'action sur la protéine p53. En effet, de façon intéressante, nous avons montré que le taux de mutation est plus élevé dans les cellules exprimant *H19*, et ce même sans traitement génotoxique. De plus, nous mettons pour la première fois en évidence une action de *H19* sur la réparation des cassures de l'ADN : les cellules surexprimant stablement *H19* sont caractérisées par une signalisation moléculaire de réponse aux dommages de l'ADN plus active, associée à une activité plus importante des mécanismes de réparation de l'ADN principaux que sont la réparation par HR et la réparation par NHEJ. Dans ces cellules, les marqueurs moléculaires des cassures de l'ADN sont moins nombreux, puisque le nombre de cassures est réduit. Ces effets trouvent également une cause au niveau transcriptomique, puisque mes résultats mettent en évidence une coopération entre *H19* et EZH2, la sous-unité catalytique du complexe de remodelage de la chromatine PRC2, dans la répression génique de *rif1*. Le gène *rif1* est connu pour son implication dans la réparation de l'ADN, la réplication des cellules mais aussi la maintenance des télomères. Un défaut d'expression de *rif1* pourrait ainsi contribuer à accentuer l'accumulation d'altérations de l'ADN et donc l'instabilité du génome des cellules cancéreuses mammaires.

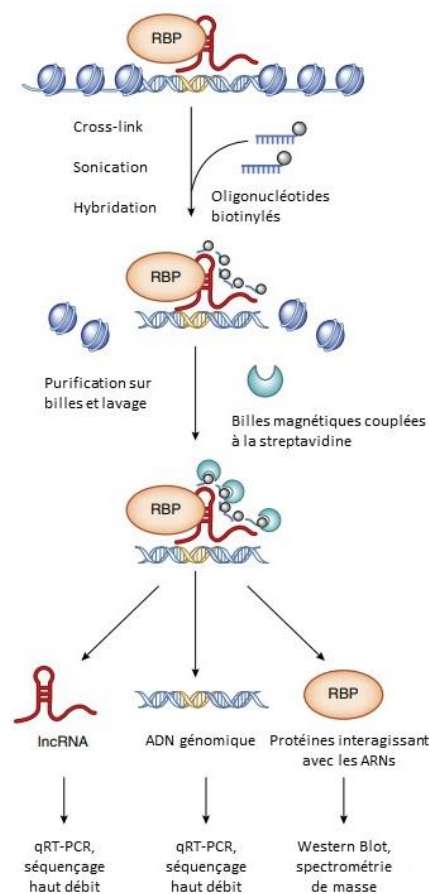
Le rôle des ARNs non codants dans le maintien de la stabilité du génome a déjà été démontré (Brown *et al.*, 2012; van Wolfswinkel et Ketting, 2010). Notamment, plusieurs études ont montré une action de certains ncRNAs dans la réparation des cassures de l'ADN. Par exemple, plusieurs protéines impliquées dans les voies de signalisation en réponse aux dommages de l'ADN (comme 53BP1, BRCA1 ou Ku70-Ku80) peuvent interagir physiquement avec des ncRNAs (Ganesan *et al.*, 2002; Pryde *et al.*, 2005; Yoo et Dynan, 1998). D'autres données indiquent une implication directe des ncRNAs au niveau du site de cassure, de façon à faciliter le recrutement des acteurs protéiques et activer les voies de signalisation en aval, voire même de favoriser l'activité des mécanismes de réparation (Storici *et al.*, 2007; Verdel

*et al.*, 2004). Ici, nous montrons que *H19* est capable d'induire ces phénomènes : dans les cellules surexprimant stablement *H19*, une phosphorylation plus importante des effecteurs ATM et ATR est observée en réponse à l'endommagement de l'ADN, associée à une activité plus importante des mécanismes de réparation de l'ADN. Etant donné l'action oncogénique bien établie de *H19*, nous pouvons supposer que son action sur la réparation des cassures de l'ADN permettra aux cellules cancéreuses mammaires de survivre malgré la mise en place de traitements, leur conférant un avantage sélectif parmi les populations cellulaires hétérogènes de la tumeur traitée. Ceci pourrait expliquer l'existence de rechute des patientes atteintes de cancer du sein, voire même l'apparition de métastases, puisque malgré le traitement les cellules surexprimant *H19* seraient capables de survivre et de proliférer de façon à générer une (des) nouvelle(s) tumeur(s). Nous pouvons ainsi faire le lien avec la discussion du paragraphe précédent : l'utilisation de *H19* comme biomarqueur pour le diagnostic du cancer du sein et la mise en place de thérapies ciblant spécifiquement ce lncRNA permettrait ainsi de réduire drastiquement la résistance aux traitements des tumeurs mammaires, ainsi que le taux de rechute à plus ou moins long terme des patientes.

En plus des résultats présentés dans ce manuscrit, d'autres expériences ont été réalisées sur des protéines impliquées dans la réparation de l'ADN que sont Rad51 et Ku70, qui sont des marqueurs de la réparation par HR et par NHEJ respectivement. De façon surprenante, et contrairement à l'augmentation de ces activités de réparation présentées dans ce manuscrit, nous avons observé dans les cellules surexprimant stablement *H19* une diminution du nombre de foci de Rad51 comme de Ku70, suggérant une moindre réparation par HR et par NHEJ dans ces cellules. Une hypothèse pouvant expliquer ces résultats est liée au traitement des cellules : en effet, le traitement à la bléomycine réalisé dure 2 heures. Or, nous avons montré grâce aux résultats de cinétique post-irradiation et d'essais comètes, que la réparation est plus rapide lorsque *H19* est surexprimé. Ainsi, il est possible que la réparation des cassures des cellules surexprimant *H19* intervienne précocement, voire même alors que le traitement à la bléomycine est en cours, ou alors qu'après les 2 heures de traitement la majeure partie des cassures soient réparées. Cette hypothèse pourrait expliquer que les mécanismes de réparation soient moins actifs, ce qui est en lien avec le nombre moindre de foci de  $\gamma$ H2AX dans ces mêmes cellules. Ces résultats sont présentés en **Annexe 2**.

Concernant l'action transcriptionnelle de *H19*, nous confirmons des résultats déjà connus selon lesquels *H19* peut interagir avec PRC2 pour contrôler l'expression de gènes

cibles. En effet, il a déjà été montré que *H19* peut recruter des complexes de remodelage de la chromatine : par exemple, *H19* interagit avec la protéine MBD1 qui se lie à l'ADN méthylé et recrute des histones lysine méthyltransférases comme SETDB1 ou SUV39H1. *H19* permet ainsi la répression de l'expression génique par remodelage de la chromatine (Monnier *et al.*, 2013). De plus, l'interaction entre *H19* et EZH2 a déjà été mise en évidence dans le cancer de la vessie dans le cadre de la répression de l'E-cadhérine, ainsi que dans le cancer du sein pour le contrôle de l'expression de BIK, favorisant la progression tumorale et la résistance aux traitements (Luo *et al.*, 2013; Si *et al.*, 2016). Grâce aux résultats de mes travaux de thèse, nous pouvons compléter le champ d'action de l'interaction *H19*-EZH2 puisque nous montrons qu'elle permet la répression du gène *rif1*. Pour confirmer ces résultats, mais aussi les étendre et déterminer de nouvelles cibles de cette interaction, d'autres outils de biologie moléculaire peuvent être envisagés : dans nos modèles de surexpression stable de *H19*, nous pourrions réaliser une analyse globale en ChIRP-seq (*chromatin isolation by RNA purification*) pour mettre en évidence les modifications épigénétiques présentes dans les cellules (**Figure 56**).



**Figure 56. Principe du séquençage par ChIRP (ChIRP-seq).**

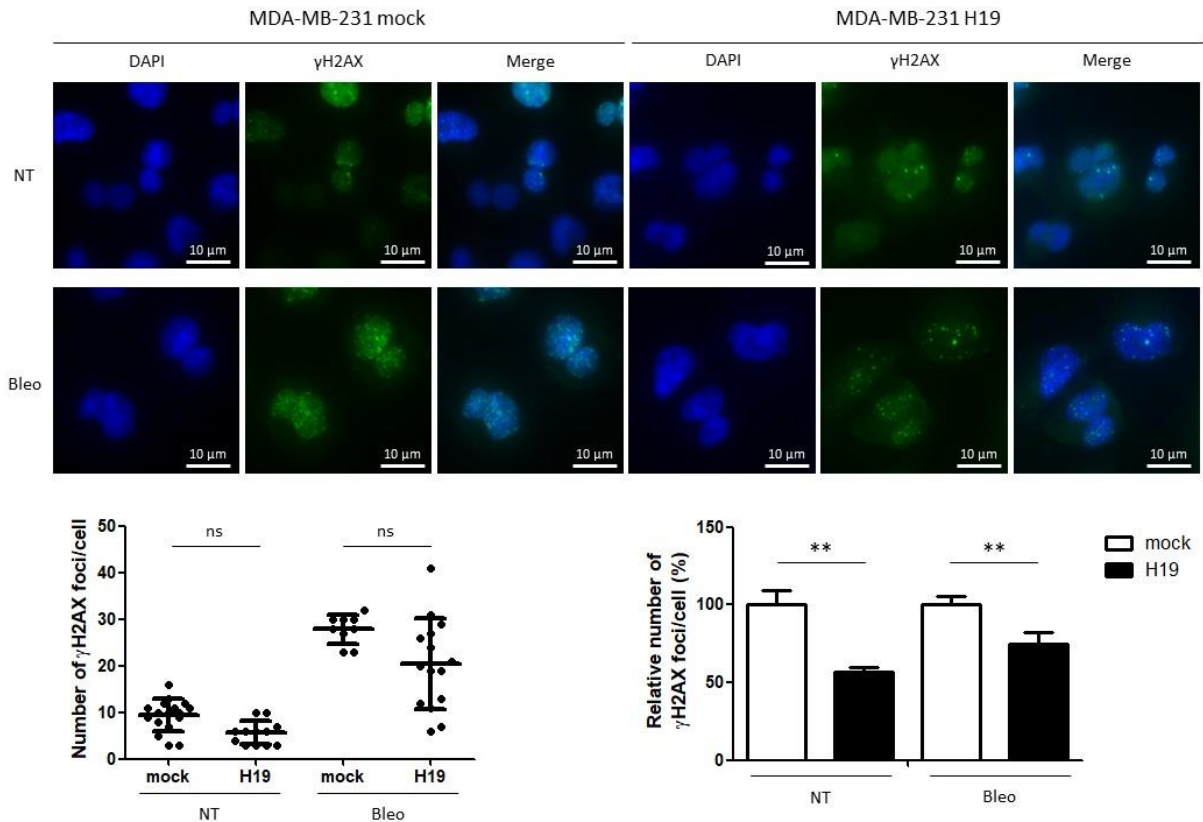
Les complexes ARN-protéine-ADN sont fixés et solubilisés par sonication. Des oligonucléotides

*biotinylés sont ensuite hybridés au lncRNA ciblé en conditions stringentes. Les ARN couplés aux oligonucléotides ainsi que les complexes associés sont précipités grâce à des billes magnétiques couplées à la streptavidine : les fractions enrichies en ARNs, protéines et ADN peuvent ensuite être isolées et purifiées pour être analysées. (Adapté de Chu et al., 2015).*

Le ChIRP consiste en une hybridation d'oligonucléotides couplés à la biotine et ciblant l'ARN d'intérêt (ici *H19*). Les ARNs, qui sont complexés à la chromatine, sont ensuite précipités à l'aide de billes couplées à la streptavidine. La chromatine associée à l'ARN, mais aussi les protéines complexées sont ainsi récupérées : de cette façon, le lien direct entre ARN non codant, modifications épigénétiques et expression génique peut être établi.

Pour étudier l'action transcriptionnelle de *H19*, j'ai mis au point pendant ma thèse un modèle de surexpression stable d'une protéine de fusion EZH2-EGFP. Des données ont montré une répression de l'expression d'EZH2 par *H19* dans certains modèles cancéreux (Li *et al.*, 2016b) : il était donc nécessaire de pouvoir assurer une expression suffisante d'EZH2 pour pouvoir réaliser notre étude. Ceci justifie la mise au point du vecteur de surexpression stable pEZH2-EGFP ainsi que son utilisation dans nos lignées cellulaires cancéreuses mammaires. Cependant, d'autres modèles expérimentaux peuvent être envisagés. En effet, il a été décrit dans la littérature une mutation de la protéine EZH2 au niveau de la tyrosine en position 641 (Y641F) retrouvée dans les lymphomes et qui agit de façon dominante (Yap *et al.*, 2011). Cette mutation entraîne une augmentation de l'activité histone méthyltransférase d'EZH2 : il pourrait donc être intéressant d'utiliser cette version mutante d'EZH2 afin de pallier la répression d'EZH2 par *H19* et de pouvoir étudier les effets de la coopération entre ces deux acteurs moléculaires. J'ai ainsi mis au point un plasmide DP-EZH2 en réalisant tout d'abord une mutagenèse dirigée pour obtenir la mutation Y641F dans la séquence d'EZH2, et de la même façon que pour le vecteur pEZH2-EGFP j'ai cloné cette séquence mutante en aval de la séquence de l'EGFP, pour générer une protéine de fusion. L'utilisation de ce plasmide devrait permettre de poursuivre les travaux initiés pendant ma thèse et ainsi mettre en évidence d'autres gènes cibles de l'interaction entre *H19* et EZH2.





**Figure 57. Marquage par immunofluorescence de la phosphorylation de l'histone H2AX dans les cellules MDA-MB-231 surexprimant stablement ou non H19.**

Marquage par immunofluorescence des foci de  $\gamma$ H2AX dans des cellules MDA-MB-231 surexprimant stablement ou non H19 et traitées ou non à la bléomycine (30  $\mu$ g/ $\mu$ L, 2h). La quantification des marquages est représentée selon le nombre de foci de  $\gamma$ H2AX par cellule et selon le nombre relatif de foci de  $\gamma$ H2AX par cellule selon les conditions. Toutes les expériences ont été réalisées au moins 3 fois. Les graphiques représentent la combinaison de 3 expériences indépendantes.

NT : non traitées ; \*\* :  $p < 0,01$  ; ns : non significatif.

Enfin, dans le cadre de l'analyse des effets de H19 sur la réparation des cassures de l'ADN, l'essentiel des résultats présentés dans ce manuscrit ont été obtenus à partir de cellules MCF-7. En effet, ce modèle a été utilisé puisque c'est dans cette lignée que nous avons prouvé la répression de p53 par H19, le but étant ici de caractériser les mécanismes par lesquels H19 favorise l'instabilité génomique. Les résultats présentés correspondent donc à un modèle d'étude où la protéine p53 n'est pas mutée, et est inactivée par H19. Pour autant, ceci n'interfère pas avec les interprétations et les conclusions des expériences, puisque les phénomènes observés ont lieu bien en amont de l'activation de p53. De façon à avoir une vision la plus objective possible, j'ai également réalisé les mêmes analyses dans la lignée

cancéreuse mammaire MDA-MB-231, dans laquelle le gène *TP53* présente une mutation “perte de fonction” et code donc pour une protéine inactive. Bien que les analyses nécessitent d’être complétées, les résultats préliminaires que j’ai obtenus dans cette lignée confirment l’effet de *H19* observé dans les cellules MCF-7 (**Figure 57**). Ces résultats sont encourageants puisqu’on retrouve la même tendance que dans la lignée MCF-7 : dans les cellules surexprimant stablement *H19*, on retrouve moins de foci de  $\gamma$ H2AX par rapport aux cellules contrôles. D’autres analyses sur la voie de signalisation en réponse aux dommages de l’ADN ainsi que sur les mécanismes de réparation sont en cours dans cette lignée, mais les résultats préliminaires confirment l’action de *H19* sur la réparation des cassures de l’ADN. Ainsi, les hypothèses que nous avons émises concernant la résistance des cellules cancéreuses mammaires aux thérapies conventionnelles pourraient être généralisées quel que soit le sous-type moléculaire de la tumeur considérée. Le choix de *H19* comme biomarqueur diagnostique mais aussi comme cible thérapeutique pour les patientes atteintes de cancer du sein devient donc encore plus pertinent.

### III – *H19* et son miR-675 agissent de façon séquentielle dans la dissémination métastatique des cellules cancéreuses mammaires

Nous savons que le lncRNA *H19* intervient à de multiples étapes de la tumorigenèse et de la progression tumorale, pour favoriser notamment la prolifération, la migration, l'invasion et l'EMT des cellules cancéreuses mammaires, ainsi que leur dissémination métastatique (Lecerf *et al.*, 2019). Cependant, plusieurs études ont montré que le miR-675, issu de *H19*, peut également être impliqué dans ces phénomènes oncogéniques (Tsang *et al.*, 2010; Vennin *et al.*, 2015; Zhuang *et al.*, 2014). De cette façon, je me suis intéressé pendant ma thèse aux rôles de *H19* et de son miR-675 dans la mise en place des phénotypes liés au développement métastatique comme la migration, l'invasion, l'EMT, la clonogénicité ou encore les propriétés souches. Nous avons dans un premier temps testé les capacités invasives des cellules cancéreuses mammaires par injection dans des embryons de poissons zèbres. Ce modèle est pertinent puisque les lignées cellulaires issues de cancers humains variés comme les cancers pancréatique, ovarien, mammaire, colorectal, le mélanome ou encore le gliome sont capables d'y proliférer, d'envahir les tissus environnants et de former des masses tumorales après injection ou transplantation (Grolez *et al.*, 2019; Raby *et al.*, 2020). La lignée de poisson zèbre transgénique Tg(fli1:GFP) utilisée dans notre étude nous permet de visualiser les vaisseaux sanguins dans le poisson vivant, et facilite ainsi l'analyse des capacités invasives des cellules cancéreuses après leur intravasation dans la circulation sanguine. Grâce à l'utilisation de ce modèle, nous avons pu montrer que l'expression de *H19* comme l'expression du miR-675 permettent une invasion plus importante dans les tissus du poisson zèbre.

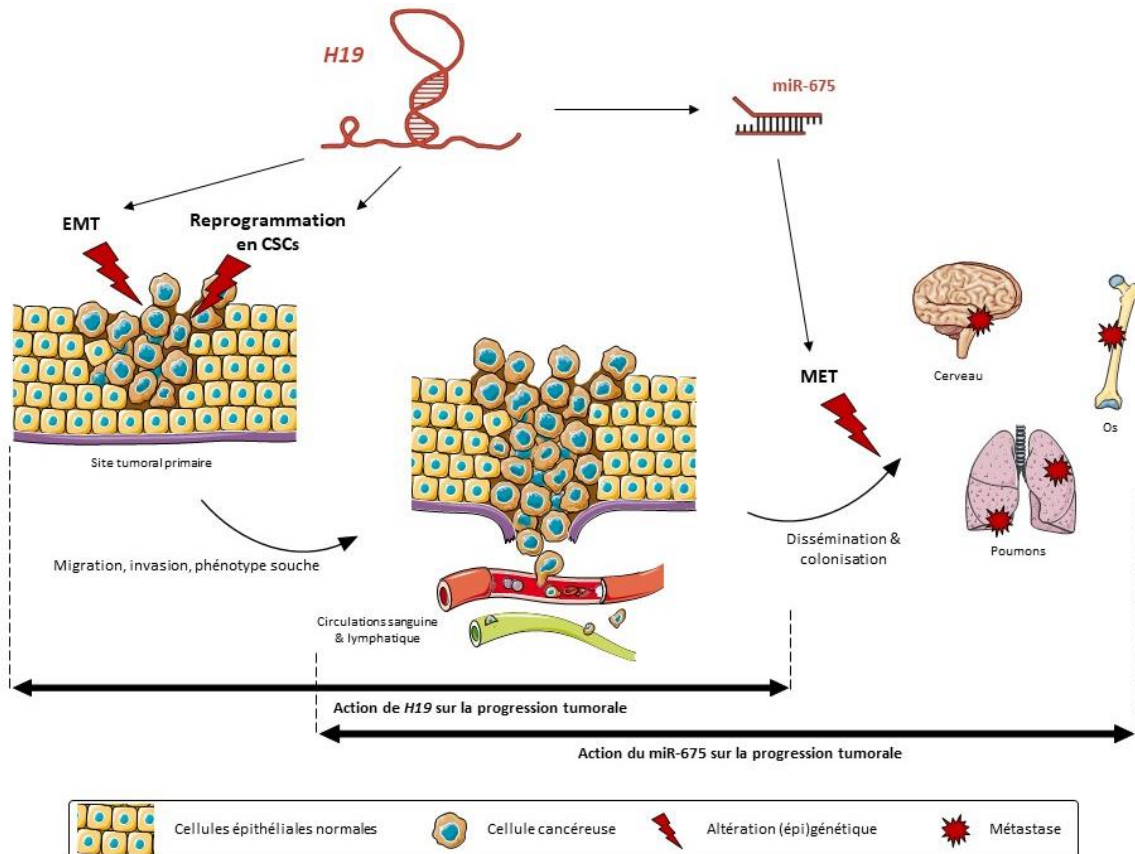
En complément, mes résultats de thèse montrent que *H19* et son miR-675, indépendamment ou non, favorisent tous deux la migration et l'invasion cellulaire *in vitro*. De façon assez surprenante, des résultats d'invasion différents ont été obtenus entre les lignées cellulaires MCF-7 et MDA-MB-231. L'inhibiteur du miR-675 n'a pas les mêmes effets selon le type cellulaire, reflétant probablement le niveau basal de *H19* exprimé par la lignée cellulaire considérée ou encore le sous-type moléculaire de cette lignée. En effet, la lignée MCF-7 est de type luminal-like, alors que la lignée MDA-MB-231 fait partie des lignées triple négatives. Pour renforcer cette hypothèse, il a été montré que l'expression de *H19* est corrélée à un mauvais pronostic pour les patientes atteintes de cancer du sein triple négatif (Shima *et al.*,

2018).

Les résultats obtenus grâce à mes travaux de thèse démontrent également que *H19* comme le miR-675 peuvent moduler l'expression des marqueurs de l'EMT, même si leur implication semble être différente selon le type cellulaire. Dans la lignée cellulaire MCF-7, les cellules surexprimant stablement *H19* montrent une diminution de l'expression des marqueurs épithéliaux. En revanche, dans les cellules MDA-MB-231 surexprimant stablement *H19* tout comme dans les cellules SUM159PT-pH19-mCherry<sup>high</sup>, de hauts niveaux d'expression de *H19* sont associés avec une augmentation de l'expression des marqueurs mésenchymateux, et en complément les cellules SUM159PT-pH19-mCherry<sup>high</sup> montrent également une diminution de l'expression du marqueur épithélial ZO-1. Ces résultats sont en accord avec les travaux réalisés dans le cancer pulmonaire, où il a été montré que l'expression de *H19* favorise la prolifération et l'invasion cellulaire *via* la surexpression de marqueurs mésenchymateux comme la N-cadhérine et la vimentine, et la sous-expression de marqueurs épithéliaux comme l'E-cadhérine (Liao *et al.*, 2019).

Dans la lignée MDA-MB-231, le miR-675 favorise l'expression de ZO-1 mais aussi celle de la N-cadhérine, et diminue l'expression de Snail. Ce résultat met en évidence un contraste intéressant entre l'action de *H19* et l'action du miR-675. Il suggère que dans la même lignée cellulaire, *H19* active l'expression des marqueurs de l'EMT, alors que l'action du miR-675 semble favoriser à la fois l'EMT et la MET (*mesenchymal-to-epithelial transition*), qui est la transition inverse de l'EMT. En effet, le miR-675 seul n'induit pas l'expression des mêmes marqueurs moléculaires que *H19* : ceci révèle que *H19* et son miR-675 participent tous deux à la migration et à l'invasion, mais n'exercent pas le même rôle pendant les événements moléculaires de l'EMT. La MET est une transition secondaire à l'EMT, qui est essentielle pour la colonisation et la prolifération des cellules au niveau des sites de métastases (Matouk *et al.*, 2016). Ainsi, *H19* et son miR-675 pourraient avoir un mode d'action séquentiel pendant la dissémination métastatique : *H19* favoriserait la migration des cellules à partir du site tumoral primaire en activant l'EMT, tandis que le miR-675 permettrait la colonisation métastatique et le développement de tumeurs secondaires en induisant la MET (**Figure 58**). Pour confirmer cette hypothèse, en plus de la balance EMT/MET comme moteur de l'apparition de métastases, il a été caractérisé dans de nombreuses lignées cancéreuses un état hybride épithélial/mésenchymateux qui apparaît de façon intermédiaire suite à l'EMT (He *et al.*, 2018). Ce phénotype intermédiaire contribuerait à la migration des cellules cancéreuses, et *in fine* au

développement de métastases (Mayor et Etienne-Manneville, 2016). De plus, une transition épithélio-mésenchymateuse partielle est associée au phénotype souche (Jolly *et al.*, 2015). De cette façon, nos résultats indiquent que l'expression du miR-675 permettrait l'acquisition de ce phénotype hybride dans le but de favoriser la métastase selon une voie différente de celle activée par *H19*.



**Figure 58. Contributions relatives du lncRNA *H19* et de son miR-675 dans la progression tumorale mammaire.**

La transition épithélio-mésenchymateuse est un processus cellulaire majeur qui fait appel à de nombreuses voies de signalisation moléculaires (Lamouille *et al.*, 2014). L'EMT joue un rôle capital pour le développement normal de l'embryon, mais elle est également fortement impliquée dans la progression tumorale et dans la dissémination métastatique (Liu *et al.*, 2016c). Au cours de ce processus, le rôle du miR-675 n'est pas bien décrit, et le rôle de *H19* semble quant à lui contradictoire. Beaucoup d'études démontrent l'induction de l'EMT par l'expression de *H19* dans de nombreux tissus dont la glande mammaire (Chen *et al.*, 2019; Liang *et al.*, 2019; Liu *et al.*, 2019; Xiong *et al.*, 2020), mais d'autres analyses mettent en évidence une suppression du processus métastatique induite par *H19* dans le carcinome

hépatocellulaire (Zhang *et al.*, 2013a). Les résultats de mes travaux de thèse permettent d'apporter un nouveau niveau de complexité à l'intervention de *H19* et de son miR-675 durant le processus métastatique, et pourraient expliquer ces résultats opposés.

Comme nous l'avons exposé à de nombreuses reprises par les données de la littérature et par les résultats obtenus, *H19* est capable d'agir à de multiples niveaux de régulation, plus particulièrement en tant qu'éponge à miRNAs. Par exemple, il a été montré que la surexpression de *H19* favorise la migration et l'invasion des cellules cancéreuses vésicales par séquestration du miR-29b-3p. Cependant, l'inactivation de l'expression de *H19* par knock-down permet au miR-29b-3p de favoriser la MET (Lv *et al.*, 2017). Il a également été mis en évidence que les miRNAs de la famille miR-200 (miR-200a, miR-200b, miR-200c, miR-141 et miR-429) sont impliqués dans la mise en place de l'EMT *via* la voie ZEB1/E-cadhérine (O'Brien *et al.*, 2018; Title *et al.*, 2018). En effet, ces miRNAs régulent les protéines ZEB1 et ZEB2 grâce au contrôle de l'expression de l'E-cadhérine. ZEB1 et ZEB2 sont des facteurs de transcription impliqués dans l'EMT et la métastase : lorsque les miRNAs de la famille miR-200 sont inhibés, l'EMT est induite, et inversement lorsque ces miRNAs sont exprimés c'est la MET qui est favorisée (Gregory *et al.*, 2008). De façon complémentaire, beaucoup de données de la littérature montrent que *H19* réprime l'activité des miRNAs de la famille miR-200 (Li *et al.*, 2016a). En effet, *H19* est notamment capable de séquestrer les miR-200a ou miR-200b/c de façon à induire le processus métastatique *via* la surexpression de ZEB1 et ZEB2 (Zhao *et al.*, 2019; Zhou *et al.*, 2017).

Pour compléter ces résultats, nous avons également analysé le rôle de *H19* et du miR-675 dans la résistance à l'anoïkis. L'anoïkis est une mort cellulaire induite par le détachement d'une cellule de sa matrice extracellulaire. La capacité d'une cellule à rester viable et croître sans attache est impliquée dans le développement de métastases : en effet, pendant l'invasion, les cellules vont devoir rompre leurs adhésions de façon à atteindre le site de tumeur secondaire. Pour évaluer le rôle de *H19* et du miR-675 dans ce phénomène, nous avons étudié la résistance à l'anoïkis de cellules cancéreuses mammaires surexprimant stablement *H19* ou le miR-675. La résistance des cellules MCF-7 surexprimant stablement *H19* ne montre pas de différence significative à long terme par rapport aux cellules contrôles. De la même façon, les cellules MDA-MB-231 surexprimant stablement *H19* ou le miR-675 ne

montrent pas de différence significative par rapport à leurs contrôles respectifs. Ces résultats sont présentés en **Annexe 3**.

Dans la suite logique des phénotypes cellulaires liés à l'EMT, j'ai également travaillé pendant ma thèse sur le rôle de *H19* dans la régulation des cellules souches cancéreuses mammaires. En effet, de nombreuses données préliminaires ont prouvé l'implication de *H19* dans le phénotype souche cancéreux mammaire (Peng *et al.*, 2017; Shima *et al.*, 2018; Wang *et al.*, 2019), notamment en favorisant la division symétrique des cellules. Les résultats obtenus pendant ma thèse mettent en évidence une corrélation entre l'expression du gène *H19* et la présence de marqueurs de cellules souches dans une cohorte de plus de 5000 échantillons tumoraux mammaires. De plus, ces résultats indiquent également que la surexpression de *H19* et du miR-675 retrouvée dans les cellules cancéreuses mammaires est globalement associée avec une surexpression de plusieurs gènes du phénotype souche comme *Sox2*, *Oct3/4* et *Abcg2*. Nous avons également pu observer une augmentation de l'expression de *Nanog* dans les cellules triple négatives MDA-MB-231 et SUM159PT, et une augmentation de *Notch1*, *Aldh1a1* et *Aldh1a3* dans la lignée SUM159PT uniquement. Dans cette lignée en particulier, l'activité de l'enzyme ALDH est diminuée en présence d'un siRNA ciblant *H19* ou d'un inhibiteur du miR-675, et augmentée par l'expression transitoire du miR-675. A notre connaissance, c'est la première fois qu'un rôle du miR-675 dans la biologie des cellules souches cancéreuses est décrit.

*Nanog*, *Sox2* et *Oct3/4* sont des facteurs de transcription très largement décrits dans la littérature pour leur implication dans la maintenance, l'auto-renouvellement et la pluripotence des cellules souches embryonnaires (Kim *et al.*, 2008) comme des cellules souches cancéreuses (Hadjimichael *et al.*, 2015). *Abcg2* code pour une pompe d'efflux associée avec la chimiorésistance des cellules souches cancéreuses (Hadjimichael *et al.*, 2015). En complément, il existe un réseau de régulation transcriptionnelle faisant intervenir *Sox2*, *Oct3/4* et c-Myc pour assurer la pluripotence des cellules souches (Kim *et al.*, 2008). De façon intéressante, il a également été démontré qu'en plus de *Sox2* et *Oct3/4*, c-Myc peut se lier de façon allèle-spécifique en amont du promoteur du gène *H19* pour favoriser sa transcription (Abi Habib *et al.*, 2014; Barsyte-Lovejoy *et al.*, 2006). Cette interaction empêche la méthylation du promoteur au niveau de l'allèle maternel, contribuant ainsi à l'expression du gène. La régulation du gène *H19* par *Sox2*, *Oct3/4* et c-Myc suggère ainsi que *H19* ait un rôle dans la

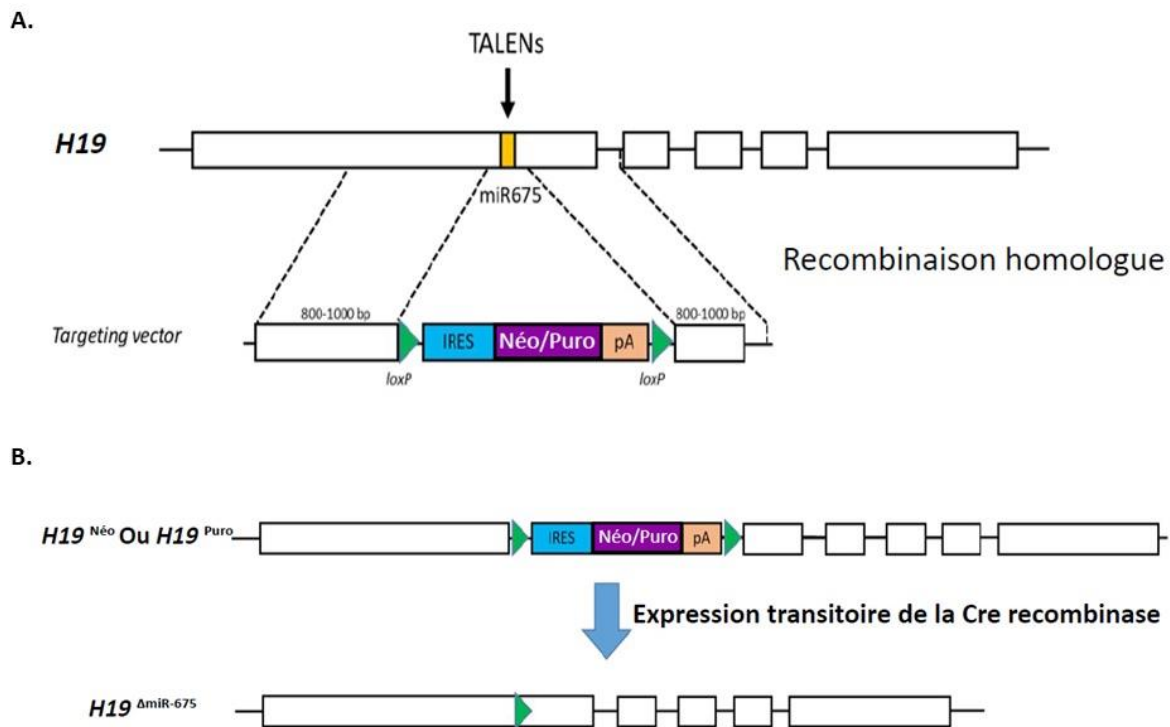
régulation des cellules souches. De plus, les résultats de mes travaux de thèse montrent que les lignées MDA-MB-231 et SUM159PT, qui ont déjà subi les modifications de l'EMT, expriment de plus hauts niveaux de *H19* lorsqu'elles forment des mammosphères, comparé aux cellules cultivées en 2D. A l'inverse, les cellules de type épithélial comme les MCF-7 expriment de plus hauts niveaux de miR-675 en mammosphères comparé aux cellules cultivées en 2D. Ces résultats pourraient ainsi confirmer notre hypothèse sur l'action séquentielle de *H19* et du miR-675 dans la progression tumorale.

Dans la littérature, il est souvent décrit que les miRNAs ont un rôle similaire au gène hôte dont ils sont issus. Par exemple, dans le cancer du sein, le miR-301 issu du gène *SKA2*, qui est un oncogène, réprime l'expression de suppresseurs de tumeur comme PTEN (Shi *et al.*, 2011). Pourtant, dans certains cas, les miRNAs ont des actions opposées à celle de leur précurseur (Gao *et al.*, 2012). C'est notamment le cas du miR-483-5p, issu du gène *IGF2*, qui inhibe la néo-angiogenèse à l'inverse de son gène hôte (Qiao *et al.*, 2011). Mes résultats ont permis de mettre en évidence un rôle bivalent pour le miR-675 selon le phénotype étudié : en effet, *H19* et son miR-675 ont des actions similaires concernant la migration et l'invasion cellulaire, et semblent réguler le phénotype souche de la même manière, mais leurs rôles paraissent opposés pendant l'EMT et la formation de clones.

Pour autant, l'ensemble des modèles d'étude disponibles au laboratoire (surexpression ectopique stable de *H19*, surexpression ectopique stable du miR-675, siRNAs ciblant spécifiquement *H19*, inhibiteurs du miR-675) ne permettent pas de différencier de façon complète l'implication de *H19* et/ou du miR-675. En effet, nous pouvons supposer que la modulation de l'expression de *H19* aura également un effet sur le niveau d'expression du miR-675, et même s'il est possible d'étudier l'effet de la surexpression stable du miR-675 sur le long terme, il est difficile de mesurer l'impact de l'inhibition permanente du miR-675 sans influencer l'expression de *H19*. Pour pallier ce problème, il serait envisageable de réaliser une mutagenèse dirigée sur notre plasmide pcDNA3.1-H19, de façon à invalider le site de synthèse du miR-675 ou sa *seed sequence*. Ce type d'approche nous permettrait d'étudier l'effet de la surexpression stable de *H19* sans modulation de l'expression du miR-675. Cependant, cette approche resterait une surexpression ectopique, et dans la même optique que pour le plasmide pH19-mCherry il serait intéressant de pouvoir moduler l'expression du miR-675 sans moduler l'expression endogène de *H19*. Une stratégie a ainsi été développée au laboratoire



dont l'objectif est de travailler à partir de lignées cellulaires comportant des allèles du gène *H19* déficients en miR-675 grâce à l'édition du génome basée sur la technologie TALEN : ceci nous permettrait alors d'étudier les effets de la perte d'expression du miR-675 dans les cellules cancéreuses mammaires, sans pour autant moduler l'expression du gène *H19* et ainsi discriminer les effets induits par *H19* des effets induits par le miR-675 (**Figure 59**).



**Figure 59. Génération d'un allèle *H19* déficient en miR-675.**

**A.** Représentation schématique du locus *H19* et de la séquence ciblée. La localisation du site de reconnaissance du TALEN au niveau du miR-675 dans l'exon 1 est indiquée en jaune. La cassette de ciblage, ne contenant pas de promoteur et flanquée de séquences d'homologie avec le gène *H19* et de sites *loxP* (en vert), contient un site "internal ribosome entry site" (IRES), un gène de résistance à un antibiotique (néomycine ou puromycine) et une séquence de polyadénylation (pA). **B.** La coupure par le TALEN puis la recombinaison homologue avec la cassette de ciblage entraîne l'insertion du gène de résistance à l'antibiotique au sein de l'allèle *H19*, conduisant à un arrêt prématuré dans sa transcription. L'élimination du knock-out induit par expression transitoire de la Cre recombinase permettra de générer un allèle *H19* déficient en miR-675.

Ce type de technologie a déjà été utilisé avec succès au laboratoire, et présente l'avantage par rapport à la technologie CRISPR/Cas9 de ne pas générer de mutation non désirée (*off-target mutation*). Dans cette approche, une cassette sans promoteur composée du site "internal ribosome entry site" (IRES) de l'EMCV, un gène de résistance aux antibiotiques (néomycine ou puromycine) et la séquence de polyadénylation SV40 flanquée de sites *loxP* et de bras d'homologie avec le gène *H19* seront ciblés sur la séquence du miR-

675 préalablement coupée par TALENs au sein du gène *H19* (**Figure 59.A**). La réparation par homologie du gène *H19* ciblé par les TALENs sera responsable de la délétion de la séquence du miR-675 et de l'insertion de la cassette sélectionnable permettant l'identification des clones résistants modifiés (**Figure 59.B**). Ces clones contiendront un *knock-out* (KO) d'un des deux allèles *H19*. L'utilisation simultanée d'une cassette codant la néomycine et d'une cassette codant la puromycine permettra de cibler les deux allèles *H19*. Ensuite, l'élimination de la cassette sélectionnable par l'expression transitoire du vecteur exprimant la Cre recombinase génèrera un allèle *H19* déficient en miR-675 (**Figure 59.B**).

