

THÈSE

Pour obtenir le grade de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

Spécialité : **Biologie Cellulaire**

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

Hélène IPAS

Thèse dirigée par **Jean-Paul ISSARTEL**

préparée au sein du **Grenoble - Institut des Neurosciences,
Equipe Nanomédecine et Cerveau**

dans l'**École Doctorale Chimie et Sciences du Vivant**

Contingent microARN des exosomes, diagnostic et physiopathologie des gliomes

Thèse soutenue publiquement le **31 Octobre 2013**,
devant le jury composé de :

M. Emmanuel GARCION

CR INSERM, Micro et Nanomédecines Biomimétiques, Angers (Rapporteur)

M. Michel RECORD

DR INSERM, Centre de Recherche en Cancérologie, Toulouse (Rapporteur)

M. Georges STEPIEN

DR INRA, Centre INRA de Clermont-Ferrand (Président)

M. François BERGER

PU-PH UJF CHU, Clinatéc, Grenoble (Examinateur)

M. Jean-Paul ISSARTEL

DR CNRS, Grenoble - Institut des Neurosciences, Grenoble (Examinateur)



Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier le Pr. François Berger de m'avoir accueillie au sein de son équipe « Nanomédecine et Cerveau », anciennement unité INSERM U318, pour moi Equipe 7 de l'Institut des Neurosciences de Grenoble, et équipe Clinatex en devenir. Je remercie aussi le Pr. Claude Feuerstein de m'avoir ouvert les portes de l'Institut des Neurosciences de Grenoble.

Je remercie également les membres du jury et notamment le Dr. Emmanuel Garcion, le Dr. Michel Record et le Dr. Georges Stepien d'avoir accepté de faire partie de mon jury. Merci d'avoir pris le temps de lire et d'évaluer mon travail de thèse.

Jean-Paul, merci pour votre encadrement pendant ces trois années, j'ai énormément appris au cours de ce doctorat. Merci pour vos conseils et votre disponibilité qui m'ont permis de mener à bien ce projet de thèse. Merci aussi pour vos jeux de mots, pas toujours limpides au premier abord, qui m'ont bien souvent fait froncer les sourcils puis sourire !

Je tiens aussi à adresser mes remerciements sincères aux différents organismes ayant financé une grande partie de mes projets, et plus particulièrement la région Rhône-Alpes, et les comités Drôme, Ardèche et Savoie de la Ligue Contre le Cancer. Un remerciement tout particulier au gouvernement américain pour n'avoir déclaré le « shut down » et donc le fonctionnement ralenti de PubMed qu'à la fin de l'écriture de mon manuscrit !

Je remercie chaleureusement toutes les personnes ayant fait partie de l'équipe 7 « Nanomédecine et cerveau » pour tous les très bons moments de la vie de laboratoire que nous avons partagés. Merci d'avoir supporté mes éclats de rire à répétition et mon incapacité de prononcer les « o » correctement !;) Merci pour votre accueil, votre bonne humeur toujours au rendez-vous et votre soutien tout au long de ces trois ans. Merci également pour le partage de vos savoir-faire respectifs, pour votre patience et votre disponibilité. Marie-France, pour tes compétences en culture cell, tes conseils éclairés et nos sessions chant en pièce de culture, mille fois merci ! Didier, merci pour le partage de ton savoir encyclopédique, tes chansonnettes dans les couloirs qui m'ont fait sourire, et je n'oublierais pas nos discussions philosophiques sur mes « bêtes de cirque » et mes « poubelles » ! Michèle, merci pour tes remarques toujours avisées, tes compétences en biomol et tous les rires partagés. Laurent P. et Marie B. merci pour votre second degré et d'avoir pérennisé les repas franchouillards du vendredi. Boudevijn et Florence merci d'avoir été des voisins de bureau exemplaires, avec toujours le mot pour rire. Adriana et Hana merci pour les bons moments partagés, entre autre lors de la

préparation de la fête de la science. Marie A., Claire, Aurélie, Elodie, Sandra et Audrey L. merci encore pour votre accueil chaleureux dès mon arrivée qui m'a permis de démarrer du bon pied dans le laboratoire. J'adresse également un grand merci à mes collègues du bureau étudiant du 2ème avec Guillaume et ses fameuses blagues, Laurent S. et ses chorégraphies inoubliables, Cyril le fournisseur de café, Hubert et son fauteuil vert, et enfin Julie et ses chansons enfantines. Merci aussi à mes collègues du bureau des thésards, à l'ambiance plus studieuse ; avec Affif, Fériel, Audrey B. ou Mini-Thésarde, Franck et Sébastien, qui m'ont ouvert la voie vers la soutenance ; et aux petits nouveaux Lauriane, Ulysse et Michel pour leur fraîcheur et leur joie de vivre. Lauriane, ma colloc de frigo, merci encore pour les sessions « soutien » au confocal ! J'ai également une pensée pour l'équipe exilée à Clinatex, Mathieu, Céline, Ali, Adrien ; et pour mes stagiaires Houssam et Nadège, c'était un plaisir de vous encadrer ! Et enfin Audrey G., mon binôme à moi ! MERCI ! Pour tout ! Pour la formation à l'utilisation de notre chère station Affymetrix et pour ton aide précieuse lors des analyses info, pour les mots réconfortants et les petites attentions, pour ton soutien sans faille et ta gentillesse. Je te souhaite tout le meilleur pour ta thèse qui débute !

Je souhaite aussi remercier grandement mon équipe d'adoption, l'équipe 2, qui a su m'apporter l'environnement « exosomes » nécessaire à ma thèse. Merci à tous pour votre accueil sympathique dans vos labos ! Un merci tout particulier à Mathilde et Charlotte pour vos compétences en purifs d'exosomes, votre patience et votre disponibilité. Avec Karine, vous formez mon Exosome Team ! Merci de tout cœur à toutes les trois !

Je tiens à remercier Nathalie, ma gestionnaire préférée, et toutes ses collègues, vous faites un travail du tonnerre ! Merci à Georges pour sa patience et sa disponibilité. Merci également à Magali de l'EDCSV pour sa patience et son aide administrative. Je souhaite également remercier la plate-forme de microscopie optique et électronique, et plus particulièrement Karin Pernet-Gallay et Julie Delaroche pour leur soutien technique. Merci aussi à Pierre Champelovier pour son aide en cytométrie en Flux, et au CRB et service d'anapat de l'IBP. Et pour finir un grand merci à Nora pour ses grands sourires et à Sandrine pour sa gentillesse ! Sandrine prends bien soin de tes petits pensionnaires facétieux !

Merci à tous mes amis thésards du GIN, Ariana merci d'avoir su adapter tes pauses repas à mes manip chaotiques, merci pour les surprises et la déco de mon bureau ! Merci à Anouk, Céline, Damien, Romain, Marie-lise, Marc, Mélina, Marine, Marjo, et tout le groupe des Neurodoc pour les bons moments passés ensemble. Merci aussi aux membres de 38 Globule et de BIOTechno et BiovisionNxt, c'était une belle expérience que d'organiser ces événements

à vos côtés. Je vous souhaite à tous de grandes aventures personnelles et professionnelles.

Je remercie tous mes proches et amis qui, de près ou de loin, m'ont accompagnée tout au long de ces trois ans. Je ne peux pas citer tout le monde mais je pense notamment à mes très « vieux » amis, Anne-Laure, Justine, Elo, . . . , à « La Com'Potes » Audrey, Ben, Erwan, Laeti, Marianne, Marie et Thomas, à mes « Insaïens » préférés Benoît, Elodie, Gaby, Lukas, Marine, Thibault . . . , à la team « Jean-Mi » Emma, Emeuh, Sophie et Oriane, à mes amis grenoblois - pur souche, d'adoption ou de passage - Ariana, Marianne, Katia, Ophélie, Sophie, Laurie, Anaïs, Nacer, Yoann, Vianney, Max, Arthur, tous mes amis CS ... Merci à tous pour les sorties décompressions et pour vos nombreux encouragements ! Et mention spéciale pour Marianne qui m'a supporté tout le long de ces 3 ans, ma Coig personnelle ! ;) I'll also want to thanks my foreign friends who always cheered me up when I needed it, Diane, Asim, Will, Rafa, Philine, Anja, Fabian, Toby, Genieva, Alma, Luis, . . . thanks for everything, you always know how to make my heart smile !

Enfin, je tiens à remercier ma famille. Merci à mes parents et mon « petit » frère chéris pour leur soutien, leur bonne humeur et leur foi en moi inébranlable. Et merci à toute ma famille en général pour leur soutien sans faille, j'ai vraiment la chance d'avoir un super cocon familial et je vous remercie tout simplement d'être là, comme vous êtes, ne changez rien. Merci encore pour les relectures par téléphone, les messages de soutien et les envois de gâteaux et autres douceurs gasconnes ! Merci, merci, merci mille fois.