La mise en place de ce modèle sera réalisée en utilisant les lignées cellulaires cancéreuses mammaires MDA-MB-231 et T-47D, qui possèdent deux allèles pour le locus *H19*. Après obtention de ce nouveau modèle cellulaire, nous pourrons réaliser une étude transcriptomique qui nous permettra de mettre en évidence les expressions géniques ainsi que les phénotypes régulés par *H19*, indépendamment de son miR-675. Cette analyse s'intègre dans un projet plus vaste qui vise à discriminer de façon précise les contributions relatives de *H19* et du miR-675 dans la tumorigenèse et la progression tumorale mammaire. Ces expériences seront réalisées par Evodie Peperstraete, actuellement en thèse au sein du laboratoire CANTHER sous la direction du Pr Eric Adriaenssens.

**Pour conclure, mes travaux de thèse ont contribué à la mise en évidence de mécanismes d'action inédits pour le long ARN non codant *H19* et son miR-675 dans les cancers du sein. Les différents processus cellulaires dans lesquels *H19* est impliqué ainsi que ses partenaires d'interaction soulignent la grande complexité de l'étude de cet ARN, ainsi que le large panel d'effets qu'il engendre au niveau cellulaire, allant de l'expression du génome jusqu'aux phénotypes des cellules cancéreuses mammaires. Même si des études complémentaires sont nécessaires, la mise en évidence de ces nouveaux modes d'action de *H19* par mes travaux de thèse s'inscrit dans un but d'amélioration des stratégies déjà utilisées en thérapie, mais aussi dans la mise au point de nouveaux traitements qui permettraient une meilleure spécificité ainsi qu'une diminution des rechutes des patientes atteintes de cancer du sein.**

# **BIBLIOGRAPHIE**



**Abi Habib**, W., Azzi, S., Brioude, F., Steunou, V., Thibaud, N., Das Neves, C., Le Jule, M., Chantot-Bastaraud, S., Keren, B., Lyonnet, S., et al. (2014). Extensive investigation of the IGF2/H19 imprinting control region reveals novel OCT4/SOX2 binding site defects associated with specific methylation patterns in Beckwith-Wiedemann syndrome. *Hum. Mol. Genet.* *23*, 5763–5773.

**Abreu**, E.B., Martinez, P., Betancourt, L., Romero, G., Godoy, A., and Bergamo, L. (2014). Treatment plan for breast cancer with sentinel node metastasis. *Ecancermedicalscience* *8*, 383.

**Adriaenssens**, E., Dumont, L., Lottin, S., Bolle, D., Leprêtre, A., Delobelle, A., Bouali, F., Dugimont, T., Coll, J., and Cury, J.-J. (1998). H19 Overexpression in Breast Adenocarcinoma Stromal Cells Is Associated with Tumor Values and Steroid Receptor Status but Independent of p53 and Ki-67 Expression. *Am J Pathol* *153*, 1597–1607.

**Adriaenssens**, E., Lottin, S., Dugimont, T., Fauquette, W., Coll, J., Dupouy, J.P., Boilly, B., and Cury, J.J. (1999). Steroid hormones modulate H19 gene expression in both mammary gland and uterus. *Oncogene* *18*, 4460–4473.

**Adriaenssens**, E., Lottin, S., Berteaux, N., Hornez, L., Fauquette, W., Fafeur, V., Peyrat, J.-P., Le Bourhis, X., Hondermarck, H., Coll, J., et al. (2002). Cross-Talk between Mesenchyme and Epithelium Increases H19 Gene Expression during Scattering and Morphogenesis of Epithelial Cells. *Experimental Cell Research* *275*, 215–229.

**Adriaenssens**, E., Vanhecke, E., Saule, P., Mougel, A., Page, A., Romon, R., Nurcombe, V., Le Bourhis, X., and Hondermarck, H. (2008). Nerve Growth Factor Is a Potential Therapeutic Target in Breast Cancer. *Cancer Research* *68*, 346–351.

**Al-Hajj**, M., Wicha, M.S., Benito-Hernandez, A., Morrison, S.J., and Clarke, M.F. (2003). Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *100*, 3983–3988.

**Al-Mayah**, A.H.J., Irons, S.L., Pink, R.C., Carter, D.R.F., and Kadhim, M.A. (2012). Possible role of exosomes containing RNA in mediating nontargeted effect of ionizing radiation. *Radiat. Res.* *177*, 539–545.

**Angrand**, P.-O., Vennin, C., Le Bourhis, X., and Adriaenssens, E. (2015). The role of long non-coding RNAs in genome formatting and expression. *Front Genet* *6*, 165.

**Apostolou**, P., and **Fostira**, F. (2013). Hereditary Breast Cancer: The Era of New Susceptibility Genes. *Biomed Res Int* *2013*.

**Arce**, C., Pérez-Plasencia, C., González-Fierro, A., de la Cruz-Hernández, E., Revilla-Vázquez, A., Chávez-Blanco, A., Trejo-Becerril, C., Pérez-Cárdenas, E., Taja-Chayeb, L., Bargallo, E., et al. (2006). A Proof-Of-Principle Study of Epigenetic Therapy Added to Neoadjuvant Doxorubicin Cyclophosphamide for Locally Advanced Breast Cancer. *PLoS ONE* *1*, e98.

**Arendt**, L.M., Rudnick, J.A., Keller, P.J., and Kuperwasser, C. (2010). Stroma in breast development and disease. *Seminars in Cell & Developmental Biology* *21*, 11–18.

**Ariel**, I., Weinstein, D., Voutilainen, R., Schneider, T., Lustig-Yariv, O., de Groot, N., and Hochberg, A. (1997). Genomic imprinting and the endometrial cycle. The expression of the imprinted gene H19 in the human female reproductive organs. *Diagn. Mol. Pathol.* *6*, 17–25.

- Ariel, I., Miao, H.Q., Ji, X.R., Schneider, T., Roll, D., Groot, N. de, Hochberg, A., and Ayesh, S. (1998).** Imprinted H19 oncofetal RNA is a candidate tumour marker for hepatocellular carcinoma. *Molecular Pathology* *51*, 21–25.
- Arnold, A., and Papanikolaou, A. (2005).** Cyclin D1 in breast cancer pathogenesis. *J. Clin. Oncol.* *23*, 4215–4224.
- Artandi, S.E., and DePinho, R.A. (2010).** Telomeres and telomerase in cancer. *Carcinogenesis* *31*, 9–18.
- Arun, G., Diermeier, S., Akerman, M., Chang, K.-C., Wilkinson, J.E., Hearn, S., Kim, Y., MacLeod, A.R., Krainer, A.R., Norton, L., et al. (2016).** Differentiation of mammary tumors and reduction in metastasis upon Malat1 lncRNA loss. *Genes Dev.* *30*, 34–51.
- Askarian-Amiri, M.E., Crawford, J., French, J.D., Smart, C.E., Smith, M.A., Clark, M.B., Ru, K., Mercer, T.R., Thompson, E.R., Lakhani, S.R., et al. (2011).** SNORD-host RNA Zfas1 is a regulator of mammary development and a potential marker for breast cancer. *RNA* *17*, 878–891.
- Aubert, L., Guilbert, M., Corbet, C., Génot, E., Adriaenssens, E., Chassat, T., Bertucci, F., Daubon, T., Magné, N., Bourhis, X.L., et al. (2015).** NGF-induced TrkA/CD44 association is involved in tumor aggressiveness and resistance to trastuzumab. *Oncotarget* *6*, 9807–9819.
- Auffinger, B., Tobias, A.L., Han, Y., Lee, G., Guo, D., Dey, M., Lesniak, M.S., and Ahmed, A.U. (2014).** Conversion of differentiated cancer cells into cancer stem-like cells in a glioblastoma model after primary chemotherapy. *Cell Death Differ* *21*, 1119–1131.
- Auyeung, V.C., Ulitsky, I., McGeary, S.E., and Bartel, D.P. (2013).** Beyond Secondary Structure: Primary-Sequence Determinants License Pri-miRNA Hairpins for Processing. *Cell* *152*, 844–858.
- Avilion, A.A., Nicolis, S.K., Pevny, L.H., Perez, L., Vivian, N., and Lovell-Badge, R. (2003).** Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. *Genes Dev.* *17*, 126–140.
- Avner, P., and Heard, E. (2001).** X-chromosome inactivation: counting, choice and initiation. *Nat Rev Genet* *2*, 59–67.
- Ayala, Y.M., Pagani, F., and Baralle, F.E. (2006).** TDP43 depletion rescues aberrant CFTR exon 9 skipping. *FEBS Letters* *580*, 1339–1344.
- Azuma-Mukai, A., Oguri, H., Mituyama, T., Qian, Z.R., Asai, K., Siomi, H., and Siomi, M.C. (2008).** Characterization of endogenous human Argonautes and their miRNA partners in RNA silencing. *PNAS* *105*, 7964–7969.
- Azzalin, C.M., Reichenbach, P., Khoriatou, L., Giulotto, E., and Lingner, J. (2007).** Telomeric Repeat Containing RNA and RNA Surveillance Factors at Mammalian Chromosome Ends. *Science* *318*, 798–801.
- Babiarz, J.E., Ruby, J.G., Wang, Y., Bartel, D.P., and Blelloch, R. (2008).** Mouse ES cells express endogenous shRNAs, siRNAs, and other Microprocessor-independent, Dicer-dependent small RNAs. *Genes Dev.* *22*, 2773–2785.
- Balzeau, J., Menezes, M.R., Cao, S., and Hagan, J.P. (2017).** The LIN28/let-7 Pathway in Cancer. *Front Genet* *8*, 31.

- Bao, S., Wu, Q., McLendon, R.E., Hao, Y., Shi, Q., Hjelmeland, A.B., Dewhirst, M.W., Bigner, D.D., and Rich, J.N. (2006).** Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature* *444*, 756–760.
- Barlow, D.P., and Bartolomei, M.S. (2014).** Genomic Imprinting in Mammals. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* *6*, a018382–a018382.
- Barlow, D.P., Stöger, R., Herrmann, B.G., Saito, K., and Schweifer, N. (1991).** The mouse insulin-like growth factor type-2 receptor is imprinted and closely linked to the Tme locus. *Nature* *349*, 84–87.
- Barsyte-Lovejoy, D., Lau, S.K., Boutros, P.C., Khosravi, F., Jurisica, I., Andrulevicius, I.L., Tsao, M.S., and Penn, L.Z. (2006).** The c-Myc oncogene directly induces the H19 noncoding RNA by allele-specific binding to potentiate tumorigenesis. *Cancer Res.* *66*, 5330–5337.
- Bartek, J., Bartkova, J., and Lukas, J. (2007).** DNA damage signalling guards against activated oncogenes and tumour progression. *Oncogene* *26*, 7773–7779.
- Bartkova, J., Rezaei, N., Liontos, M., Karakaidos, P., Kletsas, D., Issaeva, N., Vassiliou, L.-V.F., Kolettas, E., Niforou, K., Zoumpourlis, V.C., et al. (2006).** Oncogene-induced senescence is part of the tumorigenesis barrier imposed by DNA damage checkpoints. *Nature* *444*, 633–637.
- Bartolomei, M.S., Zemel, S., and Tilghman, S.M. (1991).** Parental imprinting of the mouse H19 gene. *Nature* *351*, 153–155.
- Batagov, A.O., Kuznetsov, V.A., and Kurochkin, I.V. (2011).** Identification of nucleotide patterns enriched in secreted RNAs as putative cis-acting elements targeting them to exosome nano-vesicles. *BMC Genomics* *12 Suppl 3*, S18.
- Behm-Ansmant, I., Rehwinkel, J., and Izaurralde, E. (2006).** MicroRNAs Silence Gene Expression by Repressing Protein Expression and/or by Promoting mRNA Decay. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* *71*, 523–530.
- Bekpen, C., Marques-Bonet, T., Alkan, C., Antonacci, F., Leogrande, M.B., Ventura, M., Kidd, J.M., Siswara, P., Howard, J.C., and Eichler, E.E. (2009).** Death and resurrection of the human IRGM gene. *PLoS Genet.* *5*, e1000403.
- Bellazzo, A., Sicari, D., Valentino, E., Sal, G.D., and Collavin, L. (2018).** Complexes formed by mutant p53 and their roles in breast cancer (Dove Press).
- Bennett, C.B., Westmoreland, T.J., Snipe, J.R., and Resnick, M.A. (1996).** A double-strand break within a yeast artificial chromosome (YAC) containing human DNA can result in YAC loss, deletion or cell lethality. *Mol. Cell. Biol.* *16*, 4414–4425.
- Berezikov, E., Chung, W.-J., Willis, J., Cuppen, E., and Lai, E.C. (2007).** Mammalian Mirtron Genes. *Molecular Cell* *28*, 328–336.
- Bergmann, J.H., and Spector, D.L. (2014).** Long non-coding RNAs: modulators of nuclear structure and function. *Curr. Opin. Cell Biol.* *26*, 10–18.
- Bernard, D., Prasanth, K.V., Tripathi, V., Colasse, S., Nakamura, T., Xuan, Z., Zhang, M.Q., Sedel, F., Jourdain, L., Couplier, F., et al. (2010).** A long nuclear-retained non-coding RNA regulates synaptogenesis by modulating gene expression. *EMBO J.* *29*, 3082–3093.

- Bernstein, E., Caudy, A.A., Hammond, S.M., and Hannon, G.J. (2001).** Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature* *409*, 363–366.
- Bernstein, E., Kim, S.Y., Carmell, M.A., Murchison, E.P., Alcorn, H., Li, M.Z., Mills, A.A., Elledge, S.J., Anderson, K.V., and Hannon, G.J. (2003).** Dicer is essential for mouse development. *Nat Genet* *35*, 215–217.
- Berteaux, N., Lottin, S., Adriaenssens, E., Van Coppenolle, F., Van Coppennolle, F., Leroy, X., Coll, J., Dugimont, T., and Cury, J.-J. (2004).** Hormonal regulation of H19 gene expression in prostate epithelial cells. *J. Endocrinol.* *183*, 69–78.
- Berteaux, N., Lottin, S., Monté, D., Pinte, S., Quatannens, B., Coll, J., Hondermarck, H., Cury, J.-J., Dugimont, T., and Adriaenssens, E. (2005).** H19 mRNA-like Noncoding RNA Promotes Breast Cancer Cell Proliferation through Positive Control by E2F1. *J. Biol. Chem.* *280*, 29625–29636.
- Berteaux, N., Aptel, N., Cathala, G., Genton, C., Coll, J., Daccache, A., Spruyt, N., Hondermarck, H., Dugimont, T., Cury, J.-J., et al. (2008).** A novel H19 antisense RNA overexpressed in breast cancer contributes to paternal IGF2 expression. *Mol. Cell. Biol.* *28*, 6731–6745.
- Berteaux, N., Spruyt, N., and Adriaenssens, E. (2010).** Noncoding RNAs at H19/IGF2 Locus: Role in Imprinting, Gene Expression, and Associated Pathologies. In *RNA Technologies and Their Applications*, V.A. Erdmann, and J. Barciszewski, eds. (Berlin, Heidelberg: Springer), pp. 419–443.
- Bertheau, P., Lehmann-Che, J., Varna, M., Dumay, A., Poirot, B., Porcher, R., Turpin, E., Plassa, L.-F., de Roquancourt, A., Bourstyn, E., et al. (2013).** p53 in breast cancer subtypes and new insights into response to chemotherapy. *Breast* *22 Suppl 2*, S27-29.
- Bertos, N.R., and Park, M. (2011).** Breast cancer - one term, many entities? *J. Clin. Invest.* *121*, 3789–3796.
- Bestor, T.H. (1988).** Cloning of a mammalian DNA methyltransferase. *Gene* *74*, 9–12.
- Bhattacharyya, S.N., Habermacher, R., Martine, U., Closs, E.I., and Filipowicz, W. (2006).** Stress-induced reversal of microRNA repression and mRNA P-body localization in human cells. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* *71*, 513–521.
- Biffi, G., Tannahill, D., and Balasubramanian, S. (2012).** An Intramolecular G-Quadruplex Structure Is Required for Binding of Telomeric Repeat-Containing RNA to the Telomeric Protein TRF2. *J. Am. Chem. Soc.* *134*, 11974–11976.
- Bissell, M.J., and Hines, W.C. (2011).** Why don't we get more cancer? A proposed role of the microenvironment in restraining cancer progression. *Nat Med* *17*, 320–329.
- Blaszczyk, J., Tropea, J.E., Bubunenko, M., Routzahn, K.M., Waugh, D.S., Court, D.L., and Ji, X. (2001).** Crystallographic and Modeling Studies of RNase III Suggest a Mechanism for Double-Stranded RNA Cleavage. *Structure* *9*, 1225–1236.
- Bohnsack, M.T., Czaplinski, K., and Gorlich, D. (2004).** Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. *RNA* *10*, 185–191.
- Boiko, A.D., Razorenova, O.V., van de Rijn, M., Swetter, S.M., Johnson, D.L., Ly, D.P., Butler, P.D., Yang, G.P., Joshua, B., Kaplan, M.J., et al. (2010).** Human melanoma-initiating cells express neural crest nerve growth factor receptor CD271. *Nature* *466*, 133–137.



- Boldin**, M.P., Taganov, K.D., Rao, D.S., Yang, L., Zhao, J.L., Kalwani, M., Garcia-Flores, Y., Luong, M., Devrekanli, A., Xu, J., et al. (2011). miR-146a is a significant brake on autoimmunity, myeloproliferation, and cancer in mice. *J. Exp. Med.* *208*, 1189–1201.
- Bonnet**, D., and **Dick**, J.E. (1997). Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med* *3*, 730–737.
- Bosco**, E.E., and **Knudsen**, E.S. (2007). RB in Breast Cancer: The Crossroads of Tumorigenesis and Treatment. *Cell Cycle* *6*, 667–671.
- Bourhis**, X.L., Toillon, R.-A., Boilly, B., and Hondermarck, H. (2000). Autocrine and paracrine growth inhibitors of breast cancer cells. *Breast Cancer Res Treat* *60*, 251–258.
- Bouwman**, P., Aly, A., Escandell, J.M., Pieterse, M., Bartkova, J., van der Gulden, H., Hiddingh, S., Thanasoula, M., Kulkarni, A., Yang, Q., et al. (2010). 53BP1 loss rescues BRCA1 deficiency and is associated with triple-negative and BRCA-mutated breast cancers. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *17*, 688–695.
- Boyer**, L.A., Lee, T.I., Cole, M.F., Johnstone, S.E., Levine, S.S., Zucker, J.P., Guenther, M.G., Kumar, R.M., Murray, H.L., Jenner, R.G., et al. (2005). Core transcriptional regulatory circuitry in human embryonic stem cells. *Cell* *122*, 947–956.
- Brannan**, C.I., Dees, E.C., Ingram, R.S., and Tilghman, S.M. (1990). The product of the H19 gene may function as an RNA. *Mol. Cell. Biol.* *10*, 28–36.
- Brisken**, C., and **O'Malley**, B. (2010). Hormone Action in the Mammary Gland. *Cold Spring Harb Perspect Biol* *2*.
- Brockdorff**, N. (2013). Noncoding RNA and Polycomb recruitment. *RNA* *19*, 429–442.
- Brockdorff**, N., McCabe, M., Norris, P., Cooper, J., Swift, S., and Kay, F. The Product of the Mouse Xist Gene Is a 15 kb Inactive X-Specific Transcript Containing No Conserved ORF and Located in the Nucleus. *12*.
- Brown**, C.J., Hendrich, B.D., Rupert, J.L., Lafrenière, R.G., Xing, Y., Lawrence, J., and Willard, H.F. (1992). The human XIST gene: analysis of a 17 kb inactive X-specific RNA that contains conserved repeats and is highly localized within the nucleus. *Cell* *71*, 527–542.
- Brown**, J.D., Mitchell, S.E., and O'Neill, R.J. (2012). Making a long story short: noncoding RNAs and chromosome change. *Heredity (Edinb)* *108*, 42–49.
- Bykov**, V.J.N., and Wiman, K.G. (2014). Mutant p53 reactivation by small molecules makes its way to the clinic. *FEBS Lett.* *588*, 2622–2627.
- Cai**, X., and **Cullen**, B.R. (2007). The imprinted H19 noncoding RNA is a primary microRNA precursor. *RNA* *13*, 313–316.
- Calin**, G.A., Dumitru, C.D., Shimizu, M., Bichi, R., Zupo, S., Noch, E., Aldler, H., Rattan, S., Keating, M., Rai, K., et al. (2002). Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *99*, 15524–15529.
- Callahan**, R., and **Hurvitz**, S. (2011). Human epidermal growth factor receptor-2-positive breast cancer: Current management of early, advanced, and recurrent disease. *Curr. Opin. Obstet. Gynecol.* *23*, 37–43.

**Campbell, L.L., and Polyak, K. (2007).** Breast tumor heterogeneity: cancer stem cells or clonal evolution? *Cell Cycle* 6, 2332–2338.

**Cancer Genome Atlas Network (2012).** Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 490, 61–70.

**Caretti, G., Schiltz, R.L., Dilworth, F.J., Di Padova, M., Zhao, P., Ogryzko, V., Fuller-Pace, F.V., Hoffman, E.P., Tapscott, S.J., and Sartorelli, V. (2006).** The RNA Helicases p68/p72 and the Noncoding RNA SRA Are Coregulators of MyoD and Skeletal Muscle Differentiation. *Developmental Cell* 11, 547–560.

**Carmeliet, P. (2003).** Angiogenesis in health and disease. *NATURE MEDICINE* 9, 8.

**Cavalieri, E., Chakravarti, D., Guttenplan, J., Hart, E., Ingle, J., Jankowiak, R., Muti, P., Rogan, E., Russo, J., Santen, R., et al. (2006).** Catechol estrogen quinones as initiators of breast and other human cancers: Implications for biomarkers of susceptibility and cancer prevention. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer* 1766, 63–78.

**Ceccaldi, R., Rondinelli, B., and D'Andrea, A.D. (2016).** Repair Pathway Choices and Consequences at the Double-Strand Break. *Trends in Cell Biology* 26, 52–64.

**Cesana, M., Cacchiarelli, D., Legnini, I., Santini, T., Sthandier, O., Chinappi, M., Tramontano, A., and Bozzoni, I. (2011).** A Long Noncoding RNA Controls Muscle Differentiation by Functioning as a Competing Endogenous RNA. *Cell* 147, 358–369.

**Chaffer, C.L., Brueckmann, I., Scheel, C., Kaestli, A.J., Wiggins, P.A., Rodrigues, L.O., Brooks, M., Reinhardt, F., Su, Y., Polyak, K., et al. (2011).** Normal and neoplastic nonstem cells can spontaneously convert to a stem-like state. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 7950–7955.

**Chambers, I., Colby, D., Robertson, M., Nichols, J., Lee, S., Tweedie, S., and Smith, A. (2003).** Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell* 113, 643–655.

**Chao, C.C.-K. (2015).** Mechanisms of p53 degradation. *Clin. Chim. Acta* 438, 139–147.

**Chapman, J.R., Barral, P., Vannier, J.-B., Borel, V., Steger, M., Tomas-Loba, A., Sartori, A.A., Adams, I.R., Batista, F.D., and Boulton, S.J. (2013).** RIF1 is essential for 53BP1-dependent nonhomologous end joining and suppression of DNA double-strand break resection. *Mol. Cell* 49, 858–871.

**Chau, W.K., Ip, C.K., Mak, A.S.C., Lai, H.-C., and Wong, A.S.T. (2013).** c-Kit mediates chemoresistance and tumor-initiating capacity of ovarian cancer cells through activation of Wnt/ $\beta$ -catenin-ATP-binding cassette G2 signaling. *Oncogene* 32, 2767–2781.

**Cheang, M.C.U., Chia, S.K., Voduc, D., Gao, D., Leung, S., Snider, J., Watson, M., Davies, S., Bernard, P.S., Parker, J.S., et al. (2009).** Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* 101, 736–750.

**Cheloufi, S., Dos Santos, C.O., Chong, M.M.W., and Hannon, G.J. (2010).** A dicer-independent miRNA biogenesis pathway that requires Ago catalysis. *Nature* 465, 584–589.

**Chen, B., and Huang, S. (2018).** Circular RNA: An emerging non-coding RNA as a regulator and biomarker in cancer. *Cancer Letters* 418, 41–50.

- Chen, L.-L., and Carmichael, G.G.** (2009). Altered nuclear retention of mRNAs containing inverted repeats in human embryonic stem cells: functional role of a nuclear noncoding RNA. *Mol. Cell* 35, 467–478.
- Chen, Y., and Olopade, O.I.** (2008). MYC in breast tumor progression. *Expert Rev Anticancer Ther* 8, 1689–1698.
- Chen, C., Fingerhut, J.M., and Yamashita, Y.M.** (2016). The ins(ide) and outs(ide) of asymmetric stem cell division. *Curr. Opin. Cell Biol.* 43, 1–6.
- Chen, M.-J., Deng, J., Chen, C., Hu, W., Yuan, Y.-C., and Xia, Z.-K.** (2019). LncRNA H19 promotes epithelial mesenchymal transition and metastasis of esophageal cancer via STAT3/EZH2 axis. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 113, 27–36.
- Chendrimada, T.P., Gregory, R.I., Kumaraswamy, E., Norman, J., Cooch, N., Nishikura, K., and Shiekhattar, R.** (2005). TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature* 436, 740–744.
- Chong, M.M.W., Zhang, G., Cheloufi, S., Neubert, T.A., Hannon, G.J., and Littman, D.R.** (2010). Canonical and alternate functions of the microRNA biogenesis machinery. *Genes Dev.* 24, 1951–1960.
- Chu, C., Spitale, R.C., and Chang, H.Y.** (2015). Technologies to probe functions and mechanisms of long noncoding RNAs. *Nat Struct Mol Biol* 22, 29–35.
- Chuthapisith, S., Eremin, J., El-Sheemey, M., and Eremin, O.** (2010). Breast cancer chemoresistance: emerging importance of cancer stem cells. *Surg Oncol* 19, 27–32.
- Ciccia, A., and Elledge, S.J.** (2010). The DNA Damage Response: Making It Safe to Play with Knives. *Molecular Cell* 40, 179–204.
- Cifuentes, D., Xue, H., Taylor, D.W., Patnode, H., Mishima, Y., Cheloufi, S., Ma, E., Mane, S., Hannon, G.J., Lawson, N.D., et al.** (2010). A novel miRNA processing pathway independent of Dicer requires Argonaute2 catalytic activity. *Science* 328, 1694–1698.
- Clark, B.S., and Blackshaw, S.** (2014). Long non-coding RNA-dependent transcriptional regulation in neuronal development and disease. *Front. Genet.* 5.
- Clarke, M., Collins, R., Darby, S., Davies, C., Elphinstone, P., Evans, V., Godwin, J., Gray, R., Hicks, C., James, S., et al.** (2005). Effects of radiotherapy and of differences in the extent of surgery for early breast cancer on local recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet* 366, 2087–2106.
- Colaprico, A., Silva, T.C., Olsen, C., Garofano, L., Cava, C., Garolini, D., Sabedot, T.S., Malta, T.M., Pagnotta, S.M., Castiglioni, I., et al.** (2016). TCGAbiolinks: an R/Bioconductor package for integrative analysis of TCGA data. *Nucleic Acids Res* 44, e71.
- Cole, J.M., Joseph, S., Sudhakar, C.G., and Cowden Dahl, K.D.** (2014). Enrichment for chemoresistant ovarian cancer stem cells from human cell lines. *J Vis Exp* 51891.
- Collette, J., Le Bourhis, X., and Adriaenssens, E.** (2017). Regulation of Human Breast Cancer by the Long Non-Coding RNA H19. *International Journal of Molecular Sciences* 18, 2319.

- Collins**, A.T., Berry, P.A., Hyde, C., Stower, M.J., and Maitland, N.J. (2005). Prospective Identification of Tumorigenic Prostate Cancer Stem Cells. *Cancer Res* 65, 10946–10951.
- Connolly**, R.M., Li, H., Jankowitz, R.C., Zhang, Z., Rudek, M.A., Jeter, S.C., Slater, S.A., Powers, P., Wolff, A.C., Fetting, J.H., et al. (2017). Combination Epigenetic Therapy in Advanced Breast Cancer with 5-Azacidine and Entinostat: A Phase II National Cancer Institute/Stand Up to Cancer Study. *Clin Cancer Res* 23, 2691–2701.
- Constância**, M., Dean, W., Lopes, S., Moore, T., Kelsey, G., and Reik, W. (2000). Deletion of a silencer element in *Igf2* results in loss of imprinting independent of H19. *Nat. Genet.* 26, 203–206.
- Conte**, P.F., Gennari, A., Landucci, E., and Orlandini, C. (2000). Role of epirubicin in advanced breast cancer. *Clin. Breast Cancer* 1 *Suppl* 1, S46-51.
- Cooper**, D.W., VandeBerg, J.L., Sharman, G.B., and Poole, W.E. (1971). Phosphoglycerate kinase polymorphism in kangaroos provides further evidence for paternal X inactivation. *Nature New Biol.* 230, 155–157.
- Cooper**, M.J., Fischer, M., Komitowski, D., Shevelev, A., Schulze, E., Ariel, I., Tykocinski, M.L., Miron, S., Ilan, J., de Groot, N., et al. (1996). Developmentally imprinted genes as markers for bladder tumor progression. *J. Urol.* 155, 2120–2127.
- Cortez**, D. (2019). Replication-Coupled DNA Repair. *Molecular Cell* 74, 866–876.
- Cortez**, C.C., and **Jones**, P.A. (2008). Chromatin, cancer and drug therapies. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* 647, 44–51.
- Costa**, V., Lo Dico, A., Rizzo, A., Rajata, F., Tripodi, M., Alessandro, R., and Conigliaro, A. (2017). MiR-675-5p supports hypoxia induced epithelial to mesenchymal transition in colon cancer cells. *Oncotarget* 8, 24292–24302.
- Court**, F., Baniol, M., Hagege, H., Petit, J.S., Lelay-Taha, M.-N., Carbonell, F., Weber, M., Cathala, G., and Forne, T. (2011). Long-range chromatin interactions at the mouse *Igf2/H19* locus reveal a novel paternally expressed long non-coding RNA. *Nucleic Acids Res.* 39, 5893–5906.
- Cowppli-Bony**, A., Colonna, M., Ligier, K., Jooste, V., Defosse, G., Monnereau, A., Amadeo, B., Arveux, P., Baldi, I., Bara, S., et al. (2019). Épidémiologie descriptive des cancers en France métropolitaine : incidence, survie et prévalence. *Bulletin du Cancer* 106, 617–634.
- Croker**, A.K., and **Allan**, A.L. (2012). Inhibition of aldehyde dehydrogenase (ALDH) activity reduces chemotherapy and radiation resistance of stem-like ALDH<sup>hi</sup>CD44<sup>+</sup> human breast cancer cells. *Breast Cancer Res. Treat.* 133, 75–87.
- Crouse**, H.V., Brown, A., and Mumford, B.C. (1971). --chromosome inheritance and the problem of chromosome “imprinting” in *Sciara* (Sciariidae, Diptera). *Chromosoma* 34, 324-339 8.
- Cserni**, G., Chmielik, E., Cserni, B., and Tot, T. (2018). The new TNM-based staging of breast cancer. *Virchows Arch.* 472, 697–703.
- Curtin**, N.J. (2012). DNA repair dysregulation from cancer driver to therapeutic target. *Nat Rev Cancer* 12, 801–817.

- Cusanelli, E., Romero, C.A.P., and Chartrand, P. (2013).** Telomeric Noncoding RNA TERRA Is Induced by Telomere Shortening to Nucleate Telomerase Molecules at Short Telomeres. *Molecular Cell* 51, 780–791.
- Dahiya, N., Sherman-Baust, C.A., Wang, T.-L., Davidson, B., Shih, I.-M., Zhang, Y., Wood, W., Becker, K.G., and Morin, P.J. (2008).** MicroRNA expression and identification of putative miRNA targets in ovarian cancer. *PLoS ONE* 3, e2436.
- Damaskos, C., Valsami, S., Kontos, M., Spartalis, E., Kalampokas, T., Kalampokas, E., Athanasiou, A., Moris, D., Daskalopoulou, A., Davakis, S., et al. (2017).** Histone Deacetylase Inhibitors: An Attractive Therapeutic Strategy Against Breast Cancer. *Anticancer Res* 37, 35–46.
- DeChiara, T.M., Efstratiadis, A., and Robertson, E.J. (1990).** A growth-deficiency phenotype in heterozygous mice carrying an insulin-like growth factor II gene disrupted by targeting. *Nature* 345, 78–80.
- DeChiara, T.M., Robertson, E.J., and Efstratiadis, A. (1991).** Parental imprinting of the mouse insulin-like growth factor II gene. *Cell* 64, 849–859.
- DeLeo, A.B., Jay, G., Appella, E., Dubois, G.C., Law, L.W., and Old, L.J. (1979).** Detection of a transformation-related antigen in chemically induced sarcomas and other transformed cells of the mouse. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 76, 2420–2424.
- Della Donna, L., Lagadec, C., and Pajonk, F. (2012).** Radioresistance of prostate cancer cells with low proteasome activity. *Prostate* 72, 868–874.
- Demont, Y., Corbet, C., Page, A., Ataman-Önal, Y., Choquet-Kastylevsky, G., Fliniaux, I., Bourhis, X.L., Toillon, R.-A., Bradshaw, R.A., and Hondermarck, H. (2012).** Pro-nerve Growth Factor Induces Autocrine Stimulation of Breast Cancer Cell Invasion through Tropomyosin-related Kinase A (TrkA) and Sortilin Protein. *J. Biol. Chem.* 287, 1923–1931.
- Denli, A.M., Tops, B.B.J., Plasterk, R.H.A., Ketting, R.F., and Hannon, G.J. (2004).** Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature* 432, 231–235.
- Dent, R., Trudeau, M., Pritchard, K.I., Hanna, W.M., Kahn, H.K., Sawka, C.A., Lickley, L.A., Rawlinson, E., Sun, P., and Narod, S.A. (2007).** Triple-negative breast cancer: clinical features and patterns of recurrence. *Clin. Cancer Res.* 13, 4429–4434.
- Deplus, R., Brenner, C., Burgers, W.A., Putmans, P., Kouzarides, T., de Launoit, Y., and Fuks, F. (2002).** Dnmt3L is a transcriptional repressor that recruits histone deacetylase. *Nucleic Acids Res.* 30, 3831–3838.
- Derrien, T., Johnson, R., Bussotti, G., Tanzer, A., Djebali, S., Tilgner, H., Guernec, G., Martin, D., Merkel, A., Knowles, D.G., et al. (2012).** The GENCODE v7 catalog of human long noncoding RNAs: Analysis of their gene structure, evolution, and expression. *Genome Res.* 22, 1775–1789.
- Descamps, S., Toillon, R.-A., Adriaenssens, E., Pawlowski, V., Cool, S.M., Nurcombe, V., Bourhis, X.L., Boilly, B., Peyrat, J.-P., and Hondermarck, H. (2001).** Nerve Growth Factor Stimulates Proliferation and Survival of Human Breast Cancer Cells through Two Distinct Signaling Pathways. *J. Biol. Chem.* 276, 17864–17870.

- Di Micco**, R., Fumagalli, M., Cicalese, A., Piccinin, S., Gasparini, P., Luise, C., Schurra, C., Garre', M., Giovanni Nuciforo, P., Bensimon, A., et al. (2006). Oncogene-induced senescence is a DNA damage response triggered by DNA hyper-replication. *Nature* *444*, 638–642.
- Dick**, J.E. (2008). Stem cell concepts renew cancer research. *Blood* *112*, 4793–4807.
- Dieci**, M.V., Orvieto, E., Dominici, M., Conte, P., and Guarneri, V. (2014). Rare breast cancer subtypes: histological, molecular, and clinical peculiarities. *Oncologist* *19*, 805–813.
- Diederichs**, S., and **Haber**, D.A. (2007). Dual role for argonautes in microRNA processing and posttranscriptional regulation of microRNA expression. *Cell* *131*, 1097–1108.
- Dieterich**, M., Stubert, J., Reimer, T., Erickson, N., and Berling, A. (2014). Influence of Lifestyle Factors on Breast Cancer Risk. *Breast Care (Basel)* *9*, 407–414.
- Dippold**, W.G., Jay, G., DeLeo, A.B., Khoury, G., and Old, L.J. (1981). p53 transformation-related protein: detection by monoclonal antibody in mouse and human cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *78*, 1695–1699.
- Dirat**, B., Bochet, L., Dabek, M., Daviaud, D., Dauvillier, S., Majed, B., Wang, Y.Y., Meulle, A., Salles, B., Le Gonidec, S., et al. (2011). Cancer-associated adipocytes exhibit an activated phenotype and contribute to breast cancer invasion. *Cancer Res.* *71*, 2455–2465.
- Dobrovic**, A., and **Simpfendorfer**, D. (1997). Methylation of the BRCA1 gene in sporadic breast cancer. *Cancer Res.* *57*, 3347–3350.
- Dollé**, L., El Yazidi-Belkoura, I., Adriaenssens, E., Nurcombe, V., and Hondermarck, H. (2003). Nerve growth factor overexpression and autocrine loop in breast cancer cells. *Oncogene* *22*, 5592–5601.
- Drewell**, R.A., Brenton, J.D., Ainscough, J.F., Barton, S.C., Hilton, K.J., Arney, K.L., Dandolo, L., and Surani, M.A. (2000). Deletion of a silencer element disrupts H19 imprinting independently of a DNA methylation epigenetic switch. *Development* *127*, 3419–3428.
- Drewell**, R.A., Arney, K.L., Arima, T., Barton, S.C., Brenton, J.D., and Surani, M.A. (2002a). Novel conserved elements upstream of the H19 gene are transcribed and act as mesodermal enhancers. *Development* *129*, 1205–1213.
- Drewell**, R.A., Goddard, C.J., Thomas, J.O., and Surani, M.A. (2002b). Methylation-dependent silencing at the H19 imprinting control region by MeCP2. *Nucleic Acids Res.* *30*, 1139–1144.
- Duart-Garcia**, C., and Braunschweig, M.H. (2013). The Igf2as transcript is exported into cytoplasm and associated with polysomes. *Biochem. Genet.* *51*, 119–130.
- Dueck**, A., Ziegler, C., Eichner, A., Berezikov, E., and Meister, G. (2012). microRNAs associated with the different human Argonaute proteins. *Nucleic Acids Res* *40*, 9850–9862.
- Dugimont**, T., Cury, J.J., Wernert, N., Delobelle, A., Raes, M.B., Joubel, A., Stehelin, D., and Coll, J. (1995). The H19 gene is expressed within both epithelial and stromal components of human invasive adenocarcinomas. *Biol. Cell* *85*, 117–124.
- Dugimont**, T., Montpellier, C., Adriaenssens, E., Lottin, S., Dumont, L., lotsova, V., Lagrou, C., Stéhelin, D., Coll, J., and Cury, J.J. (1998). The H19 TATA-less promoter is efficiently repressed by wild-type tumor suppressor gene product p53. *Oncogene* *16*, 2395–2401.

- Dulbecco, R.** (1986). A turning point in cancer research: sequencing the human genome. *Science* *231*, 1055–1056.
- Dworkin, A.M., Huang, T.H.-M., and Toland, A.E.** (2009). Epigenetic alterations in the breast: Implications for breast cancer detection, prognosis and treatment. *Semin Cancer Biol* *19*, 165–171.
- Eiðmann, M., Gutschner, T., Hämmerle, M., Günther, S., Caudron-Herger, M., Groß, M., Schirmacher, P., Rippe, K., Braun, T., Zörnig, M., et al.** (2012). Loss of the abundant nuclear non-coding RNA MALAT1 is compatible with life and development. *RNA Biol* *9*, 1076–1087.
- El Hajj, J., Nguyen, E., Liu, Q., Bouyer, C., Adriaenssens, E., Hilal, G., and Ségal-Bendirdjian, E.** (2018). Telomerase regulation by the long non-coding RNA H19 in human acute promyelocytic leukemia cells. *Molecular Cancer* *17*.
- Elenbaas, B., and Weinberg, R.A.** (2001). Heterotypic Signaling between Epithelial Tumor Cells and Fibroblasts in Carcinoma Formation. *Experimental Cell Research* *264*, 169–184.
- Ellsworth, R.E., Decewicz, D.J., Shriver, C.D., and Ellsworth, D.L.** (2010). Breast Cancer in the Personal Genomics Era. *Curr Genomics* *11*, 146–161.
- Elsheikh, S.E., Green, A.R., Rakha, E.A., Powe, D.G., Ahmed, R.A., Collins, H.M., Soria, D., Garibaldi, J.M., Paish, C.E., Ammar, A.A., et al.** (2009). Global Histone Modifications in Breast Cancer Correlate with Tumor Phenotypes, Prognostic Factors, and Patient Outcome. *Cancer Res* *69*, 3802–3809.
- Engstrøm, M.J., Opdahl, S., Hagen, A.I., Romundstad, P.R., Akslen, L.A., Haugen, O.A., Vatten, L.J., and Bofin, A.M.** (2013). Molecular subtypes, histopathological grade and survival in a historic cohort of breast cancer patients. *Breast Cancer Res. Treat.* *140*, 463–473.
- Eramo, A., Lotti, F., Sette, G., Pilozi, E., Biffoni, M., Di Virgilio, A., Conticello, C., Ruco, L., Peschle, C., and De Maria, R.** (2008). Identification and expansion of the tumorigenic lung cancer stem cell population. *Cell Death Differ.* *15*, 504–514.
- Eroles, P., Bosch, A., Pérez-Fidalgo, J.A., and Lluch, A.** (2012). Molecular biology in breast cancer: intrinsic subtypes and signaling pathways. *Cancer Treat. Rev.* *38*, 698–707.
- Espósito, A., Criscitiello, C., Salè, E.O., and Curigliano, G.** (2014). Optimal adjuvant chemotherapy in breast cancer: selection of agents. *Expert Rev Clin Pharmacol* *7*, 605–611.
- Esteller, M.** (2000). Promoter Hypermethylation and BRCA1 Inactivation in Sporadic Breast and Ovarian Tumors. *Journal of the National Cancer Institute* *92*, 564–569.
- Evron, E., Umbricht, C.B., Korz, D., Raman, V., Loeb, D.M., Niranjana, B., Buluwela, L., Weitzman, S.A., Marks, J., and Sukumar, S.** (2001). Loss of cyclin D2 expression in the majority of breast cancers is associated with promoter hypermethylation. *Cancer Res.* *61*, 2782–2787.
- Eyfjörd, J.E., Thorlacius, S., Steinarsdóttir, M., Valgardsdóttir, R., Ögmundsdóttir, H.M., and Anamthawat-Jonsson, K.** (1995). p53 Abnormalities and Genomic Instability in Primary Human Breast Carcinomas. *Cancer Res* *55*, 646–651.
- Fabbri, M., Garzon, R., Cimmino, A., Liu, Z., Zanesi, N., Callegari, E., Liu, S., Alder, H., Costinean, S., Fernandez-Cymering, C., et al.** (2007). MicroRNA-29 family reverts aberrant methylation in lung cancer by targeting DNA methyltransferases 3A and 3B. *PNAS* *104*, 15805–15810.

- Fackenthal**, J.D., and **Olopade**, O.I. (2007). Breast cancer risk associated with BRCA1 and BRCA2 in diverse populations. *Nat. Rev. Cancer* 7, 937–948.
- Fackler**, M.J., McVeigh, M., Evron, E., Garrett, E., Mehrotra, J., Polyak, K., Sukumar, S., and Argani, P. (2003). DNA methylation of RASSF1A, HIN-1, RAR-beta, Cyclin D2 and Twist in in situ and invasive lobular breast carcinoma. *Int. J. Cancer* 107, 970–975.
- Faghihi**, M.A., Modarresi, F., Khalil, A.M., Wood, D.E., Sahagan, B.G., Morgan, T.E., and Finch, C.E. (2008). Expression of a noncoding RNA is elevated in Alzheimer's disease and drives rapid feed-forward regulation of b-secretase. *NATURE MEDICINE* 14, 8.
- Faghihi**, M.A., Zhang, M., Huang, J., Modarresi, F., Van der Brug, M.P., Nalls, M.A., Cookson, M.R., St-Laurent, G., and Wahlestedt, C. (2010). Evidence for natural antisense transcript-mediated inhibition of microRNA function. *Genome Biol* 11, R56.
- Fang**, D., Nguyen, T.K., Leishear, K., Finko, R., Kulp, A.N., Hotz, S., Van Belle, P.A., Xu, X., Elder, D.E., and Herlyn, M. (2005). A tumorigenic subpopulation with stem cell properties in melanomas. *Cancer Res.* 65, 9328–9337.
- Farmer**, P., Bonnefoi, H., Becette, V., Tubiana-Hulin, M., Fumoleau, P., Larsimont, D., Macgrogan, G., Bergh, J., Cameron, D., Goldstein, D., et al. (2005). Identification of molecular apocrine breast tumours by microarray analysis. *Oncogene* 24, 4660–4671.
- Feil**, R., Walter, J., Allen, N.D., and Reik, W. (1994). Developmental control of allelic methylation in the imprinted mouse *Igf2* and *H19* genes. *Development* 120, 2933–2943.
- Feng**, X., Zhang, J., Smuga-Otto, K., Tian, S., Yu, J., Stewart, R., and Thomson, J.A. (2012). Protein kinase C mediated extraembryonic endoderm differentiation of human embryonic stem cells. *Stem Cells* 30, 461–470.
- Ferguson-Smith**, A.C., Cattanach, B.M., Barton, S.C., Beechey, C.V., and Surani, M.A. (1991). Embryological and molecular investigations of parental imprinting on mouse chromosome 7. *Nature* 351, 667–670.
- Feuerhahn**, S., Iglesias, N., Panza, A., Porro, A., and Lingner, J. (2010). TERRA biogenesis, turnover and implications for function. *FEBS Letters* 584, 3812–3818.
- Figueroa-Magalhães**, M.C., Jelovac, D., Connolly, R., and Wolff, A.C. (2014). Treatment of HER2-positive breast cancer. *Breast* 23, 128–136.
- Fillmore**, C.M., and Kuperwasser, C. (2008). Human breast cancer cell lines contain stem-like cells that self-renew, give rise to phenotypically diverse progeny and survive chemotherapy. *Breast Cancer Res.* 10, R25.
- Fiore**, R.D., D'Anneo, A., Tesoriere, G., and Vento, R. (2013). RB1 in cancer: Different mechanisms of RB1 inactivation and alterations of pRb pathway in tumorigenesis. *Journal of Cellular Physiology* 228, 1676–1687.
- Flynt**, A.S., Greimann, J.C., Chung, W.-J., Lima, C.D., and Lai, E.C. (2010). MicroRNA Biogenesis via Splicing and Exosome-Mediated Trimming in *Drosophila*. *Molecular Cell* 38, 900–907.



- Förstemann, K., Horwich, M.D., Wee, L., Tomari, Y., and Zamore, P.D. (2007).** Drosophila microRNAs Are Sorted into Functionally Distinct Argonaute Complexes after Production by Dicer-1. *Cell* *130*, 287–297.
- Foulkes, W.D., and Shuen, A.Y. (2013).** In Brief: BRCA1 and BRCA2. *The Journal of Pathology* *230*, 347–349.
- Fouse, S.D., Shen, Y., Pellegrini, M., Cole, S., Meissner, A., Van Neste, L., Jaenisch, R., and Fan, G. (2008).** Promoter CpG methylation contributes to ES cell gene regulation in parallel with Oct4/Nanog, PcG complex, and histone H3 K4/K27 trimethylation. *Cell Stem Cell* *2*, 160–169.
- Fox, A.H., Lam, Y.W., Leung, A.K.L., Lyon, C.E., Andersen, J., Mann, M., and Lamond, A.I. (2002).** Paraspeckles: A Novel Nuclear Domain. *Current Biology* *12*, 13–25.
- Freeman, J.A., and Espinosa, J.M. (2013).** The impact of post-transcriptional regulation in the p53 network. *Brief Funct Genomics* *12*, 46–57.
- Fuchs, E., and Chen, T. (2013).** A matter of life and death: self-renewal in stem cells. *EMBO Rep.* *14*, 39–48.
- Fujita, N., Watanabe, S., Ichimura, T., Tsuruzoe, S., Shinkai, Y., Tachibana, M., Chiba, T., and Nakao, M. (2003).** Methyl-CpG binding domain 1 (MBD1) interacts with the Suv39h1-HP1 heterochromatic complex for DNA methylation-based transcriptional repression. *J. Biol. Chem.* *278*, 24132–24138.
- Fuks, F. (2003).** [DNA methyltransferases: from chromatin remodeling to cancer]. *Med Sci (Paris)* *19*, 477–480.
- Fuks, F., Burgers, W.A., Brehm, A., Hughes-Davies, L., and Kouzarides, T. (2000).** DNA methyltransferase Dnmt1 associates with histone deacetylase activity. *Nat. Genet.* *24*, 88–91.
- Fuks, F., Burgers, W.A., Godin, N., Kasai, M., and Kouzarides, T. (2001).** Dnmt3a binds deacetylases and is recruited by a sequence-specific repressor to silence transcription. *EMBO J.* *20*, 2536–2544.
- Fuks, F., Hurd, P.J., Wolf, D., Nan, X., Bird, A.P., and Kouzarides, T. (2003).** The methyl-CpG-binding protein MeCP2 links DNA methylation to histone methylation. *J. Biol. Chem.* *278*, 4035–4040.
- Gall, J.G. (1981).** Chromosome structure and the C-value paradox. *J. Cell Biol.* *91*, 3s–14s.
- Gallmeier, E., Hermann, P.C., Mueller, M.-T., Machado, J.G., Ziesch, A., De Toni, E.N., Palagyi, A., Eisen, C., Ellwart, J.W., Rivera, J., et al. (2011).** Inhibition of ataxia telangiectasia- and Rad3-related function abrogates the in vitro and in vivo tumorigenicity of human colon cancer cells through depletion of the CD133(+) tumor-initiating cell fraction. *Stem Cells* *29*, 418–429.
- Ganesan, S., Silver, D.P., Greenberg, R.A., Avni, D., Drapkin, R., Miron, A., Mok, S.C., Randrianarison, V., Brodie, S., Salstrom, J., et al. (2002).** BRCA1 Supports XIST RNA Concentration on the Inactive X Chromosome. *Cell* *111*, 393–405.
- Gao, X., Qiao, Y., Han, D., Zhang, Y., and Ma, N. (2012).** Enemy or partner: relationship between intronic micrnas and their host genes. *IUBMB Life* *64*, 835–840.
- Garcia, A.I., Buisson, M., Bertrand, P., Rimokh, R., Rouleau, E., Lopez, B.S., Lidereau, R., Mikaélian, I., and Mazoyer, S. (2011).** Down-regulation of BRCA1 expression by miR-146a and miR-146b-5p in triple negative sporadic breast cancers. *EMBO Mol Med* *3*, 279–290.

- Garzon**, R., Fabbri, M., Cimmino, A., Calin, G.A., and Croce, C.M. (2006). MicroRNA expression and function in cancer. *Trends in Molecular Medicine* 12, 580–587.
- Garzon**, R., Heaphy, C.E.A., Havelange, V., Fabbri, M., Volinia, S., Tsao, T., Zanesi, N., Kornblau, S.M., Marcucci, G., Calin, G.A., et al. (2009). MicroRNA 29b functions in acute myeloid leukemia. *Blood* 114, 5331–5341.
- Geng**, Y.J., Xie, S.L., Li, Q., Ma, J., and Wang, G.Y. (2011). Large intervening non-coding RNA HOTAIR is associated with hepatocellular carcinoma progression. *J. Int. Med. Res.* 39, 2119–2128.
- Ghildiyal**, M., Xu, J., Seitz, H., Weng, Z., and Zamore, P.D. (2010). Sorting of *Drosophila* small silencing RNAs partitions microRNA\* strands into the RNA interference pathway. *RNA* 16, 43–56.
- Ghisolfi**, L., Keates, A.C., Hu, X., Lee, D., and Li, C.J. (2012). Ionizing radiation induces stemness in cancer cells. *PLoS ONE* 7, e43628.
- Ginestier**, C., Hur, M.H., Charafe-Jauffret, E., Monville, F., Dutcher, J., Brown, M., Jacquemier, J., Viens, P., Kleer, C.G., Liu, S., et al. (2007). ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome. *Cell Stem Cell* 1, 555–567.
- Ginger**, M.R., Gonzalez-Rimbau, M.F., Gay, J.P., and Rosen, J.M. (2001). Persistent changes in gene expression induced by estrogen and progesterone in the rat mammary gland. *Mol. Endocrinol.* 15, 1993–2009.
- Gjorevski**, N., and **Nelson**, C.M. (2011). Integrated morphodynamic signalling of the mammary gland. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12, 581–593.
- Goehe**, R.W., Di, X., Sharma, K., Bristol, M.L., Henderson, S.C., Valerie, K., Rodier, F., Davalos, A.R., and Gewirtz, D.A. (2012). The autophagy-senescence connection in chemotherapy: must tumor cells (self) eat before they sleep? *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 343, 763–778.
- Gofrit**, O.N., Benjamin, S., Halachmi, S., Leibovitch, I., Dotan, Z., Lamm, D.L., Ehrlich, N., Yutkin, V., Ben-Am, M., and Hochberg, A. (2014). DNA based therapy with diphtheria toxin-A BC-819: a phase 2b marker lesion trial in patients with intermediate risk nonmuscle invasive bladder cancer. *J. Urol.* 191, 1697–1702.
- Goldstein**, M., and **Kastan**, M.B. (2015). The DNA damage response: implications for tumor responses to radiation and chemotherapy. *Annu. Rev. Med.* 66, 129–143.
- Gómez-Miragaya**, J., Palafox, M., Paré, L., Yoldi, G., Ferrer, I., Vila, S., Galván, P., Pellegrini, P., Pérez-Montoyo, H., Igea, A., et al. (2017). Resistance to Taxanes in Triple-Negative Breast Cancer Associates with the Dynamics of a CD49<sup>+</sup> Tumor-Initiating Population. *Stem Cell Reports* 8, 1392–1407.
- Gong**, L., Bao, Q., Hu, C., Wang, J., Zhou, Q., Wei, L., Tong, L., Zhang, W., and Shen, Y. (2018). Exosomal miR-675 from metastatic osteosarcoma promotes cell migration and invasion by targeting CALN1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 500, 170–176.
- González-Duarte**, A., Berk, J.L., Quan, D., Mauermann, M.L., Schmidt, H.H., Polydefkis, M., Waddington-Cruz, M., Ueda, M., Conceição, I.M., Kristen, A.V., et al. (2020). Analysis of autonomic outcomes in APOLLO, a phase III trial of the RNAi therapeutic patisiran in patients with hereditary transthyretin-mediated amyloidosis. *J. Neurol.* 267, 703–712.

- Gordon**, F.E., Nutt, C.L., Cheunsuchon, P., Nakayama, Y., Provencher, K.A., Rice, K.A., Zhou, Y., Zhang, X., and Klibanski, A. (2010). Increased expression of angiogenic genes in the brains of mouse meg3-null embryos. *Endocrinology* *151*, 2443–2452.
- Goswami**, S., Sahai, E., Wyckoff, J.B., Cammer, M., Cox, D., Pixley, F.J., Stanley, E.R., Segall, J.E., and Condeelis, J.S. (2005). Macrophages Promote the Invasion of Breast Carcinoma Cells via a Colony-Stimulating Factor-1/Epidermal Growth Factor Paracrine Loop. *Cancer Res* *65*, 5278–5283.
- Grandjean**, V., O'Neill, L., Sado, T., Turner, B., and Ferguson-Smith, A. (2001). Relationship between DNA methylation, histone H4 acetylation and gene expression in the mouse imprinted Igf2-H19 domain. *FEBS Lett.* *488*, 165–169.
- Gregory**, P.A., Bert, A.G., Paterson, E.L., Barry, S.C., Tsykin, A., Farshid, G., Vadas, M.A., Khew-Goodall, Y., and Goodall, G.J. (2008). The miR-200 family and miR-205 regulate epithelial to mesenchymal transition by targeting ZEB1 and SIP1. *Nat. Cell Biol.* *10*, 593–601.
- Gregory**, R.I., Yan, K., Amuthan, G., Chendrimada, T., Doratotaj, B., Cooch, N., and Shiekhattar, R. (2004). The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature* *432*, 235–240.
- Gregory**, R.I., Chendrimada, T.P., Cooch, N., and Shiekhattar, R. (2005). Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing. *Cell* *123*, 631–640.
- Grelet**, S., Link, L.A., Howley, B., Obellianne, C., Palanisamy, V., Gangaraju, V.K., Diehl, J.A., and Howe, P.H. (2017). A regulated PNUTS mRNA to lncRNA splice switch mediates EMT and tumour progression. *Nat Cell Biol* *19*, 1105–1115.
- Grishok**, A., Pasquinelli, A.E., Conte, D., Li, N., Parrish, S., Ha, I., Baillie, D.L., Fire, A., Ruvkun, G., and Mello, C.C. (2001). Genes and Mechanisms Related to RNA Interference Regulate Expression of the Small Temporal RNAs that Control *C. elegans* Developmental Timing. *Cell* *106*, 23–34.
- Grolez**, G.P., Hammadi, M., Barras, A., Gordienko, D., Slomianny, C., Völkel, P., Angrand, P.O., Pinault, M., Guimaraes, C., Potier-Cartereau, M., et al. (2019). Encapsulation of a TRPM8 Agonist, WS12, in Lipid Nanocapsules Potentiates PC3 Prostate Cancer Cell Migration Inhibition through Channel Activation. *Sci Rep* *9*, 7926.
- Grotwinkel**, J.T., Wild, K., Segnitz, B., and Sinning, I. (2014). SRP RNA Remodeling by SRP68 Explains Its Role in Protein Translocation. *Science* *344*, 101–104.
- Gumireddy**, K., Li, A., Yan, J., Setoyama, T., Johannes, G.J., Ørom, U.A., Tchou, J., Liu, Q., Zhang, L., Speicher, D.W., et al. (2013). Identification of a long non-coding RNA-associated RNP complex regulating metastasis at the translational step. *The EMBO Journal* *32*, 2672–2684.
- Guo**, S., Liu, M., and Gonzalez-Perez, R.R. (2011). Role of Notch and its oncogenic signaling crosstalk in breast cancer. *Biochim. Biophys. Acta* *1815*, 197–213.
- Gupta**, R.A., Shah, N., Wang, K.C., Kim, J., Horlings, H.M., Wong, D.J., Tsai, M.-C., Hung, T., Argani, P., Rinn, J.L., et al. (2010). Long non-coding RNA HOTAIR reprograms chromatin state to promote cancer metastasis. *Nature* *464*, 1071–1076.
- Guttman**, M., Amit, I., Garber, M., French, C., Lin, M.F., Feldser, D., Huarte, M., Zuk, O., Carey, B.W., Cassady, J.P., et al. (2009). Chromatin signature reveals over a thousand highly conserved large non-coding RNAs in mammals. *Nature* *458*, 223–227.

- Ha, M., and Kim, V.N.** (2014). Regulation of microRNA biogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* *15*, 509–524.
- Haase, A.D., Jaskiewicz, L., Zhang, H., Lainé, S., Sack, R., Gatignol, A., and Filipowicz, W.** (2005). TRBP, a regulator of cellular PKR and HIV-1 virus expression, interacts with Dicer and functions in RNA silencing. *EMBO Reports* *6*, 961–967.
- Hadjimichael, C., Chanoumidou, K., Papadopoulou, N., Arampatzi, P., Papamatheakis, J., and Kretsovali, A.** (2015). Common stemness regulators of embryonic and cancer stem cells. *World J Stem Cells* *7*, 1150–1184.
- Hagège, H., Klous, P., Braem, C., Splinter, E., Dekker, J., Cathala, G., de Laat, W., and Forné, T.** (2007). Quantitative analysis of chromosome conformation capture assays (3C-qPCR). *Nat Protoc* *2*, 1722–1733.
- Halazonetis, T.D., Gorgoulis, V.G., and Bartek, J.** (2008). An oncogene-induced DNA damage model for cancer development. *Science* *319*, 1352–1355.
- Hamilton, G., and Olszewski, U.** (2013). Chemotherapy-induced Enrichment of Cancer Stem Cells in Lung Cancer. p.
- Hammond, S.M., Boettcher, S., Caudy, A.A., Kobayashi, R., and Hannon, G.J.** (2001). Argonaute2, a link between genetic and biochemical analyses of RNAi. *Science* *293*, 1146–1150.
- Han, J., Lee, Y., Yeom, K.-H., Kim, Y.-K., Jin, H., and Kim, V.N.** (2004). The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes Dev.* *18*, 3016–3027.
- Han, J., Lee, Y., Yeom, K.-H., Nam, J.-W., Heo, I., Rhee, J.-K., Sohn, S.Y., Cho, Y., Zhang, B.-T., and Kim, V.N.** (2006). Molecular basis for the recognition of primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 complex. *Cell* *125*, 887–901.
- Hanahan, D., and Coussens, L.M.** (2012). Accessories to the Crime: Functions of Cells Recruited to the Tumor Microenvironment. *Cancer Cell* *21*, 309–322.
- Hanahan, D., and Weinberg, R.A.** (2000). The Hallmarks of Cancer. *Cell* *100*, 57–70.
- Hanahan, D., and Weinberg, R.A.** (2011). Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* *144*, 646–674.
- Hansen, T.B., Jensen, T.I., Clausen, B.H., Bramsen, J.B., Finsen, B., Damgaard, C.K., and Kjems, J.** (2013). Natural RNA circles function as efficient microRNA sponges. *Nature* *495*, 384–388.
- Hansji, H., Leung, E.Y., Baguley, B.C., Finlay, G.J., and Askarian-Amiri, M.E.** (2014). Keeping abreast with long non-coding RNAs in mammary gland development and breast cancer. *Front. Genet.* *5*.
- Hao, Y., Crenshaw, T., Moulton, T., Newcomb, E., and Tycko, B.** (1993). Tumour-suppressor activity of H19 RNA. *Nature* *365*, 764–767.
- Hark, A.T., and Tilghman, S.M.** (1998). Chromatin conformation of the H19 epigenetic mark. *Hum. Mol. Genet.* *7*, 1979–1985.
- Hark, A.T., Schoenherr, C.J., Katz, D.J., Ingram, R.S., Levorse, J.M., and Tilghman, S.M.** (2000). CTCF mediates methylation-sensitive enhancer-blocking activity at the H19/Igf2 locus. *Nature* *405*, 486–489.

- Harper, J.W., and Elledge, S.J.** (2007). The DNA Damage Response: Ten Years After. *Molecular Cell* *28*, 739–745.
- Harrison, P.M., Zheng, D., Zhang, Z., Carriero, N., and Gerstein, M.** (2005). Transcribed processed pseudogenes in the human genome: an intermediate form of expressed retrosequence lacking protein-coding ability. *Nucleic Acids Res.* *33*, 2374–2383.
- Hatsell, S.J., and Cowin, P.** (2006). Gli3-mediated repression of Hedgehog targets is required for normal mammary development. *Development* *133*, 3661–3670.
- He, D., Wang, J., Zhang, C., Shan, B., Deng, X., Li, B., Zhou, Y., Chen, W., Hong, J., Gao, Y., et al.** (2015). Down-regulation of miR-675-5p contributes to tumor progression and development by targeting pro-tumorigenic GPR55 in non-small cell lung cancer. *Mol. Cancer* *14*, 73.
- He, J., Shi, L.Z., Truong, L.N., Lu, C.-S., Razavian, N., Li, Y., Negrete, A., Shiloach, J., Berns, M.W., and Wu, X.** (2012). Rad50 zinc hook is important for the Mre11 complex to bind chromosomal DNA double-stranded breaks and initiate various DNA damage responses. *J. Biol. Chem.* *287*, 31747–31756.
- He, P., Qiu, K., and Jia, Y.** (2018). Modeling of mesenchymal hybrid epithelial state and phenotypic transitions in EMT and MET processes of cancer cells. *Sci Rep* *8*, 14323.
- Heintzman, N.D., Stuart, R.K., Hon, G., Fu, Y., Ching, C.W., Hawkins, R.D., Barrera, L.O., Van Calcar, S., Qu, C., Ching, K.A., et al.** (2007). Distinct and predictive chromatin signatures of transcriptional promoters and enhancers in the human genome. *Nat Genet* *39*, 311–318.
- Heintzman, N.D., Hon, G.C., Hawkins, R.D., Kheradpour, P., Stark, A., Harp, L.F., Ye, Z., Lee, L.K., Stuart, R.K., Ching, C.W., et al.** (2009). Histone modifications at human enhancers reflect global cell-type-specific gene expression. *Nature* *459*, 108–112.
- Hemberger, M., Redies, C., Krause, R., Oswald, J., Walter, J., and Fundele, R.H.** (1998). H19 and Igf2 are expressed and differentially imprinted in neuroectoderm-derived cells in the mouse brain. *Dev. Genes Evol.* *208*, 393–402.
- Heo, J.B., and Sung, S.** (2011). Vernalization-mediated epigenetic silencing by a long intronic noncoding RNA. *Science* *331*, 76–79.
- Hermann, P.C., Huber, S.L., Herrler, T., Aicher, A., Ellwart, J.W., Guba, M., Bruns, C.J., and Heeschen, C.** (2007). Distinct populations of cancer stem cells determine tumor growth and metastatic activity in human pancreatic cancer. *Cell Stem Cell* *1*, 313–323.
- Hernandez, J.M., Elahi, A., Clark, C.W., Wang, J., Humphries, L.A., Centeno, B., Bloom, G., Fuchs, B.C., Yeatman, T., and Shibata, D.** (2013). miR-675 Mediates Downregulation of Twist1 and Rb in AFP-Secreting Hepatocellular Carcinoma. *Annals of Surgical Oncology* *20*, 625–635.
- Hibi, K., Nakamura, H., Hirai, A., Fujikake, Y., Kasai, Y., Akiyama, S., Ito, K., and Takagi, H.** (1996). Loss of H19 Imprinting in Esophageal Cancer. *Cancer Res* *56*, 480–482.
- Hickson, I., Zhao, Y., Richardson, C.J., Green, S.J., Martin, N.M.B., Orr, A.I., Reaper, P.M., Jackson, S.P., Curtin, N.J., and Smith, G.C.M.** (2004). Identification and Characterization of a Novel and Specific Inhibitor of the Ataxia-Telangiectasia Mutated Kinase ATM. *Cancer Res* *64*, 9152–9159.
- Holland, J.D., Klaus, A., Garratt, A.N., and Birchmeier, W.** (2013). Wnt signaling in stem and cancer stem cells. *Curr. Opin. Cell Biol.* *25*, 254–264.

- den Hollander**, P., Savage, M.I., and Brown, P.H. (2013). Targeted therapy for breast cancer prevention. *Front Oncol* 3, 250.
- Holm**, K., Hegardt, C., Staaf, J., Vallon-Christersson, J., Jönsson, G., Olsson, H., Borg, Å., and Ringnér, M. (2010). Molecular subtypes of breast cancer are associated with characteristic DNA methylation patterns. *Breast Cancer Res* 12, R36.
- Holmes**, D.S., Mayfield, J.E., Sander, G., and Bonner, J. (1972). Chromosomal RNA: Its Properties. *Science* 177, 72–74.
- Hori**, K., Sen, A., and Artavanis-Tsakonas, S. (2013). Notch signaling at a glance. *J Cell Sci* 126, 2135–2140.
- Hu**, B., Weng, Y., Xia, X.-H., Liang, X.-J., and Huang, Y. (2019). Clinical advances of siRNA therapeutics. *J Gene Med* 21, e3097.
- Hu**, X., Ghisolfi, L., Keates, A.C., Zhang, J., Xiang, S., Lee, D., and Li, C.J. (2012). Induction of cancer cell stemness by chemotherapy. *Cell Cycle* 11, 2691–2698.
- Hu**, Z., Fan, C., Oh, D.S., Marron, J.S., He, X., Qaqish, B.F., Livasy, C., Carey, L.A., Reynolds, E., Dressler, L., et al. (2006). The molecular portraits of breast tumors are conserved across microarray platforms. *BMC Genomics* 7, 96.
- Huang**, J., Zhou, N., Watabe, K., Lu, Z., Wu, F., Xu, M., and Mo, Y.-Y. (2014). Long non-coding RNA UCA1 promotes breast tumor growth by suppression of p27 (Kip1). *Cell Death Dis* 5, e1008.
- Huang**, L.C., Clarkin, K.C., and Wahl, G.M. (1996). Sensitivity and selectivity of the DNA damage sensor responsible for activating p53-dependent G1 arrest. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 4827–4832.
- Hui**, L., Zheng, Y., Yan, Y., Bargonetti, J., and Foster, D.A. (2006). Mutant p53 in MDA-MB-231 breast cancer cells is stabilized by elevated phospholipase D activity and contributes to survival signals generated by phospholipase D. *Oncogene* 25, 7305–7310.
- Humphreys**, D.T., Westman, B.J., Martin, D.I.K., and Preiss, T. (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, 16961–16966.
- Hur**, W., and Yoon, S.K. (2017). Molecular Pathogenesis of Radiation-Induced Cell Toxicity in Stem Cells. *International Journal of Molecular Sciences* 18, 2749.
- Hutvagner**, G., and Zamore, P.D. (2002). A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. *Science* 297, 2056–2060.
- Hutvagner**, G., McLachlan, J., Pasquinelli, A.E., Bálint, E., Tuschl, T., and Zamore, P.D. (2001). A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. *Science* 293, 834–838.
- Ideraabduallah**, F.Y., Vigneau, S., and Bartolomei, M.S. (2008). Genomic imprinting mechanisms in mammals. *Mutat. Res.* 647, 77–85.
- Iliopoulos**, D., Hirsch, H.A., Wang, G., and Struhl, K. (2011). Inducible formation of breast cancer stem cells and their dynamic equilibrium with non-stem cancer cells via IL6 secretion. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 1397–1402.

**Imig, J.,** Brunschweiler, A., Brümmer, A., Guennewig, B., Mittal, N., Kishore, S., Tsikrika, P., Gerber, A.P., Zavolan, M., and Hall, J. (2015). miR-CLIP capture of a miRNA targetome uncovers a lincRNA H19-miR-106a interaction. *Nat. Chem. Biol.* *11*, 107–114.

**International Human Genome Sequencing Consortium** (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* *409*, 860–921.

**International Human Genome Sequencing Consortium** (2004). Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature* *431*, 931–945.

**Iorio, M.V.,** Ferracin, M., Liu, C.-G., Veronese, A., Spizzo, R., Sabbioni, S., Magri, E., Pedriali, M., Fabbri, M., Campiglio, M., et al. (2005). MicroRNA Gene Expression Deregulation in Human Breast Cancer. *Cancer Res* *65*, 7065–7070.

**Ishiguro, T.,** Ohata, H., Sato, A., Yamawaki, K., Enomoto, T., and Okamoto, K. (2017). Tumor-derived spheroids: Relevance to cancer stem cells and clinical applications. *Cancer Sci.* *108*, 283–289.

**Ishihara, K.,** and **Sasaki, H.** (2002). An evolutionarily conserved putative insulator element near the 3' boundary of the imprinted Igf2/H19 domain. *Hum. Mol. Genet.* *11*, 1627–1636.

**Ishizawa, K.,** Rasheed, Z.A., Karisch, R., Wang, Q., Kowalski, J., Susky, E., Pereira, K., Karamboulas, C., Moghal, N., Rajeshkumar, N.V., et al. (2010). Tumor-initiating cells are rare in many human tumors. *Cell Stem Cell* *7*, 279–282.

**Iso, T.,** Kedes, L., and Hamamori, Y. (2003). HES and HERP families: Multiple effectors of the notch signaling pathway. *Journal of Cellular Physiology* *194*, 237–255.

**Iyengar, P.,** Espina, V., Williams, T.W., Lin, Y., Berry, D., Jelicks, L.A., Lee, H., Temple, K., Graves, R., Pollard, J., et al. (2005). Adipocyte-derived collagen VI affects early mammary tumor progression in vivo, demonstrating a critical interaction in the tumor/stroma microenvironment. *J. Clin. Invest.* *115*, 1163–1176.

**Jackson, S.P.,** and **Bartek, J.** (2009). The DNA-damage response in human biology and disease. *Nature* *461*, 1071–1078.

**Jarroux, J.,** Morillon, A., and Pinskaya, M. (2017). History, Discovery, and Classification of lncRNAs. *Adv. Exp. Med. Biol.* *1008*, 1–46.

**Jeggo, P.A.,** Pearl, L.H., and Carr, A.M. (2016). DNA repair, genome stability and cancer: a historical perspective. *Nat Rev Cancer* *16*, 35–42.

**Jella, K.K.,** Rani, S., O'Driscoll, L., McClean, B., Byrne, H.J., and Lyng, F.M. (2014). Exosomes Are Involved in Mediating Radiation Induced Bystander Signaling in Human Keratinocyte Cells. *Rare* *181*, 138–145.

**Jelonek, K.,** Widlak, P., and Pietrowska, M. (2016). The Influence of Ionizing Radiation on Exosome Composition, Secretion and Intercellular Communication. *Protein Pept. Lett.* *23*, 656–663.

**Jeon, Y.,** and **Lee, J.T.** (2011). YY1 Tethers Xist RNA to the Inactive X Nucleation Center. *Cell* *146*, 119–133.

**Ji, P.,** Diederichs, S., Wang, W., Böing, S., Metzger, R., Schneider, P.M., Tidow, N., Brandt, B., Buerger, H., Bulk, E., et al. (2003). MALAT-1, a novel noncoding RNA, and thymosin  $\beta$ 4 predict metastasis and survival in early-stage non-small cell lung cancer. *Oncogene* *22*, 8031–8041.

- Jiang, C., Fang, X., Jiang, Y., Shen, F., Hu, Z., Li, X., and Huang, X. (2016).** TNF- $\alpha$  induces vascular endothelial cells apoptosis through overexpressing pregnancy induced noncoding RNA in Kawasaki disease model. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* *72*, 118–124.
- Jiang, M., Huang, O., Xie, Z., Wu, S., Zhang, X., Shen, A., Liu, H., Chen, X., Wu, J., Lou, Y., et al. (2014).** A novel long non-coding RNA-ARA: Adriamycin Resistance Associated. *Biochemical Pharmacology* *87*, 254–283.
- Jin, V.X., O’Geen, H., Iyengar, S., Green, R., and Farnham, P.J. (2007).** Identification of an OCT4 and SRY regulatory module using integrated computational and experimental genomics approaches. *Genome Res.* *17*, 807–817.
- Jolly, M.K., Boareto, M., Huang, B., Jia, D., Lu, M., Ben-Jacob, E., Onuchic, J.N., and Levine, H. (2015).** Implications of the Hybrid Epithelial/Mesenchymal Phenotype in Metastasis. *Front Oncol* *5*, 155.
- Joubel, A., Curgy, J.J., Pelczar, H., Begue, A., Lagrou, C., Stehelin, D., and Coll, J. (1996).** The 5’ part of the human H19 RNA contains cis-acting elements hampering its translatability. *Cell. Mol. Biol. (Noisy-Le-Grand)* *42*, 1159–1172.
- Jouvenot, Y., Poirier, F., Jami, J., and Paldi, A. (1999).** Biallelic transcription of Igf2 and H19 in individual cells suggests a post-transcriptional contribution to genomic imprinting. *Curr. Biol.* *9*, 1199–1202.
- Jovanovic, J., Rønneberg, J.A., Tost, J., and Kristensen, V. (2010).** The epigenetics of breast cancer. *Mol Oncol* *4*, 242–254.
- Juan, V., Crain, C., and Wilson, C. (2000).** Evidence for evolutionarily conserved secondary structure in the H19 tumor suppressor RNA. *Nucleic Acids Res.* *28*, 1221–1227.
- Kallen, A.N., Zhou, X.-B., Xu, J., Qiao, C., Ma, J., Yan, L., Lu, L., Liu, C., Yi, J.-S., Zhang, H., et al. (2013).** The Imprinted H19 lncRNA Antagonizes Let-7 MicroRNAs. *Mol Cell* *52*.
- Kalluri, R., and Zeisberg, M. (2006).** Fibroblasts in cancer. *Nat Rev Cancer* *6*, 392–401.
- Kanduri, C., Thakur, N., and Pandey, R.R. (2006).** The length of the transcript encoded from the Kcnq1ot1 antisense promoter determines the degree of silencing. *EMBO J.* *25*, 2096–2106.
- Kanellopoulou, C., Muljo, S.A., Kung, A.L., Ganesan, S., Drapkin, R., Jenuwein, T., Livingston, D.M., and Rajewsky, K. (2005).** Dicer-deficient mouse embryonic stem cells are defective in differentiation and centromeric silencing. *Genes Dev.* *19*, 489–501.
- Kanhere, A., and Jenner, R.G. (2012).** Noncoding RNA localisation mechanisms in chromatin regulation. *Silence* *3*, 2.
- Kapranov, P., Cheng, J., Dike, S., Nix, D.A., Duttgupta, R., Willingham, A.T., Stadler, P.F., Hertel, J., Hackermüller, J., Hofacker, I.L., et al. (2007).** RNA Maps Reveal New RNA Classes and a Possible Function for Pervasive Transcription. *Science* *316*, 1484–1488.
- Karsli-Ceppioglu, S., Dagdemir, A., Judes, G., Ngollo, M., Penault-Llorca, F., Pajon, A., Bignon, Y.-J., and Bernard-Gallon, D. (2014).** Epigenetic mechanisms of breast cancer: an update of the current knowledge. *Epigenomics* *6*, 651–664.
- Kasinski, A.L., and Slack, F.J. (2011).** Epigenetics and genetics. MicroRNAs en route to the clinic: progress in validating and targeting microRNAs for cancer therapy. *Nat. Rev. Cancer* *11*, 849–864.