Principales abréviations

ADN : Acide Désoxyribo Nucléique
ADNc : Acide Désoxyribo Nucléique Complémentaire
AGO : Argonaute
AGS : Astrocytes Growth Supplement
ANOVA : ANalysis Of VAriance
ARN : Acide Ribo Nucléique
ARNm : Acide Ribo Nucléique messenger
ATCC : American Type Culture Collection
BHE : Barrière Hémato Encéphalique
CMH : Complexe Majeur d’Histocompatibilité
Cq / CT : Quantification cycle / Cycle Threshold
CRB : Centre de Ressources Biologiques
DAVID : Database for Annotations Visualisation and Integrated Discovery
DLS : Dynamic Light Scattering
DMEM : Dulbecco’s Modified Eagle Medium
dNTP : Désoxyribonucléotides
ECL : Enhanced Chemio Luminescence,
EGF/EGFR : Epidermal Growth Factor/ Epidermal Growth Factor Receptor
ESCRT : Endosomal Sorting Complex Required for Transport
FFPE : Formalin Fixed Paraffin Embedded
GBM : Glioblastome
HA : Human Astrocytes
HRP : HorseRadish Peroxidase
IDH : Isocitrate DésHydrogénase
ILV : Intra Luminal Vésicles
IPA : Ingenuity Pathway Analysis
IRM : Imagerie par Résonance Magnétique
MVE : Multi –Vesicular Endosomes
ODG : Oligodendrogliome
OMS : Organisation Mondiale de la Santé
PBS : Phosphate-Buffered Saline
PCR : Polymerase Chain Reaction

PFA : Paraformaldéhyde

PVDF : Polyvinylidene DiFluoride

REST : Relative Expression Software Tool

RISC : Rna-Induced Silencing Complex

RMA : Robust Multi-array Average

RNase : Ribonucléase

SNC : Système nerveux central

SVF : Sérum de Veau Fœtal

TBST : Tris-Buffered Saline Tween

VEGF/VEGFR : Vascular Endothelial Growth Factor/ Vascular Endothelial Growth Factor
Receptor

WHO : World Health Organisation

Table des matières

I	Introduction	17
1	Gliomes	19
1.1	D'un point de vue clinique	19
1.1.1	Données épidémiologiques	19
1.1.2	Diagnostic	20
1.1.3	Classification	21
1.1.4	Traitements	24
1.2	D'un point de vue moléculaire	27
1.2.1	Caractéristiques physiopathologiques et moléculaires	27
1.2.2	Hypothèses sur les origines des gliomes	33
1.2.3	Recherche de biomarqueurs diagnostiques et suivi	34
1.3	MicroARN : agents thérapeutiques et de diagnostic ?	35
1.3.1	MicroARN	35
1.3.2	MicroARN et diagnostic	40
1.3.3	MicroARN et thérapie	42
1.4	Communication des gliomes avec leur microenvironnement	43
1.4.1	Autocrine	43
1.4.2	Juxtacrine	46
1.4.3	Matricrine	48
1.4.4	Paracrine	49
2	Les exosomes, moyen de communication	51
2.1	Que sont les exosomes ?	51
2.1.1	Découverte des exosomes	51
2.1.2	Cycle de vie d'un exosome	52
2.1.3	Composition	58
2.2	Fonctions des exosomes : communication intercellulaire	63
2.2.1	Communication intercellulaire du système nerveux	63
2.2.2	Communication par transfert d'information	64
2.2.3	Effet des exosomes sur leur environnement	65
2.3	Utilisation comme biomarqueurs ou agents thérapeutiques	68
2.3.1	Exosomes vecteurs de biomarqueurs	69
2.3.2	Exosomes vecteurs de thérapie	71
3	Objectifs	75

II	Matériels et Méthodes	77
1	Matériels Biologiques	79
1.1	Echantillons tissulaires	79
1.2	Lignées cellulaires	79
2	Méthodes	81
2.1	Cultures et tests cellulaires	81
2.1.1	Culture cellulaire	81
2.1.2	Marquages au PKH67 ou au PKH26	81
2.1.3	Cytométrie en flux	82
2.1.4	Incubation d'exosomes ou de nanocapsules lipidiques	83
2.1.5	Fixation, coloration et visualisation des cellules	83
2.1.6	Transfection d'agonistes ou antagonistes de microARN	83
2.2	Production et caractérisation d'exosomes	83
2.2.1	Production d'exosomes	83
2.2.2	Collecte d'exosomes	84
2.2.3	Microscopie électronique	85
2.2.4	Quantification des exosomes au Nanosight	85
2.2.5	Diffusion dynamique de lumière (Dynamic Light Scattering, DLS)	86
2.2.6	Quantification des exosomes au qNano	86
2.2.7	Western blot	86
2.3	Préparations et analyses d'acides nucléiques	88
2.3.1	Préparation d'acides nucléiques	88
2.3.2	PCR (Polymerase Chain Reaction)	89
2.3.3	RT-qPCR	89
2.3.4	QuantiGene	91
2.3.5	Marquage et hybridation sur Affymetrix (microARN et ARNm)	91
2.3.6	Analyses et statistiques	93
2.3.7	Rationalisation des données et recherche <i>in silico</i> des ARNm cibles	95
III	Résultats	97
1	Caractérisation des microARN de gliomes	99
1.1	Caractérisation biomoléculaire des tumeurs	99
1.1.1	Sélection d'échantillons pertinents	99
1.1.2	Analyse de l'expression des microARN des échantillons précédemment sélectionnés	100
1.2	Caractérisation des modèles de lignées cellulaires <i>in vitro</i>	102
1.2.1	Choix des modèles <i>in vitro</i>	102
1.2.2	Caractérisation des profils microARN des modèles <i>in vitro</i>	104
2	ARN exosomaux de gliomes	107
2.1	Les cellules de gliomes en culture produisent des exosomes	107
2.1.1	Production d'exosomes par la lignée de glioblastomes en culture U87	107

2.1.2	Les cellules gliales en culture produisent des exosomes en quantité importante	109
2.2	Caractérisation qualitative des exosomes produits	111
2.2.1	Effets de la durée de production des exosomes	111
2.2.2	Contenu microARN des exosomes de U87 et de HA	113
2.2.3	Contenu ARNm	116
3	Contrôle expérimental de la sécrétion des ARN exosomaux	119
3.1	L'hypoxie affecte la sécrétion d'exosomes par les cellules de U87	119
3.1.1	Effet de l'hypoxie sur les cellules	119
3.1.2	L'hypoxie n'affecte pas la quantité d'exosomes produits	122
3.1.3	L'hypoxie affecte le contenu en ARN des exosomes produits	123
3.2	Impacts de composés pharmacologiques sur la sécrétion et le contenu des exosomes produits par les cellules U87	126
3.2.1	Effet sur les cellules U87	127
3.2.2	Les composés pharmacologiques GW4869 et 5-Aza-2'-désoxycytidine n'affectent pas la quantité d'exosomes produits par les cellules U87 . .	129
3.2.3	GW4869 et 5-Aza-2'-désoxycytidine affectent le contenu en microARN des exosomes produits	130
4	Effets des exosomes de gliomes sur des cellules saines	133
4.1	Les exosomes des glioblastomes sont internalisés dans les cellules voisines . .	133
4.1.1	Observation de l'internalisation d'exosomes de U87 dans des cellules HA ou U87	133
4.1.2	Comparaison de l'internalisation des exosomes de glioblastomes et des nanocapsules lipidiques	135
4.1.3	Cinétique d'entrée des exosomes dans les cellules réceptrices	137
4.2	Effets des exosomes tumoraux sur les cellules réceptrices	140
4.2.1	Recherche d'un effet proapoptotique <i>in vitro</i>	140
4.2.2	Recherche d'un effet des exosomes <i>in vivo</i>	141
4.3	Les exosomes de glioblastomes affectent le miRnome des cellules réceptrices .	141
IV	Discussion	145
1	Les microARN peuvent-ils être de bons biomarqueurs pour aider au diagnostic des gliomes ?	147
2	Quelle est la composition en microARN des exosomes de cellules saines et quelles sont les différences majeures avec celle des exosomes de tumeurs gliales ?	151
3	Est-il possible de perturber le processus de production des exosomes ainsi que leur contenu en microARN ?	161
4	Les exosomes de cellules de glioblastomes ont-ils un effet sur les cellules voisines ?	167

VI Bibliographie	173
A Annexe1 : Méthodes d'analyse des ARN	197
A.1 Analyse des ARN par électrophorèse capillaire	197
A.2 Quantification des microARN par RT-qPCR Taqman	198
A.3 Dosage des microARN par hybridation (technique QuantiGene)	198
A.4 Analyse des profils d'expression sur puces Affymetrix	199
A.4.1 microARN	200
A.4.2 ARN messagers	201
A.5 Analyse des profils d'expression à l'aide des puces 3D-Gene	202
B Annexe2 : revue « MicroRNAs : molecular features and role in cancer »	205
C Production Scientifique	239

Table des figures

1	Les cellules du système nerveux central	19
2	Diagnostic des gliomes par CT-scan et IRM	20
3	Les tumeurs astrocytaires selon l’OMS	22
4	Classification Ste Anne	23
5	Activation de la voie PI3/AKT par les récepteurs EGFR	28
6	Voies de contrôle du cycle cellulaire	29
7	Rôle de IDH1 et IDH2 dans la résistance au stress oxydatif, à l’apoptose et aux traitements alkylants	31
8	Altérations génétiques impliquées dans la tumorigénèse des oligodendrogliomes et glioblastomes primaires et secondaires	32
9	Différentes cellules pouvant être à l’origine des gliomes	34
10	Voie de biosynthèse des microARN et impact sur la traduction des ARNm	36
11	Action des microARN dans la tumorigénèse	39
12	Différents moyens de communication des gliomes	44
13	Biosynthèse des exosomes	53
14	Libération des exosomes	56
15	Recapture des exosomes par les cellules environnantes	57
16	Protéines majoritairement retrouvées dans les exosomes	59
17	Lipides et protéines associées fréquemment présentes dans les exosomes.	61
18	Association des endosomes avec le complexe RISC et formation des exosomes	62
19	Exemple du miR-222 et de ses isomiR	93
20	Biomarqueurs microARN permettant un diagnostic inter-tissulaire	100
21	Biomarqueurs microARN permettant un diagnostic intra-tissulaire	101
22	Comparaison des profils microARN des modèles cellulaires potentiels et des tissus cérébraux sains ou cancéreux	103
23	Profils microARN des modèles cellulaires HA et U87	105
24	Effets d’une carence en SVF pendant 24h sur les cellules U87 en culture	108
25	Caractérisation des préparations d’exosomes de gliomes	109
26	Cinétique de production d’exosomes par les cellules U87	110
27	Production d’exosomes par les cellules gliales	111
28	Comparaison des contingents microARN contenus dans les productions d’exosomes à 1h et 24	112