- Kedde**, M., Strasser, M.J., Boldajipour, B., Vrieling, J.A.F.O., Slanchev, K., le Sage, C., Nagel, R., Voorhoeve, P.M., van Duijse, J., Ørom, U.A., et al. (2007). RNA-Binding Protein Dnd1 Inhibits MicroRNA Access to Target mRNA. *Cell* *131*, 1273–1286.
- Keniry**, A., Oxley, D., Monnier, P., Kyba, M., Dandolo, L., Smits, G., and Reik, W. (2012). The H19 lincRNA is a developmental reservoir of miR-675 that suppresses growth and Igf1r. *Nature Cell Biology* *14*, 659–665.
- Ketting**, R.F., Fischer, S.E., Bernstein, E., Sijen, T., Hannon, G.J., and Plasterk, R.H. (2001). Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in *C. elegans*. *Genes Dev.* *15*, 2654–2659.
- Khalil**, A.M., Guttman, M., Huarte, M., Garber, M., Raj, A., Rivea Morales, D., Thomas, K., Presser, A., Bernstein, B.E., van Oudenaarden, A., et al. (2009). Many human large intergenic noncoding RNAs associate with chromatin-modifying complexes and affect gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *106*, 11667–11672.
- Khoo**, K.H., Verma, C.S., and Lane, D.P. (2014). Drugging the p53 pathway: understanding the route to clinical efficacy. *Nature Reviews Drug Discovery* *13*, 217–236.
- Khvorova**, A., Reynolds, A., and Jayasena, S.D. (2003). Functional siRNAs and miRNAs Exhibit Strand Bias. *Cell* *115*, 209–216.
- Kim**, Y.-K., and **Kim**, V.N. (2007). Processing of intronic microRNAs. *The EMBO Journal* *26*, 775–783.
- Kim**, H.H., Kuwano, Y., Srikantan, S., Lee, E.K., Martindale, J.L., and Gorospe, M. (2009). HuR recruits let-7/RISC to repress c-Myc expression. *Genes Dev.* *23*, 1743–1748.
- Kim**, J., Chu, J., Shen, X., Wang, J., and Orkin, S.H. (2008). An extended transcriptional network for pluripotency of embryonic stem cells. *Cell* *132*, 1049–1061.
- Kim**, K., Nguyen, T.D., Li, S., and Nguyen, T.A. (2018). SRSF3 recruits DROSHA to the basal junction of primary microRNAs. *RNA* *24*, 892–898.
- Kim**, M.O., Kim, S.-H., Cho, Y.-Y., Nadas, J., Jeong, C.-H., Yao, K., Kim, D.J., Yu, D.-H., Keum, Y.-S., Lee, K.-Y., et al. (2012). ERK1 and ERK2 regulate embryonic stem cell self-renewal through phosphorylation of Klf4. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *19*, 283–290.
- Kim**, T.-K., Hemberg, M., Gray, J.M., Costa, A.M., Bear, D.M., Wu, J., Harmin, D.A., Laptewicz, M., Barbara-Haley, K., Kuersten, S., et al. (2010). Widespread transcription at neuronal activity-regulated enhancers. *Nature* *465*, 182–187.
- Kino**, T., Hurt, D.E., Ichijo, T., Nader, N., and Chrousos, G.P. (2010). Noncoding RNA gas5 is a growth arrest- and starvation-associated repressor of the glucocorticoid receptor. *Sci Signal* *3*, ra8.
- Knight**, S.W., and **Bass**, B.L. (2001). A Role for the RNase III Enzyme DCR-1 in RNA Interference and Germ Line Development in *Caenorhabditis elegans*. *Science* *293*, 2269–2271.
- Knudson**, A.G. (1993). Antioncogenes and human cancer. *Proc Natl Acad Sci U S A* *90*, 10914–10921.
- Knudson**, A.G. (2001). Two genetic hits (more or less) to cancer. *Nat Rev Cancer* *1*, 157–162.

- Kogo, R., Shimamura, T., Mimori, K., Kawahara, K., Imoto, S., Sudo, T., Tanaka, F., Shibata, K., Suzuki, A., Komune, S., et al. (2011).** Long noncoding RNA HOTAIR regulates polycomb-dependent chromatin modification and is associated with poor prognosis in colorectal cancers. *Cancer Res.* *71*, 6320–6326.
- Kondo, M., Suzuki, H., Ueda, R., Osada, H., Takagi, K., Takahashi, T., and Takahashi, T. (1995).** Frequent loss of imprinting of the H19 gene is often associated with its overexpression in human lung cancers. *Oncogene* *10*, 1193–1198.
- Kopf, E., Bibi, O., Ayesb, S., Tykocinski, M., Vitner, K., Looijenga, L.H.J., Groot, N. de, and Hochberg, A. (1998).** The effect of retinoic acid on the activation of the human H19 promoter by a 3' downstream region. *FEBS Letters* *432*, 123–127.
- Kornberg, R.D. (1974).** Chromatin Structure: A Repeating Unit of Histones and DNA. *Science* *184*, 868–871.
- Kouzarides, T. (2007).** Chromatin Modifications and Their Function. *Cell* *128*, 693–705.
- Kozomara, A., Birgaoanu, M., and Griffiths-Jones, S. (2019).** miRBase: from microRNA sequences to function. *Nucleic Acids Res.* *47*, D155–D162.
- Krause, M., Yaromina, A., Eicheler, W., Koch, U., and Baumann, M. (2011).** Cancer stem cells: targets and potential biomarkers for radiotherapy. *Clin. Cancer Res.* *17*, 7224–7229.
- Kreso, A., and Dick, J.E. (2014).** Evolution of the cancer stem cell model. *Cell Stem Cell* *14*, 275–291.
- Lacey, J.V., Kreimer, A.R., Buys, S.S., Marcus, P.M., Chang, S.-C., Leitzmann, M.F., Hoover, R.N., Prorok, P.C., Berg, C.D., Hartge, P., et al. (2009).** Breast cancer epidemiology according to recognized breast cancer risk factors in the Prostate, Lung, Colorectal and Ovarian (PLCO) Cancer Screening Trial Cohort. *BMC Cancer* *9*, 84.
- Lacroix, M., Toillon, R.-A., and Leclercq, G. (2006).** p53 and breast cancer, an update. *Endocrine-Related Cancer* *13*, 293–325.
- Lagadec, C., Vlashi, E., Donna, L.D., Dekmezian, C., and Pajonk, F. (2012).** Radiation-induced reprogramming of breast cancer cells. *Stem Cells* *30*, 833–844.
- Lagadec, C., Vlashi, E., Bhuta, S., Lai, C., Mischel, P., Werner, M., Henke, M., and Pajonk, F. (2014).** Tumor cells with low proteasome subunit expression predict overall survival in head and neck cancer patients. *BMC Cancer* *14*, 152.
- Lamouille, S., Xu, J., and Derynck, R. (2014).** Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *15*, 178–196.
- Lanz, R.B., McKenna, N.J., Onate, S.A., Albrecht, U., Wong, J., Tsai, S.Y., Tsai, M.-J., and O'Malley, B.W. (1999).** A Steroid Receptor Coactivator, SRA, Functions as an RNA and Is Present in an SRC-1 Complex. *Cell* *97*, 17–27.
- Lanz, R.B., Chua, S.S., Barron, N., Söder, B.M., DeMayo, F., and O'Malley, B.W. (2003).** Steroid Receptor RNA Activator Stimulates Proliferation as Well as Apoptosis In Vivo. *Molecular and Cellular Biology* *23*, 7163–7176.
- Lavie, O., Edelman, D., Levy, T., Fishman, A., Hubert, A., Segev, Y., Raveh, E., Gilon, M., and Hochberg, A. (2017).** A phase 1/2a, dose-escalation, safety, pharmacokinetic, and preliminary efficacy study of

intraperitoneal administration of BC-819 (H19-DTA) in subjects with recurrent ovarian/peritoneal cancer. *Arch. Gynecol. Obstet.* 295, 751–761.

**Lecerf, C., Le Bourhis, X., and Adriaenssens, E. (2019).** The long non-coding RNA H19: an active player with multiple facets to sustain the hallmarks of cancer. *Cell. Mol. Life Sci.* 76, 4673–4687.

**Lee, J.T. (2012).** Epigenetic Regulation by Long Noncoding RNAs. 338, 6.

**Lee, E.Y.H.P., and Muller, W.J. (2010).** Oncogenes and Tumor Suppressor Genes. Cold Spring Harb Perspect Biol 2.

**Lee, J., Davidow, L.S., and Warshawsky, D. (1999).** Tsix, a gene antisense to Xist at the X-inactivation centre. *Nat Genet* 21, 400–404.

**Lee, R.C., Feinbaum, R.L., and Ambros, V. (1993).** The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 75, 843–854.

**Lee, Y., Hur, I., Park, S.-Y., Kim, Y.-K., Suh, M.R., and Kim, V.N. (2006).** The role of PACT in the RNA silencing pathway. *EMBO J.* 25, 522–532.

**Lee, Y.S., Nakahara, K., Pham, J.W., Kim, K., He, Z., Sontheimer, E.J., and Carthew, R.W. (2004).** Distinct roles for *Drosophila* Dicer-1 and Dicer-2 in the siRNA/miRNA silencing pathways. *Cell* 117, 69–81.

**Lehmann, B.D., Bauer, J.A., Chen, X., Sanders, M.E., Chakravarthy, A.B., Shyr, Y., and Pietenpol, J.A. (2011).** Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *J. Clin. Invest.* 121, 2750–2767.

**Leibovitch, M.P., Solhonne, B., Guillier, M., Verrelle, P., Leibovitch, S.A., and Verelle P [corrected to Verrelle, P. (1995).** Direct relationship between the expression of tumor suppressor H19 mRNA and *c-mos* proto-oncogene during myogenesis. *Oncogene* 10, 251–260.

**Leighton, P.A., Ingram, R.S., Eggenschwiler, J., Efstratiadis, A., and Tilghman, S.M. (1995).** Disruption of imprinting caused by deletion of the H19 gene region in mice. *Nature* 375, 34–39.

**Lengauer, C., Kinzler, K.W., and Vogelstein, B. (1998).** Genetic instabilities in human cancers. *Nature* 396, 643–649.

**Lenos, K.J., and Vermeulen, L. (2016).** Cancer stem cells don't waste their time cleaning-low proteasome activity, a marker for cancer stem cell function. *Ann Transl Med* 4, 519.

**Leonhardt, H., Page, A.W., Weier, H.U., and Bestor, T.H. (1992).** A targeting sequence directs DNA methyltransferase to sites of DNA replication in mammalian nuclei. *Cell* 71, 865–873.

**Lerebours, F., and Lidereau, R. (2002).** Molecular alterations in sporadic breast cancer. *Critical Reviews in Oncology/Hematology* 44, 121–141.

**Leuschner, P.J.F., Ameres, S.L., Kueng, S., and Martinez, J. (2006).** Cleavage of the siRNA passenger strand during RISC assembly in human cells. *EMBO Reports* 7, 314–320.

**Lewis, C.E., and Pollard, J.W. (2006).** Distinct Role of Macrophages in Different Tumor Microenvironments. *Cancer Res* 66, 605–612.

- Li, E., Bestor, T.H., and Jaenisch, R. (1992).** Targeted mutation of the DNA methyltransferase gene results in embryonic lethality. *Cell* 69, 915–926.
- Li, H., Yu, B., Li, J., Su, L., Yan, M., Zhu, Z., and Liu, B. (2014).** Overexpression of lncRNA H19 enhances carcinogenesis and metastasis of gastric cancer. *Oncotarget* 5, 2318–2329.
- Li, H., Li, J., Jia, S., Wu, M., An, J., Zheng, Q., Zhang, W., and Lu, D. (2015a).** miR675 upregulates long noncoding RNA H19 through activating EGR1 in human liver cancer. *Oncotarget* 6, 31958–31984.
- Li, J., Wang, G., Wang, C., Zhao, Y., Zhang, H., Tan, Z., Song, Z., Ding, M., and Deng, H. (2007).** MEK/ERK signaling contributes to the maintenance of human embryonic stem cell self-renewal. *Differentiation* 75, 299–307.
- Li, M., Chen, H., Zhao, Y., Gao, S., and Cheng, C. (2016a).** H19 Functions as a ceRNA in Promoting Metastasis Through Decreasing miR-200s Activity in Osteosarcoma. *DNA Cell Biol.* 35, 235–240.
- Li, S., Yu, Z., Chen, S.-S., Li, F., Lei, C.-Y., Chen, X.-X., Bao, J.-M., Luo, Y., Lin, G.-Z., Pang, S.-Y., et al. (2015b).** The YAP1 oncogene contributes to bladder cancer cell proliferation and migration by regulating the H19 long noncoding RNA. *Urol. Oncol.* 33, 427.e1-10.
- Li, T., Hu, J.-F., Qiu, X., Ling, J., Chen, H., Wang, S., Hou, A., Vu, T.H., and Hoffman, A.R. (2008a).** CTCF regulates allelic expression of Igf2 by orchestrating a promoter-polycomb repressive complex 2 intrachromosomal loop. *Mol. Cell. Biol.* 28, 6473–6482.
- Li, W., Notani, D., Ma, Q., Tanasa, B., Nunez, E., Chen, A.Y., Merkurjev, D., Zhang, J., Ohgi, K., Song, X., et al. (2013).** Functional roles of enhancer RNAs for oestrogen-dependent transcriptional activation. *Nature* 498, 516–520.
- Li, X., Lewis, M.T., Huang, J., Gutierrez, C., Osborne, C.K., Wu, M.-F., Hilsenbeck, S.G., Pavlick, A., Zhang, X., Chamness, G.C., et al. (2008b).** Intrinsic Resistance of Tumorigenic Breast Cancer Cells to Chemotherapy. *JNCI Journal of the National Cancer Institute* 100, 672–679.
- Li, X., Lin, Y., Yang, X., Wu, X., and He, X. (2016b).** Long noncoding RNA H19 regulates EZH2 expression by interacting with miR-630 and promotes cell invasion in nasopharyngeal carcinoma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 473, 913–919.
- Li, Y.M., Franklin, G., Cui, H.M., Svensson, K., He, X.B., Adam, G., Ohlsson, R., and Pfeifer, S. (1998).** The H19 transcript is associated with polysomes and may regulate IGF2 expression in trans. *J. Biol. Chem.* 273, 28247–28252.
- Liang, W.-C., Fu, W.-M., Wong, C.-W., Wang, Y., Wang, W.-M., Hu, G.-X., Zhang, L., Xiao, L.-J., Wan, D.C.-C., Zhang, J.-F., et al. (2015).** The lncRNA H19 promotes epithelial to mesenchymal transition by functioning as miRNA sponges in colorectal cancer. *Oncotarget* 6, 22513–22525.
- Liang, W.-Q., Zeng, D., Chen, C.-F., Sun, S.-M., Lu, X.-F., Peng, C.-Y., and Lin, H.-Y. (2019).** Long noncoding RNA H19 is a critical oncogenic driver and contributes to epithelial-mesenchymal transition in papillary thyroid carcinoma. *Cancer Manag Res* 11, 2059–2072.
- Liao, B., Hu, Y., Herrick, D.J., and Brewer, G. (2005).** The RNA-binding protein IMP-3 is a translational activator of insulin-like growth factor II leader-3 mRNA during proliferation of human K562 leukemia cells. *J. Biol. Chem.* 280, 18517–18524.

- Liao, S., Yu, C., Liu, H., Zhang, C., Li, Y., and Zhong, X. (2019).** Long non-coding RNA H19 promotes the proliferation and invasion of lung cancer cells and regulates the expression of E-cadherin, N-cadherin, and vimentin. *Onco Targets Ther* 12, 4099–4107.
- Lim, S., Janzer, A., Becker, A., Zimmer, A., Schüle, R., Buettner, R., and Kirfel, J. (2010).** Lysine-specific demethylase 1 (LSD1) is highly expressed in ER-negative breast cancers and a biomarker predicting aggressive biology. *Carcinogenesis* 31, 512–520.
- Lin, R., Roychowdhury-Saha, M., Black, C., Watt, A.T., Marcusson, E.G., Freier, S.M., and Edgington, T.S. (2011).** Control of RNA processing by a large non-coding RNA over-expressed in carcinomas. *FEBS Letters* 585, 671–676.
- Liu, C., Chen, Z., Fang, J., Xu, A., Zhang, W., and Wang, Z. (2016a).** H19-derived miR-675 contributes to bladder cancer cell proliferation by regulating p53 activation. *Tumor Biology* 37, 263–270.
- Liu, F., Pan, H., Xia, G., Qiu, C., and Zhu, Z. (2016b).** Prognostic and clinicopathological significance of long noncoding RNA H19 overexpression in human solid tumors: evidence from a meta-analysis. *Oncotarget* 7, 83177–83186.
- Liu, F., Gu, L.-N., Shan, B.-E., Geng, C.-Z., and Sang, M.-X. (2016c).** Biomarkers for EMT and MET in breast cancer: An update. *Oncol Lett* 12, 4869–4876.
- Liu, G., Yuan, X., Zeng, Z., Tunici, P., Ng, H., Abdulkadir, I.R., Lu, L., Irvin, D., Black, K.L., and Yu, J.S. (2006).** Analysis of gene expression and chemoresistance of CD133+ cancer stem cells in glioblastoma. *Mol. Cancer* 5, 67.
- Liu, G., Xiang, T., Wu, Q.-F., and Wang, W.-X. (2016d).** Long Noncoding RNA H19-Derived miR-675 Enhances Proliferation and Invasion via RUNX1 in Gastric Cancer Cells. *Oncology Research Featuring Preclinical and Clinical Cancer Therapeutics* 23, 99–107.
- Liu, J., Kahri, A.I., Heikkilä, P., Ilvesmäki, V., and Voutilainen, R. (1995).** H19 and insulin-like growth factor-II gene expression in adrenal tumors and cultured adrenal cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 80, 492–496.
- Liu, J., Carmell, M.A., Rivas, F.V., Marsden, C.G., Thomson, J.M., Song, J.-J., Hammond, S.M., Joshua-Tor, L., and Hannon, G.J. (2004).** Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science* 305, 1437–1441.
- Liu, K., Lin, B., Zhao, M., Yang, X., Chen, M., Gao, A., Liu, F., Que, J., and Lan, X. (2013).** The multiple roles for Sox2 in stem cell maintenance and tumorigenesis. *Cell. Signal.* 25, 1264–1271.
- Liu, L., Liu, L., and Lu, S. (2019).** lncRNA H19 promotes viability and epithelial-mesenchymal transition of lung adenocarcinoma cells by targeting miR-29b-3p and modifying STAT3. *Int. J. Oncol.* 54, 929–941.
- Liu, X., Li, D., Zhang, W., Guo, M., and Zhan, Q. (2012).** Long non-coding RNA gadd7 interacts with TDP-43 and regulates Cdk6 mRNA decay. *The EMBO Journal* 31, 4415–4427.
- Liu, Y., Oakeley, E.J., Sun, L., and Jost, J.P. (1998).** Multiple domains are involved in the targeting of the mouse DNA methyltransferase to the DNA replication foci. *Nucleic Acids Res.* 26, 1038–1045.
- Liu, Y., Ye, X., Jiang, F., Liang, C., Chen, D., Peng, J., Kinch, L.N., Grishin, N.V., and Liu, Q. (2009).** C3PO, an endoribonuclease that promotes RNAi by facilitating RISC activation. *Science* 325, 750–753.

- Lo, P.-K., and Sukumar, S.** (2008). Epigenomics and breast cancer. *Pharmacogenomics* 9, 1879–1902.
- Loewer, S., Cabili, M.N., Guttman, M., Loh, Y.-H., Thomas, K., Park, I.H., Garber, M., Curran, M., Onder, T., Agarwal, S., et al.** (2010). Large intergenic non-coding RNA-RoR modulates reprogramming of human induced pluripotent stem cells. *Nat Genet* 42, 1113–1117.
- Loginov, V.I., Pronina, I.V., Burdennyi, A.M., Pereyaslova, E.A., Braga, E.A., Kazubskaya, T.P., and Kushlinskii, N.E.** (2017). Role of Methylation in the Regulation of Apoptosis Genes APAF1, DAPK1, and BCL2 in Breast Cancer. *Bull. Exp. Biol. Med.* 162, 797–800.
- Lombardo, Y., de Giorgio, A., Coombes, C.R., Stebbing, J., and Castellano, L.** (2015). Mammosphere formation assay from human breast cancer tissues and cell lines. *J Vis Exp*.
- Lottin, S., Adriaenssens, E., Dupressoir, T., Berteaux, N., Montpellier, C., Coll, J., Dugimont, T., and Curgy, J.J.** (2002). Overexpression of an ectopic H19 gene enhances the tumorigenic properties of breast cancer cells. *Carcinogenesis* 23, 1885–1895.
- Lu, H., Samanta, D., Xiang, L., Zhang, H., Hu, H., Chen, I., Bullen, J.W., and Semenza, G.L.** (2015). Chemotherapy triggers HIF-1-dependent glutathione synthesis and copper chelation that induces the breast cancer stem cell phenotype. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 112, E4600-4609.
- Luger, K., Dechassa, M.L., and Tremethick, D.J.** (2012). New insights into nucleosome and chromatin structure: an ordered state or a disordered affair? *Nat Rev Mol Cell Biol* 13, 436–447.
- Lund, E., Güttinger, S., Calado, A., Dahlberg, J.E., and Kutay, U.** (2004). Nuclear Export of MicroRNA Precursors. *Science* 303, 95–98.
- Luo, J., Solimini, N.L., and Elledge, S.J.** (2009). Principles of cancer therapy: oncogene and non-oncogene addiction. *Cell* 136, 823–837.
- Luo, J., Li, Q., Pan, J., Li, L., Fang, L., and Zhang, Y.** (2018). Expression level of long noncoding RNA H19 in plasma of patients with nonsmall cell lung cancer and its clinical significance. *J Cancer Res Ther* 14, 860–863.
- Luo, M., Li, Z., Wang, W., Zeng, Y., Liu, Z., and Qiu, J.** (2013). Long non-coding RNA H19 increases bladder cancer metastasis by associating with EZH2 and inhibiting E-cadherin expression. *Cancer Letters* 333, 213–221.
- Lustberg, M.B., and Ramaswamy, B.** (2011). Epigenetic Therapy in Breast Cancer. *Curr Breast Cancer Rep* 3, 34–43.
- Lustig, O., Ariel, I., Ilan, J., Lev-Lehman, E., De-Groot, N., and Hochberg, A.** (1994). Expression of the imprinted gene H19 in the human fetus. *Mol. Reprod. Dev.* 38, 239–246.
- Lv, M., Zhong, Z., Huang, M., Tian, Q., Jiang, R., and Chen, J.** (2017). lncRNA H19 regulates epithelial–mesenchymal transition and metastasis of bladder cancer by miR-29b-3p as competing endogenous RNA. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1864, 1887–1899.
- Lyle, R., Watanabe, D., te Vruchte, D., Lerchner, W., Smrzka, O.W., Wutz, A., Schageman, J., Hahner, L., Davies, C., and Barlow, D.P.** (2000). The imprinted antisense RNA at the *Igf2r* locus overlaps but does not imprint *Mas1*. *Nat. Genet.* 25, 19–21.

- Ma, J.-B., Yuan, Y.-R., Meister, G., Pei, Y., Tuschl, T., and Patel, D.J. (2005).** Structural basis for 5'-end-specific recognition of guide RNA by the *A. fulgidus* Piwi protein. *Nature* *434*, 666–670.
- Macrae, I.J., Zhou, K., Li, F., Repic, A., Brooks, A.N., Cande, W.Z., Adams, P.D., and Doudna, J.A. (2006).** Structural basis for double-stranded RNA processing by Dicer. *Science* *311*, 195–198.
- MacRae, I.J., Ma, E., Zhou, M., Robinson, C.V., and Doudna, J.A. (2008).** In vitro reconstitution of the human RISC-loading complex. *PNAS* *105*, 512–517.
- Magee, J.A., Piskounova, E., and Morrison, S.J. (2012).** Cancer stem cells: impact, heterogeneity, and uncertainty. *Cancer Cell* *21*, 283–296.
- Mani, S.A., Guo, W., Liao, M.-J., Eaton, E.N., Ayyanan, A., Zhou, A.Y., Brooks, M., Reinhard, F., Zhang, C.C., Shipitsin, M., et al. (2008).** The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell* *133*, 704–715.
- Maniatakis, E., and Mourelatos, Z. (2005).** Human mitochondrial tRNA<sup>Met</sup> is exported to the cytoplasm and associates with the Argonaute 2 protein. *RNA* *11*, 849–852.
- Mao, Y.S., Sunwoo, H., Zhang, B., and Spector, D.L. (2011).** Direct visualization of the co-transcriptional assembly of a nuclear body by noncoding RNAs. *Nat. Cell Biol.* *13*, 95–101.
- Marcato, P., Dean, C.A., Pan, D., Araslanova, R., Gillis, M., Joshi, M., Helyer, L., Pan, L., Leidal, A., Gujar, S., et al. (2011a).** Aldehyde dehydrogenase activity of breast cancer stem cells is primarily due to isoform ALDH1A3 and its expression is predictive of metastasis. *Stem Cells* *29*, 32–45.
- Marcato, P., Dean, C.A., Giacomantonio, C.A., and Lee, P.W.K. (2011b).** Aldehyde dehydrogenase: its role as a cancer stem cell marker comes down to the specific isoform. *Cell Cycle* *10*, 1378–1384.
- Marjanovic, N.D., Weinberg, R.A., and Chaffer, C.L. (2013).** Cell plasticity and heterogeneity in cancer. *Clin. Chem.* *59*, 168–179.
- Maroney, P.A., Yu, Y., Fisher, J., and Nilsen, T.W. (2006).** Evidence that microRNAs are associated with translating messenger RNAs in human cells. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *13*, 1102–1107.
- Martianov, I., Ramadass, A., Serra Barros, A., Chow, N., and Akoulitchev, A. (2007).** Repression of the human dihydrofolate reductase gene by a non-coding interfering transcript. *Nature* *445*, 666–670.
- Martinez, J., and Tuschl, T. (2004).** RISC is a 5' phosphomonoester-producing RNA endonuclease. *Genes Dev.* *18*, 975–980.
- Mathonnet, G., Fabian, M.R., Svitkin, Y.V., Parsyan, A., Huck, L., Murata, T., Biffo, S., Merrick, W.C., Darzynkiewicz, E., Pillai, R.S., et al. (2007).** MicroRNA inhibition of translation initiation in vitro by targeting the cap-binding complex eIF4F. *Science* *317*, 1764–1767.
- Matouk, I.J., Mezan, S., Mizrahi, A., Ohana, P., Abu-Lail, R., Fellig, Y., Degroot, N., Galun, E., and Hochberg, A. (2010).** The oncofetal H19 RNA connection: hypoxia, p53 and cancer. *Biochim. Biophys. Acta* *1803*, 443–451.
- Matouk, I.J., Raveh, E., Abu-lail, R., Mezan, S., Gilon, M., Gershtain, E., Birman, T., Gallula, J., Schneider, T., Barkali, M., et al. (2014).** Oncofetal H19 RNA promotes tumor metastasis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* *1843*, 1414–1426.

- Matouk**, I.J., Halle, D., Raveh, E., Gilon, M., Sorin, V., and Hochberg, A. (2016). The role of the oncofetal H19 lncRNA in tumor metastasis: orchestrating the EMT-MET decision. *Oncotarget* 7, 3748–3765.
- Matranga**, C., Tomari, Y., Shin, C., Bartel, D.P., and Zamore, P.D. (2005). Passenger-strand cleavage facilitates assembly of siRNA into Ago2-containing RNAi enzyme complexes. *Cell* 123, 607–620.
- Mattarocci**, S., Reinert, J.K., Bunker, R.D., Fontana, G.A., Shi, T., Klein, D., Cavadini, S., Faty, M., Shyian, M., Hafner, L., et al. (2017). Rif1 maintains telomeres and mediates DNA repair by encasing DNA ends. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 24, 588–595.
- Maugeri-Sacca**, M., Bartucci, M., and De Maria, R. (2012). DNA Damage Repair Pathways in Cancer Stem Cells. *Molecular Cancer Therapeutics* 11, 1627–1636.
- Maughan**, K.L., Lutterbie, M.A., and Ham, P.S. (2010). Treatment of breast cancer. *Am Fam Physician* 81, 1339–1346.
- Mavaddat**, N., Antoniou, A.C., Easton, D.F., and Garcia-Closas, M. (2010). Genetic susceptibility to breast cancer. *Mol Oncol* 4, 174–191.
- Mayor**, R., and **Etienne-Manneville**, S. (2016). The front and rear of collective cell migration. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 17, 97–109.
- McGrath**, J., and **Solter**, D. (1984a). Completion of mouse embryogenesis requires both the maternal and paternal genomes. *Cell* 37, 179–183.
- McGrath**, J., and **Solter**, D. (1984b). Inability of mouse blastomere nuclei transferred to enucleated zygotes to support development in vitro. *Science* 226, 1317–1319.
- Meister**, G., Landthaler, M., Patkaniowska, A., Dorsett, Y., Teng, G., and Tuschl, T. (2004). Human Argonaute2 Mediates RNA Cleavage Targeted by miRNAs and siRNAs. *Molecular Cell* 15, 185–197.
- Melo**, S.A., Moutinho, C., Ropero, S., Calin, G.A., Rossi, S., Spizzo, R., Fernandez, A.F., Davalos, V., Villanueva, A., Montoya, G., et al. (2010). A genetic defect in exportin-5 traps precursor microRNAs in the nucleus of cancer cells. *Cancer Cell* 18, 303–315.
- Memczak**, S., Jens, M., Elefsinioti, A., Torti, F., Krueger, J., Rybak, A., Maier, L., Mackowiak, S.D., Gregersen, L.H., Munschauer, M., et al. (2013). Circular RNAs are a large class of animal RNAs with regulatory potency. *Nature* 495, 333–338.
- Messier**, T.L., Gordon, J.A.R., Boyd, J.R., Tye, C.E., Browne, G., Stein, J.L., Lian, J.B., and Stein, G.S. (2016). Histone H3 lysine 4 acetylation and methylation dynamics define breast cancer subtypes. *Oncotarget* 7, 5094–5109.
- Milićević**, Z., Bajić, V., Živković, L., Kasapović, J., Andjelković, U., and Spremo-Potparević, B. (2014). Identification of p53 and its isoforms in human breast carcinoma cells. *ScientificWorldJournal* 2014, 618698.
- Milligan**, L., Antoine, E., Bisbal, C., Weber, M., Brunel, C., Forné, T., and Cathala, G. (2000). H19 gene expression is up-regulated exclusively by stabilization of the RNA during muscle cell differentiation. *Oncogene* 19, 5810–5816.
- Mirsky**, A.E., and **Ris**, H. (1951). The desoxyribonucleic acid content of animal cells and its evolutionary significance. *J. Gen. Physiol.* 34, 451–462.



- Mishima**, Y., Giraldez, A.J., Takeda, Y., Fujiwara, T., Sakamoto, H., Schier, A.F., and Inoue, K. (2006). Differential Regulation of Germline mRNAs in Soma and Germ Cells by Zebrafish miR-430. *Current Biology* *16*, 2135–2142.
- Mitsui**, K., Tokuzawa, Y., Itoh, H., Segawa, K., Murakami, M., Takahashi, K., Maruyama, M., Maeda, M., and Yamanaka, S. (2003). The homeoprotein Nanog is required for maintenance of pluripotency in mouse epiblast and ES cells. *Cell* *113*, 631–642.
- Miyoshi**, K., Tsukumo, H., Nagami, T., Siomi, H., and Siomi, M.C. (2005). Slicer function of *Drosophila* Argonautes and its involvement in RISC formation. *Genes Dev.* *19*, 2837–2848.
- Moasser**, M.M. (2007). The oncogene HER2; Its signaling and transforming functions and its role in human cancer pathogenesis. *Oncogene* *26*, 6469–6487.
- Molinié**, F., Vanier, A., Woronoff, A.S., Guizard, A.V., Delafosse, P., Velten, M., Daubisse-Marliac, L., Arveux, P., and Tretarre, B. (2014). Trends in breast cancer incidence and mortality in France 1990–2008. *Breast Cancer Res Treat* *147*, 167–175.
- Moloney**, J.N., and **Cotter**, T.G. (2018). ROS signalling in the biology of cancer. *Seminars in Cell & Developmental Biology* *80*, 50–64.
- Monnier**, P., Martinet, C., Pontis, J., Stancheva, I., Ait-Si-Ali, S., and Dandolo, L. (2013). H19 lncRNA controls gene expression of the Imprinted Gene Network by recruiting MBD1. *PNAS* *110*, 20693–20698.
- Moore**, N., Houghton, J., and Lyle, S. (2011). Slow-Cycling Therapy-Resistant Cancer Cells. *Stem Cells and Development* *21*, 1822–1830.
- Morel**, A.-P., Lièvre, M., Thomas, C., Hinkal, G., Ansieau, S., and Puisieux, A. (2008). Generation of breast cancer stem cells through epithelial-mesenchymal transition. *PLoS ONE* *3*, e2888.
- Morel**, A.-P., Ginestier, C., Pommier, R.M., Cabaud, O., Ruiz, E., Wicinski, J., Devouassoux-Shisheboran, M., Combaret, V., Finetti, P., Chassot, C., et al. (2017). A stemness-related ZEB1-MSRB3 axis governs cellular plasticity and breast cancer genome stability. *Nat. Med.* *23*, 568–578.
- Mourelatos**, Z., Dostie, J., Paushkin, S., Sharma, A., Charroux, B., Abel, L., Rappsilber, J., Mann, M., and Dreyfuss, G. (2002). miRNPs: a novel class of ribonucleoproteins containing numerous microRNAs. *Genes Dev.* *16*, 720–728.
- Mourtada-Maarabouni**, M., Hasan, A.M., Farzaneh, F., and Williams, G.T. (2010). Inhibition of human T-cell proliferation by mammalian target of rapamycin (mTOR) antagonists requires noncoding RNA growth-arrest-specific transcript 5 (GAS5). *Mol. Pharmacol.* *78*, 19–28.
- Mousavi**, K., Zare, H., Dell’Orso, S., Grontved, L., Gutierrez-Cruz, G., Derfoul, A., Hager, G.L., and Sartorelli, V. (2013). eRNAs Promote Transcription by Establishing Chromatin Accessibility at Defined Genomic Loci. *Molecular Cell* *51*, 606–617.
- Mujtaba**, S., Zeng, L., and Zhou, M.-M. (2007). Structure and acetyl-lysine recognition of the bromodomain. *Oncogene* *26*, 5521–5527.
- Mukherjee**, C., Tripathi, V., Manolika, E.M., Heijink, A.M., Ricci, G., Merzouk, S., de Boer, H.R., Demmers, J., van Vugt, M.A.T.M., and Ray Chaudhuri, A. (2019). RIF1 promotes replication fork protection and efficient restart to maintain genome stability. *Nat Commun* *10*, 3287.

- Müller**, B.M., Jana, L., Kasajima, A., Lehmann, A., Prinzler, J., Budczies, J., Winzer, K.-J., Dietel, M., Weichert, W., and Denkert, C. (2013). Differential expression of histone deacetylases HDAC1, 2 and 3 in human breast cancer - overexpression of HDAC2 and HDAC3 is associated with clinicopathological indicators of disease progression. *BMC Cancer* *13*, 215.
- Mulligan**, C.J. (2018). Insights from epigenetic studies on human health and evolution. *Current Opinion in Genetics & Development* *53*, 36–42.
- Munakata**, K., Uemura, M., Tanaka, S., Kawai, K., Kitahara, T., Miyo, M., Kano, Y., Nishikawa, S., Fukusumi, T., Takahashi, Y., et al. (2016). Cancer Stem-like Properties in Colorectal Cancer Cells with Low Proteasome Activity. *Clin. Cancer Res.* *22*, 5277–5286.
- Murchison**, E.P., Partridge, J.F., Tam, O.H., Cheloufi, S., and Hannon, G.J. (2005). Characterization of Dicer-deficient murine embryonic stem cells. *PNAS* *102*, 12135–12140.
- Murrell**, A., Heeson, S., Bowden, L., Constância, M., Dean, W., Kelsey, G., and Reik, W. (2001). An intragenic methylated region in the imprinted *Igf2* gene augments transcription. *EMBO Rep.* *2*, 1101–1106.
- Murrell**, A., Heeson, S., and Reik, W. (2004). Interaction between differentially methylated regions partitions the imprinted genes *Igf2* and *H19* into parent-specific chromatin loops. *Nat. Genet.* *36*, 889–893.
- Nabholtz**, J.-M., and **Gligorov**, J. (2005). The role of taxanes in the treatment of breast cancer. *Expert Opin Pharmacother* *6*, 1073–1094.
- Nagelkerke**, A., and **Span**, P.N. (2016). Staining Against Phospho-H2AX ( $\gamma$ -H2AX) as a Marker for DNA Damage and Genomic Instability in Cancer Tissues and Cells. In *Tumor Microenvironment*, C. Koumenis, L.M. Coussens, A. Giaccia, and E. Hammond, eds. (Cham: Springer International Publishing), pp. 1–10.
- Nakada**, H., Nakagomi, H., Hirotsu, Y., Amemiya, K., Mochizuki, H., Inoue, M., Oyama, T., and Omata, M. (2017). A study of tumor heterogeneity in a case with breast cancer. *Breast Cancer* *24*, 483–489.
- Nakagawa**, S., Ip, J.Y., Shioi, G., Tripathi, V., Zong, X., Hirose, T., and Prasanth, K.V. (2012). *Malat1* is not an essential component of nuclear speckles in mice. *RNA* *18*, 1487–1499.
- Nassar**, F.J., Nasr, R., and Talhouk, R. (2017). MicroRNAs as biomarkers for early breast cancer diagnosis, prognosis and therapy prediction. *Pharmacol. Ther.* *172*, 34–49.
- Negrini**, S., Gorgoulis, V.G., and Halazonetis, T.D. (2010). Genomic instability--an evolving hallmark of cancer. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *11*, 220–228.
- Nielsen**, F.C., Nielsen, J., and Christiansen, J. (2001). A family of IGF-II mRNA binding proteins (IMP) involved in RNA trafficking. *Scand. J. Clin. Lab. Invest. Suppl.* *234*, 93–99.
- Niwa**, H., Burdon, T., Chambers, I., and Smith, A. (1998). Self-renewal of pluripotent embryonic stem cells is mediated via activation of *STAT3*. *Genes Dev.* *12*, 2048–2060.
- Nkondjock**, A., and **Ghadirian**, P. (2005). Facteurs de risque du cancer du sein. *Med Sci (Paris)* *21*, 175–180.

- Nottrott**, S., Simard, M.J., and Richter, J.D. (2006). Human let-7a miRNA blocks protein production on actively translating polyribosomes. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *13*, 1108–1114.
- Novak**, P., Jensen, T., Oshiro, M.M., Watts, G.S., Kim, C.J., and Futscher, B.W. (2008). Agglomerative epigenetic aberrations are a common event in human breast cancer. *Cancer Res.* *68*, 8616–8625.
- Obici**, L., Berk, J.L., González-Duarte, A., Coelho, T., Gillmore, J., Schmidt, H.H.-J., Schilling, M., Yamashita, T., Labeyrie, C., Brannagan, T.H., et al. (2020). Quality of life outcomes in APOLLO, the phase 3 trial of the RNAi therapeutic patisiran in patients with hereditary transthyretin-mediated amyloidosis. *Amyloid* 1–10.
- O’Brien**, C.A., Pollett, A., Gallinger, S., and Dick, J.E. (2007). A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature* *445*, 106–110.
- O’Brien**, S.J., Carter, J.V., Burton, J.F., Oxford, B.G., Schmidt, M.N., Hallion, J.C., and Galandiuk, S. (2018). The role of the miR-200 family in epithelial-mesenchymal transition in colorectal cancer: a systematic review. *Int. J. Cancer* *142*, 2501–2511.
- Ogawa**, Y., Sun, B.K., and Lee, J.T. (2008). Intersection of the RNA Interference and X-Inactivation Pathways. *Science* *320*, 1336–1341.
- Ohana**, P., Bibi, O., Matouk, I., Levy, C., Birman, T., Ariel, I., Schneider, T., Ayesb, S., Giladi, H., Laster, M., et al. (2002). Use of H19 regulatory sequences for targeted gene therapy in cancer. *Int. J. Cancer* *98*, 645–650.
- Ohlsson**, R., Hedborg, F., Holmgren, L., Walsh, C., and Ekström, T.J. (1994). Overlapping patterns of IGF2 and H19 expression during human development: biallelic IGF2 expression correlates with a lack of H19 expression. *Development* *120*, 361–368.
- Ohno**, S. (1972). So much “junk” DNA in our genome. *Brookhaven Symp. Biol.* *23*, 366–370.
- Okamura**, K., Ishizuka, A., Siomi, H., and Siomi, M.C. (2004). Distinct roles for Argonaute proteins in small RNA-directed RNA cleavage pathways. *Genes Dev.* *18*, 1655–1666.
- Okano**, M., Xie, S., and Li, E. (1998). Cloning and characterization of a family of novel mammalian DNA (cytosine-5) methyltransferases. *Nat Genet* *19*, 219–220.
- Okutsu**, T., Kuroiwa, Y., Kagitani, F., Kai, M., Aisaka, K., Tsutsumi, O., Kaneko, Y., Yokomori, K., Surani, M.A., Kohda, T., et al. (2000). Expression and Imprinting Status of Human PEG8/IGF2AS, a Paternally Expressed Antisense Transcript from the IGF2 Locus, in Wilms’ Tumors. *J Biochem* *127*, 475–483.
- Olsen**, P.H., and Ambros, V. (1999). The lin-4 Regulatory RNA Controls Developmental Timing in *Caenorhabditis elegans* by Blocking LIN-14 Protein Synthesis after the Initiation of Translation. *Developmental Biology* *216*, 671–680.
- Orecchia**, R., Fossati, P., Zurrada, S., and Krengli, M. (2015). New frontiers in proton therapy: applications in breast cancer. *Curr Opin Oncol* *27*, 427–432.
- Ørom**, U.A., Nielsen, F.C., and Lund, A.H. (2008). MicroRNA-10a binds the 5’UTR of ribosomal protein mRNAs and enhances their translation. *Mol. Cell* *30*, 460–471.

- Ørom**, U.A., Derrien, T., Beringer, M., Gumireddy, K., Gardini, A., Bussotti, G., Lai, F., Zytnicki, M., Notredame, C., Huang, Q., et al. (2010). Long Noncoding RNAs with Enhancer-like Function in Human Cells. *Cell* *143*, 46–58.
- Osborne**, C., Wilson, P., and Tripathy, D. (2004). Oncogenes and Tumor Suppressor Genes in Breast Cancer: Potential Diagnostic and Therapeutic Applications. *The Oncologist* *9*, 361–377.
- Pachnis**, V., Belayew, A., and Tilghman, S.M. (1984). Locus unlinked to alpha-fetoprotein under the control of the murine raf and Rif genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *81*, 5523–5527.
- Pachnis**, V., Brannan, C.I., and Tilghman, S.M. (1988). The structure and expression of a novel gene activated in early mouse embryogenesis. *EMBO J.* *7*, 673–681.
- Pan**, J., Zhang, Q., Wang, Y., and You, M. (2010). 26S proteasome activity is down-regulated in lung cancer stem-like cells propagated in vitro. *PLoS ONE* *5*, e13298.
- Paredes**, J. (2005). P-Cadherin Overexpression Is an Indicator of Clinical Outcome in Invasive Breast Carcinomas and Is Associated with CDH3 Promoter Hypomethylation. *Clinical Cancer Research* *11*, 5869–5877.
- Park**, J.-E., Heo, I., Tian, Y., Simanshu, D.K., Chang, H., Jee, D., Patel, D.J., and Kim, V.N. (2011). Dicer recognizes the 5' end of RNA for efficient and accurate processing. *Nature* *475*, 201–205.
- Parker**, J.S., Roe, S.M., and Barford, D. (2005). Structural insights into mRNA recognition from a PIWI domain-siRNA guide complex. *Nature* *434*, 663–666.
- Parrella**, P. (2004). Nonrandom Distribution of Aberrant Promoter Methylation of Cancer-Related Genes in Sporadic Breast Tumors. *Clinical Cancer Research* *10*, 5349–5354.
- Pasculli**, B., Barbano, R., and Parrella, P. (2018). Epigenetics of breast cancer: Biology and clinical implication in the era of precision medicine. *Seminars in Cancer Biology* *51*, 22–35.
- Pefanis**, E., Wang, J., Rothschild, G., Lim, J., Kazadi, D., Sun, J., Federation, A., Chao, J., Elliott, O., Liu, Z.-P., et al. (2015). RNA exosome-regulated long non-coding RNA transcription controls super-enhancer activity. *Cell* *161*, 774–789.
- Peng**, F., Li, T.-T., Wang, K.-L., Xiao, G.-Q., Wang, J.-H., Zhao, H.-D., Kang, Z.-J., Fan, W.-J., Zhu, L.-L., Li, M., et al. (2017). H19/let-7/LIN28 reciprocal negative regulatory circuit promotes breast cancer stem cell maintenance. *Cell Death Dis* *8*, e2569.
- Peperstraete**, E., Lecerf, C., Collette, J., Vennin, C., Raby, L., Völkel, P., Angrand, P.-O., Winter, M., Bertucci, F., Finetti, P., et al. (2020). Enhancement of Breast Cancer Cell Aggressiveness by lncRNA H19 and its Mir-675 Derivative: Insight into Shared and Different Actions. *Cancers (Basel)* *12*.
- Perincheri**, S., Dingle, R.W.C., Peterson, M.L., and Spear, B.T. (2005). Hereditary persistence of alpha-fetoprotein and H19 expression in liver of BALB/cJ mice is due to a retrovirus insertion in the Zfx2 gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *102*, 396–401.
- Perou**, C.M., Sørlie, T., Eisen, M.B., van de Rijn, M., Jeffrey, S.S., Rees, C.A., Pollack, J.R., Ross, D.T., Johnsen, H., Akslén, L.A., et al. (2000). Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* *406*, 747–752.

- Petrova, R., and Joyner, A.L.** (2014). Roles for Hedgehog signaling in adult organ homeostasis and repair. *Development* *141*, 3445–3457.
- Phillips, T.M., McBride, W.H., and Pajonk, F.** (2006). The Response of CD24<sup>-/low</sup>/CD44<sup>+</sup> Breast Cancer–Initiating Cells to Radiation. *JNCI: Journal of the National Cancer Institute* *98*, 1777–1785.
- Pierpont, M.E., and Yunis, J.J.** (1977). Localization of chromosomal RNA in human G-banded metaphase chromosomes. *Exp. Cell Res.* *106*, 303–308.
- Place, A.E., Jin Huh, S., and Polyak, K.** (2011). The microenvironment in breast cancer progression: biology and implications for treatment. *Breast Cancer Res* *13*, 227.
- Pleasance, E.D., Cheetham, R.K., Stephens, P.J., McBride, D.J., Humphray, S.J., Greenman, C.D., Varela, I., Lin, M.-L., Ordóñez, G.R., Bignell, G.R., et al.** (2010a). A comprehensive catalogue of somatic mutations from a human cancer genome. *Nature* *463*, 191–196.
- Pleasance, E.D., Stephens, P.J., O’Meara, S., McBride, D.J., Meynert, A., Jones, D., Lin, M.-L., Beare, D., Lau, K.W., Greenman, C., et al.** (2010b). A small-cell lung cancer genome with complex signatures of tobacco exposure. *Nature* *463*, 184–190.
- Poirier, F., Chan, C.T., Timmons, P.M., Robertson, E.J., Evans, M.J., and Rigby, P.W.** (1991). The murine H19 gene is activated during embryonic stem cell differentiation in vitro and at the time of implantation in the developing embryo. *Development* *113*, 1105–1114.
- Poliseno, L., Salmena, L., Zhang, J., Carver, B., Haveman, W.J., and Pandolfi, P.P.** (2010). A coding-independent function of gene and pseudogene mRNAs regulates tumour biology. *Nature* *465*, 1033–1038.
- Polk, A., Svane, I.-M., Andersson, M., and Nielsen, D.** (2018). Checkpoint inhibitors in breast cancer - Current status. *Cancer Treat. Rev.* *63*, 122–134.
- Polyak, K.** (2007). Breast cancer: origins and evolution. *J. Clin. Invest.* *117*, 3155–3163.
- Porro, A., Feuerhahn, S., Delafontaine, J., Riethman, H., Rougemont, J., and Lingner, J.** (2014). Functional characterization of the TERRA transcriptome at damaged telomeres. *Nat Commun* *5*, 5379.
- Prat, A., Parker, J.S., Karginova, O., Fan, C., Livasy, C., Herschkowitz, J.I., He, X., and Perou, C.M.** (2010). Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. *Breast Cancer Res.* *12*, R68.
- Prat, A., Pineda, E., Adamo, B., Galván, P., Fernández, A., Gaba, L., Díez, M., Viladot, M., Arance, A., and Muñoz, M.** (2015). Clinical implications of the intrinsic molecular subtypes of breast cancer. *The Breast* *24*, S26–S35.
- Prince, M.E., Sivanandan, R., Kaczorowski, A., Wolf, G.T., Kaplan, M.J., Dalerba, P., Weissman, I.L., Clarke, M.F., and Ailles, L.E.** (2007). Identification of a subpopulation of cells with cancer stem cell properties in head and neck squamous cell carcinoma. *PNAS* *104*, 973–978.
- Prise, K.M., and O’Sullivan, J.M.** (2009). Radiation-induced bystander signalling in cancer therapy. *Nat Rev Cancer* *9*, 351–360.

- Pryde, F., Khalili, S., Robertson, K., Selfridge, J., Ritchie, A.-M., Melton, D.W., Jullien, D., and Adachi, Y.** (2005). 53BP1 exchanges slowly at the sites of DNA damage and appears to require RNA for its association with chromatin. *J. Cell. Sci.* *118*, 2043–2055.
- Pu, H., Zheng, Q., Li, H., Wu, M., An, J., Gui, X., Li, T., and Lu, D.** (2015). CUDR promotes liver cancer stem cell growth through upregulating TERT and C-Myc. *Oncotarget* *6*, 40775–40798.
- Qiao, Y., Ma, N., Wang, X., Hui, Y., Li, F., Xiang, Y., Zhou, J., Zou, C., Jin, J., Lv, G., et al.** (2011). MiR-483-5p controls angiogenesis in vitro and targets serum response factor. *FEBS Lett.* *585*, 3095–3100.
- Qu, H., and Fang, X.** (2013). A brief review on the Human Encyclopedia of DNA Elements (ENCODE) project. *Genomics Proteomics Bioinformatics* *11*, 135–141.
- Raby, L., Völkel, P., Le Bourhis, X., and Angrand, P.-O.** (2020). [Cancer cell transplantation in zebrafish: From translational research to personalized medicine]. *Bull Cancer* *107*, 30–40.
- Raha, D., Wilson, T.R., Peng, J., Peterson, D., Yue, P., Evangelista, M., Wilson, C., Merchant, M., and Settleman, J.** (2014). The cancer stem cell marker aldehyde dehydrogenase is required to maintain a drug-tolerant tumor cell subpopulation. *Cancer Res.* *74*, 3579–3590.
- Rainier, S., Johnson, L.A., Dobry, C.J., Ping, A.J., Grundy, P.E., and Feinberg, A.P.** (1993). Relaxation of imprinted genes in human cancer. *Nature* *362*, 747–749.
- Rand, T.A., Petersen, S., Du, F., and Wang, X.** (2005). Argonaute2 cleaves the anti-guide strand of siRNA during RISC activation. *Cell* *123*, 621–629.
- Raveh, E., Matouk, I.J., Gilon, M., and Hochberg, A.** (2015). The H19 Long non-coding RNA in cancer initiation, progression and metastasis – a proposed unifying theory. *Molecular Cancer* *14*.
- Reik, W., Brown, K.W., Schneid, H., Le Bouc, Y., Bickmore, W., and Maher, E.R.** (1995). Imprinting mutations in the Beckwith-Wiedemann syndrome suggested by altered imprinting pattern in the IGF2-H19 domain. *Hum. Mol. Genet.* *4*, 2379–2385.
- Reisz, J.A., Bansal, N., Qian, J., Zhao, W., and Furdui, C.M.** (2014). Effects of Ionizing Radiation on Biological Molecules—Mechanisms of Damage and Emerging Methods of Detection. *Antioxidants & Redox Signaling* *21*, 260–292.
- Reya, T., Morrison, S.J., Clarke, M.F., and Weissman, I.L.** (2001). Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* *414*, 105–111.
- Rich, J.N.** (2016). Cancer stem cells: understanding tumor hierarchy and heterogeneity. *Medicine (Baltimore)* *95*.
- Rinn, J.L., Kertesz, M., Wang, J.K., Squazzo, S.L., Xu, X., Bruggmann, S.A., Goodnough, L.H., Helms, J.A., Farnham, P.J., Segal, E., et al.** (2007). Functional demarcation of active and silent chromatin domains in human HOX loci by noncoding RNAs. *Cell* *129*, 1311–1323.
- Ripoche, M.A., Kress, C., Poirier, F., and Dandolo, L.** (1997). Deletion of the H19 transcription unit reveals the existence of a putative imprinting control element. *Genes Dev.* *11*, 1596–1604.
- Risso, D., Schwartz, K., Sherlock, G., and Dudoit, S.** (2011). GC-Content Normalization for RNA-Seq Data. *BMC Bioinformatics* *12*, 480.

- Rizk, M., and Tüzmen, S.** (2019). Patisiran for the treatment of patients with familial amyloid polyneuropathy. *Drugs Today* 55, 315–327.
- Rodda, D.J., Chew, J.-L., Lim, L.-H., Loh, Y.-H., Wang, B., Ng, H.-H., and Robson, P.** (2005). Transcriptional regulation of nanog by OCT4 and SOX2. *J. Biol. Chem.* 280, 24731–24737.
- Rogakou, E.P., Pilch, D.R., Orr, A.H., Ivanova, V.S., and Bonner, W.M.** (1998). DNA double-stranded breaks induce histone H2AX phosphorylation on serine 139. *J. Biol. Chem.* 273, 5858–5868.
- Roos, W., Baumgartner, M., and Kaina, B.** (2004). Apoptosis triggered by DNA damage O6-methylguanine in human lymphocytes requires DNA replication and is mediated by p53 and Fas/CD95/Apo-1. *Oncogene* 23, 359–367.
- Rose, D.P., and Vona-Davis, L.** (2014). Biochemical and molecular mechanisms for the association between obesity, chronic Inflammation, and breast cancer. *BioFactors* 40, 1–12.
- Rossouw, J.E., Anderson, G.L., Prentice, R.L., LaCroix, A.Z., Kooperberg, C., Stefanick, M.L., Jackson, R.D., Beresford, S.A., Howard, B.V., Johnson, K.C., et al.** (2002). Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women’s Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA* 288, 321–333.
- Rotter, V.** (1983). p53, a transformation-related cellular-encoded protein, can be used as a biochemical marker for the detection of primary mouse tumor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 80, 2613–2617.
- Rouzier, R., Perou, C.M., Symmans, W.F., Ibrahim, N., Cristofanilli, M., Anderson, K., Hess, K.R., Stec, J., Ayers, M., Wagner, P., et al.** (2005). Breast cancer molecular subtypes respond differently to preoperative chemotherapy. *Clin. Cancer Res.* 11, 5678–5685.
- Roy, P.G., and Thompson, A.M.** (2006). Cyclin D1 and breast cancer. *The Breast* 15, 718–727.
- Ruby, J.G., Jan, C.H., and Bartel, D.P.** (2007). Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing. *Nature* 448, 83–86.
- Runge, S., Nielsen, F.C., Nielsen, J., Lykke-Andersen, J., Wewer, U.M., and Christiansen, J.** (2000). H19 RNA binds four molecules of insulin-like growth factor II mRNA-binding protein. *J. Biol. Chem.* 275, 29562–29569.
- Russo, J., and Russo, I.H.** (2004). Development of the human breast. *Maturitas* 49, 2–15.
- Sandhu, S.K., Volinia, S., Costinean, S., Galasso, M., Neinast, R., Santhanam, R., Parthun, M.R., Perrotti, D., Marcucci, G., Garzon, R., et al.** (2012). miR-155 targets histone deacetylase 4 (HDAC4) and impairs transcriptional activity of B-cell lymphoma 6 (BCL6) in the E $\mu$ -miR-155 transgenic mouse model. *PNAS* 109, 20047–20052.
- Santanam, U., Zanesi, N., Efanov, A., Costinean, S., Palamarchuk, A., Hagan, J.P., Volinia, S., Alder, H., Rassenti, L., Kipps, T., et al.** (2010). Chronic lymphocytic leukemia modeled in mouse by targeted miR-29 expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107, 12210–12215.
- Schoeftner, S., and Blasco, M.A.** (2008). Developmentally regulated transcription of mammalian telomeres by DNA-dependent RNA polymerase II. *Nat Cell Biol* 10, 228–236.
- Schwarz, D.S., Hutvagner, G., Du, T., Xu, Z., Aronin, N., and Zamore, P.D.** (2003). Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell* 115, 199–208.

- Searle**, A.G., and **Beechey**, C.V. (1978). Complementation studies with mouse translocations. *Cytogenet. Cell Genet.* *20*, 282–303.
- Seluanov**, A., Mao, Z., and Gorbunova, V. (2010). Analysis of DNA Double-strand Break (DSB) Repair in Mammalian Cells. *J Vis Exp*.
- Seto**, E., and **Yoshida**, M. (2014). Erasers of histone acetylation: the histone deacetylase enzymes. *Cold Spring Harb Perspect Biol* *6*, a018713.
- Shackleton**, M., Quintana, E., Fearon, E.R., and Morrison, S.J. (2009). Heterogeneity in cancer: cancer stem cells versus clonal evolution. *Cell* *138*, 822–829.
- Shafee**, N., Smith, C.R., Wei, S., Kim, Y., Mills, G.B., Hortobagyi, G.N., Stanbridge, E.J., and Lee, E.Y.-H.P. (2008). Cancer stem cells contribute to cisplatin resistance in Brca1/p53-mediated mouse mammary tumors. *Cancer Res.* *68*, 3243–3250.
- Sharma**, A., Singh, K., and Almasan, A. (2012). Histone H2AX phosphorylation: a marker for DNA damage. *Methods Mol. Biol.* *920*, 613–626.
- Shi**, W., Gerster, K., Alajez, N.M., Tsang, J., Waldron, L., Pintilie, M., Hui, A.B., Sykes, J., P'ng, C., Miller, N., et al. (2011). MicroRNA-301 mediates proliferation and invasion in human breast cancer. *Cancer Res.* *71*, 2926–2937.
- Shi**, X., Sun, M., Liu, H., Yao, Y., and Song, Y. (2013). Long non-coding RNAs: A new frontier in the study of human diseases. *Cancer Letters* *339*, 159–166.
- Shi**, Y., Wang, Y., Luan, W., Wang, P., Tao, T., Zhang, J., Qian, J., Liu, N., and You, Y. (2014). Long non-coding RNA H19 promotes glioma cell invasion by deriving miR-675. *PLoS ONE* *9*, e86295.
- Shima**, H., Kida, K., Adachi, S., Yamada, A., Sugae, S., Narui, K., Miyagi, Y., Nishi, M., Ryo, A., Murata, S., et al. (2018). Lnc RNA H19 is associated with poor prognosis in breast cancer patients and promotes cancer stemness. *Breast Cancer Res. Treat.* *170*, 507–516.
- Shimomura**, A., Shiino, S., Kawauchi, J., Takizawa, S., Sakamoto, H., Matsuzaki, J., Ono, M., Takeshita, F., Niida, S., Shimizu, C., et al. (2016). Novel combination of serum microRNA for detecting breast cancer in the early stage. *Cancer Sci.* *107*, 326–334.
- Shore**, A.N., and **Rosen**, J.M. (2014). Regulation of mammary epithelial cell homeostasis by lncRNAs. *Int J Biochem Cell Biol* *54*, 318–330.
- Si**, X., Zang, R., Zhang, E., Liu, Y., Shi, X., Zhang, E., Shao, L., Li, A., Yang, N., Han, X., et al. (2016). LncRNA H19 confers chemoresistance in ER $\alpha$ -positive breast cancer through epigenetic silencing of the pro-apoptotic gene BIK. *Oncotarget* *7*, 81452–81462.
- Silva**, J.M., Boczek, N.J., Berres, M.W., Ma, X., and Smith, D.I. (2011). LSINCT5 is over expressed in breast and ovarian cancer and affects cellular proliferation. *RNA Biol* *8*, 496–505.
- Silva**, M.J., Costa, P., Dias, A., Valente, M., Louro, H., and Boavida, M.G. (2005). Comparative analysis of the mutagenic activity of oxaliplatin and cisplatin in the Hprt gene of CHO cells. *Environmental and Molecular Mutagenesis* *46*, 104–115.



- Singh, P., Yang, M., Dai, H., Yu, D., Huang, Q., Tan, W., Kernstine, K.H., Lin, D., and Shen, B. (2008).** Overexpression and hypomethylation of flap endonuclease 1 gene in breast and other cancers. *Mol. Cancer Res.* *6*, 1710–1717.
- Singh, S.K., Clarke, I.D., Terasaki, M., Bonn, V.E., Hawkins, C., Squire, J., and Dirks, P.B. (2003).** Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res.* *63*, 5821–5828.
- Smith, J., Mun Tho, L., Xu, N., and A. Gillespie, D. (2010).** The ATM–Chk2 and ATR–Chk1 Pathways in DNA Damage Signaling and Cancer. In *Advances in Cancer Research*, (Elsevier), pp. 73–112.
- Sohn, S.Y., Bae, W.J., Kim, J.J., Yeom, K.-H., Kim, V.N., and Cho, Y. (2007).** Crystal structure of human DGCR8 core. *Nat Struct Mol Biol* *14*, 847–853.
- Son, K.S., Kang, H.-S., Kim, S.J., Jung, S.-Y., Min, S.Y., Lee, S.Y., Kim, S.W., Kwon, Y., Lee, K.S., Shin, K.H., et al. (2010).** Hypomethylation of the interleukin-10 gene in breast cancer tissues. *Breast* *19*, 484–488.
- Song, J.-J., Smith, S.K., Hannon, G.J., and Joshua-Tor, L. (2004).** Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity. *Science* *305*, 1434–1437.
- Song, Y., Wang, R., Li, L.-W., Liu, X., Wang, Y.-F., Wang, Q.-X., and Zhang, Q. (2019).** Long non-coding RNA HOTAIR mediates the switching of histone H3 lysine 27 acetylation to methylation to promote epithelial-to-mesenchymal transition in gastric cancer. *Int. J. Oncol.* *54*, 77–86.
- Sørli, T., Perou, C.M., Tibshirani, R., Aas, T., Geisler, S., Johnsen, H., Hastie, T., Eisen, M.B., van de Rijn, M., Jeffrey, S.S., et al. (2001).** Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *98*, 10869–10874.
- Sørli, T., Tibshirani, R., Parker, J., Hastie, T., Marron, J.S., Nobel, A., Deng, S., Johnsen, H., Pesich, R., Geisler, S., et al. (2003).** Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *100*, 8418–8423.
- Soussi, T., and Wiman, K.G. (2015).** TP53: an oncogene in disguise. *Cell Death Differ* *22*, 1239–1249.
- South, A.P., Cho, R.J., and Aster, J.C. (2012).** The double-edged sword of Notch signaling in cancer. *Semin. Cell Dev. Biol.* *23*, 458–464.
- Soysal, S.D., Tzankov, A., and Muenst, S.E. (2015).** Role of the Tumor Microenvironment in Breast Cancer. *Pathobiology* *82*, 142–152.
- Spandidos, D.A. (2007).** Oncogenes and tumor suppressor genes as paradigms in oncogenesis. *J BUON* *12 Suppl 1*, S9-12.
- Srivastava, M., Hsieh, S., Grinberg, A., Williams-Simons, L., Huang, S.P., and Pfeifer, K. (2000).** H19 and Igf2 monoallelic expression is regulated in two distinct ways by a shared cis acting regulatory region upstream of H19. *Genes Dev.* *14*, 1186–1195.
- St Laurent, G., Wahlestedt, C., and Kapranov, P. (2015).** The Landscape of long noncoding RNA classification. *Trends Genet.* *31*, 239–251.
- Standart, N., and Jackson, R.J. (2007).** MicroRNAs repress translation of m7Gppp-capped target mRNAs in vitro by inhibiting initiation and promoting deadenylation. *Genes Dev.* *21*, 1975–1982.

- Stefani, G., and Slack, F.J.** (2008). Small non-coding RNAs in animal development. *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 219–230.
- Stefansson, O.A., Jonasson, J.G., Olafsdottir, K., Hilmarsdottir, H., Olafsdottir, G., Esteller, M., Johannsson, O.T., and Eyfjord, J.E.** (2011). CpG island hypermethylation of *BRCA1* and loss of pRb as co-occurring events in basal/triple-negative breast cancer. *Epigenetics* 6, 638–649.
- Stefansson, O.A., Moran, S., Gomez, A., Sayols, S., Arribas-Jorba, C., Sandoval, J., Hilmarsdottir, H., Olafsdottir, E., Tryggvadottir, L., Jonasson, J.G., et al.** (2015). A DNA methylation-based definition of biologically distinct breast cancer subtypes. *Molecular Oncology* 9, 555–568.
- Steg, A.D., Bevis, K.S., Katre, A.A., Ziebarth, A., Dobbin, Z.C., Alvarez, R.D., Zhang, K., Conner, M., and Landen, C.N.** (2012). Stem cell pathways contribute to clinical chemoresistance in ovarian cancer. *Clin. Cancer Res.* 18, 869–881.
- Stendahl, M., Kronblad, Å., Rydén, L., Emdin, S., Bengtsson, N.O., and Landberg, G.** (2004). Cyclin D1 overexpression is a negative predictive factor for tamoxifen response in postmenopausal breast cancer patients. *Br J Cancer* 90, 1942–1948.
- Storici, F., Bebenek, K., Kunkel, T.A., Gordenin, D.A., and Resnick, M.A.** (2007). RNA-templated DNA repair. *Nature* 447, 338–341.
- Su, H., Trombly, M.I., Chen, J., and Wang, X.** (2009). Essential and overlapping functions for mammalian Argonautes in microRNA silencing. *Genes & Development* 23, 304–317.
- Suetsugu, A., Nagaki, M., Aoki, H., Motohashi, T., Kunisada, T., and Moriwaki, H.** (2006). Characterization of CD133+ hepatocellular carcinoma cells as cancer stem/progenitor cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 351, 820–824.
- Sugihara, E., and Saya, H.** (2013). Complexity of cancer stem cells. *International Journal of Cancer* 132, 1249–1259.
- Sun, S., Del Rosario, B.C., Szanto, A., Ogawa, Y., Jeon, Y., and Lee, J.T.** (2013). Jpx RNA activates Xist by evicting CTCF. *Cell* 153, 1537–1551.
- Sundaram, G.M., Common, J.E.A., Gopal, F.E., Srikanta, S., Lakshman, K., Lunny, D.P., Lim, T.C., Tanavde, V., Lane, E.B., and Sampath, P.** (2013). ‘See-saw’ expression of microRNA-198 and FSTL1 from a single transcript in wound healing. *Nature* 495, 103–106.
- Sunwoo, H., Dinger, M.E., Wilusz, J.E., Amaral, P.P., Mattick, J.S., and Spector, D.L.** (2009). MEN epsilon/beta nuclear-retained non-coding RNAs are up-regulated upon muscle differentiation and are essential components of paraspeckles. *Genome Res.* 19, 347–359.
- Surani, M.A., Barton, S.C., and Norris, M.L.** (1984). Development of reconstituted mouse eggs suggests imprinting of the genome during gametogenesis. *Nature* 308, 548–550.
- Suzuki, J., Chen, Y.-Y., Scott, G.K., DeVries, S., Chin, K., Benz, C.C., Waldman, F.M., and Hwang, E.S.** (2009). Protein Acetylation and Histone Deacetylase Expression Associated with Malignant Breast Cancer Progression. *Clinical Cancer Research* 15, 3163–3171.
- Szabó, P., Tang, S.H., Rentsendorj, A., Pfeifer, G.P., and Mann, J.R.** (2000). Maternal-specific footprints at putative CTCF sites in the H19 imprinting control region give evidence for insulator function. *Curr. Biol.* 10, 607–610.

- Szatmári, T., Kis, D., Bogdándi, E.N., Benedek, A., Bright, S., Bowler, D., Persa, E., Kis, E., Balogh, A., Naszályi, L.N., et al. (2017).** Extracellular Vesicles Mediate Radiation-Induced Systemic Bystander Signals in the Bone Marrow and Spleen. *Front Immunol* **8**, 347.
- Tabara, H., Sarkissian, M., Kelly, W.G., Fleenor, J., Grishok, A., Timmons, L., Fire, A., and Mello, C.C. (1999).** The rde-1 Gene, RNA Interference, and Transposon Silencing in *C. elegans*. *Cell* **99**, 123–132.
- Taganov, K.D., Boldin, M.P., Chang, K.-J., and Baltimore, D. (2006).** NF-kappaB-dependent induction of microRNA miR-146, an inhibitor targeted to signaling proteins of innate immune responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **103**, 12481–12486.
- Takahashi, K., and Yamanaka, S. (2006).** Induction of Pluripotent Stem Cells from Mouse Embryonic and Adult Fibroblast Cultures by Defined Factors. *Cell* **126**, 663–676.
- Takahashi, R.-U., Takeshita, F., Fujiwara, T., Ono, M., and Ochiya, T. (2011).** Cancer stem cells in breast cancer. *Cancers (Basel)* **3**, 1311–1328.
- Takai, D., Gonzales, F.A., Tsai, Y.C., Thayer, M.J., and Jones, P.A. (2001).** Large scale mapping of methylcytosines in CTCF-binding sites in the human H19 promoter and aberrant hypomethylation in human bladder cancer. *Hum. Mol. Genet.* **10**, 2619–2626.
- Takaishi, S., Okumura, T., Tu, S., Wang, S.S.W., Shibata, W., Vigneshwaran, R., Gordon, S.A.K., Shimada, Y., and Wang, T.C. (2009).** Identification of Gastric Cancer Stem Cells Using the Cell Surface Marker CD44. *STEM CELLS* **27**, 1006–1020.
- Tamaichi, H., Sato, M., Porter, A.C.G., Shimizu, T., Mizutani, S., and Takagi, M. (2013).** Ataxia telangiectasia mutated-dependent regulation of topoisomerase II alpha expression and sensitivity to topoisomerase II inhibitor. *Cancer Science* **104**, 178–184.
- Tanei, T., Morimoto, K., Shimazu, K., Kim, S.J., Tanji, Y., Taguchi, T., Tamaki, Y., and Noguchi, S. (2009).** Association of breast cancer stem cells identified by aldehyde dehydrogenase 1 expression with resistance to sequential Paclitaxel and epirubicin-based chemotherapy for breast cancers. *Clin. Cancer Res.* **15**, 4234–4241.
- Tessier, C.R., Doyle, G.A., Clark, B.A., Pitot, H.C., and Ross, J. (2004).** Mammary tumor induction in transgenic mice expressing an RNA-binding protein. *Cancer Res.* **64**, 209–214.
- Tétreault, N., and De Guire, V. (2013).** miRNAs: Their discovery, biogenesis and mechanism of action. *Clinical Biochemistry* **46**, 842–845.
- The 1000 Genomes Project Consortium (2010).** A map of human genome variation from population-scale sequencing. *Nature* **467**, 1061–1073.
- The ENCODE Project Consortium (2007).** Identification and analysis of functional elements in 1% of the human genome by the ENCODE pilot project. *Nature* **447**, 799–816.
- Thomas, C.A. (1971).** The genetic organization of chromosomes. *Annu. Rev. Genet.* **5**, 237–256.
- Thomas, A., Tanaka, M., Trepel, J., Reinhold, W.C., Rajapakse, V.N., and Pommier, Y. (2017).** Temozolomide in the Era of Precision Medicine. *Cancer Res.* **77**, 823–826.
- Thompson, D., and Easton, D. (2001).** Variation in Cancer Risks, by Mutation Position, in BRCA2 Mutation Carriers. *Am J Hum Genet* **68**, 410–419.

- Tian**, Y., Simanshu, D.K., Ma, J.-B., Park, J.-E., Heo, I., Kim, V.N., and Patel, D.J. (2014). A phosphate-binding pocket within the platform-PAZ-connector helix cassette of human Dicer. *Mol. Cell* *53*, 606–616.
- Title**, A.C., Hong, S.-J., Pires, N.D., Hasenöhrl, L., Godbersen, S., Stokar-Regenscheit, N., Bartel, D.P., and Stoffel, M. (2018). Genetic dissection of the miR-200-Zeb1 axis reveals its importance in tumor differentiation and invasion. *Nat Commun* *9*, 4671.
- Toillon**, R.-A., Lagadec, C., Page, A., Chopin, V., Sautière, P.-E., Ricort, J.-M., Lemoine, J., Zhang, M., Hondermarck, H., and Bourhis, X.L. (2007). Proteomics Demonstration That Normal Breast Epithelial Cells Can Induce Apoptosis of Breast Cancer Cells through Insulin-like Growth Factor-binding Protein-3 and Maspin. *Molecular & Cellular Proteomics* *6*, 1239–1247.
- Tomao**, F., Papa, A., Zaccarelli, E., Rossi, L., Caruso, D., Minozzi, M., Vici, P., Frati, L., and Tomao, S. (2015). Triple-negative breast cancer: new perspectives for targeted therapies. *Onco Targets Ther* *8*, 177–193.
- Tomari**, Y. (2004). A Protein Sensor for siRNA Asymmetry. *Science* *306*, 1377–1380.
- Tomari**, Y., Du, T., and Zamore, P.D. (2007). Sorting of *Drosophila* Small Silencing RNAs. *Cell* *130*, 299–308.
- Torres**, L., Ribeiro, F.R., Pandis, N., Andersen, J.A., Heim, S., and Teixeira, M.R. (2007). Intratumor genomic heterogeneity in breast cancer with clonal divergence between primary carcinomas and lymph node metastases. *Breast Cancer Res Treat* *102*, 143–155.
- Traverso**, N., Ricciarelli, R., Nitti, M., Marengo, B., Furfaro, A.L., Pronzato, M.A., Marinari, U.M., and Domenicotti, C. (2013). Role of glutathione in cancer progression and chemoresistance. *Oxid Med Cell Longev* *2013*, 972913.
- Tremblay**, K.D., Duran, K.L., and Bartolomei, M.S. (1997). A 5' 2-kilobase-pair region of the imprinted mouse H19 gene exhibits exclusive paternal methylation throughout development. *Mol. Cell. Biol.* *17*, 4322–4329.
- Tripathi**, V., Ellis, J.D., Shen, Z., Song, D.Y., Pan, Q., Watt, A.T., Freier, S.M., Bennett, C.F., Sharma, A., Bubulya, P.A., et al. (2010). The nuclear-retained noncoding RNA MALAT1 regulates alternative splicing by modulating SR splicing factor phosphorylation. *Mol. Cell* *39*, 925–938.
- Tropberger**, P., and **Schneider**, R. (2013). Scratching the (lateral) surface of chromatin regulation by histone modifications. *Nat Struct Mol Biol* *20*, 657–661.
- Trzaska**, C., Amand, S., Bailly, C., Leroy, C., Marchand, V., Duvernois-Berthet, E., Saliou, J.-M., Benhabiles, H., Werkmeister, E., Chassat, T., et al. (2020). 2,6-Diaminopurine as a highly potent corrector of UGA nonsense mutations. *Nat Commun* *11*, 1509.
- Tsai**, M.-C., Manor, O., Wan, Y., Mosammaparast, N., Wang, J.K., Lan, F., Shi, Y., Segal, E., and Chang, H.Y. (2010). Long Noncoding RNA as Modular Scaffold of Histone Modification Complexes. *Science* *329*, 689–693.
- Tsang**, W.P., Wong, T.W.L., Cheung, A.H.H., Co, C.N.N., and Kwok, T.T. (2007). Induction of drug resistance and transformation in human cancer cells by the noncoding RNA CUDR. *RNA* *13*, 890–898.

- Tsang, W.P., Ng, E.K.O., Ng, S.S.M., Jin, H., Yu, J., Sung, J.J.Y., and Kwok, T.T. (2010).** Oncofetal H19-derived miR-675 regulates tumor suppressor RB in human colorectal cancer. *Carcinogenesis* *31*, 350–358.
- Tsutsumi, A., Kawamata, T., Izumi, N., Seitz, H., and Tomari, Y. (2011).** Recognition of the pre-miRNA structure by Drosophila Dicer-1. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *18*, 1153–1158.
- Turner, N.C., Reis-Filho, J.S., Russell, A.M., Springall, R.J., Ryder, K., Steele, D., Savage, K., Gillett, C.E., Schmitt, F.C., Ashworth, A., et al. (2007).** BRCA1 dysfunction in sporadic basal-like breast cancer. *Oncogene* *26*, 2126–2132.
- Ungerleider, N.A., Rao, S.G., Shahbandi, A., Yee, D., Niu, T., Frey, W.D., and Jackson, J.G. (2018).** Breast cancer survival predicted by TP53 mutation status differs markedly depending on treatment. *Breast Cancer Res.* *20*, 115.
- Vallejos, C.S., Gómez, H.L., Cruz, W.R., Pinto, J.A., Dyer, R.R., Velarde, R., Suazo, J.F., Neciosup, S.P., León, M., de la Cruz, M.A., et al. (2010).** Breast cancer classification according to immunohistochemistry markers: subtypes and association with clinicopathologic variables in a peruvian hospital database. *Clin. Breast Cancer* *10*, 294–300.
- Vanhecke, E., Adriaenssens, E., Verbeke, S., Meignan, S., Germain, E., Berteaux, N., Nurcombe, V., Le Bourhis, X., and Hondermarck, H. (2011).** Brain-Derived Neurotrophic Factor and Neurotrophin-4/5 Are Expressed in Breast Cancer and Can Be Targeted to Inhibit Tumor Cell Survival. *Clinical Cancer Research* *17*, 1741–1752.
- Vargo-Gogola, T., and Rosen, J.M. (2007).** Modelling breast cancer: one size does not fit all. *Nat Rev Cancer* *7*, 659–672.
- Varlakhanova, N.V., Cotterman, R.F., deVries, W.N., Morgan, J., Donahue, L.R., Murray, S., Knowles, B.B., and Knoepfler, P.S. (2010).** myc maintains embryonic stem cell pluripotency and self-renewal. *Differentiation* *80*, 9–19.
- Vassilev, L.T. (2007).** MDM2 inhibitors for cancer therapy. *Trends in Molecular Medicine* *13*, 23–31.
- Vasudevan, S., and Steitz, J.A. (2007).** AU-Rich-Element-Mediated Upregulation of Translation by FXR1 and Argonaute 2. *Cell* *128*, 1105–1118.
- Veeck, J., and Esteller, M. (2010).** Breast Cancer Epigenetics: From DNA Methylation to microRNAs. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* *15*, 5–17.
- Venkitaraman, A.R. (2002).** Cancer Susceptibility and the Functions of BRCA1 and BRCA2. *Cell* *108*, 171–182.
- Vennin, C., Spruyt, N., Dahmani, F., Julien, S., Bertucci, F., Finetti, P., Chassat, T., Bourette, R.P., Bourhis, X.L., and Adriaenssens, E. (2015).** H19 non coding RNA-derived miR-675 enhances tumorigenesis and metastasis of breast cancer cells by downregulating c-Cbl and Cbl-b. *Oncotarget* *6*, 29209–29223.
- Vennin, C., Spruyt, N., Robin, Y.-M., Chassat, T., Le Bourhis, X., and Adriaenssens, E. (2017).** The long non-coding RNA 91H increases aggressive phenotype of breast cancer cells and up-regulates H19/IGF2 expression through epigenetic modifications. *Cancer Lett.* *385*, 198–206.
- Verdel, A., Jia, S., Gerber, S., Sugiyama, T., Gygi, S., Grewal, S.I.S., and Moazed, D. (2004).** RNAi-mediated targeting of heterochromatin by the RITS complex. *Science* *303*, 672–676.