29	Diagramme de Venn des microARN exosomaux et cellulaires des cellules U87 et HA	113
30	Profils microARN des exosomes et des cellules U87 et HA	115
31	Diagramme de Venn des probesets Affymetrix d'ARNm exosomaux et cellulaires des cellules U87 et HA	117
32	ARNm exosomaux et cellulaires des cellules U87 et HA	118
33	Effets de l'hypoxie sur les cellules U87 en culture	120
34	Dérégulations des profils transcriptomiques par les conditions hypoxiques . .	121
35	Production d'exosomes en condition d'hypoxie	122
36	Profils microARN exosomaux hypoxiques	123
37	Profils microARN cellulaires et exosomaux obtenus en conditions hypoxiques	124
38	Effets d'une incubation de composés pharmacologiques GW4869 ou 5-Aza-2'-désoxycytidine sur les cellules U87 en culture	127
39	Production d'exosomes par des cellules traitées avec des composés pharmacologiques	129
40	Uptake des exosomes de glioblastomes par des cellules gliales	134
41	Uptake d'exosomes de glioblastomes U87 et de Nanocapsule DiO et DiI par des cellules de glioblastomes	136
42	Cinétique d'entrée des exosomes de U87 dans des cellules gliales HA	138
43	Cinétique d'entrée des exosomes de U87 dans des cellules de gliomes U87 . .	139
44	Effets d'une incubation d'exosomes de U87 sur des cellules HA en culture . .	141
45	Effets d'une incubation d'exosomes de U87 sur le miRnome des cellules U87 en culture	142
46	Effets d'une incubation d'exosomes de U87 sur le miRnome des cellules HA en culture	143
47	Types d'ARN détectés dans les exosomes	153
48	MicroARN détectés dans les exosomes de Glioblastomes en culture	155
49	Cibles les plus vraisemblables des microARN exosomaux	156
50	Network dans lequel les ARNm exosomaux sont impliqués	159
51	MicroARN détectés dans les exosomes de U87 en conditions hypoxiques . . .	162
52	Network dans lequel les ARNm exosomaux hypoxiques sont impliqués	165
53	Principe de fonctionnement Bioanalyseur Agilent 2100 et profils obtenus . . .	197
54	Principe de la RT-qPCR Taqman	198
55	Principe de la méthode QuantiGene	199
56	Principe des puces Affymetrix	199
57	Principe de marquage Genisphere	200
58	Trois versions de puces Affymetrix miRNA Genechip	201
59	Principe de marquage IVT express	202
60	Principe de la méthode 3D-Gene	203

Liste des tableaux

1	Anticorps	88
2	ARNm exosomaux et cellulaires des cellules U87 en conditions hypoxiques . .	126
3	Dérégulations transcriptomiques dans les cellules dues à l'utilisation de com- posés pharmacologiques GW4869 ou 5-Aza-2'-désoxycytidine	128
4	Profils microARN cellulaires et exosomaux en présence ou en absence de GW4869 ou 5-Aza-2'-désoxycytidine	130
5	Fonctions canoniques des ARNm exosomaux	157

I Introduction

1 Gliomes

1.1 D'un point de vue clinique

1.1.1 Données épidémiologiques

Les tumeurs cérébrales sont les cancers affectant le système nerveux central (SNC). Elles représentent 2% des cancers chez l'adulte dans le monde, avec une incidence de 4,5 cas pour 100 000 personnes par an. En France cette incidence est de 6,2 cas pour 100 000 habitants pour les adultes (globocan, IARC). Parmi ces tumeurs du SNC, les gliomes sont les plus courantes, 45% environ (Ohgaki et Kleihues, 2005), et représentent une forte cause de mortalité puisqu'elles sont la deuxième cause de mortalité chez les enfants de moins de 14 ans atteints d'un cancer, et la troisième pour la tranche d'âge des 15-39 ans.

Les gliomes affectent les cellules gliales et essentiellement les cellules macrogliales que sont les astrocytes et les oligodendrocytes. Ces cellules jouent un rôle de soutien auprès du système nerveux. Les astrocytes, de forme étoilée et 5 fois plus nombreux que les neurones, participent à la fourniture en nutriments des neurones et à la propagation des signaux nerveux (Oberheim *et al.*, 2012; Sofroniew et Vinters, 2009). Les oligodendrocytes, eux, forment les gaines de myéline qui entourent les axones des fibres nerveuses (Blakemore et Keirstead, 1999).

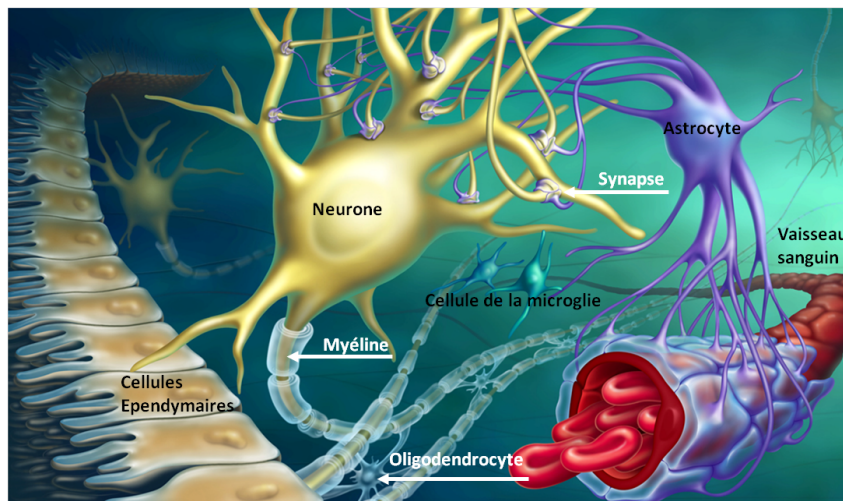


FIGURE 1 – Les cellules du système nerveux central (source : © Sylvie Dessert)

1.1.2 Diagnostic

Les signes cliniques associés à ce type de tumeur sont la conséquence d'un développement tumoral au sein du tissu nerveux fonctionnel et dans une boîte crânienne inextensible. Ces signes cliniques dépendent essentiellement de la localisation et du volume de la masse tumorale. Ils peuvent être caractérisés par des symptômes tels qu'un déficit moteur, une aphasie, des crises d'épilepsie, un déficit sensitif, des troubles mnésiques, des troubles psychiatriques, des céphalées, une hypertension intracrânienne, des troubles visuels ou auditifs (DeAngelis, 2001) ; s'accompagnant souvent de maux de têtes, vertiges ou nausées.

Chez les patients présentant les signes cliniques laissant présager un gliome, une imagerie cérébrale est réalisée pour confirmer ou infirmer la présence de la supposée tumeur. Cette imagerie est possible grâce aux méthodes radiologiques que sont le CT –scanner (Computed Tomography) et l'IRM (Imagerie par Résonance Magnétique) (Martin-Duverneuil *et al.*, 2008). Ces deux techniques nécessitent l'utilisation d'agents de contraste comme par exemple des produits iodés et hydrosolubles bloquant les rayons X pour le CT-scanner ou des produits aux propriétés paramagnétiques comme le gadolinium pour l'IRM. Le CT-scanner permet de mettre en évidence la localisation de la tumeur et d'en évaluer la masse tumorale. L'IRM, quant à elle, rend possible la visualisation des tissus mous et, grâce à sa meilleure sensibilité de contraste, permet de préciser l'anatomie et la localisation des lésions tumorales et d'en définir les limites et les rapports avec les structures environnantes.

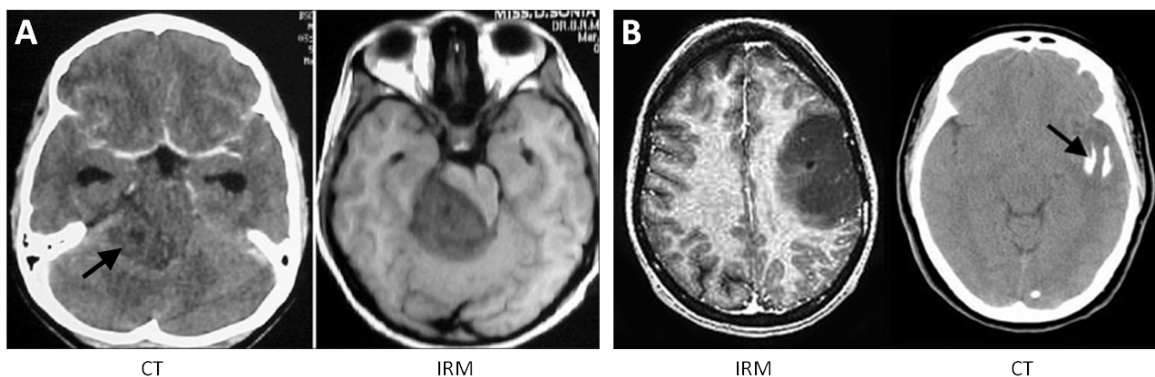


FIGURE 2 – Diagnostic des gliomes par CT-scan et IRM

A) Une lésion cérébrale infiltrante, non-proliférative et à apparence diffuse en CT-Scan est considérée comme une lésion focale en IRM (source : Sridhar *et al.*, 2011).