- Viale, G.** (2012). The current state of breast cancer classification. *Annals of Oncology* 23, x207–x210.
- Virani, S., Colacino, J.A., Kim, J.H., and Rozek, L.S.** (2012). Cancer Epigenetics: A Brief Review. *ILAR Journal* 53, 359–369.
- Viré, E., Brenner, C., Deplus, R., Blanchon, L., Fraga, M., Didelot, C., Morey, L., Van Eynde, A., Bernard, D., Vanderwinden, J.-M., et al.** (2006). The Polycomb group protein EZH2 directly controls DNA methylation. *Nature* 439, 871–874.
- Visvader, J.E.** (2009). Keeping abreast of the mammary epithelial hierarchy and breast tumorigenesis. *Genes Dev* 23, 2563–2577.
- Visvader, J.E., and Lindeman, G.J.** (2008). Cancer stem cells in solid tumours: accumulating evidence and unresolved questions. *Nat Rev Cancer* 8, 755–768.
- Visvader, J.E., and Stingl, J.** (2014). Mammary stem cells and the differentiation hierarchy: current status and perspectives. *Genes Dev.* 28, 1143–1158.
- Vlashi, E., Kim, K., Lagadec, C., Donna, L.D., McDonald, J.T., Eghbali, M., Sayre, J.W., Stefani, E., McBride, W., and Pajonk, F.** (2009). In vivo imaging, tracking, and targeting of cancer stem cells. *J. Natl. Cancer Inst.* 101, 350–359.
- Vlashi, E., Lagadec, C., Chan, M., Frohnen, P., Jean McDonald, A., and Pajonk, F.** (2013). Targeted Elimination of Breast Cancer Cells with Low Proteasome Activity is Sufficient for Tumor Regression. *Breast Cancer Res Treat* 141.
- Volinia, S., Calin, G.A., Liu, C.-G., Ambs, S., Cimmino, A., Petrocca, F., Visone, R., Iorio, M., Roldo, C., Ferracin, M., et al.** (2006). A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 2257–2261.
- Völkel, P., and Angrand, P.-O.** (2007). The control of histone lysine methylation in epigenetic regulation. *Biochimie* 89, 1–20.
- Vona-Davis, L., and Rose, D.P.** (2007). Adipokines as endocrine, paracrine, and autocrine factors in breast cancer risk and progression. *Endocr. Relat. Cancer* 14, 189–206.
- Voutilainen, R., Ilvesmäki, V., Ariel, I., Rachmilewitz, J., de Groot, N., and Hochberg, A.** (1994). Parallel regulation of parentally imprinted H19 and insulin-like growth factor-II genes in cultured human fetal adrenal cells. *Endocrinology* 134, 2051–2056.
- Vuong, D., Simpson, P.T., Green, B., Cummings, M.C., and Lakhani, S.R.** (2014). Molecular classification of breast cancer. *Virchows Arch* 465, 1–14.
- Walerych, D., Napoli, M., Collavin, L., and Del Sal, G.** (2012). The rebel angel: mutant p53 as the driving oncogene in breast cancer. *Carcinogenesis* 33, 2007–2017.
- Walsh, T., and King, M.-C.** (2007). Ten genes for inherited breast cancer. *Cancer Cell* 11, 103–105.
- Walter, M., Liang, S., Ghosh, S., Hornsby, P.J., and Li, R.** (2009). Interleukin 6 secreted from adipose stromal cells promotes migration and invasion of breast cancer cells. *Oncogene* 28, 2745–2755.

- Wan, G., Zhang, X., Langley, R.R., Liu, Y., Hu, X., Han, C., Peng, G., Ellis, L.M., Jones, S.N., and Lu, X. (2013).** DNA-damage-induced nuclear export of precursor microRNAs is regulated by the ATM-AKT pathway. *Cell Rep* 3, 2100–2112.
- Wang, J., Wakeman, T.P., Lathia, J.D., Hjelmeland, A.B., Wang, X.-F., White, R.R., Rich, J.N., and Sullenger, B.A. (2010).** Notch promotes radioresistance of glioma stem cells. *Stem Cells* 28, 17–28.
- Wang, J., Wang, X., Chen, T., Jiang, L., and Yang, Q. (2017).** Huaier Extract Inhibits Breast Cancer Progression Through a LncRNA-H19/MiR-675-5p Pathway. *CPB* 44, 581–593.
- Wang, K.C., Yang, Y.W., Liu, B., Sanyal, A., Corces-Zimmerman, R., Chen, Y., Lajoie, B.R., Protacio, A., Flynn, R.A., Gupta, R.A., et al. (2011).** A long noncoding RNA maintains active chromatin to coordinate homeotic gene expression. *Nature* 472, 120–124.
- Wang, M., Wang, Y., and Zhong, J. (2015).** Side population cells and drug resistance in breast cancer. *Mol Med Rep* 11, 4297–4302.
- Wang, M., Li, Y., Xiao, G.-D., Zheng, X.-Q., Wang, J.-C., Xu, C.-W., Qin, S., Ren, H., Tang, S.-C., and Sun, X. (2019).** H19 regulation of oestrogen induction of symmetric division is achieved by antagonizing Let-7c in breast cancer stem-like cells. *Cell Proliferation* 52, e12534.
- Wang, W., Quan, Y., Fu, Q., Liu, Y., Liang, Y., Wu, J., Yang, G., Luo, C., Ouyang, Q., and Wang, Y. (2014).** Dynamics between cancer cell subpopulations reveals a model coordinating with both hierarchical and stochastic concepts. *PLoS ONE* 9, e84654.
- Wang, X.-S., Zhang, Z., Wang, H.-C., Cai, J.-L., Xu, Q.-W., Li, M.-Q., Chen, Y.-C., Qian, X.-P., Lu, T.-J., Yu, L.-Z., et al. (2006).** Rapid identification of UCA1 as a very sensitive and specific unique marker for human bladder carcinoma. *Clin. Cancer Res.* 12, 4851–4858.
- Wang, Y., Medvid, R., Melton, C., Jaenisch, R., and Blelloch, R. (2007).** DGCR8 is essential for microRNA biogenesis and silencing of embryonic stem cell self-renewal. *Nat Genet* 39, 380–385.
- Wang, Y., Sheng, G., Juraneck, S., Tuschl, T., and Patel, D.J. (2008).** Structure of the guide-strand-containing argonaute silencing complex. *Nature* 456, 209–213.
- Watson, C.J., and Khaled, W.T. (2008).** Mammary development in the embryo and adult: a journey of morphogenesis and commitment. *Development* 135, 995–1003.
- Weber, A.M., and Ryan, A.J. (2015).** ATM and ATR as therapeutic targets in cancer. *Pharmacology & Therapeutics* 149, 124–138.
- Weigelt, B., Geyer, F.C., and Reis-Filho, J.S. (2010).** Histological types of breast cancer: how special are they? *Mol Oncol* 4, 192–208.
- Weinstein, J.N., Collisson, E.A., Mills, G.B., Shaw, K.M., Ozenberger, B.A., Ellrott, K., Shmulevich, I., Sander, C., and Stuart, J.M. (2013).** The Cancer Genome Atlas Pan-Cancer Analysis Project. *Nat Genet* 45, 1113–1120.
- Wellings, S.R., and Jensen, H.M. (1973).** On the Origin and Progression of Ductal Carcinoma in the Human Breast. *J Natl Cancer Inst* 50, 1111–1118.
- Wightman, B., Ha, I., and Ruvkun, G. (1993).** Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell* 75, 855–862.

- Wilkin, F., Paquette, J., Ledru, E., Hamelin, C., Pollak, M., Deal, C.L., and Mamelin, C. (2000).** H19 sense and antisense transgenes modify insulin-like growth factor-II mRNA levels. *Eur. J. Biochem.* *267*, 4020–4027.
- Willmore, E., de Caux, S., Sunter, N.J., Tilby, M.J., Jackson, G.H., Austin, C.A., and Durkacz, B.W. (2004).** A novel DNA-dependent protein kinase inhibitor, NU7026, potentiates the cytotoxicity of topoisomerase II poisons used in the treatment of leukemia. *Blood* *103*, 4659–4665.
- Wilusz, J.E., Freier, S.M., and Spector, D.L. (2008).** 3' End Processing of a Long Nuclear-Retained Noncoding RNA Yields a tRNA-like Cytoplasmic RNA. *Cell* *135*, 919–932.
- van Wolfswinkel, J.C., and Ketting, R.F. (2010).** The role of small non-coding RNAs in genome stability and chromatin organization. *J. Cell. Sci.* *123*, 1825–1839.
- Woodward, W.A., Chen, M.S., Behbod, F., Alfaro, M.P., Buchholz, T.A., and Rosen, J.M. (2007).** WNT/ $\beta$ -catenin mediates radiation resistance of mouse mammary progenitor cells. *PNAS* *104*, 618–623.
- Wu, C., and Alman, B.A. (2008).** Side population cells in human cancers. *Cancer Lett.* *268*, 1–9.
- Wu, Y., Sarkissyan, M., and Vadgama, J.V. (2015).** Epigenetics in Breast and Prostate Cancer. In *Cancer Epigenetics*, M. Verma, ed. (New York, NY: Springer New York), pp. 425–466.
- Wyckoff, J., Wang, W., Lin, E.Y., Wang, Y., Pixley, F., Stanley, E.R., Graf, T., Pollard, J.W., Segall, J., and Condeelis, J. (2004).** A Paracrine Loop between Tumor Cells and Macrophages Is Required for Tumor Cell Migration in Mammary Tumors. *Cancer Res* *64*, 7022–7029.
- Xiong, H., Shen, J., Chen, Z., Yang, J., Xie, B., Jia, Y., Jayasinghe, U., Wang, J., Zhao, W., Xie, S., et al. (2020).** H19/let-7/Lin28 ceRNA network mediates autophagy inhibiting epithelial-mesenchymal transition in breast cancer. *Int. J. Oncol.* *56*, 794–806.
- Xu, B., Gerin, I., Miao, H., Vu-Phan, D., Johnson, C.N., Xu, R., Chen, X.-W., Cawthorn, W.P., MacDougald, O.A., and Koenig, R.J. (2010a).** Multiple roles for the non-coding RNA SRA in regulation of adipogenesis and insulin sensitivity. *PLoS ONE* *5*, e14199.
- Xu, J., Chen, Y., and Olopade, O.I. (2010b).** MYC and Breast Cancer. *Genes Cancer* *1*, 629–640.
- Xu, Z., Robitaille, A.M., Berndt, J.D., Davidson, K.C., Fischer, K.A., Mathieu, J., Potter, J.C., Ruohola-Baker, H., and Moon, R.T. (2016).** Wnt/ $\beta$ -catenin signaling promotes self-renewal and inhibits the primed state transition in naïve human embryonic stem cells. *PNAS* *113*, E6382–E6390.
- Yamashita, T., Ji, J., Budhu, A., Forgues, M., Yang, W., Wang, H.-Y., Jia, H., Ye, Q., Qin, L.-X., Wauthier, E., et al. (2009).** EpCAM-positive hepatocellular carcinoma cells are tumor-initiating cells with stem/progenitor cell features. *Gastroenterology* *136*, 1012–1024.
- Yamazaki, T., and Hirose, T. (2015).** The building process of the functional paraspeckle with long non-coding RNAs. *Front Biosci (Elite Ed)* *7*, 1–41.
- Yan, J., Zhang, Y., She, Q., Li, X., Peng, L., Wang, X., Liu, S., Shen, X., Zhang, W., Dong, Y., et al. (2017).** Long Noncoding RNA H19/miR-675 Axis Promotes Gastric Cancer via FADD/Caspase 8/Caspase 3 Signaling Pathway. *CPB* *42*, 2364–2376.
- Yang, J.-S., and Lai, E.C. (2011).** Alternative miRNA biogenesis pathways and the interpretation of core miRNA pathway mutants. *Mol. Cell* *43*, 892–903.



- Yang, F., Bi, J., Xue, X., Zheng, L., Zhi, K., Hua, J., and Fang, G. (2012).** Up-regulated long non-coding RNA H19 contributes to proliferation of gastric cancer cells. *The FEBS Journal* **279**, 3159–3165.
- Yang, P., Du, C.W., Kwan, M., Liang, S.X., and Zhang, G.J. (2013).** The impact of p53 in predicting clinical outcome of breast cancer patients with visceral metastasis. *Sci Rep* **3**.
- Yap, D.B., Chu, J., Berg, T., Schapira, M., Cheng, S.-W.G., Moradian, A., Morin, R.D., Mungall, A.J., Meissner, B., Boyle, M., et al. (2011).** Somatic mutations at EZH2 Y641 act dominantly through a mechanism of selectively altered PRC2 catalytic activity, to increase H3K27 trimethylation. *Blood* **117**, 2451–2459.
- Yardley, D.A., Ismail-Khan, R.R., Melichar, B., Lichinitser, M., Munster, P.N., Klein, P.M., Cruickshank, S., Miller, K.D., Lee, M.J., and Trepel, J.B. (2013).** Randomized Phase II, Double-Blind, Placebo-Controlled Study of Exemestane With or Without Entinostat in Postmenopausal Women With Locally Recurrent or Metastatic Estrogen Receptor-Positive Breast Cancer Progressing on Treatment With a Nonsteroidal Aromatase Inhibitor. *Journal of Clinical Oncology*.
- Ye, X., Huang, N., Liu, Y., Paroo, Z., Huerta, C., Li, P., Chen, S., Liu, Q., and Zhang, H. (2011).** Structure of C3PO and mechanism of human RISC activation. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **18**, 650–657.
- Yeom, K.-H., Lee, Y., Han, J., Suh, M.R., and Kim, V.N. (2006).** Characterization of DGCR8/Pasha, the essential cofactor for Drosha in primary miRNA processing. *Nucleic Acids Res.* **34**, 4622–4629.
- Yin, H., and Glass, J. (2011).** The phenotypic radiation resistance of CD44+/CD24(-or low) breast cancer cells is mediated through the enhanced activation of ATM signaling. *PLoS ONE* **6**, e24080.
- Yoda, M., Kawamata, T., Paroo, Z., Ye, X., Iwasaki, S., Liu, Q., and Tomari, Y. (2010).** ATP-dependent human RISC assembly pathways. *Nat Struct Mol Biol* **17**, 17–23.
- Yoda, M., Cifuentes, D., Izumi, N., Sakaguchi, Y., Suzuki, T., Giraldez, A.J., and Tomari, Y. (2013).** Poly(A)-Specific Ribonuclease Mediates 3'-End Trimming of Argonaute2-Cleaved Precursor MicroRNAs. *Cell Reports* **5**, 715–726.
- Yoo, S., and Dynan, W.S. (1998).** Characterization of the RNA binding properties of Ku protein. *Biochemistry* **37**, 1336–1343.
- Yoshimizu, T., Miroglio, A., Ripoche, M.-A., Gabory, A., Vernucci, M., Riccio, A., Colnot, S., Godard, C., Terris, B., Jammes, H., et al. (2008).** The H19 locus acts in vivo as a tumor suppressor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **105**, 12417–12422.
- Yu, F., Yao, H., Zhu, P., Zhang, X., Pan, Q., Gong, C., Huang, Y., Hu, X., Su, F., Lieberman, J., et al. (2007).** let-7 Regulates Self Renewal and Tumorigenicity of Breast Cancer Cells. *Cell* **131**, 1109–1123.
- Yue, W., Yager, J.D., Wang, J.-P., Jupe, E.R., and Santen, R.J. (2013).** Estrogen receptor-dependent and independent mechanisms of breast cancer carcinogenesis. *Steroids* **78**, 161–170.
- Zeng, Y., Yi, R., and Cullen, B.R. (2005).** Recognition and cleavage of primary microRNA precursors by the nuclear processing enzyme Drosha. *The EMBO Journal* **24**, 138–148.
- Zhang, Y., and Tycko, B. (1992).** Monoallelic expression of the human H19 gene. *Nat. Genet.* **1**, 40–44.

**Zhang, B., Arun, G., Mao, Y.S., Lazar, Z., Hung, G., Bhattacharjee, G., Xiao, X., Booth, C.J., Wu, J., Zhang, C., et al. (2012).** The lncRNA Malat1 Is Dispensable for Mouse Development but Its Transcription Plays a cis-Regulatory Role in the Adult. *Cell Reports* 2, 111–123.

**Zhang, E., Li, W., Yin, D., De, W., Zhu, L., Sun, S., and Han, L. (2016a).** c-Myc-regulated long non-coding RNA H19 indicates a poor prognosis and affects cell proliferation in non-small-cell lung cancer. *Tumour Biol.* 37, 4007–4015.

**Zhang, H., Kolb, F.A., Jaskiewicz, L., Westhof, E., and Filipowicz, W. (2004).** Single Processing Center Models for Human Dicer and Bacterial RNase III. *Cell* 118, 57–68.

**Zhang, H., Niu, B., Hu, J.-F., Ge, S., Wang, H., Li, T., Ling, J., Steelman, B.N., Qian, G., and Hoffman, A.R. (2011).** Interruption of intrachromosomal looping by CCCTC binding factor decoy proteins abrogates genomic imprinting of human insulin-like growth factor II. *J. Cell Biol.* 193, 475–487.

**Zhang, K., Sun, X., Zhou, X., Han, L., Chen, L., Shi, Z., Zhang, A., Ye, M., Wang, Q., Liu, C., et al. (2015).** Long non-coding RNA HOTAIR promotes glioblastoma cell cycle progression in an EZH2 dependent manner. *Oncotarget* 6, 537–546.

**Zhang, K., Luo, Z., Zhang, Y., Zhang, L., Wu, L., Liu, L., Yang, J., Song, X., and Liu, J. (2016b).** Circulating lncRNA H19 in plasma as a novel biomarker for breast cancer. *Cancer Biomarkers* 17, 187–194.

**Zhang, L., Yang, F., Yuan, J., Yuan, S., Zhou, W., Huo, X., Xu, D., Bi, H., Wang, F., and Sun, S. (2013a).** Epigenetic activation of the MiR-200 family contributes to H19-mediated metastasis suppression in hepatocellular carcinoma. *Carcinogenesis* 34, 577–586.

**Zhang, M., Lee, A.V., and Rosen, J.M. (2017).** The Cellular Origin and Evolution of Breast Cancer. *Cold Spring Harb Perspect Med* 7, a027128.

**Zhang, S., Balch, C., Chan, M.W., Lai, H.-C., Matei, D., Schilder, J.M., Yan, P.S., Huang, T.H.-M., and Nephew, K.P. (2008).** Identification and characterization of ovarian cancer-initiating cells from primary human tumors. *Cancer Res.* 68, 4311–4320.

Zhang, T.-J., Zhou, J.-D., Zhang, W., Lin, J., Ma, J.-C., Wen, X.-M., Yuan, Q., Li, X.-X., Xu, Z.-J., and Qian, J. (2018a). H19 overexpression promotes leukemogenesis and predicts unfavorable prognosis in acute myeloid leukemia. *Clin Epigenetics* 10, 47.

**Zhang, Y., Zhang, X.-O., Chen, T., Xiang, J.-F., Yin, Q.-F., Xing, Y.-H., Zhu, S., Yang, L., and Chen, L.-L. (2013b).** Circular Intronic Long Noncoding RNAs. *Molecular Cell* 51, 792–806.

**Zhang, Z., Xie, Q., He, D., Ling, Y., Li, Y., Li, J., and Zhang, H. (2018b).** Circular RNA: new star, new hope in cancer. *BMC Cancer* 18, 834.

**Zhao, J. (2016).** Cancer stem cells and chemoresistance: The smartest survives the raid. *Pharmacol. Ther.* 160, 145–158.

**Zhao, Q.-Y., Lei, P.-J., Zhang, X., Zheng, J.-Y., Wang, H.-Y., Zhao, J., Li, Y.-M., Ye, M., Li, L., Wei, G., et al. (2016).** Global histone modification profiling reveals the epigenomic dynamics during malignant transformation in a four-stage breast cancer model. *Clin Epigenet* 8, 34.

**Zhao, Y., Feng, C., Li, Y., Ma, Y., and Cai, R. (2019).** lncRNA H19 promotes lung cancer proliferation and metastasis by inhibiting miR-200a function. *Mol. Cell. Biochem.* 460, 1–8.

- Zheng, Z.-H., Wu, D.-M., Fan, S.-H., Zhang, Z.-F., Chen, G.-Q., and Lu, J. (2019).** Upregulation of miR-675-5p induced by lncRNA H19 was associated with tumor progression and development by targeting tumor suppressor p53 in non-small cell lung cancer. *J. Cell. Biochem.* *120*, 18724–18735.
- Zhou, S., Schuetz, J.D., Bunting, K.D., Colapietro, A.M., Sampath, J., Morris, J.J., Lagutina, I., Grosveld, G.C., Osawa, M., Nakauchi, H., et al. (2001).** The ABC transporter Bcrp1/ABCG2 is expressed in a wide variety of stem cells and is a molecular determinant of the side-population phenotype. *Nat. Med.* *7*, 1028–1034.
- Zhou, W., Ye, X.-L., Xu, J., Cao, M.-G., Fang, Z.-Y., Li, L.-Y., Guan, G.-H., Liu, Q., Qian, Y.-H., and Xie, D. (2017).** The lncRNA H19 mediates breast cancer cell plasticity during EMT and MET plasticity by differentially sponging miR-200b/c and let-7b. *Sci Signal* *10*.
- Zhou, X., Yin, C., Dang, Y., Ye, F., and Zhang, G. (2015a).** Identification of the long non-coding RNA H19 in plasma as a novel biomarker for diagnosis of gastric cancer. *Scientific Reports* *5*, 11516.
- Zhou, X., Ye, F., Yin, C., Zhuang, Y., Yue, G., and Zhang, G. (2015b).** The Interaction Between MiR-141 and lncRNA-H19 in Regulating Cell Proliferation and Migration in Gastric Cancer. *Cellular Physiology and Biochemistry* *36*, 1440–1452.
- Zhou, Y., Zhong, Y., Wang, Y., Zhang, X., Batista, D.L., Gejman, R., Ansell, P.J., Zhao, J., Weng, C., and Klibanski, A. (2007).** Activation of p53 by MEG3 non-coding RNA. *J. Biol. Chem.* *282*, 24731–24742.
- Zhou, Y.-W., Zhang, H., Duan, C.-J., Gao, Y., Cheng, Y.-D., He, D., Li, R., and Zhang, C.-F. (2016).** miR-675-5p enhances tumorigenesis and metastasis of esophageal squamous cell carcinoma by targeting REPS2. *Oncotarget* *7*, 30730–30747.
- Zhuang, M., Gao, W., Xu, J., Wang, P., and Shu, Y. (2014).** The long non-coding RNA H19-derived miR-675 modulates human gastric cancer cell proliferation by targeting tumor suppressor RUNX1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *448*, 315–322.



# **ANNEXES**



# Annexe 1

---

**Clément Lecerf**, Xuefen Le Bourhis, Eric Adriaenssens. (2019). The long non-coding RNA *H19* : an active player with multiple facets to sustain the hallmarks of cancer. Cellular and Molecular Life Sciences, 76, 4673-4687.





# The Long Non-Coding RNA *H19* : an Active Player with Multiple Facets to Sustain the Hallmarks of Cancer

Clément Lecerf<sup>1, 2</sup>, Xuefen Le Bourhis<sup>1, 2</sup>, Eric Adriaenssens<sup>1, 2, \*</sup>

<sup>1</sup> INSERM U908, 59655 Villeneuve d'Ascq, France ; [clement.lecerf@univ-lille.fr](mailto:clement.lecerf@univ-lille.fr) (C.L.) ; [xuefen.le-bourhis@univ-lille.fr](mailto:xuefen.le-bourhis@univ-lille.fr) (X.L.B.)

<sup>2</sup> University of Lille, 59655 Villeneuve d'Ascq, France

\* Correspondence: [eric.adriaenssens@univ-lille.fr](mailto:eric.adriaenssens@univ-lille.fr); +33 3 20 33 64 06

**Keywords:** lncRNA, *H19*, hallmarks of cancer, proliferation, metastasis, miRNA

## **Abstract**

Cancer cells exhibit hallmarks in terms of proliferation, resistance to cell death, angiogenesis, invasion, metastasis, and genomic instability. Despite the progress in cancer research and the comprehension of tumorigenesis mechanisms, cancer remains a major issue in public health. A better understanding of the molecular factors associated with the appearance or progression of cancer may allow the development of therapeutic alternatives. Increasing data highlight the role of long non-coding RNAs in many diseases, including cancer. The long non-coding RNA *H19* was the first discovered riboregulator, and it has been shown to be involved at multiple steps of tumorigenesis. Indeed, this lncRNA exerts its action at various molecular scales. Understanding the role of *H19* in cancer progression may allow to set up therapeutic strategies to prevent tumor expansion and metastatic dissemination. In this review, we will summarize the overexpression of the long non-coding RNA *H19* in several types of cancer, and the multiple implications of the long non-coding RNA *H19* in the different hallmarks that define human cancer.

Since its very beginning, the comprehension of molecular and cellular mechanisms that underpin the apparition and evolution of cancer has considerably evolved, and keeps moving. The study of these physiopathological events has been marked in the 1970s by the discovery of the first “cancer-triggering” genes, called oncogenes, and then by their opposites named tumor suppressor genes. The conceptual framework of tumorigenesis thus involves a random intervention of genes that manage essential biological processes such as proliferation, cell death, senescence, motility and invasion. During cancer development, cells will acquire specific genetic features, increase their proliferative potential, evade cell death control and immune system vigilance, but also adapt their own metabolism. In 2000, Hanahan and Weinberg enumerated six cancer cell features that would be considered as hallmarks : sustained proliferative signalling, evasion of growth suppressors, replicative immortality, activation of invasion and metastasis, induction of angiogenesis and resistance to cell death [1]. With recent progress in the field of cancer research came the proposal that tumors are more than masses of proliferating cancer cells, and are a lot more like hierarchical structures composed of multiple cell types that interact with each other. Accordingly, Hanahan and Weinberg added 4 more hallmarks in 2011: avoiding of immune destruction, tumor-promoting inflammation, genome instability and mutation, and the deregulation of cell energetics [2]. All these hallmarks are considered as distinctive and complementary capabilities that enable tumor growth and metastatic dissemination.

The Encyclopedia of DNA Elements (ENCODE) consortium exposed that nearly 80% of the human genome is transcribed into functional RNAs, but only 2% of the genome codes for proteins [3–5]. From this analysis have been highlighted RNAs that are not translated called non-coding RNAs (ncRNAs). These ncRNAs are classified according to their length in small ncRNAs (less than 200 nt) and long ncRNAs (more than 200 nt). Small ncRNAs regroup microRNAs (miRNAs), small interfering RNAs (siRNAs), PIWI-interacting RNAs (piRNAs) that are involved in gene expression regulation, and small nucleolar RNAs (snoRNAs) that act as guides to induce chemical modification of other RNAs [6]. Among long ncRNAs, approximatively 20.000 have been identified as potentially functional and subject to transcriptional regulation by transcription factors and epigenetic modifications [7]. They exhibit classical features of mRNAs such as transcription by RNA polymerase II, 5' capping, 3' polyadenylation, and splicing [8,9]. Long ncRNAs are increasingly described to be involved not only in normal development but also in the development of several pathologies, like neurological disorders [10,11],

diabetes [12] and cancers [13].

Interestingly, embryonic cells and cancer cells share similar features including active proliferation, plasticity, invasive behaviours and gene expression profiles, all being coordinated by common molecular pathways and epigenetic regulation [14]. One of the common regulators during embryonic development and tumorigenesis is the long non-coding RNA *H19*, encoded by the *H19* gene, which is subject to genome imprinting and is maternally expressed [15]. The *H19* gene is localized near the telomeric region of chromosome 11p15, within a unique locus shared with the *IGF2* gene. Alterations of gene expression at the *H19/IGF2* locus are associated to malignancies and developmental disorders [16]. The long non-coding RNA *H19* of 2,3 kb is transcribed by the RNA polymerase II, polyadenylated, capped and spliced with conserved secondary RNA structure, and was proposed for the first time by Brannan *et al.* to act as a riboregulator [17].

The aim of this review is to give an overview of the long non-coding RNA *H19* expression in cancer, and to highlight its impact on the hallmarks of cancer.

### **I – Overexpression of the long non-coding RNA *H19* in cancer**

*H19* is expressed during embryonic development and repressed after birth, excepted for some tissues like mammary gland and uterus [18]. However, it is expressed *de novo* in cancers of different tissue origins including breast, liver, lung and esophageal cancers [19–26]. A meta-analysis using 10 studies of various solid cancers showed that patients with high expression of *H19* have a poor prognosis [27]. More recently, *H19* overexpression was reported to be correlated with lower complete remission rate and shorter overall survival of acute myeloid leukemia patients [28]. *H19* overexpression and its known biological effects in cancer cells are summarized in Table 1.

*H19* expression in cancer cells is modulated by different stimuli including hypoxia, inflammation, cytokines/growth factors and therapeutic agents (Table 1). *H19* exerts its diverse actions by interacting with proteins or with miRNAs as a sponge (Table 2) [77]. *H19* is also a precursor of miR-675 [78], that is increasingly found to be involved in physiological processes and cancer development. However, the targets of miR-675 differ according to cancer type, and are listed in Table 3.

## **II – Implication of the long non-coding RNA *H19* in the hallmarks of cancer**

### **1. Sustaining proliferative signalling**

Proliferation is considered as the most fundamental trait of cancer cells. In normal cells, the regulation of proliferation is stringent, fully controlled and involved at multiple levels. Production and signalling of growth-promoting factors that modulate entry into and progression through cell division cycles have to be strictly controlled to ensure tissue homeostasis (cell number, tissue architecture and function). In cancer cells, this control system is altered. *H19* is found to sustain cell proliferation in different types of cancers (Table 1). For example, *H19* expression is correlated with an increased proliferation of gastric cancer cells, through its association with p53 protein [47]. Moreover, Liu *et al.* reported that curcumin reduces gastric cancer cells proliferation through inhibiting *H19* expression ; accordingly, ectopic overexpression of *H19*, or c-Myc-induced *H19* expression impedes the growth inhibitory effect of curcumin [88]. Still in gastric cancer, miR-141 binds to *H19* and suppresses its expression, leading to a reduced cell proliferation [80].

It has been shown that *H19* can sustain cancer cell growth through several mechanisms (Fig. 1). *H19* can promote cell cycle progression through G1/S transition. Knockdown of *H19* in esophageal squamous cell carcinoma results in the inhibition of cell growth *in vitro* and *in vivo* by the induction of a G0/G1 arrest [32]. Our team showed that *H19*, activated by the transcription factor E2F1, promotes cell proliferation by facilitating G1/S transition in breast cancer cells [40] (Fig. 1A). Knockdown of *H19* induces cell accumulation in G0/G1 in pancreatic ductal adenocarcinoma, resulting in a slower tumor growth in mice. Interestingly, in this model, *H19* knockdown downregulates E2F1 levels, and E2F1 knockdown reduces *H19* expression, indicating an activation loop of cell cycle progression [62]. *H19* can also stimulate cell cycle progression through the sequestration of eIF4A3, which controls pre-mRNA splicing, in colorectal cancer cells (Fig. 1A). This leads to a reduced expression of cell cycle regulatory genes, including *CCND1*, *CCNE1*, and *CDK4* [67].

*H19* can also promote cancer cell proliferation by sponging miRNAs. In colorectal cancer, miR-200a decreases cell proliferation by inhibiting  $\beta$ -catenin expression. *H19* is able to sponge miR-200a (Fig. 1B), and thereby enhance  $\beta$ -catenin expression and activity to promote cell proliferation [68]. DNMTs are critical for *de novo* DNA methylation, that ensure a main epigenetic code controlling the transcription profile. Notably, DNMTs allow the expression of

growth-promoting genes. DNMT1 is downregulated by miR-152 in breast cancer cells. *H19* sponges miR-152 (Fig. 1B), allowing DNMT1 expression and function to enhance cell proliferation [29]. Similarly, DNMT3B is transcriptionally repressed by miR-29b-3p in bladder cancer cells. *H19* can sponge miR-29b-3p, leading to the re-expression of DNMT3B and the stimulation of cell proliferation [64].

## **2. Evading growth suppressors**

In addition to the presence of positive regulators, cancer cells have to override mechanisms that curb cell proliferation. Many of these control systems are based on molecular actors such as tumor suppressors (like p53 and RB), or other elements with an antiproliferative effect. In this context, *H19* can physically interact with p53 protein to suppress its activation (Fig. 2A), thus increasing proliferation of gastric cancer cells [47]. On the other hand, PHB1, a mitochondrial chaperone with diverse functions including cell proliferation, apoptosis, and mitochondrial homeostasis has been reported as a negative regulator of hepatocellular carcinoma [53]. It was found that the expression level of *H19* negatively correlates with that of *PHB1* in human hepatocellular carcinoma [53]. *H19* silencing induces *PHB1* expression and prevents *PHB1* knockdown-mediated growth, whereas *H19* overexpression induces the reverse effect, indicating the ability of *H19* to override the tumor suppressing activity of PHB1 (Fig. 2B). In human glioma cell lines, *H19* is able to sponge miR-152 (which is known as a tumor suppressor by targeting proliferation and invasion factors such as DNMT1 or PIK3R3 [29,89]) to downregulate its activity and promote glioma cells proliferation (Fig. 2C) [79].

*H19* can also favour the evasion from growth suppressors *via* its product miR-675 (Fig. 2D), which downregulates RB protein expression in colorectal cancer cells and hepatocellular carcinoma cells [69,85]. Moreover, miR-675 is able to negatively regulate RUNX1 expression in gastric cancer cells, leading to the activation of AKT/mTOR pathway and the progression of gastric cancer [48].

## **3. Resisting cell death**

Programmed cell death by apoptosis is a natural multistep process that plays an important role in the development and life of multicellular organisms, by eliminating damaged cells through a fine-tuned regulatory mechanism. Cancer cells exhibit enhanced tolerance to both environmental and genomic stresses, resulting in resistance to apoptosis and tumor

progression.

It has been shown that *H19* knockdown upregulates expression of pro-apoptotic genes (*DDIT3*, *CASP3*) [90], and leads to cholangiocarcinoma cells apoptosis [60]. Furthermore, *H19* decreases caspase 3 cleavage in pancreatic ductal carcinoma cell lines (Fig. 3A), thus avoiding apoptosis [62]. SIRT1, the histone deacetylase that mediates heterochromatin formation and reduces tumor suppressors expression, is targeted by miR-138-5p in cervical cancer cells to enhance apoptosis (Fig. 3B). *H19* will serve as an endogenous sponge to downregulate miR-138-5p and attenuate its suppressive effect [70]. The expression levels of *H19* and miR-675 are negatively correlated with FADD expression level in gastric cancer. miR-675 targets FADD (Fig. 3D) and inhibits caspases 8 and 3 [49].

There are evidences that *H19* is involved in drug resistance. Overexpression of *H19* in lung adenocarcinoma is associated with acquired resistance to cisplatin and correlated with the patients' clinical response to cisplatin-based chemotherapy [36]. Knockdown of *H19* in glioblastoma leads to increased apoptosis due to temolozomide treatment, suggesting the role of *H19* in the anti-apoptotic process of glioblastoma cells [91]. In Bcr-Abl-positive leukemic cells, c-Myc-induced expression of *H19* enhances cell survival. Silencing of *H19* results in the imatinib-induced apoptosis of leukemic cells and the inhibition of tumor growth induced by Bcr-Abl [73]. *H19* silencing in ovarian cancer cell lines induces cell apoptosis characterized by an enhanced expression of the pro-apoptotic protein Bax and a decreased expression of the anti-apoptotic protein Bcl2, as well as the activation of caspases 9 and 3 [71]. In ER $\alpha$ + breast cancer cells, *H19* expression is linked to paclitaxel resistance (Fig. 3C). *H19* is involved in the epigenetic silencing of *BIK*, and contributes to attenuate the apoptosis response [43]. The expression of *H19* is suppressed in breast cancer cells by Huaier extract (aqueous extract of *Trametes robiniophila murr*, used in China for cancer complementary therapy) to promote anti-tumor effects. Interestingly, Huaier extract enhances Cbl expression, that our team previously demonstrated as a miR-675-5p direct target (Fig. 3D) [82].

#### **4. Enabling replicative immortality**

Linked to their proliferative potential, cancer cells require to replicate endlessly in order to generate macroscopic tumors. This goes against normal cells standards, which divide a limited number of times before undergo senescence and/or cell death.

It is now known that the protection of chromosomes' ends by telomeres plays a major role in

the unlimited replicative potential [92]. Telomeres are constituted by the repetition of multiple tandem hexamers and have an outward 3' strand that presents a loop structure to protect them from nucleases. In normal (non-immortalized) cells, telomeres are shortened through cycles of replication. The number of cell generations is thereby dictated by the length of telomeric DNA. Telomeres erosion triggers entrance into replicative senescence and potentially cell death. Telomerase is a RNA-dependent DNA polymerase specific of telomeres. This enzyme adds telomere repeats segments to the ends of telomeric DNA. It is absent from non-immortalized cells but found at significant levels in immortalized cells, including cancer cells. The extension of telomeres length by telomerase is thus a “counter-attack” of cancer cells to avoid induction of senescence and/or apoptosis. Telomerase is composed of 2 major subunits: TERT (telomerase reverse transcriptase) that carries the DNA polymerase activity, and TERC (telomerase RNA component) that serves as a matrix for telomeric sequences. Recent studies highlighted the role of *H19* in the regulation of telomerase activity, but opposite models have been proposed. In liver cancer, the non-coding RNA *CUDR* (Cancer Up-regulated Drug Resistant) associates with cyclin D1 and PTEN in an inactive trimeric complex. The decrease of PTEN leads to increase the binding capacity of *CUDR* to cyclin D1, thus forming an active dimer. *CUDR* and cyclin D1 accelerate the proliferation of liver cancer stem cells by demethylating *H19* promoter. *H19* expression allows the enhancement of telomerase activity by promoting TERT/TERC complex formation and inhibiting TERT/TERRA (Telomeric repeat-containing RNA, a telomeric long non-coding RNA) complex formation [54]. El Hajj *et al.* studied for their part the effects of All-trans retinoic acid (ATRA) treatment in acute promyelocytic leukemic cell lines resistant to retinoids. ATRA is associated with TERT repression, and induces *H19* expression. *H19* thus induces the inhibition of telomerase activity by disassembling the telomerase complex TERT/TERC. According to El Hajj *et al.*, *H19* would function as a molecular chaperone able to promote either the association or the dissociation of TERT to TERC, and thereby telomerase activity, depending on the cellular context [74].