B) L'image obtenue par IRM (à gauche) montre une importante tumeur dans le lobe frontal gauche. L'image obtenue par CT scan (à droite) montre que la tumeur est partiellement calcifiée (flèche), (source : <http://radonc.ucla.edu/body.cfm?id=155>).

Pour établir un diagnostic plus précis un examen anatomopathologique est nécessaire. Cet examen est réalisé après biopsie ou exérèse chirurgicale et permet d'identifier les caractéristiques histologiques de la tumeur.

téristiques histologiques des différents types de tumeurs du SNC dont les gliomes.

1.1.3 Classification

La toute première classification des tumeurs cérébrales fut établie en 1928 par Cushing et Bailey. Différentes classifications furent mises en place par la suite et ont conduit à l'élaboration de la classification unificatrice actuelle de l'OMS (Organisation Mondiale de la Santé ou WHO, World Health Organization) (WHO, Louis *et al.*, 2007). Cette classification, basée sur des méthodes d'immunohistochimie essentiellement, est mondialement reconnue et est actuellement la plus utilisée.

Cette classification inclut un système de gradation des tumeurs, s'appuyant sur des critères strictement histologiques, qui corrèle avec une échelle de malignité. En effet au niveau histologique, les grades de gliomes sont caractérisés par la présence ou l'absence d'une densité cellulaire importante (cellules peu différenciées et de taille variable), la présence ou l'absence de mitose, la présence ou l'absence d'une prolifération intense des cellules endothéliales, et enfin la présence ou l'absence de nécrose.

Grade I : Astrocytomes pilocytiques

Grade II : Astrocytomes fibrillaires, oligoastrocytomes et oligodendrogliomes

Grade III : Astrocytomes, oligoastrocytomes et oligodendrogliomes anaplasiques

Grade IV : Glioblastomes

Le grade prédit l'évolutivité naturelle de la tumeur et détermine la prise en charge thérapeutique des patients. Ainsi, les gliomes de grade I, tels que l'astrocytome pilocytaire très fréquent chez les enfants, sont caractérisés par leur évolution lente et leur caractère curable après chirurgie d'exérèse. Les lésions gliales de grade II sont généralement de nature infiltrante. Malgré leur faible activité proliférative, elles récidivent souvent, même après exérèse chirurgicale et la médiane de survie est d'environ une dizaine d'année. Les gliomes de grade II incluent, entre autres, les oligodendrogliomes et les épendymomes. Le grade III est réservé aux tumeurs gliales qui présentent des critères de malignité évidents (atypies nucléaires, intense activité mitotique), impliquant une radiothérapie et/ou une chimiothérapie et dont la survie ne dépasse pas 2 à 5 ans (exemple oligodendrogliomes ou astrocytomes anaplasiques). Le grade IV regroupe les astrocytomes de plus haut grade qui présentent les critères du grade III associés à une prolifération microvasculaire et à des plages de nécrose tumorale. Ce grade IV est appliqué à des tumeurs très agressives cliniquement dont l'évolution est rapidement fatale en absence de traitement. Ces astrocytomes de plus haut grade, ou glioblastomes, re-

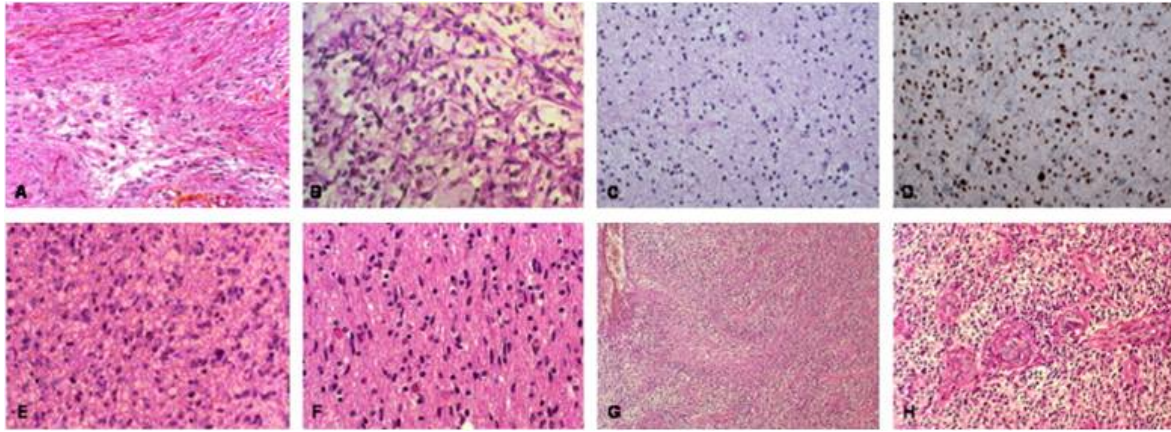


FIGURE 3 – Les tumeurs astrocytaires selon l’OMS

A : astrocytome pilocytique dans sa forme classique, biphasique (OMS, grade I) ; B : astrocytome pilocytique de type pilomyxoïde (OMS, grade II) ; C : astrocytome diffus de type fibrillaire (OMS, grade II) ; D : OLIG2 est exprimé dans de nombreuses cellules tumorales dans les astrocytomes fibrillaires (OMS, grade II) ; E : astrocytome anaplasique ; présence de mitoses et d’atypies nucléaires (OMS, grade III) ; F : parenchyme cérébral infiltré par des cellules tumorales isolées (périphérie d’un glioblastome (OMS, grade IV)) ; G et H : la présence de palissades périnécrotiques (G) et d’une prolifération microvasculaire (H) caractérisent le glioblastome (OMS, grade IV), (Figarella-Branger *et al.*, 2008).

présentent 50% des gliomes. La médiane de survie des patients est inférieure à un an et le taux de récurrence après l’acte chirurgical est de 90%.

Cependant la classification de l’OMS est critiquée concernant les tumeurs gliales. En effet, elle est basée essentiellement sur des données histologiques et ne tient compte ni des données cliniques ni des données d’imagerie ; ce qui entraîne un certain manque de reproductibilité (Figarella-Branger et Bouvier, 2005; Mittler *et al.*, 1996). Ce manque de reproductibilité est en partie dû aux nombreux paramètres histologiques pouvant être contradictoires et au fait de ne tenir compte ni de l’hétérogénéité tumorale ni de l’invasion du parenchyme par les cellules tumorales. Une autre classification, proposée par le Dr Daumas-Duport et appelée classification de l’Hôpital Ste Anne (Daumas-Duport *et al.*, 2000), est également utilisée en France pour les tumeurs gliales. Cette classification se base à la fois sur des données histologiques obtenues sur des biopsies étagées stéréotaxiquement et sur des données d’imagerie IRM, ce qui permet de définir la structure spatiale des différents types de tumeurs.

Trois structures sont définies pour le tissu tumoral : solides, infiltrants ou mixtes. Une structure solide est composée uniquement de cellules tumorales et est accompagnée d’une microangiogenèse permettant une prise de contraste en IRM. Une structure infiltrante est, elle, composée de cellules tumorales isolées et dispersées dans le parenchyme intact, se traduisant par l’absence de microvascularisation et donc l’absence de prise de contraste en IRM. Enfin, les structures mixtes sont composées d’un tissu tumoral solide accompagné de cellules

tumorales isolées, ce qui se traduit en IRM par une prise de contraste pour le tissu tumoral solide seulement.


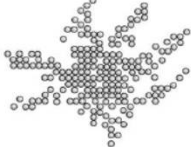
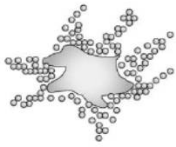
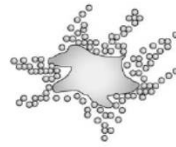
	Astrocytomes Pilocytiques	Oligodendrogliomes et Oligoastrocytomes de Grade A	Oligodendrogliomes et Oligoastrocytomes de Grade B	Glioblastomes
Structure Spaciale	 <p>Tissu tumoral</p> <p>Structure solide</p>	 <p>Cellules tumorales isolées</p> <p>Structure infiltrante pure</p>	 <p>Tissu tumoral et Cellules tumorales isolées</p> <p>Structure mixte</p>	 <p>Tissu tumoral et Cellules tumorales isolées</p> <p>Structure mixte</p>
Aspect en IRM	Prise de gadolinium	Pas de prise de gadolinium Hypo-intense en T1 et T2	Prise de gadolinium (tissu tumoral uniquement) Modérée, multicentrique ou multinodulaire	Prise de gadolinium (tissu tumoral uniquement) En anneau

FIGURE 4 – Classification Ste Anne

D'après cette classification, seuls les astrocytomes pilocytiques sont considérés comme non infiltrants. Pour les formes de gliomes les plus connues chez l'adulte seules trois catégories histologiques sont définies :

- Oligodendrogliomes et oligoastrocytomes de grade A (structure infiltrante pure)
- Oligodendrogliomes et oligoastrocytomes de grade B (structure mixte)
- Glioblastomes (structure mixte)

En marge de ces classifications, certains auteurs font aussi la distinction entre glioblastomes primaires qui apparaissent spontanément avec un grade de malignité élevé et glioblastomes secondaires provenant d'une évolution maligne progressive à partir d'un astrocytome de grade inférieur (Ohgaki et Kleihues, 2009).

Enfin, d'autres moyens de diagnostiquer le type de tumeur dans un prélèvement, axés sur la recherche de données moléculaires, sont aussi en voie de développement pour tenter d'améliorer la précision et la sensibilité du diagnostic délivré, notamment basés sur des analyses transcriptomiques (Cooper *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2009a; Phillips *et al.*, 2006; Verhaak *et al.*, 2010).