## **5. Inducing angiogenesis**

As long as tumor size remains small, cancer growth does not depend on blood supply, as cells can be sufficiently supplied with oxygen and nutrients *via* diffusion. However, when tumor grows beyond a few millimeters, it triggers an angiogenic switch to form blood vessels within the tumor, allowing for supplies of nutrients and oxygen, as well as an evacuating arrangement



for metabolic wastes. Tumor angiogenesis is driven by numerous cytokines, chemokines and growth factors such as VASH 2 (vasohibin 2).

Stable overexpression of *H19* promotes tumor formation of glioblastoma cells in mice [31]. CD90+ liver cancer cells are cancer stem cells-like and show a mesenchymal phenotype. Conigliaro *et al.* have shown that CD90+ cells express *H19* and release it *via* active production of exosomes. *H19* will stimulate angiogenesis and promote cell adhesion to endothelial cell monolayer [55]. *H19* can also enhance tumor angiogenesis by sponging miRNAs. *H19* sponges miR-29a, resulting in an overexpression of VASH2 in glioma microvessels and glioma-associated endothelial cells, to favour tumor-induced endothelial cell proliferation and tube formation *in vitro* [30].

Halofuginone, a quinazolinone alkaloid isolated from the plant *dicroa febrifuga*, can be used in bladder carcinoma cells to suppress extracellular matrix deposition and cell proliferation. This negative effect is accompanied by a marked decrease in blood vessel density and in *H19* gene expression, suggesting a role for *H19* in bladder carcinoma angiogenesis [65].

## 6. Activating invasion and metastasis

Metastasis is a multi-step process including *i*) invasion of tissues surrounding the primary tumor, *ii*) escape of the tumor site *via* the lymphatic circulation of blood vessels, *iii*) extravasation from the blood vessels to colonize distant organs and *iv*) formation of secondary tumors. During this process, cancer cells modify their microenvironment in order to make it permissive and conducive to their growth. In return, tumor microenvironment contributes to cancer cells migration and invasion. Our team previously showed that in response to HGF/SF, *H19* is able to modify cell morphology and enhance their migratory potential [93]. *H19* expression correlates with metastatic potential of breast cancer cells and is found in common metastatic sites according to primary tumor localization [39]. We also demonstrated that the lncRNA *91H*, the *H19* antisense RNA, is able to increase oncogenic properties of breast cancer cells by enhancing migration and invasion *in vitro* and metastasis in xenografted mouse model [44].

During the first steps of metastasis, carcinoma cells are induced to suppress their epithelial features and upregulate mesenchymal gene expression programs to acquire a new fibroblastic-like phenotype. This phenotypic plasticity, named epithelial-to-mesenchymal transition (EMT), enables cancer cells to invade and disseminate. Several well-known EMT

inducers like TGF- $\beta$ , hypoxia, HGF/SF, or multi-drug resistance were reported to increase *H19* gene expression [39,45,93]. Xu *et al.* showed that inhibition of *H19* in cholangiocarcinoma reverses EMT and represses cell migration and invasion *in vitro* [60]. *H19* can promote EMT by modulating factors like cell adhesion molecules. In bladder cancer, *H19* associates with EZH2, the catalytic subunit of PRC2 complex, to induce chromatin condensation at the promoter of *CDH1*, and a decrease of E-cadherin expression (Fig. 4A). This leads to the promotion of bladder cancer cell metastasis [66]. Zhang *et al.* showed that *H19* promotes tumor growth and metastasis of tongue squamous cell carcinoma through its association with EZH2. Downregulation of *H19* impedes  $\beta$ -catenin/GSK-3 $\beta$  activation, and modulates the expression of mesenchymal/epithelial markers to reverse EMT [33]. *H19* also represses E-cadherin expression in human esophageal cancer cell lines, and enhances vimentin and fibronectin expression [34] (Fig. 4C). Knockdown of *H19* in this model suppresses cell migration and invasion [32]. *H19* acts as a ceRNA in osteosarcoma cells to suppress miR-200 family and increase the expression of ZEB1 and ZEB2 (Fig. 4B), thereby promoting cell migration and invasion [75]. *H19* can also regulate expression of DNMT3B and EMT-associated proteins by sponging miR-29b-3p. This repression enhances migration and invasion of bladder cancer cells [64]. miR-29b-3p is also targeted by *H19* in clear cell renal cell carcinoma to upregulate E2F1 (Fig. 4B), thus promoting migration and invasion [63].

The expression of miR-675 in ovarian carcinoma cells downregulates the slug transcription factor expression (Fig. 4D), creating a *H19*-slug positive loop involved in the suppression of E-cadherin expression [39]. Similarly, *H19*/miR-675 upregulation promotes gastric cancer cell migration and invasion *in vitro* [50]. *H19* is also able to cooperate with PEG10 (paternally expressed gene 10) to promote gastric cancer cells transformation, invasion and anchorage-independent growth [51]. c-Cbl and Cbl-b are involved in the degradation of tyrosine kinase receptors after their activation by growth factors. Our team showed that in breast cancer cells, miR-675 targets c-Cbl and Cbl-b expression to induce the activation of AKT and ERK pathways (Fig. 4E), which in turn increase metastatic potential of breast cancer cells [45].

Interestingly, Wang *et al.* showed that miR-675 expression could have opposite effects. The miR-675-5p targets miR-200 expression through an increased expression of ZEB1 and ubiquitin-like UBQLN1 protein. This leads to the inhibition of cell migration and invasion in pancreatic ductal adenocarcinoma [94]. According to the authors, contrary findings about *H19* and miR-675 mechanisms of action in pancreatic cancer may be due to different cell lines used

and the respective levels of *H19* expression. However, these results contribute to the complexity and plasticity of *H19* mechanisms of action in cancer.

## 7. Genomic instability and mutation

Genomic instability and mutation of cancer cells constitute the first of cancer “emerging hallmarks” defined by Hanahan and Weinberg [2]. It is considered as the triggering element of all previous hallmarks: the induction of genome mutations would confer selective advantage to cancer cells and their progeny, allowing them to multiply and take over normal cells in a local tissue environment. These modulations can be characterized by the inactivation of tumor suppressor genes, or perturbation of epigenetic mechanisms such as DNA methylation. Genomic instability can also concern chromosomal organization. In somatic cells, chromosomal stability and the number of chromosomes pairs are essential features during cell cycle to prevent DNA damages or flawed replication.

In this context, Wolanin *et al.* showed that the use of curcumin downregulates survivin expression, leading to polyploid formation and defects in chromosome segregation in Bcr-Abl expressing cells. Curcumin disrupts cell cycle regulation and blocks cells in G2/M phase, resulting in the accumulation of abnormalities of mitosis and cytokinesis, and then in apoptosis. [95]. Moreover, curcumin was proved by Kujundžić *et al.* to downregulate the transcription of both *H19* and DNA topoisomerase II alpha (TOPO2A) in several tumor cell lines [96]. Ravid *et al.* showed that adipose-derived mesenchymal stem cells stably retain their diploid state under various culture conditions. This ability is associated with a reduced *H19* expression and a higher basal activity of p53 protein [97]. Shoshani *et al.* studied for their part polyploid mesenchymal stem cells, illustrating that polyploid condition maintains a non-tumorigenic state. They revealed that *H19* expression differs between diploid and polyploid cultured mesenchymal stem cells, and that *H19* suppression is associated with a tetraploidization of diploid cells and a reduced tumorigenic potential.

Benzo[ $\alpha$ ]pyrene (B $\alpha$ P) is a carcinogen molecule that enhances the interaction between *H19* and SAHH (S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase, the methyl cycle enzyme). Fu *et al.* studied the effects of B $\alpha$ P treatment in human lung-derived cells *in vitro*, and showed that the *H19*/SAHH interaction following the treatment inhibits the methyltransferase activity of SAHH. This leads to the demethylation of Long Interspersed Element-1 (LINE-1), which has a retrotranscription activity. Hypomethylation of LINE-1 leads to chromosomal instability and in

several genomic alterations such as deletion, amplification, and translocation, and has been reported as a marker of poor prognosis in lung cancer [98]. Thus, *H19* is able to disrupt the genome stability and induce mutations in cancer cells [37].

In an interesting way, DNA demethylation of rhabdomyosarcoma (RMS) cells due to 5-azacytidine treatment upregulates miR-675 expression. This overexpression has been shown to inhibit cell growth through loss of imprinting at the *H19-IGF2* locus : *H19* is re-expressed and IGF2 is downregulated. Tarnowski *et al.* show that miR-675 overexpression in RMS cells impairs insulin signalling in repressing IGF1R and insulin receptor expression [99]. However, the authors highlight the putative role of several other genes demethylation that could contribute to this phenomenon.

## **8. Tumor-promoting inflammation**

The promotion of inflammation would seem paradoxical for a phenomenon like tumorigenesis, but immune cells have been shown to have functionally important effects on tumor progression [100]. Indeed, an immunosuppressive microenvironment will be generated by the tumor, thereby preventing its infiltration by immune effector cells. However, cancer cells promote the recruitment of macrophages and regulatory T cells that inhibit antitumoral immune response. These cells will release mutagenic factors (such as ROS) or other inflammatory factors (like TNF- $\alpha$ ) that enhance the malignancy evolution of surrounding cells [101].

There is few data available about the link between *H19* and cancer inflammation. *H19* has been shown to influence inflammation-associated pathways initiated by oxidative stress in cholangiocarcinoma cells. Indeed, *H19* sponges let-7a/let-7b miRNAs to upregulate IL-6 expression and enhance chronic inflammation response to the tumor micro-environment [61]. However, the existence of inflammation processes involving *H19* in other models (pathological or not) can bring us to think that it could exist similar mechanisms in cancer.

## **9. Deregulating cellular energetics**

In normal cells, the oxygen availability conditions the process of glucose: under aerobic context, glucose is processed *via* glycolysis in pyruvate and then in carbon dioxide through Krebs cycle, and is dispatched to the respiratory chain in mitochondria. Under anaerobic context, pyruvate is processed in lactate, that characterizes fermentation. Cancer cells energy

metabolism does not follow that logic: even in presence of oxygen, cancer cells can reprogram their glucose metabolism, and thus their energy production, by favoring glycolysis, in a state called “aerobic glycolysis”. This allows the redirection of glycolysis intermediates into various biosynthetic pathways and facilitate the generation of new cells.

Knockdown of *H19* modulates the expression of several genes involved in lipid, carbohydrate and polyamine metabolisms (such as *PLA2G4A*, *MPI*, *PYGB*) [90]. We previously saw that *H19* expression downregulates PHB1, the chaperone that maintains the functional integrity of the mitochondria [53]. In addition, it has been shown that *H19* overexpression in high-grade serous ovarian cancer promotes glutathione metabolism, that induces cisplatin resistance [72]. Moreover, *H19* enhances pyruvate dehydrogenase kinase 1 (PDK1) expression and thus promotes glycolysis in breast cancer stem cells [102].

*H19* can also act on miRNAs expression to disrupt cell energetics. *H19* sponges miR-106a-5p to upregulate E2F3 expression and promote glucose metabolism and growth of melanoma cells [76]. *H19* also modulates lipid metabolic by sponging miR-130b in ox-LDL treated macrophages from atherosclerotic patients [59].

## **10. Avoiding immune destruction**

Immune surveillance is a mechanism in which cells and tissues are checked at any time by an immune system always on alert. It recognizes and eliminates foreign bodies, putative dangers or abnormalities. To keep walking through the multiple steps of tumorigenesis, cancer cells will have to develop strategies that will dissimulate them from the immune system. In that way, solid tumors that could make it through this surveillance have handled to avoid detection or limit immunological elimination, therefore prevent cancer destruction. The immunological defecting managed by tumors is observed in some cases of cancer development in immunodeficient individuals [103]. These are generally virus-induced cancers, meaning that this class of cancers can expand depending on the reduction of viral burden in infected individuals, through eliminating virus-infected cells. Cancer cells can also escape to immune surveillance in impeding its mobilization against the tumor. As we previously said in the tumor-promoting inflammation context, tumors will generate an immunosuppressive microenvironment, that prevents its infiltration by immune effector cells. However, macrophages and regulatory T cells recruited by cancer cells inhibit antitumoral immune response: those bypassing strategies will thus allow tumor growth.

Few are known about the implication of long non-coding RNAs in the invalidation of the immune system. An emerging theory would involve lncRNAs in cases of virus-caused immunodeficiencies [104]. In other pathologies such as laryngeal squamous cell carcinoma, some immunity-associated molecules like FOXP3 or CD274, that are expressed at the surface of lymphocytes and macrophages respectively, are enhanced. However, other factors that reduce immune response such as IL-10 are upregulated and negatively associated with patient's survival, meaning that a program leading to the immune response avoidance is set up. Sun *et al.* showed that a ceRNA network, including several lncRNAs like *H19*, is involved in the regulation of those molecules, thus developing an immune escape mechanism for LSCC cells [35].

## CONCLUSIONS

In this review, we highlight the upregulation of the long non-coding RNA *H19* and its strong implication in cancer progression. *H19* acts through various mechanisms such as interaction with proteins and/or miRNAs or the action of *H19*-derived miR-675 to sustain the hallmarks of cancer (Fig. 5). The presence of *H19* in exosomes, involved in tumor progression, reinforces its importance in this pathology. Although further studies are needed to deepen our knowledge on the function of *H19* in a more integrative manner, *H19* has already attracted strong interest in terms of clinical application. Thus, plasma levels of *H19* have been proposed as a predictive marker for breast, stomach and lung cancers and as a tool to monitor the evolution of cancer [38,46,52]. Moreover, by using a plasmid approach that allows the expression of diphtheria toxin A-chain gene under the control of *H19* promoter (DTA-*H19*/BC-819) to selectively kill *H19*-expressing cells, Sorin *et al.* showed a significant reduction of liver metastasis growth in treated animals [105]. This strategy is currently in phase 2b clinical trial for bladder cancer and in phase 1/2a trial for ovarian and pancreatic cancers [106,107]. Clearly, a better understanding of the mechanisms of action of *H19* and the molecular pathways altered by *H19* or miR-675 could provide new therapeutic targets and strategies in the development of personalized management of cancer.

## **References**

- [1] Hanahan D, Weinberg RA. The Hallmarks of Cancer. *Cell* 2000;100:57–70. doi:10.1016/S0092-8674(00)81683-9.
- [2] Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of Cancer: The Next Generation. *Cell* 2011;144:646–74. doi:10.1016/j.cell.2011.02.013.
- [3] The ENCODE Project Consortium. Identification and analysis of functional elements in 1% of the human genome by the ENCODE pilot project. *Nature* 2007;447:799–816. doi:10.1038/nature05874.
- [4] Qu H, Fang X. A Brief Review on the Human Encyclopedia of DNA Elements (ENCODE) Project. *Genomics Proteomics Bioinformatics* 2013;11:135–41. doi:10.1016/j.gpb.2013.05.001.
- [5] Kapranov P, Cheng J, Dike S, Nix DA, Dutttagupta R, Willingham AT, et al. RNA Maps Reveal New RNA Classes and a Possible Function for Pervasive Transcription. *Science* 2007;316:1484–8. doi:10.1126/science.1138341.
- [6] Scott MS, Ono M. From snoRNA to miRNA: Dual function regulatory non-coding RNAs. *Biochimie* 2011;93:1987–92. doi:10.1016/j.biochi.2011.05.026.
- [7] Hon C-C, Ramilowski JA, Harshbarger J, Bertin N, Rackham OJL, Gough J, et al. An atlas of human long non-coding RNAs with accurate 5' ends. *Nature* 2017;543:199–204. doi:10.1038/nature21374.
- [8] Wu H, Yang L, Chen L-L. The Diversity of Long Noncoding RNAs and Their Generation. *Trends Genet* 2017;33:540–52. doi:10.1016/j.tig.2017.05.004.
- [9] Quinn JJ, Chang HY. Unique features of long non-coding RNA biogenesis and function. *Nat Rev Genet* 2016;17:47–62. doi:10.1038/nrg.2015.10.
- [10] Luo Q, Chen Y. Long noncoding RNAs and Alzheimer's disease. *Clin Investig Aging* 2016;11:867–72.
- [11] Huang X, Luo Y, Mao Y, Ji J. The link between long noncoding RNAs and depression. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 2017;73:73–8. doi:10.1016/j.pnpbp.2016.06.004.
- [12] Mirza AH, Kaur S, Pociot F. Long non-coding RNAs as novel players in  $\beta$  cell function and type 1 diabetes. *Hum Genomics* 2017;11. doi:10.1186/s40246-017-0113-7.
- [13] Bhan A, Soleimani M, Mandal SS. Long Noncoding RNA and Cancer: A New Paradigm. *Cancer Res* 2017;77:3965–81. doi:10.1158/0008-5472.CAN-16-2634.
- [14] Ma Y, Zhang P, Wang F, Yang J, Yang Z, Qin H. The relationship between early embryo development and tumorigenesis. *J Cell Mol Med* 2010;14:2697–701. doi:10.1111/j.1582-4934.2010.01191.x.
- [15] Bartolomei MS, Zemel S, Tilghman SM. Parental imprinting of the mouse H19 gene. *Nature* 1991;351:153.
- [16] Delaval K, Wagschal A, Feil R. Epigenetic deregulation of imprinting in congenital diseases of aberrant growth. *BioEssays News Rev Mol Cell Dev Biol* 2006;28:453–9. doi:10.1002/bies.20407.

- [17] Brannan CI, Dees EC, Ingram RS, Tilghman SM. The product of the H19 gene may function as an RNA. *Mol Cell Biol* 1990;10:28–36. doi:10.1128/MCB.10.1.28.
- [18] Vennin C, Dahmani F, Spruyt N, Adriaenssens E. Role of long non-coding RNA in cells: Example of the H19/IGF2 locus. *Adv Biosci Biotechnol* 2013;04:34–44. doi:10.4236/abb.2013.45A004.
- [19] Rainier S, Johnson LA, Dobry CJ, Ping AJ, Grundy PE, Feinberg AP. Relaxation of imprinted genes in human cancer. *Nature* 1993;362:747–9. doi:10.1038/362747a0.
- [20] Raveh E, Matouk IJ, Gilon M, Hochberg A. The H19 Long non-coding RNA in cancer initiation, progression and metastasis – a proposed unifying theory. *Mol Cancer* 2015;14. doi:10.1186/s12943-015-0458-2.
- [21] Adriaenssens E, Dumont L, Lottin S, Bolle D, Leprêtre A, Delobelle A, et al. H19 Overexpression in Breast Adenocarcinoma Stromal Cells Is Associated with Tumor Values and Steroid Receptor Status but Independent of p53 and Ki-67 Expression. *Am J Pathol* 1998;153:1597–607.
- [22] Lottin S, Adriaenssens E, Dupressoir T, Berteaux N, Montpellier C, Coll J, et al. Overexpression of an ectopic H19 gene enhances the tumorigenic properties of breast cancer cells. *Carcinogenesis* 2002;23:1885–95. doi:10.1093/carcin/23.11.1885.
- [23] Cooper MJ, Fischer M, Komitowski D, Shevelev A, Schulze E, Ariel I, et al. Developmentally imprinted genes as markers for bladder tumor progression. *J Urol* 1996;155:2120–7.
- [24] Ariel I, Miao HQ, Ji XR, Schneider T, Roll D, Groot N de, et al. Imprinted H19 oncofetal RNA is a candidate tumour marker for hepatocellular carcinoma. *Mol Pathol* 1998;51:21–5. doi:10.1136/mp.51.1.21.
- [25] Kondo M, Suzuki H, Ueda R, Osada H, Takagi K, Takahashi T, et al. Frequent loss of imprinting of the H19 gene is often associated with its overexpression in human lung cancers. *Oncogene* 1995;10:1193–8.
- [26] Hibi K, Nakamura H, Hirai A, Fujikake Y, Kasai Y, Akiyama S, et al. Loss of H19 Imprinting in Esophageal Cancer. *Cancer Res* 1996;56:480–2.
- [27] Liu F, Pan H, Xia G, Qiu C, Zhu Z. Prognostic and clinicopathological significance of long noncoding RNA H19 overexpression in human solid tumors: evidence from a meta-analysis. *Oncotarget* 2016;7:83177–86. doi:10.18632/oncotarget.13076.
- [28] Zhang T, Zhou J, Zhang W, Lin J, Ma J, Wen X, et al. H19 overexpression promotes leukemogenesis and predicts unfavorable prognosis in acute myeloid leukemia. *Clin Epigenetics* 2018;10. doi:10.1186/s13148-018-0486-z.
- [29] Li Z, Li Y, Li Y, Ren K, Li X, Han X, et al. Long non-coding RNA H19 promotes the proliferation and invasion of breast cancer through upregulating DNMT1 expression by sponging miR-152. *J Biochem Mol Toxicol* 2017;31:e21933. doi:10.1002/jbt.21933.
- [30] Jia P, Cai H, Liu X, Chen J, Ma J, Wang P, et al. Long non-coding RNA H19 regulates glioma angiogenesis and the biological behavior of glioma-associated endothelial cells by inhibiting microRNA-29a. *Cancer Lett* 2016;381:359–69. doi:10.1016/j.canlet.2016.08.009.



- [31] Jiang X, Yan Y, Hu M, Chen X, Wang Y, Dai Y, et al. Increased level of H19 long noncoding RNA promotes invasion, angiogenesis, and stemness of glioblastoma cells. *J Neurosurg* 2016;124:129–36. doi:10.3171/2014.12.JNS1426.
- [32] Tan D, Wu Y, Hu L, He P, Xiong G, Bai Y, et al. Long noncoding RNA H19 is up-regulated in esophageal squamous cell carcinoma and promotes cell proliferation and metastasis. *Dis Esophagus* 2017;30:1–9. doi:10.1111/dote.12481.
- [33] Zhang D-M, Lin Z-Y, Yang Z-H, Wang Y-Y, Wan D, Zhong J-L, et al. lncRNA H19 promotes tongue squamous cell carcinoma progression through  $\beta$ -catenin/GSK3 $\beta$ /EMT signaling via association with EZH2. *Am J Transl Res* 2017;9:3474–86.
- [34] Huang C, Cao L, Qiu L, Dai X, Ma L, Zhou Y, et al. Upregulation of H19 promotes invasion and induces epithelial-to-mesenchymal transition in esophageal cancer. *Oncol Lett* 2015;10:291–6. doi:10.3892/ol.2015.3165.
- [35] Sun J, Lian M, Ma H, Wang R, Ma Z, Wang H, et al. Competing endogenous RNA network analysis of CD274, IL-10 and FOXP3 co-expression in laryngeal squamous cell carcinoma. *Mol Med Rep* 2018;17:3859–69. doi:10.3892/mmr.2017.8307.
- [36] Wang Q, Cheng N, Li X, Pan H, Li C, Ren S, et al. Correlation of long non-coding RNA H19 expression with cisplatin-resistance and clinical outcome in lung adenocarcinoma. *Oncotarget* 2016;8:2558–67. doi:10.18632/oncotarget.13708.
- [37] Fu Y, Wang W, Li X, Liu Y, Niu Y, Zhang B, et al. lncRNA H19 interacts with S-adenosylhomocysteine hydrolase to regulate LINE-1 Methylation in human lung-derived cells exposed to Benzo[a]pyrene. *Chemosphere* 2018;207:84–90. doi:10.1016/j.chemosphere.2018.05.048.
- [38] Luo J, Li Q, Pan J, Li L, Fang L, Zhang Y. Expression level of long noncoding RNA H19 in plasma of patients with nonsmall cell lung cancer and its clinical significance. *J Cancer Res Ther* 2018;14:860–3. doi:10.4103/jcrt.JCRT\_733\_17.
- [39] Matouk IJ, Raveh E, Abu-lail R, Mezan S, Gilon M, Gershtain E, et al. Oncofetal H19 RNA promotes tumor metastasis. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Res* 2014;1843:1414–26. doi:10.1016/j.bbamcr.2014.03.023.
- [40] Berteaux N, Lottin S, Monté D, Pinte S, Quatannens B, Coll J, et al. H19 mRNA-like Noncoding RNA Promotes Breast Cancer Cell Proliferation through Positive Control by E2F1. *J Biol Chem* 2005;280:29625–36. doi:10.1074/jbc.M504033200.
- [41] Basak P, Chatterjee S, Weger S, Bruce MC, Murphy LC, Raouf A. Estrogen regulates luminal progenitor cell differentiation through H19 gene expression. *Endocr Relat Cancer* 2015;22:505–17. doi:10.1530/ERC-15-0105.
- [42] Sun H, Sun H, Wang G, Wang G, Peng Y, Peng Y, et al. H19 lncRNA mediates 17 $\beta$ -estradiol-induced cell proliferation in MCF-7 breast cancer cells. *Oncol Rep* 2015;33:3045–52. doi:10.3892/or.2015.3899.
- [43] Si X, Zang R, Zhang E, Liu Y, Shi X, Zhang E, et al. lncRNA H19 confers chemoresistance in ER $\alpha$ -positive breast cancer through epigenetic silencing of the pro-apoptotic gene BIK. *Oncotarget* 2016;7:81452–62. doi:10.18632/oncotarget.13263.

- [44] Vennin C, Spruyt N, Robin Y-M, Chassat T, Le Bourhis X, Adriaenssens E. The long non-coding RNA 91H increases aggressive phenotype of breast cancer cells and up-regulates H19/IGF2 expression through epigenetic modifications. *Cancer Lett* 2017;385:198–206. doi:10.1016/j.canlet.2016.10.023.
- [45] Vennin C, Spruyt N, Dahmani F, Julien S, Bertucci F, Finetti P, et al. H19 non coding RNA-derived miR-675 enhances tumorigenesis and metastasis of breast cancer cells by downregulating c-Cbl and Cbl-b. *Oncotarget* 2015;6:29209–23. doi:10.18632/oncotarget.4976.
- [46] Zhang K, Luo Z, Zhang Y, Zhang L, Wu L, Liu L, et al. Circulating lncRNA H19 in plasma as a novel biomarker for breast cancer. *Cancer Biomark* 2016;17:187–94. doi:10.3233/CBM-160630.
- [47] Yang F, Bi J, Xue X, Zheng L, Zhi K, Hua J, et al. Up-regulated long non-coding RNA H19 contributes to proliferation of gastric cancer cells. *FEBS J* 2012;279:3159–65. doi:10.1111/j.1742-4658.2012.08694.x.
- [48] Liu G, Xiang T, Wu Q-F, Wang W-X. Long Noncoding RNA H19-Derived miR-675 Enhances Proliferation and Invasion via RUNX1 in Gastric Cancer Cells. *Oncol Res Featur Preclin Clin Cancer Ther* 2016;23:99–107. doi:10.3727/096504015X14496932933575.
- [49] Yan J, Zhang Y, She Q, Li X, Peng L, Wang X, et al. Long Noncoding RNA H19/miR-675 Axis Promotes Gastric Cancer via FADD/Caspase 8/Caspase 3 Signaling Pathway. *Cell Physiol Biochem* 2017;42:2364–76. doi:10.1159/000480028.
- [50] Li H, Yu B, Li J, Su L, Yan M, Zhu Z, et al. Overexpression of lncRNA H19 enhances carcinogenesis and metastasis of gastric cancer. *Oncotarget* 2014;5:2318–29. doi:10.18632/oncotarget.1913.
- [51] Ishii S, Yamashita K, Harada H, Ushiku H, Tanaka T, Nishizawa N, et al. The H19-PEG10/IGF2BP3 axis promotes gastric cancer progression in patients with high lymph node ratios. *Oncotarget* 2017;8:74567–81. doi:10.18632/oncotarget.20209.
- [52] Zhou X, Yin C, Dang Y, Ye F, Zhang G. Identification of the long non-coding RNA H19 in plasma as a novel biomarker for diagnosis of gastric cancer. *Sci Rep* 2015;5:11516. doi:10.1038/srep11516.
- [53] Ramani K, Mavila N, Ko KS, Mato JM, Lu SC. Prohibitin 1 Regulates the H19-Igf2 Axis and Proliferation in Hepatocytes. *J Biol Chem* 2016;291:24148–59. doi:10.1074/jbc.M116.744045.
- [54] Pu H, Zheng Q, Li H, Wu M, An J, Gui X, et al. CUDR promotes liver cancer stem cell growth through upregulating TERT and C-Myc. *Oncotarget* 2015;6:40775–98. doi:10.18632/oncotarget.5805.
- [55] Conigliaro A, Costa V, Lo Dico A, Saieva L, Buccheri S, Dieli F, et al. CD90+ liver cancer cells modulate endothelial cell phenotype through the release of exosomes containing H19 lncRNA. *Mol Cancer* 2015;14. doi:10.1186/s12943-015-0426-x.
- [56] Li H, Li J, Jia S, Wu M, An J, Zheng Q, et al. miR675 upregulates long noncoding RNA H19 through activating EGR1 in human liver cancer. *Oncotarget* 2015;6:31958–84.
- [57] Song Y, Liu C, Liu X, Trottier J, Beaudoin M, Zhang L, et al. H19 promotes cholestatic liver fibrosis by preventing ZEB1-mediated inhibition of EpCAM. *Hepatol Baltim Md* 2017;66:1183–96. doi:10.1002/hep.29209.
- [58] Zhang Y, Liu C, Barbier O, Smalling R, Tsuchiya H, Lee S, et al. Bcl2 is a critical regulator of bile acid homeostasis by dictating Shp and lncRNA H19 function. *Sci Rep* 2016;6:20559. doi:10.1038/srep20559.

- [59] Han Y, Ma J, Wang J, Wang L. Silencing of H19 inhibits the adipogenesis and inflammation response in ox-LDL-treated Raw264.7 cells by up-regulating miR-130b. *Mol Immunol* 2018;93:107–14. doi:10.1016/j.molimm.2017.11.017.
- [60] Xu Y, Wang Z, Jiang X, Cui Y. Overexpression of long noncoding RNA H19 indicates a poor prognosis for cholangiocarcinoma and promotes cell migration and invasion by affecting epithelial-mesenchymal transition. *Biomed Pharmacother* 2017;92:17–23. doi:10.1016/j.biopha.2017.05.061.
- [61] Wang W-T, Ye H, Wei P-P, Han B-W, He B, Chen Z-H, et al. LncRNAs H19 and HULC, activated by oxidative stress, promote cell migration and invasion in cholangiocarcinoma through a ceRNA manner. *J Hematol Oncol* 2016;9. doi:10.1186/s13045-016-0348-0.
- [62] Ma L, Tian X, Wang F, Zhang Z, Du C, Xie X, et al. The long noncoding RNA H19 promotes cell proliferation via E2F-1 in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Cancer Biol Ther* 2016;17:1051–61. doi:10.1080/15384047.2016.1219814.
- [63] He H, Wang N, Yi X, Tang C, Wang D. Long non-coding RNA H19 regulates E2F1 expression by competitively sponging endogenous miR-29a-3p in clear cell renal cell carcinoma. *Cell Biosci* 2017;7. doi:10.1186/s13578-017-0193-z.
- [64] Lv M, Zhong Z, Huang M, Tian Q, Jiang R, Chen J. lncRNA H19 regulates epithelial–mesenchymal transition and metastasis of bladder cancer by miR-29b-3p as competing endogenous RNA. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Cell Res* 2017;1864:1887–99. doi:10.1016/j.bbamcr.2017.08.001.
- [65] Elkin M, Ariel I, Miao H-Q, Nagler A, Pines M, de-Groot N, et al. Inhibition of Bladder Carcinoma Angiogenesis, Stromal Support, and Tumor Growth by Halofuginone. *Cancer Res* 1999;59:4111–8.
- [66] Luo M, Li Z, Wang W, Zeng Y, Liu Z, Qiu J. Long non-coding RNA H19 increases bladder cancer metastasis by associating with EZH2 and inhibiting E-cadherin expression. *Cancer Lett* 2013;333:213–21. doi:10.1016/j.canlet.2013.01.033.
- [67] Han D, Gao X, Wang M, Qiao Y, Xu Y, Yang J, et al. Long noncoding RNA H19 indicates a poor prognosis of colorectal cancer and promotes tumor growth by recruiting and binding to eIF4A3. *Oncotarget* 2016;7:22159–73. doi:10.18632/oncotarget.8063.
- [68] Yang W, Ning N, Jin X. The lncRNA H19 Promotes Cell Proliferation by Competitively Binding to miR-200a and Derepressing  $\beta$ -Catenin Expression in Colorectal Cancer. *BioMed Res Int* 2017. doi:10.1155/2017/2767484.
- [69] Tsang WP, Ng EKO, Ng SSM, Jin H, Yu J, Sung JJY, et al. Oncofetal H19-derived miR-675 regulates tumor suppressor RB in human colorectal cancer. *Carcinogenesis* 2010;31:350–8. doi:10.1093/carcin/bgp181.
- [70] Ou L, Wang D, Zhang H, Yu Q, Hua F. Decreased Expression of miR-138-5p by lncRNA H19 in Cervical Cancer Promotes Tumor Proliferation. *Oncol Res Featur Preclin Clin Cancer Ther* 2018;26:401–10. doi:10.3727/096504017X15017209042610.
- [71] Zhu Z, Song L, He J, Sun Y, Liu X, Zou X. Ectopic expressed long non-coding RNA H19 contributes to malignant cell behavior of ovarian cancer. *Int J Clin Exp Pathol* 2015;8:10082–91.
- [72] Zheng Z-G, Xu H, Suo S-S, Xu X-L, Ni M-W, Gu L-H, et al. The Essential Role of H19 Contributing to Cisplatin Resistance by Regulating Glutathione Metabolism in High-Grade Serous Ovarian Cancer. *Sci Rep* 2016;6:26093. doi:10.1038/srep26093.

- [73] Guo G, Kang Q, Chen Q, Chen Z, Wang J, Tan L, et al. High expression of long non-coding RNA H19 is required for efficient tumorigenesis induced by Bcr-Abl oncogene. *FEBS Lett* 2014;588:1780–6. doi:10.1016/j.febslet.2014.03.038.
- [74] El Hajj J, Nguyen E, Liu Q, Bouyer C, Adriaenssens E, Hilal G, et al. Telomerase regulation by the long non-coding RNA H19 in human acute promyelocytic leukemia cells. *Mol Cancer* 2018;17. doi:10.1186/s12943-018-0835-8.
- [75] Li M, Chen H, Zhao Y, Gao S, Cheng C. H19 Functions as a ceRNA in Promoting Metastasis Through Decreasing miR-200s Activity in Osteosarcoma. *DNA Cell Biol* 2016;35:235–40. doi:10.1089/dna.2015.3171.
- [76] Luan W, Zhou Z, Ni X, Xia Y, Wang J, Yan Y, et al. Long non-coding RNA H19 promotes glucose metabolism and cell growth in malignant melanoma via miR-106a-5p/E2F3 axis. *J Cancer Res Clin Oncol* 2018;144:531–42. doi:10.1007/s00432-018-2582-z.
- [77] Angrand P-O, Vennin C, Le Bourhis X, Adriaenssens E. The role of long non-coding RNAs in genome formatting and expression. *Front Genet* 2015;6. doi:10.3389/fgene.2015.00165.
- [78] Cai X, Cullen BR. The imprinted H19 noncoding RNA is a primary microRNA precursor. *RNA* 2007;13:313–6. doi:10.1261/rna.351707.
- [79] Chen L, Wang Y, He J, Zhang C, Chen J, Shi D. Long non-coding RNA H19 promotes proliferation and invasion in human glioma cells by downregulating miR-152. *Oncol Res Featur Preclin Clin Cancer Ther* 2018. doi:10.3727/096504018X15178768577951.
- [80] Zhou X, Ye F, Yin C, Zhuang Y, Yue G, Zhang G. The Interaction Between MiR-141 and lncRNA-H19 in Regulating Cell Proliferation and Migration in Gastric Cancer. *Cell Physiol Biochem* 2015;36:1440–52. doi:10.1159/000430309.
- [81] Shi Y, Wang Y, Luan W, Wang P, Tao T, Zhang J, et al. Long non-coding RNA H19 promotes glioma cell invasion by deriving miR-675. *PloS One* 2014;9:e86295. doi:10.1371/journal.pone.0086295.
- [82] Wang J, Wang X, Chen T, Jiang L, Yang Q. Huaier Extract Inhibits Breast Cancer Progression Through a lncRNA-H19/MiR-675-5p Pathway. *Cell Physiol Biochem* 2017;44:581–93. doi:10.1159/000485093.
- [83] He D, Wang J, Zhang C, Shan B, Deng X, Li B, et al. Down-regulation of miR-675-5p contributes to tumor progression and development by targeting pro-tumorigenic GPR55 in non-small cell lung cancer. *Mol Cancer* 2015;14:73. doi:10.1186/s12943-015-0342-0.
- [84] Zhou Y-W, Zhang H, Duan C-J, Gao Y, Cheng Y-D, He D, et al. miR-675-5p enhances tumorigenesis and metastasis of esophageal squamous cell carcinoma by targeting REPS2. *Oncotarget* 2016;7:30730–47. doi:10.18632/oncotarget.8950.
- [85] Hernandez JM, Elahi A, Clark CW, Wang J, Humphries LA, Centeno B, et al. miR-675 Mediates Downregulation of Twist1 and Rb in AFP-Secreting Hepatocellular Carcinoma. *Ann Surg Oncol* 2013;20:625–35. doi:10.1245/s10434-013-3106-3.
- [86] Costa V, Lo Dico A, Rizzo A, Rajata F, Tripodi M, Alessandro R, et al. MiR-675-5p supports hypoxia induced epithelial to mesenchymal transition in colon cancer cells. *Oncotarget* 2017;8:24292–302. doi:10.18632/oncotarget.14464.

- [87] Gong L, Bao Q, Hu C, Wang J, Zhou Q, Wei L, et al. Exosomal miR-675 from metastatic osteosarcoma promotes cell migration and invasion by targeting CALN1. *Biochem Biophys Res Commun* 2018;500:170–6. doi:10.1016/j.bbrc.2018.04.016.
- [88] Liu G, Xiang T, Wu Q-F, Wang W-X. Curcumin suppresses the proliferation of gastric cancer cells by downregulating H19. *Oncol Lett* 2016;12:5156–62. doi:10.3892/ol.2016.5354.
- [89] Li B, Xie Z, Li B. miR-152 functions as a tumor suppressor in colorectal cancer by targeting PIK3R3. *Tumour Biol J Int Soc Oncodevelopmental Biol Med* 2016;37:10075–84. doi:10.1007/s13277-016-4888-2.
- [90] Matouk IJ, DeGroot N, Mezan S, Ayesh S, Abu-lail R, Hochberg A, et al. The H19 Non-Coding RNA Is Essential for Human Tumor Growth. *PLoS ONE* 2007;2:e845. doi:10.1371/journal.pone.0000845.
- [91] Li W, Jiang P, Sun X, Xu S, Ma X, Zhan R. Suppressing H19 Modulates Tumorigenicity and Stemness in U251 and U87MG Glioma Cells. *Cell Mol Neurobiol* 2016;36:1219–27. doi:10.1007/s10571-015-0320-5.
- [92] Blasco MA. Telomeres and human disease: ageing, cancer and beyond. *Nat Rev Genet* 2005;6:611–22. doi:10.1038/nrg1656.
- [93] Adriaenssens E, Lottin S, Berteaux N, Hornez L, Fauquette W, Fafeur V, et al. Cross-talk between mesenchyme and epithelium increases H19 gene expression during scattering and morphogenesis of epithelial cells. *Exp Cell Res* 2002;275:215–29. doi:10.1006/excr.2002.5500.
- [94] Wang J, Zhang Y, Wei H, Zhang X, Wu Y, Gong A, et al. The mir-675-5p regulates the progression and development of pancreatic cancer via the UBQLN1-ZEB1-mir200 axis. *Oncotarget* 2017;8:24978–87. doi:10.18632/oncotarget.15330.
- [95] Wolanin K, Magalska A, Mosieniak G, Klinger R, McKenna S, Vejda S, et al. Curcumin Affects Components of the Chromosomal Passenger Complex and Induces Mitotic Catastrophe in Apoptosis-Resistant Bcr-Abl-Expressing Cells. *Mol Cancer Res* 2006;4:457–69. doi:10.1158/1541-7786.MCR-05-0172.
- [96] Kujundžić RN, Grbeša I, Ivkić M, Katdare M, Gall-Trošelj K. Curcumin downregulates H19 gene transcription in tumor cells. *J Cell Biochem* 2008;104:1781–92. doi:10.1002/jcb.21742.
- [97] Ravid O, Shoshani O, Sela M, Weinstock A, Sadan T, Gur E, et al. Relative genomic stability of adipose tissue derived mesenchymal stem cells: analysis of ploidy, H19 long non-coding RNA and p53 activity. *Stem Cell Res Ther* 2014;5:139. doi:10.1186/scrt529.
- [98] Saito K, Kawakami K, Matsumoto I, Oda M, Watanabe G, Minamoto T. Long Interspersed Nuclear Element 1 Hypomethylation Is a Marker of Poor Prognosis in Stage IA Non-Small Cell Lung Cancer. *Clin Cancer Res* 2010;16:2418–26. doi:10.1158/1078-0432.CCR-09-2819.
- [99] Tarnowski M, Tarnowski M, Tkacz M, Tkacz M, Czerewaty M, Czerewaty M, et al. 5-Azacytidine inhibits human rhabdomyosarcoma cell growth by downregulating insulin-like growth factor 2 expression and reactivating the H19 gene product miR-675, which negatively affects insulin-like growth factors and insulin signaling. *Int J Oncol* 2015;46:2241–50. doi:10.3892/ijo.2015.2906.