1.1.4 Traitements

La prise en charge des tumeurs gliales repose à la fois sur des traitements antitumoraux classiques et sur des soins de support apportés au patient. Malheureusement, aucun de ces traitements n'est actuellement capable d'éviter les récurrences ni de permettre la guérison des malades.

1.1.4.1 Chirurgie

La chirurgie permet l'exérèse de la masse tumorale visible en imagerie. Elle est possible selon la localisation de la tumeur dans le tissu nerveux (tumeur facilement accessible et à distance des régions fonctionnelles majeures du cerveau), et selon l'état général et les conditions physiques du patient.

La résection tumorale permet de diminuer les symptômes dus à l'hypertension intracrânienne et améliore donc l'état neurologique des patients. Cependant, si pour des gliomes de bas grade la résection tumorale permet une augmentation de la durée de vie, pour des gliomes de haut grade cette prolongation de la durée de vie est souvent réduite à quelques mois (Amirati *et al.*, 1987; Devaux *et al.*, 1993; Lacroix *et al.*, 2001; Vives et Piepmeyer, 1999). En effet, les gliomes de hauts grades ayant un caractère hautement invasif lié à de nombreuses lésions tumorales microscopiques dans le parenchyme, leur exérèse totale est souvent impossible. La récurrence survient dans presque 100% des cas, très majoritairement dans les 4 cm entourant la lésion d'origine et ce même pour des gliomes de bas grade qui récidivent environ 11 mois après la chirurgie (Abeloos *et al.*, 2007).

La chirurgie n'est pas suffisante et doit donc être associée à des thérapies adjuvantes telles que la chimiothérapie et la radiothérapie. Elle permet cependant d'obtenir des échantillons de tissus utiles pour poser un diagnostic anatomopathologique et moléculaire.

1.1.4.2 Radiothérapie

La radiothérapie est un traitement par rayons ionisants, la tumeur est irradiée aux rayons X. Cette émission de radiations a pour but d'altérer la composition de l'information génétique des cellules cancéreuses pour entraîner leur mort. Les photons émis ont la capacité d'ioniser les molécules d'eau provoquant ainsi la création des radicaux libres. Ce sont ces radicaux libres qui en se fixant sur les molécules d'ADN vont y créer des lésions qui rendront la cellule incapable de se reproduire réduisant ainsi la reproduction anarchique de ces cellules malignes; lésions qui à terme induiront la mort des cellules. Les cellules normales ayant un taux de réparation supérieur à celui des cellules cancéreuses, les effets de la radiothérapie restent donc ciblés aux cellules tumorales.

Administrée en complément de la chirurgie, la radiothérapie postopératoire est un traitement efficace. Les patients qui en bénéficient ont une durée de survie plus longue que les patients n'étant traités que par chirurgie seule ou couplée à une chimiothérapie. Les cellules de glioblastomes étant intrinsèquement résistantes à la radiothérapie (Shu *et al.*, 1998), ce gain de durée de survie est plus particulièrement marqué pour les patients atteints de gliomes de bas grade ; néanmoins, une amélioration allant jusqu'à 6 mois peut-être apportée pour des gliomes de haut grade (Walker *et al.*, 1978).

1.1.4.3 Chimiothérapie

Le traitement par chimiothérapie consiste à administrer aux patients des agents alkylants, ou agents chimiothérapeutiques, qui ont la capacité de bloquer la croissance de la tumeur. En effet, ces agents stoppent la division des cellules à division rapide que sont les cellules tumorales en empêchant la réplication de l'ADN.

Les médicaments les plus couramment utilisés sont le cisplatine, le temozolomide, ou les agents nitroso-urées comme la carmustine (BCNU) ou la lomustine (CCNU), mais encore d'autres agents chimiothérapeutiques tels que le carboplatine, la vincristine ou la procarbazine. Ces deux dernières couplées au CCNU constituent la thérapie PCV qui est utilisée pour le traitement des oligodendrogliomes anaplasiques. Le temozolomide, quant à lui, possède des propriétés lipophiles lui conférant la capacité de franchir la barrière hémato-encéphalique et est moins toxique que les autres agents (Friedman, 2000).

Si la chimiothérapie seule, thérapie PCV ou au temozolomide, est très efficace pour des tumeurs cérébrales de bas grades comme les oligodendrogliomes anaplasiques avec des taux de réponse supérieurs à 80%, elle reste inefficace dans le traitement des glioblastomes (Chinot *et al.*, 2001; Van den Bent *et al.*, 2005). Toutefois, une chimiothérapie au temozolomide associée à la radiothérapie permet d'augmenter de 15% la survie à 2 ans des patients atteints de glioblastomes, et ce traitement fait partie du protocole thérapeutique standard utilisé contre les gliomes de grade IV (Stupp *et al.*, 2005).

1.1.4.4 Thérapies ciblées

Actuellement aucun traitement n'est parfaitement efficace dans le cas des tumeurs du cerveau. De nombreuses études tentent donc de mieux comprendre le fonctionnement de ces tumeurs et ont mis en évidence des voies moléculaires et leurs acteurs impliqués dans la tumorigénèse et l'agressivité des gliomes ; révélant ainsi de nouvelles cibles thérapeutiques

potentielles. Dans le cas des gliomes, ces nouvelles thérapies visent principalement le microenvironnement de la tumeur via les récepteurs de surfaces et les voies de signalisations (Mao *et al.*, 2012).

Une des principales voies moléculaires ciblées par ces nouveaux agents thérapeutiques est la voie de signalisation des récepteurs aux tyrosines kinases EGF et PDGF, facteurs de croissances qui jouent un rôle majeur dans la transduction du signal mitotique par le biais de leurs récepteurs. En effet, le degré de malignité d'un gliome est bien corrélé à l'amplification d'EGFR, et le PDGFR est lui aussi connu pour son rôle dans la progression tumorale des gliomes. L'Imatinib (glivec), inhibiteur du PDGFR et les Géfitinib (iressa) et Erlotinib (tarceva), inhibiteurs d'EGFR ont fait l'objet de tests pharmacologiques. Malheureusement, pour chacune de ces molécules, les résultats d'une phase II menée sur des glioblastomes en récurrence ne se sont pas montrés satisfaisants (Raymond *et al.*, 2008; Rich *et al.*, 2004; Van den Bent *et al.*, 2009).

Le microenvironnement des gliomes malins est perturbé notamment au niveau de la microangiogénèse qui est activée par des cytokines pro-angiogéniques telles que le VEGF. Le Bevacizumab (avastin) est un anticorps séquestrant le VEGF, et qui bloque l'angiogénèse en empêchant le VEGF de se fixer sur son récepteur, le VEGFR. Utilisé couplé à de l'Irinotécan son efficacité est accrue (Friedman *et al.*, 2009). Enfin, d'autres voies de signalisation perturbées dans les gliomes sont visées en inhibant d'autres récepteurs telle la protéine RAS, ou les médiateurs mTOR, AKT, p53, ou PKC (Mao *et al.*, 2012).

Dans le cadre du traitement des gliomes, l'un des problèmes majeurs est l'accessibilité des tumeurs du SNC. En effet le parenchyme cérébral est séparé du sang par la présence de la barrière hémato-encéphalique (BHE). Pour essayer de pallier ce problème une stratégie intéressante est la vectorisation des agents anticancéreux par des nanocapsules. Ces nanoobjets ayant pour particularité de franchir la BHE doivent avant tout posséder les qualités suivantes : être biocompatible, biodégradable, faiblement immunogène et de taille nanométrique. Ces nanocapsules ont de plus été montrées efficaces dans la vectorisation d'agent anticancéreux dans le cas des gliomes (Garcion *et al.*, 2006; Griveau *et al.*, 2013).

1.2 D'un point de vue moléculaire

1.2.1 Caractéristiques physiopathologiques et moléculaires

L'apparition d'une tumeur cérébrale provient donc, comme pour tout autre type de tumeur, d'un développement anarchique de certaines cellules. Ce dérèglement du cycle cellulaire est lié à l'acquisition de lésions génétiques par la future cellule tumorale. Les causes possibles de ces lésions génétiques sont multiples et dépendent également des organes : mutations spontanées, anomalies lors de la division cellulaire ou actions de divers agents mutagènes tels que les radiations, rayonnements UV, virus ou autres agents chimiques, contenus sous le terme de facteurs environnementaux. Ces lésions génétiques affectent généralement certains gènes ayant un rôle de « suppresseurs de tumeurs » ou d'oncogène et favorisant ainsi l'apparition de cancers. Aussi ces dernières années, plusieurs études ont été menées pour mieux comprendre les altérations génétiques et voies moléculaires impliquées dans l'oncogénèse des gliomes qu'ils soient des glioblastomes ou des oligodendrogliomes.

1.2.1.1 Glioblastomes

Les altérations génétiques les plus courantes dans les glioblastomes concernent les gènes codant pour les protéines ayant un rôle dans le contrôle du cycle cellulaire, la réparation de l'ADN, l'invasion ou encore l'angiogénèse. Aussi une prolifération cellulaire incontrôlée associée à des mécanismes de réparation de l'ADN perturbés favorisent les accumulations des anomalies génétiques, et ainsi la croissance tumorale. Qu'ils soient primaires ou secondaires, l'altération génétique la plus fréquente pour les glioblastomes est une perte d'hétérozygotie du chromosome 10q. En revanche, des différences d'altérations entre glioblastomes primaires ou des glioblastomes secondaires ont été confirmées.

Dans les glioblastomes primaires la perte d'hétérozygotie du chromosome 10p ou encore la perte de l'ensemble du chromosome 10 est typique (Ohgaki et Kleihues, 2007) ; tout comme la perte d'hétérozygotie du chromosome 9p et le gain du chromosome 7.

Autre spécificité des glioblastomes primaires, la surexpression de l'EGFR -récepteur à l'EGF, Epidermal Growth Factor- (le cas de plus de 60% des glioblastomes primaires). Dans quelques cas rares, une mutation dans le gène de l'EGFR mène à la synthèse d'un récepteur tronqué EGFRvIII, présentant une délétion de deux exons. La surexpression de ces récepteurs (EGFR ou EGFRvIII) est à l'origine d'une prolifération cellulaire incontrôlée par activation de la voie de signalisation P13K/AKT (Figure 5). En effet, lors de l'activation des récepteurs EGFR

(EGFR par fixation de leurs ligands l'EGF ou le TGF- α ou EGFRvIII actif de manière intrinsèque), la protéine PI3K est recrutée à la membrane cellulaire. Cette protéine peut alors phosphoryler PIP2 en PIP3, PIP3 qui va ensuite activer des molécules effectrices telles que AKT ou mTOR. Comme AKT et mTOR inhibent l'apoptose et favorisent la prolifération cellulaire, leur activation entraîne donc une augmentation de la prolifération et de la survie cellulaire. Cette cascade de réaction peut être inhibée par PTEN (Phosphatase and TENsin homolog) qui empêche la phosphorylation de PIP2 en PIP3; PTEN qui est inactivée dans 25% des glioblastomes primaires (Ohgaki et Kleihues, 2009).

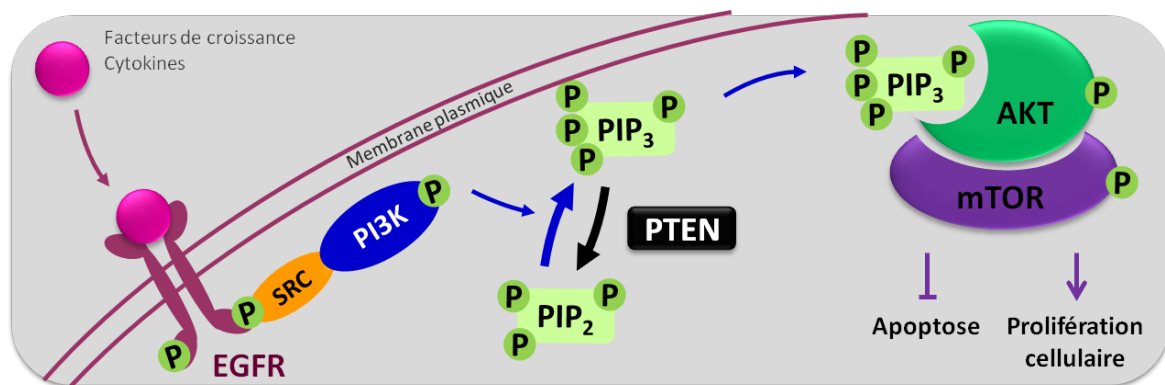


FIGURE 5 – Activation de la voie PI3/AKT par les récepteurs EGFR

Lorsque la protéine PTEN est présente et active, PIP3 est déphosphorylée en PIP2; la cascade de réaction est alors stoppée.

EGFR : Epidermal Growth Factor Receptor; mTOR : mammalian Target Of Rapamycin; PTEN : Phosphatase and TENsin homolog

Pour les glioblastomes secondaires, la progression maligne d'une lésion de bas grade en une lésion de haut grade se fait par l'acquisition séquentielle d'altérations génétiques. L'anomalie génétique la plus fréquemment observée est l'altération de la séquence (sur le bras court du chromosome 17 : 17p11.1) du gène TP53 codant pour la protéine pro-apoptotique p53; protéine impliquée dans l'activation de gènes permettant une régulation du développement cellulaire (Hoang-Xuan *et al.*, 2005). Cette anomalie menant à une inactivation de p53 est présente dans 65% des cas de glioblastomes secondaires contre seulement 30% des cas de glioblastomes primaires (Ohgaki et Kleihues, 2007). p53 est également inactivée par amplification de la protéine MDM2 qui en s'associant à p53 l'empêche de jouer son rôle de contrôle du cycle cellulaire et mène même à sa dégradation (Furnari *et al.*, 2007). Une telle amplification de la protéine MDM2 est observée dans environ 10% des glioblastomes primaires ne présentant pas de mutation dans le gène TP53 (Reifenberger *et al.*, 1993).

Par conséquent, dans de nombreux glioblastomes p53 ne peut plus jouer son rôle de suppresseur de tumeur lors d'une agression génotoxique; ainsi elle n'induit plus la réparation de l'ADN, n'engendre plus l'entrée en apoptose de la cellule et ne participe plus à bloquer

le cycle cellulaire en G1 (Vousden et Lu, 2002). Au même titre que p53 d'autres protéines intervenant dans le contrôle du « check-point » en phase G1 du cycle cellulaire sont affectées par des lésions génétiques. CDK4 (Cyclin Dependent Kinase 4) est souvent sur-exprimée, p16 et RB1 sous-exprimées. Ces sous-expressions peuvent être dues à une délétion homozygote du gène suppresseur p16 (fréquent dans les glioblastomes primaires) ou à une hyperméthylation de promoteurs de gène : du gène suppresseur de p16 (fréquent dans les glioblastomes secondaires) (Nakamura *et al.*, 2001a), ou du gène RB1 (dans 40% des glioblastomes secondaires et 15% des glioblastomes primaires) (Nakamura *et al.*, 2001b) ; hyperméthylation qui est souvent associée à une baisse d'expression des protéines codées. C'est ainsi qu'est activée la voie p16/RB1 (Figure 6). Dans un contexte non pathologique, et dans les cellules quiescentes, la protéine RB1 est hypophosphorylée et peut ainsi séquestrer le facteur de transcription E2F, ce qui bloque le cycle cellulaire. Une fois RB1 phosphorylée par le complexe CyclinD1/CDK4, E2F est libéré et la transcription de gènes activant l'avancée dans le cycle cellulaire est activée (Sherr et Roberts, 1999). Le rôle de contrôle négatif sur la prolifération cellulaire joué par la protéine RB1 par sa liaison à E2F peut être aboli, soit par la phosphorylation de RB1 suite à une amplification de CDK4 principalement, soit par inactivation du gène RB1. p16, elle, inhibe l'action du complexe CyclineD1/CDK4 par liaison avec CDK4.

Cette voie est impliquée dans le contrôle de la progression de la phase G1 à la phase S, et une fois activée, le facteur de transcription E2F est libéré et le « check-point » en phase G1 n'est plus efficace. Les aberrations chromosomiques à l'origine de la tumorigénèse des glioblastomes, primaires et secondaires, vont alors s'accumuler.

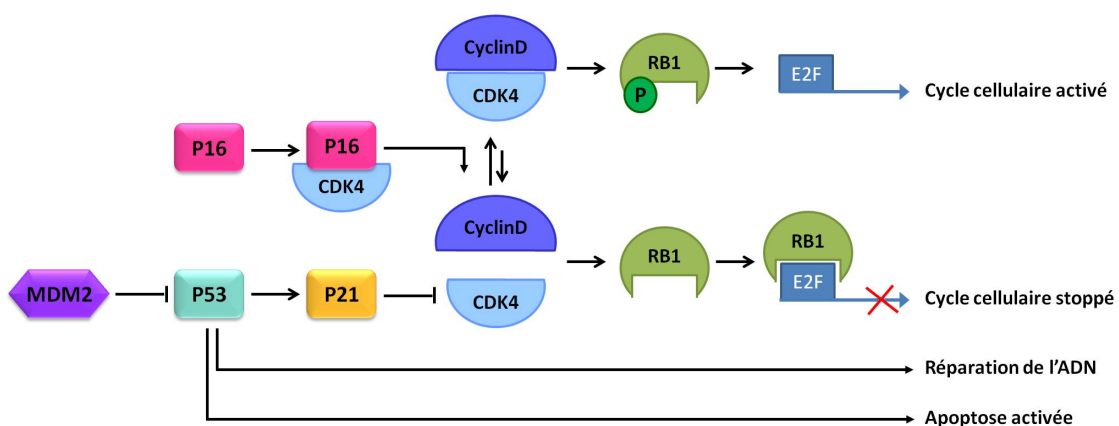


FIGURE 6 – Voies de contrôle du cycle cellulaire

CDK : Cyclin Dependent Kinase ; E2F : Facteur de transcription ; MDM2 : Murine Double Minute 2 ; RB1 : gène 1 du RétinoBlasome

Enfin, une inactivation du gène de la méthylguanine méthyltransférase (MGMT) par hyperméthylation de son promoteur est retrouvée dans 75% des glioblastomes secondaires et

dans 35% des glioblastomes primaires (Nakamura *et al.*, 2001b). Cette inactivation de MGMT est associée à un déficit de réparation de l'ADN puisque MGMT est une enzyme de réparation qui ôte spécifiquement les groupements alkyles promutagéniques présents dans l'ADN. Comme MGMT permet de protéger les cellules de la carcinogénèse induite par des agents alkylants, les patients dont MGMT est exprimée (absence de méthylation du promoteur), seront plus chimiorésistants que les patients dont le gène n'est pas exprimé (Esteller *et al.*, 2000).

1.2.1.2 Oligodendrogliomes

Les oligodendrogliomes sont majoritairement caractérisés par une perte d'hétérozygotie des régions chromosomiques 1p ou 19q (Reifenberger *et al.*, 1994); codélétion qui semble survenir tôt dans le processus de tumorigénèse car elle est à la fois présente dans les oligodendrogliomes de bas grade (grade II) et dans les oligodendrogliomes anaplasiques (grade III). Cette altération est quasiment « spécifique » des oligodendrogliomes puisqu'elle est présente dans plus de deux tiers des tumeurs, contre seulement 10% de présence pour des tumeurs astrocytaires (Smith *et al.*, 1999).