- [100] DeNardo DG, Andreu P, Coussens LM. Interactions between lymphocytes and myeloid cells regulate pro- versus anti-tumor immunity. *Cancer Metastasis Rev* 2010;29:309–16. doi:10.1007/s10555-010-9223-6.
- [101] Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, Inflammation, and Cancer. *Cell* 2010;140:883–99. doi:10.1016/j.cell.2010.01.025.
- [102] Peng F, Wang J-H, Fan W-J, Meng Y-T, Li M-M, Li T-T, et al. Glycolysis gatekeeper PDK1 reprograms breast cancer stem cells under hypoxia. *Oncogene* 2018;37:1062–74. doi:10.1038/onc.2017.368.
- [103] Vajdic CM, Leeuwen MT van. Cancer incidence and risk factors after solid organ transplantation. *Int J Cancer* 2009;125:1747–54. doi:10.1002/ijc.24439.
- [104] Lazar DC, Morris KV, Saayman SM. The emerging role of long non-coding RNAs in HIV infection. *Virus Res* 2016;212:114–26. doi:10.1016/j.virusres.2015.07.023.
- [105] Sorin V, Ohana P, Mizrahi A, Matouk I, Birman T, Hochberg A, et al. Regional therapy with DTA-H19 vector suppresses growth of colon adenocarcinoma metastases in the rat liver. *Int J Oncol* 2011;39:1407–12. doi:10.3892/ijo.2011.1171.
- [106] Gofrit ON, Benjamin S, Halachmi S, Leibovitch I, Dotan Z, Lamm DL, et al. DNA based therapy with diphtheria toxin-A BC-819: a phase 2b marker lesion trial in patients with intermediate risk nonmuscle invasive bladder cancer. *J Urol* 2014;191:1697–702. doi:10.1016/j.juro.2013.12.011.
- [107] Lavie O, Edelman D, Levy T, Fishman A, Hubert A, Segev Y, et al. A phase 1/2a, dose-escalation, safety, pharmacokinetic, and preliminary efficacy study of intraperitoneal administration of BC-819 (H19-DTA) in subjects with recurrent ovarian/peritoneal cancer. *Arch Gynecol Obstet* 2017;295:751–61. doi:10.1007/s00404-017-4293-0.

## **Legends**

**Fig. 1.** The long non-coding RNA *H19* promotes cancer cell proliferation.

**A.** *H19* promotes the G1/S transition in breast and colorectal cancer cells, in esophageal squamous cell carcinoma and in pancreatic ductal adenocarcinoma [40,67,32,62]. **B.** *H19* sponges several miRNAs to allow  $\beta$ -catenin and DNMTs expression in colorectal, breast and bladder cancer respectively [68,29,64].

**Fig. 2.** *H19* downregulates growth suppressors.

**A.** In gastric cancer, *H19* interacts physically with p53 to inhibit its anti-proliferative activity [47]. **B.** *H19* induces the transcriptional inhibition of *PHB1* in liver cancer cells [53]. **C.** *H19* is able to sponge miR-152 and so enhance glioma cells proliferation [79]. **D.** *H19*-derived miR-675 inhibits the expression of well known growth suppressors such as RB and RUNX1 in colorectal and hepatocellular cancers, and in gastric cancer respectively [69,85,48].

**Fig. 3.** *H19* impedes cancer cell death.

**A.** In pancreatic cancer cells, *H19* prevents caspase 3 cleavage [62]. **B.** *H19* sponges miR-138-5p in cervical cancer to allow the transcription of SIRT1 [70]. **C.** *H19* is able to physically interact with PRC2 complex in order to catalyze the trimethylation of H3K27, that will lead to chromatin condensation and repression of pro-apoptotic factor *BIK* in breast cancer cells [43]. **D.** miR-675 is able to inhibit the expression of pro-apoptotic factors such as Cbl and FADD in breast and gastric cancers respectively [82,49].

**Fig. 4.** *H19* promotes the migration, invasion and metastasis of cancer cells.

**A.** In bladder cancer, *H19* is able to interact with PRC2 complex to induce chromatin condensation at the *CDH1* promoter, leading to the repression of E-cadherin [66]. **B.** *H19* sponges miR-29b-3p and miR-200 in renal cell carcinoma and osteosarcoma respectively to activate the transcription of E2F1, ZEB1 and ZEB2 [63,75]. **C.** *H19* acts as a transcriptional activator in esophageal cancer to enhance the expression of vimentin and fibronectin [34]. **D.** miR-675 represses the expression of SNAI2 in ovarian cancer to create an activation loop of the *H19* expression and repress E-cadherin expression [39]. **E.** miR-675 inhibits Cbl-b and c-Cbl expression to induce the activation of AKT and ERK pathways in breast cancer cells [45].

**Fig. 5.** Implication of the long non-coding RNA *H19* in the hallmarks of cancer.  
For each hallmark is figured a representative example of *H19* mechanism of action.



Type of cancer	Known inducers of H19 overexpression	Biological consequences and/or clinical values	Ref.
<b>Glioma</b>	/	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Increase of cell proliferation.</li> <li>• Enhancement of pro-angiogenic factors.</li> <li>• Inverse correlation with patient's survival rate.</li> </ul>	[29] [30] [31]
<b>Oral squamous cell carcinoma</b>	/	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Increase of cell proliferation.</li> <li>• Promotion of migration and invasion through epithelial-to-mesenchymal (EMT)-associated proteins expression regulation.</li> <li>• Immune escape through modulation of pro- and anti-immune factors expression.</li> </ul>	[32] [33,34] [35]
<b>Lung adenocarcinoma</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Cisplatin treatment</li> <li>• Benzo[<math>\alpha</math>]pyrene treatment</li> <li>• HGF/SF</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Acquisition of chemoresistance.</li> <li>• Disruption of genomic stability by increased mutation frequency.</li> <li>• Association with patients' clinical resistance to cisplatin-based chemotherapy.</li> <li>• Serological marker for patients' auxiliary diagnosis</li> <li>• Activation of migration and invasion.</li> </ul>	[36] [37] [38] [39]
<b>Breast cancer</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• E2F1</li> <li>• ER<math>\alpha</math>/17<math>\beta</math>-estradiol</li> <li>• 91H</li> <li>• HGF</li> <li>• TGF-<math>\beta</math></li> <li>• Hypoxia</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Increase of cell proliferation</li> <li>• Paclitaxel resistance through epigenetic silencing of pro-apoptotic genes.</li> <li>• Enhancing of cell migratory potential.</li> <li>• Potential biomarker for early screening and prognosis monitor.</li> <li>• Induction of epithelial-to-mesenchymal transition.</li> </ul>	[29,40–42] [43] [44] [45] [46] [39]
<b>Gastric cancer</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• c-Myc</li> <li>• PEG10</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Inhibition of growth suppressors activity.</li> <li>• Inhibition of pro-apoptotic genes expression.</li> <li>• Promotion of cell migration, invasion and metastasis.</li> <li>• Correlation with poor prognosis and clinical stage.</li> <li>• Potential biomarker for diagnosis and early tumor screening.</li> </ul>	[47,48] [49] [50] [51] [52]
<b>Liver cancer</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Cyclin D/CUDR</li> <li>• EGR1/PKM2</li> <li>• Bcl2</li> <li>• TNF-<math>\alpha</math></li> <li>• TGF-<math>\beta</math></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Inhibition of growth suppressors expression.</li> <li>• Modulation of telomerase activity.</li> <li>• Activation of pro-angiogenic factors expression.</li> <li>• Regulation of immunological response.</li> <li>• Association with bile acid homeostasis deregulation.</li> <li>• Enhancement of obstructive cholestatic liver fibrosis development.</li> <li>• Induction of epithelial-to-mesenchymal transition.</li> </ul>	[53] [54] [55,56] [57] [58] [59] [39]
<b>Cholangiocarcinoma</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Oxidative stress</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Activation of invasion and metastasis through regulation of EMT-associated proteins expression.</li> <li>• Enhancement of chronic inflammation response to the tumor micro-environment.</li> <li>• Correlation with tumor size, TNM stage, postoperative recurrence and poor prognosis.</li> </ul>	[60] [60] [61]
<b>Pancreatic cancer</b>	/	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Inhibition of apoptosis through inhibition of caspase 3 cleavage.</li> </ul>	[62]
<b>Renal cell carcinoma</b>	/	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Promotion of migration and invasion.</li> </ul>	[63]
<b>Bladder cancer</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• TGF-<math>\beta</math></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Increase of cell proliferation.</li> <li>• Increase of blood vessel density.</li> <li>• Activation of invasion and metastasis through epigenetic silencing of EMT-associated proteins.</li> <li>• Induction of epithelial-to-mesenchymal transition.</li> </ul>	[64] [65] [66] [39]
<b>Colorectal cancer</b>	/	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Increase of cell proliferation through enhanced cell cycle progression.</li> <li>• Inhibition of growth suppressors expression.</li> <li>• Enhancing of tumor migration and invasion.</li> </ul>	[67] [68] [69]
<b>Cervical cancer</b>	/	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Inhibition of apoptosis.</li> </ul>	[70]
<b>Ovarian cancer</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Cisplatin resistance</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Inhibition of pro-apoptotic factors.</li> <li>• Activation of invasion and metastasis through regulation of EMT-associated proteins expression.</li> <li>• Induction of cisplatin resistance through regulation of cell metabolism.</li> </ul>	[71] [39] [72]
<b>Leukemia</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Bcr-Abl kinase</li> <li>• c-Myc</li> <li>• ATRA treatment</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Enhancement of drug resistance.</li> <li>• Modulation of telomerase activity.</li> </ul>	[73] [74]
<b>Osteosarcoma</b>	/	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Promotion of cell migration and invasion.</li> </ul>	[75]
<b>Melanoma</b>	/	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Promotion of glucose metabolism and cell growth.</li> </ul>	[76]

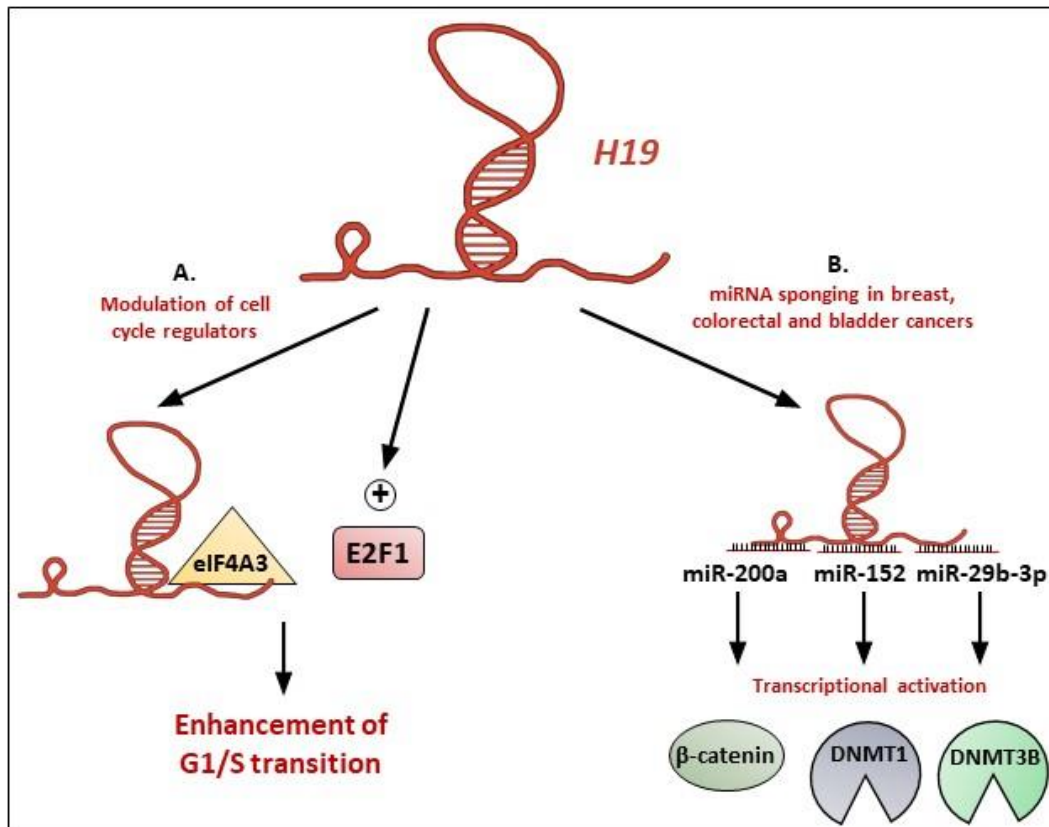
**Table 1.** Overexpression of the long non-coding RNA *H19* in several cancer.

Type of cancer	Mediators of <i>H19</i> action	Impact on hallmarks of cancer	Ref.
<b>Glioma</b>	• miR-152 • miR-29a	• Evading growth suppressors • Inducing angiogenesis	[79] [30]
<b>Tongue squamous cell carcinoma</b>	• EZH2	• Activating invasion and metastasis	[33]
<b>Lung adenocarcinoma</b>	• SAHH	• Genomic instability and mutation	[37]
<b>Breast cancer</b>	• E2F1 • ER $\alpha$ • miR-152	• Sustaining proliferative signalling	[40] [41] [29]
<b>Gastric cancer</b>	• p53 • miR-141 • PEG10	• Evading growth suppressors • Sustaining proliferative signalling • Activating invasion and metastasis	[47] [80] [51]
<b>Liver cancer</b>	• Telomerase complex	• Enabling replicative immortality	[54]
<b>Cholangiocarcinoma</b>	• let-7	• Tumor-promoting inflammation	[61]
<b>Pancreatic cancer</b>	• E2F1	• Sustaining proliferative signalling • Resisting cell death	[62]
<b>Renal cell carcinoma</b>	• miR-29b-3p	• Activating invasion and metastasis	[63]
<b>Bladder cancer</b>	• miR-29b-3p • EZH2	• Sustaining proliferative signalling • Resisting cell death • Activating invasion and metastasis	[64] [43] [66]
<b>Colorectal cancer</b>	• eIF4A3 • miR-200a	• Sustaining proliferative signalling	[67] [68]
<b>Cervical cancer</b>	• miR-138-5p	• Resisting cell death	[70]
<b>Leukemia</b>	• Telomerase complex	• Enabling replicative immortality	[74]
<b>Osteosarcoma</b>	• miR-200	• Activating invasion and metastasis	[75]
<b>Melanoma</b>	• miR-106a-5p	• Deregulating cell energetics	[76]

**Table 2.** Mediators of lncRNA *H19* action in cancer.

Type of cancer	Targets of miR-675	Target function	Ref.
<b>Glioma</b>	• Cadherin 13	• Atypical cadherin lacking the cytoplasmic domain.	[81]
<b>Breast cancer</b>	• Cbl-b, c-Cbl	• Ubiquitin ligases E3.	[45,82]
<b>Lung cancer</b>	• GPR55	• G protein-coupled receptor.	[83]
<b>Esophageal squamous cell carcinoma</b>	• REPS2	• Repressor of cell proliferation and migration.	[84]
<b>Gastric cancer</b>	• FADD • RUNX1 • CALN1	• Apoptotic adaptor that recruits caspases 8 or 10. • Transcription factor. • Calcium-binding protein.	[49] [48] [50]
<b>Liver cancer</b>	• HP1 • RB • TWIST1	• Heterochromatin assembler and regulator. • Tumor suppressor. • Transcription factor involved in EMT.	[56] [85] [85]
<b>Colorectal cancer</b>	• RB • DDB2	• Tumor suppressor. • Transcriptional repressor.	[69] [86]
<b>Ovarian cancer</b>	• Slug	• Transcriptional factor involved in EMT.	[39]
<b>Osteosarcoma</b>	• CALN1	• Calcium binding-protein.	[87]

**Table 3.** Validated targets of *H19*-derived miR-675 in cancer.



**Fig. 1.** The long non-coding RNA *H19* promotes cancer cell proliferation.

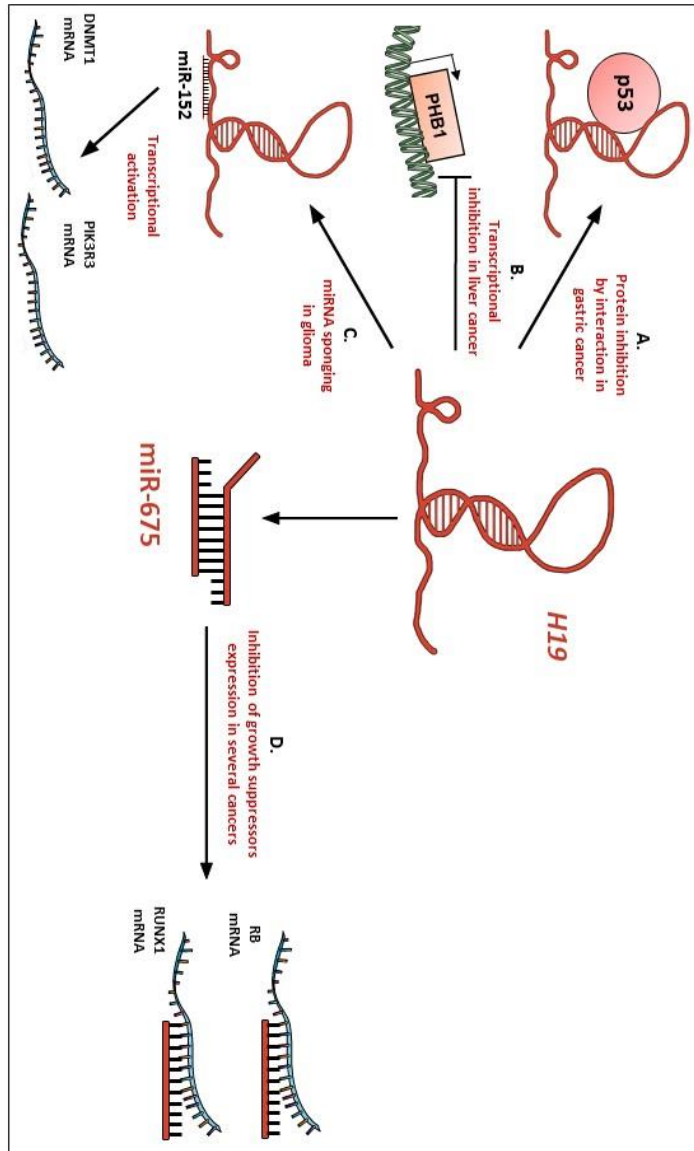


Fig. 2. *H19* downregulates growth suppressors.

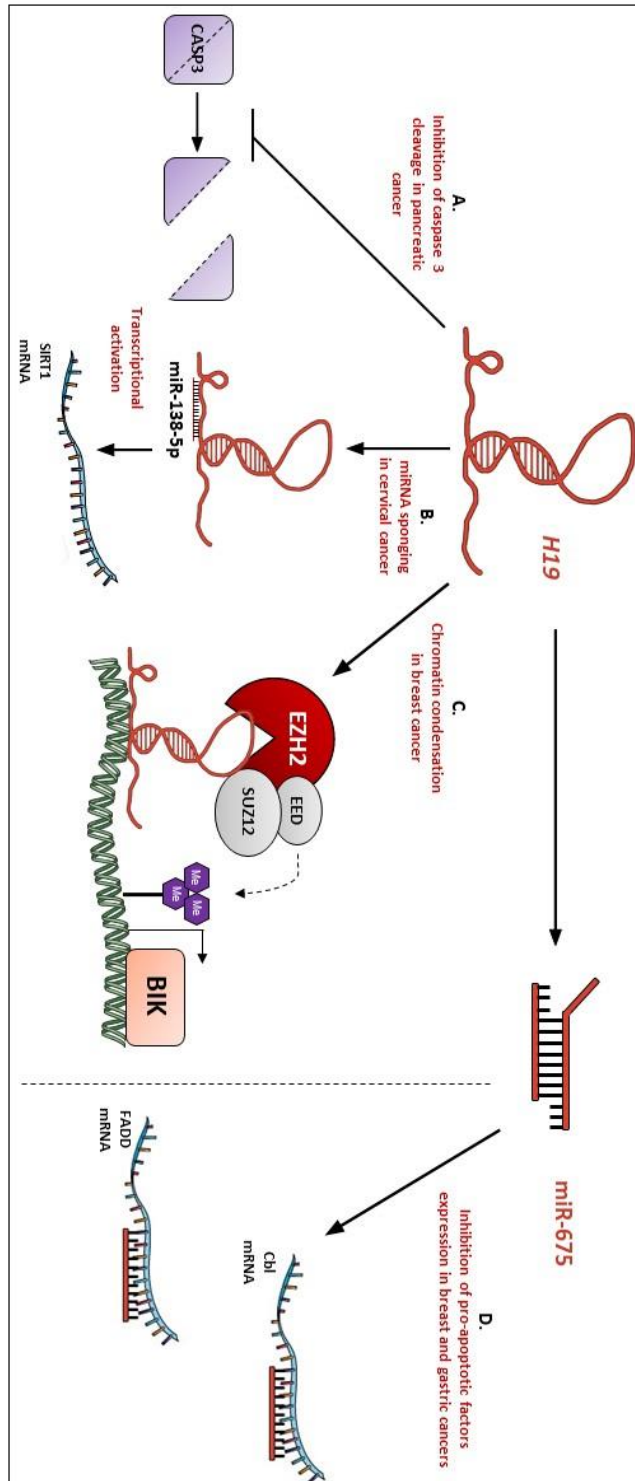


Fig. 3. H19 impedes cancer cell death.

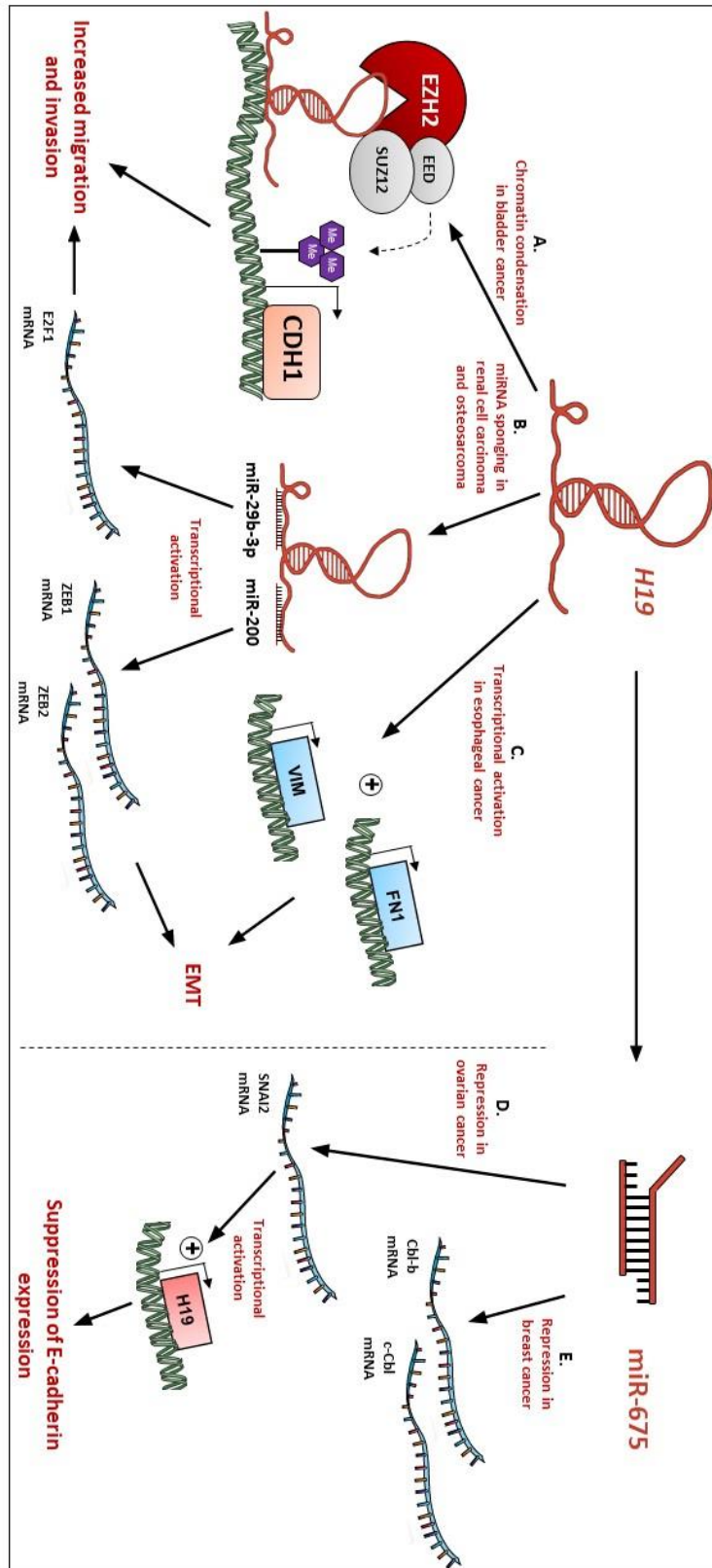
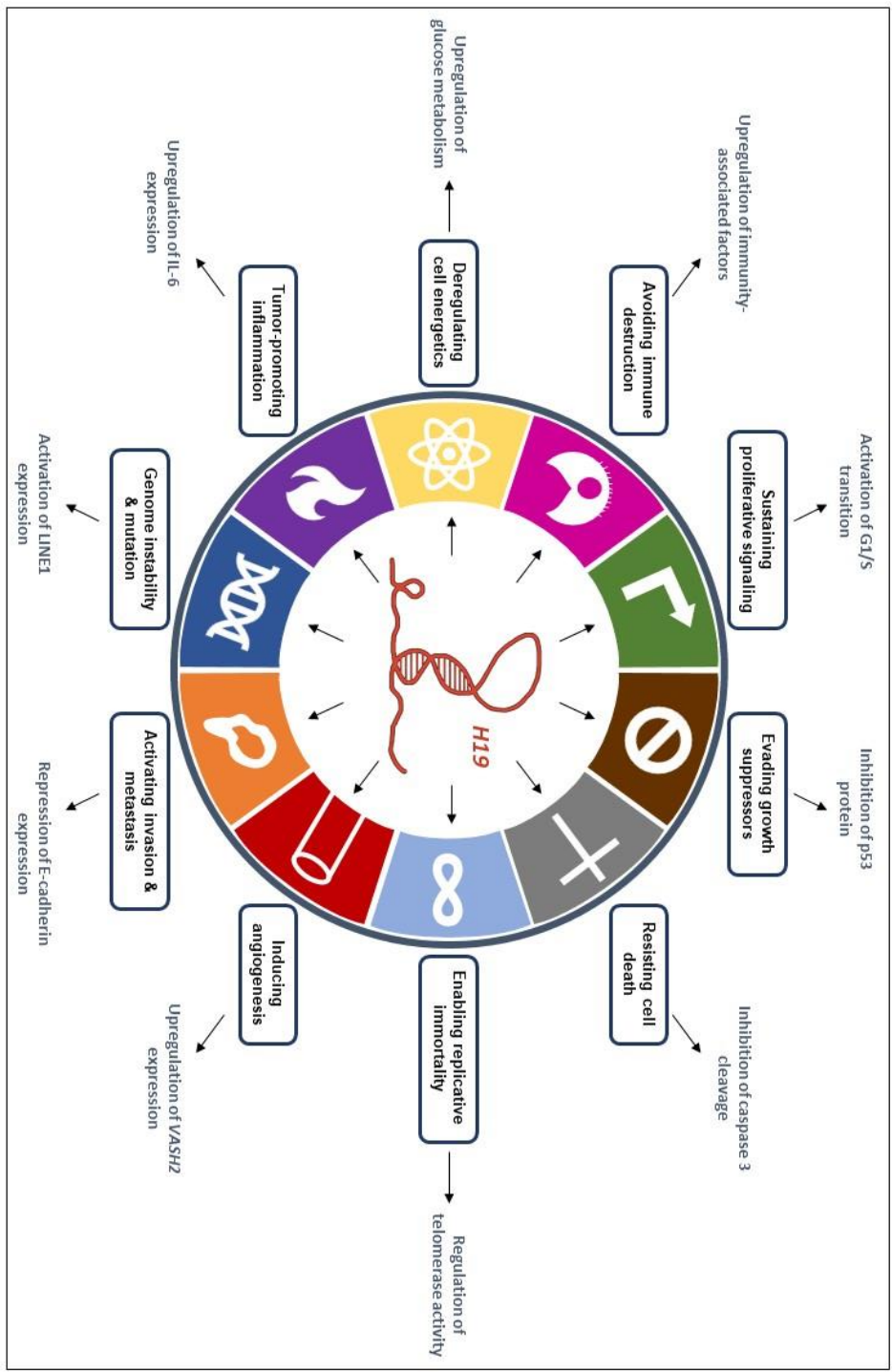


Fig. 4. H19 promotes the migration, invasion and metastasis of cancer cells.

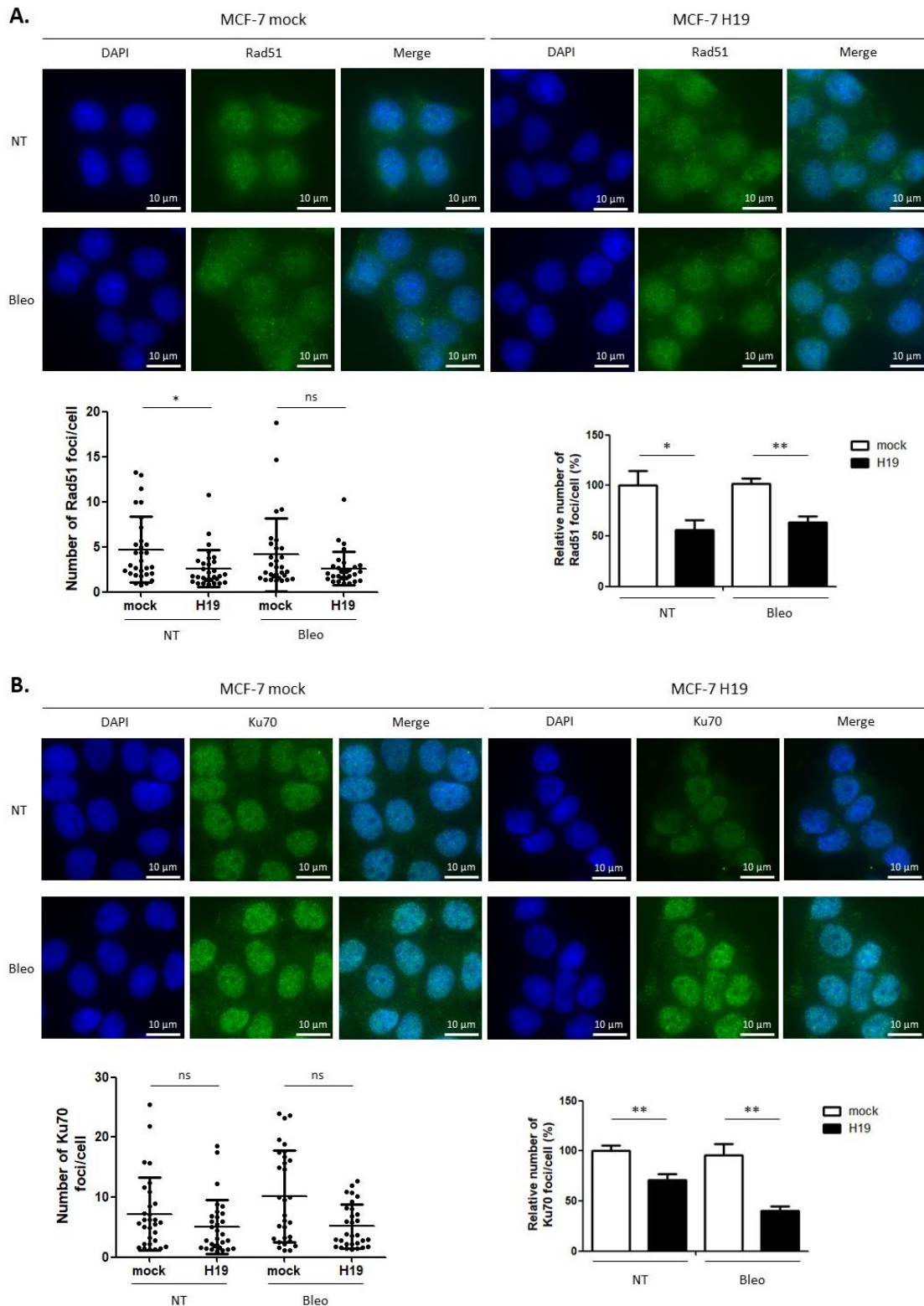


**Fig. 5.** Implication of the long non-coding RNA *H19* in the hallmarks of cancer.





## Annexe 2

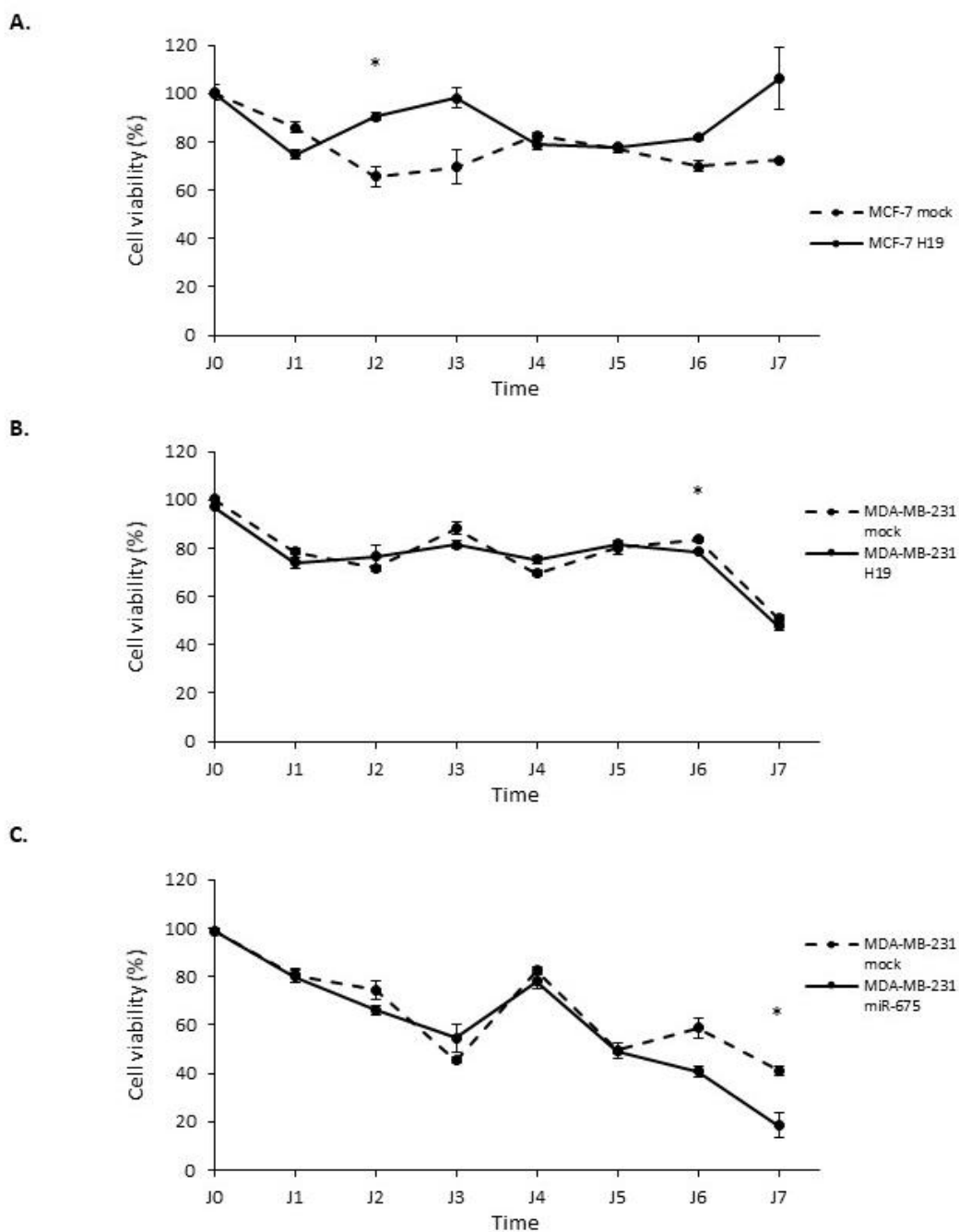


### Annexe 2. Marquage par immunofluorescence des protéines Rad51 et Ku70.

**A.** Marquage par immunofluorescence des foci de Rad51 dans des cellules MCF-7 surexprimant stablement ou non H19 et traitées ou non à la bléomycine (30 µg/µL, 2h). La quantification des marquages est représentée selon le nombre de foci de Rad51 par cellule et selon le nombre relatif de foci de Rad51 selon les conditions. **B.** Marquage par immunofluorescence des foci de Ku70 dans des

cellules MCF-7 surexprimant stablement ou non H19 et traitées ou non à la bléomycine (30  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ , 2h). La quantification des marquages est représentée selon le nombre de foci de Ku70 par cellule et selon le nombre relatif de foci de Ku70 selon les conditions. Toutes les expériences ont été réalisées au moins 3 fois. Sur les graphiques, les données représentent la moyenne de 3 expériences indépendantes et les écarts-types associés. \* :  $p < 0,05$  ; \*\* :  $p < 0,01$  ; ns : non significatif.

## Annexe 3



### Annexe 3. Résistance à l'anoïkis de lignées cellulaires cancéreuses mammaires surexprimant stablement ou non *H19* ou le *miR-675*.

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