Enfin, la présence de cette codélétion est associée à un phénotype de chimiosensibilité des tumeurs possédant cette altération (Cairncross *et al.*, 1998), expliquant une meilleure réponse au traitement de la part des oligodendrogliomes par rapport aux glioblastomes.

Ces dernières années, plusieurs études ont montré que la présence de mutation dans le gène codant la protéine IDH1 (Isocitrate Déshydrogénase Cytosolique) est très spécifique d'une tumeur de type oligodendrogliome et permet de reconnaître différents types de gliomes (Bleeker *et al.*, 2009; Watanabe *et al.*, 2009). En effet, si cette mutation de IDH1 est peu fréquente dans les glioblastomes primaires, seulement 6% des cas; elle est présente dans plus de 70% des oligodendrogliomes, 50% des astrocytomes de grades II et III et 50% des glioblastomes secondaires (Balss *et al.*, 2008; Ichimura *et al.*, 2009). Cinq différentes mutations simples ont été décrites, mais l'une d'elles s'avère largement majoritaire (>90%). Elle affecte le codon 132 et entraîne le remplacement d'une arginine par une histidine (CGT -> CAT).

Plus rarement (environ 5% des cas), IDH2, homologue mitochondrial de IDH1, peut aussi être mutée (Hartmann *et al.*, 2009). Ici la mutation majoritaire concerne le codon 172, avec la présence d'une lysine à la place de l'arginine, et une deuxième mutation concerne le codon 140 où une glutamine prend la place d'une arginine (CGA -> CAA ou CGG -> CAG) (Cairns et Mak, 2013).

Mutées, les protéines IDH1 et IDH2 sont incapables de catalyser la réaction de décarboxylation de l'isocitrate en α -cétoglutarate et NADPH (Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate), nécessaire dans le mécanisme de défense en cas de stress oxydatif, n'est donc plus produit (Figure 7). De plus, le mutant IDH1 devient capable de catalyser la réduction de l' α -cétoglutarate en 2-hydroxyglutarate, utilisant le NADPH pour former du NADP⁺ (Dang *et al.*, 2009). Cette nouvelle activité enzymatique a pour conséquence une accumulation de 2-hydroxyglutarate qui serait liée à une augmentation de risque de développer un cancer du cerveau (Aghili *et al.*, 2009).

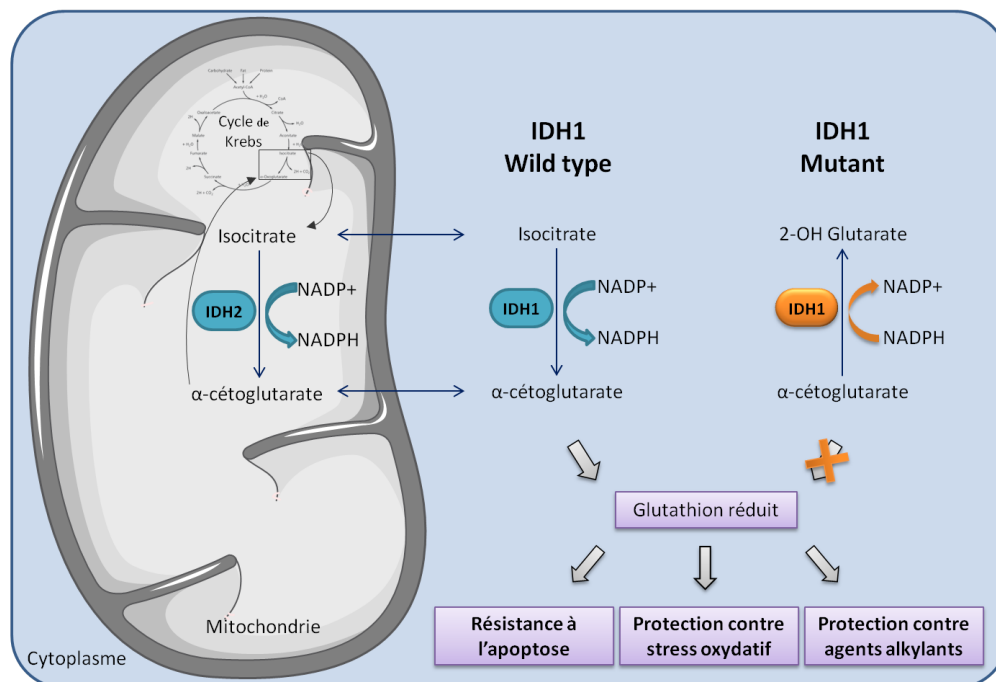


FIGURE 7 – Rôle de IDH1 et IDH2 dans la résistance au stress oxydatif, à l'apoptose et aux traitements alkylants, d'après Labussiere *et al.* (2010) (IDH1 : Isocitrate Déshydrogénase Cytosolique; IDH2 : isoforme mitochondriale; NADP : Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate)

Enfin, si la présence des mutants IDH1 ou IDH2 ne favorise pas la progression de la tumeur, elle est en revanche associée à une meilleure survie du patient portant la mutation avec 31 mois de survie au lieu de 15 mois pour un patient non muté (Yan *et al.*, 2009). IDH1 devient ainsi un bon marqueur pronostic (Yao *et al.*, 2013).

Si les altérations génétiques précédentes sont spécifiques des oligodendrogliomes, certaines altérations marquantes des tumeurs astrocytaires sont également retrouvées dans les oligodendrogliomes à une fréquence plus faible. Par exemple sont retrouvées dans environ 35% des oligodendrogliomes, des délétions du chromosome 10q; dans 5-20% des cas, des amplifications du récepteur EGFR ou encore, dans moins de 30% des cas, des codélétions de p16 et de CDK4 (Hoang-Xuan *et al.*, 2001; Reifenberger *et al.*, 1996; Sato *et al.*, 1996). En revanche,

les mutations de p53 qui sont très fréquentes dans les glioblastomes, ne le sont que très peu chez les oligodendrogliomes, seulement dans 4-15% des cas (Hoang-Xuan *et al.*, 2001; Ohgaki *et al.*, 1991).

1.2.1.3 Résumé

La figure 8 illustre les principales voies moléculaires de tumorigénèse menant à l'apparition d'oligodendrogliomes ou de glioblastomes.

Pour les glioblastomes, il existe deux voies : l'une est directe avec une acquisition tout de go d'un grand nombre de lésions génétiques différentes ; la deuxième est due à l'acquisition progressive de ces différentes lésions provoquant l'évolutivité de la tumeur pour atteindre un haut grade. Enfin, pour les oligodendrogliomes il existe aussi deux voies. L'une est caractérisée par une perte d'hétérozygotie des régions chromosomiques 1p ou 19q et entraîne l'apparition d'oligodendrogliomes de bas grade (grade II). La deuxième voie est elle caractérisée par l'acquisition d'altérations génétiques comme une perte d'hétérozygotie du chromosome 10q, une délétion de p16 et de CDK4 ou encore une amplification du récepteur EGFR. Cette deuxième voie donnerait lieu à des oligodendrogliomes de plus haut grade (grade III), plus agressifs et au caractère infiltrant.

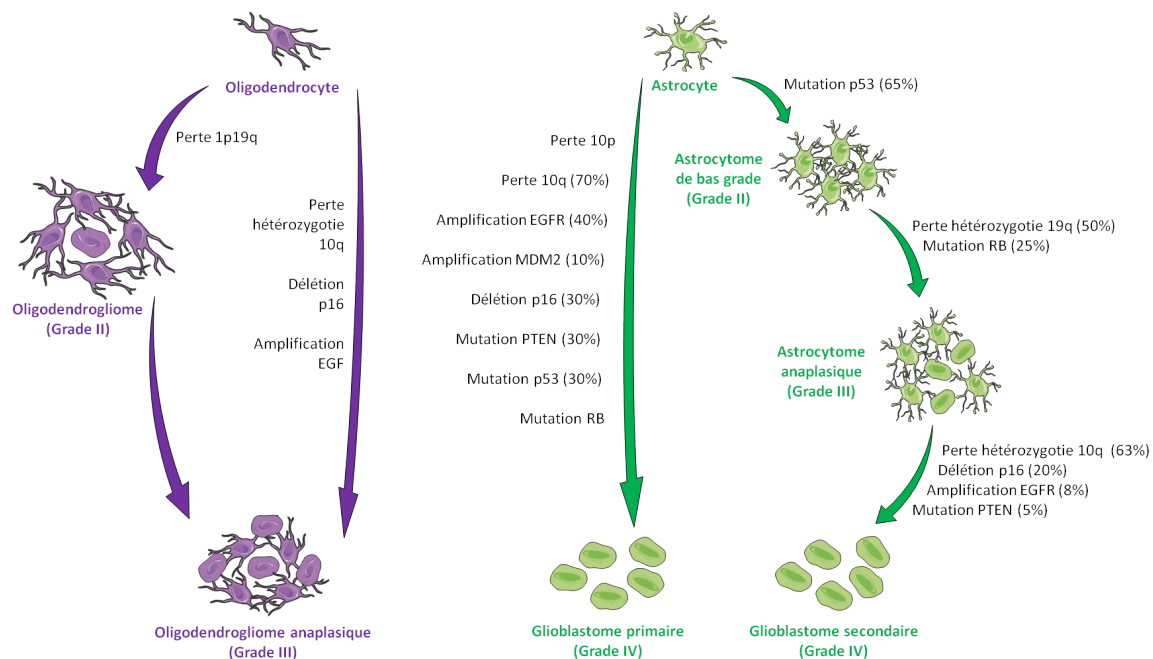


FIGURE 8 – Altérations génétiques impliquées dans la tumorigénèse des oligodendrogliomes et glioblastomes primaires et secondaires. Les pourcentages représentent la fréquence de chacune de ces altérations sur un ensemble de tumeurs du même type (Selon Hoang-Xuan *et al.* (2005); Larsen (2010); Ohgaki *et al.* (2004)).

1.2.2 Hypothèses sur les origines des gliomes

Les similarités histologiques entre les gliomes et les cellules gliales normales ont mené durant de nombreuses années à l'hypothèse que les gliomes dérivent de cellules gliales différenciées normales. La question de l'origine des gliomes a donc été remise au goût du jour il y a quelques années, lors de la découverte des cellules gliales immatures. En effet, ces cellules, souches (cellules souches neurales (NSC)) ou progénitrices (Astrocyte Progenitor Cell (APC) ou Oligodendrocyte Progenitor Cell (OPC)), ont pour particularités d'être indifférenciées, pluripotentes et capables de s'auto-renouveler ; particularités qui sont retrouvées chez les cellules cancéreuses.

Les NSC sont en effet régulées par les mêmes voies cellulaires que celles activées chez les gliomes. Leur comportement dans un cerveau adulte est activement coordonné pour permettre un juste équilibre entre la formation et l'élimination (par apoptose ou par différenciation) de nouvelles cellules NSC. La transformation maligne a alors lieu lors d'une accumulation d'anomalies génétiques au sein des NSC (Germano *et al.*, 2010). Ainsi, des NSC de souris déficientes en gènes régulant le contrôle du cycle cellulaire et de l'apoptose, transfectées avec un EGFR actif, ont dérivé en gliome de haut grade une fois implantées dans le cerveau d'une souris adulte. Ceci suggère que les cellules gliales « immatures » semblent constituer un risque plus conséquent de transformation maligne dans la mesure où leur machinerie cellulaire (prolifération, activité des télomérases, et gènes antiapoptotiques) est déjà activée. Le nombre de mutations nécessaire à une transformation maligne serait donc moindre pour ce type cellulaire que pour une cellule différenciée (Sanai *et al.*, 2005).

Dans le but d'identifier la présence de cellules souches au sein des tumeurs gliales, les différents marqueurs intracellulaires et membranaires des NSC ont été testés. Par exemple, le CD133 a d'abord été reconnu comme marqueur membranaire capable de distinguer et de trier les cellules souches de gliomes capables de recréer une tumeur (Singh *et al.*, 2004). Par la suite, des expériences sur des glioblastomes primaires ont montré que si des cellules souches de gliomes CD133+ remises en culture était capables de se développer de manière non-adhérente et de créer des neurosphères, des cellules souches de gliomes CD133- étaient aussi capables de se développer, bien que de manière adhérente et moins proliférative. Ces deux souches sont aussi tumorigéniques l'une que l'autre et ont un profil moléculaire qui diffère avec 117 gènes différentiellement exprimés (Beier *et al.*, 2007).

Cependant tous les gliomes ne proviennent pas exclusivement de NSC. En effet, dans les mêmes conditions de remise en culture que précédemment, les glioblastomes secondaires

semblent incapables de se développer, ce qui suggère qu'ils ne contiennent pas de cellules tumorales issues de NSC (Beier *et al.*, 2007). De même, les oligodendrogliomes semblent provenir d'OPC (Oligodendrocyte Progenitor Cell) plutôt que de NSC (Pei et Wechsler-Reya, 2010; Persson *et al.*, 2010).

En conclusion, les NSC, les progéniteurs APC ou OPC ou encore les cellules différenciées peuvent être à l'origine des gliomes (Figure 9). Il est possible que plusieurs cellules distinctes évoluent respectivement en chacun des types de gliomes différents ou bien que différentes altérations génétiques d'un seul type de cellule mènent aux différentes manifestations pathologiques, ou encore les deux à la fois (Zong *et al.*, 2012). De plus, l'hétérogénéité possible des cellules au sein même de la tumeur peut mener à une résistance aux traitements, car si certaines cellules répondent et périssent, les cellules résistantes vont, elles, rester et se développer plus facilement une fois les autres cellules mortes (Saunders *et al.*, 2012).

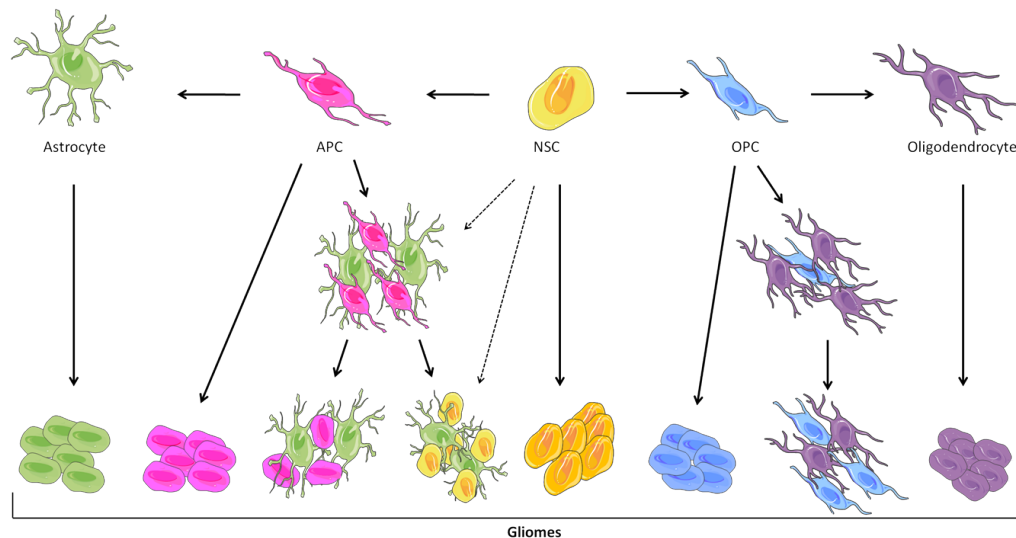


FIGURE 9 – Différentes cellules pouvant être à l'origine des gliomes

OPC : Oligodendrocyte Progenitor Cell; APC : Astrocyte Progenitor Cell; NSC : Neural Stem Cell (d'après Pei et Wechsler-Reya (2010) et Jiang et Uhrbom (2012)).

Ainsi, si le mystère de l'origine des gliomes n'est pas encore élucidé, de nombreuses équipes continuent de chercher une réponse ; car, connaître le ou les types des cellules à l'origine de chaque gliome permettrait de prédire sa physiopathologie, son évolution et sa réponse aux différents traitements (Jiang et Uhrbom, 2012).

1.2.3 Recherche de biomarqueurs diagnostiques et suivi

Les caractéristiques génomiques connues sont utilisées couramment comme moyen de caractérisation des tumeurs dans les laboratoires de recherche. Plus récemment, une étude réalisée par Li et ses collaborateurs montre que les gliomes peuvent aussi être classés à

partir de données transcriptomiques telles que les analyses des profils d'expression des ARN messagers (Li *et al.*, 2009a). Il est également envisageable que les tumeurs puissent être distinguées à partir de données concernant le contingent microARN contenu par les cellules gliales tumorales (Lages *et al.*, 2011).

1.3 MicroARN : agents thérapeutiques et de diagnostic ?

1.3.1 MicroARN

Découverts au début des années 1990, les microARN sont des ARN simple-brin longs d'environ 21 à 24 nucléotides, et représentent 1 à 2% des ARN (Lim *et al.*, 2003, Lages *et al.*, 2012 en Annexe B, page 205). ARN interférants (ARNi) comme les siRNA (short interfering RNA), les microARN sont des répresseurs post-transcriptionnels et contrôlent ainsi l'expression des gènes (Fire *et al.*, 1998; Mello et Conte, 2004). C'est en s'appariant sur la partie 3'UTR des ARN messagers (ARNm) que les microARN guident la répression de la traduction des ARNm en protéine (Figure 10). Lorsque l'appariement miARN/ARNm est parfait, la fonction des microARN s'apparente à celles des siARN, et va mener à la dégradation des ARNm ciblés (Bartel, 2004). Les microARN réguleraient l'expression d'au minimum un tiers de l'ensemble des gènes humains.

1.3.1.1 La biosynthèse des microARN

Chez les mammifères environ 50% des microARN sont regroupés en polycistron et la co-expression du gène incluant la région codant un microARN (gène hôte) et du microARN lui-même a été proposée pour plusieurs gènes (Baskerville et Bartel, 2005).

Les gènes des microARN sont d'abord transcrits sous forme de précurseurs longs de quelques kilobases et appelés pri-microARN. Ces pri-microARN contiennent une coiffe et une queue polyA (Lee *et al.*, 2004). Après leur transcription, réalisée par une polymérase II ou III, la première étape de maturation des microARN dans le noyau est la coupure des pri-microARN par l'enzyme Drosha (endonucléase de masse moléculaire de 650kDa qui nécessite pour son activité un cofacteur, la protéine DGCR8 (DiGeorge syndrome critical region 8)). Un ARN de 60 à 100 nucléotides et ayant une structure en épingle à cheveux est généré : le pré-microARN (Kim *et al.*, 2009). Ce pré-microARN est ensuite acheminé du noyau au cytosol par transport actif GTP-dépendant grâce à une interaction avec l'exportine 5. Le pré-microARN est ensuite clivé par la ribonucléase Dicer qui permet l'hydrolyse de la structure boucle pour libérer un petit ARN double-brin d'une vingtaine de nucléotides. Ce double brin d'ARN va alors interagir avec une protéine de la famille Argonaute (Ago1 ou Ago2) pour

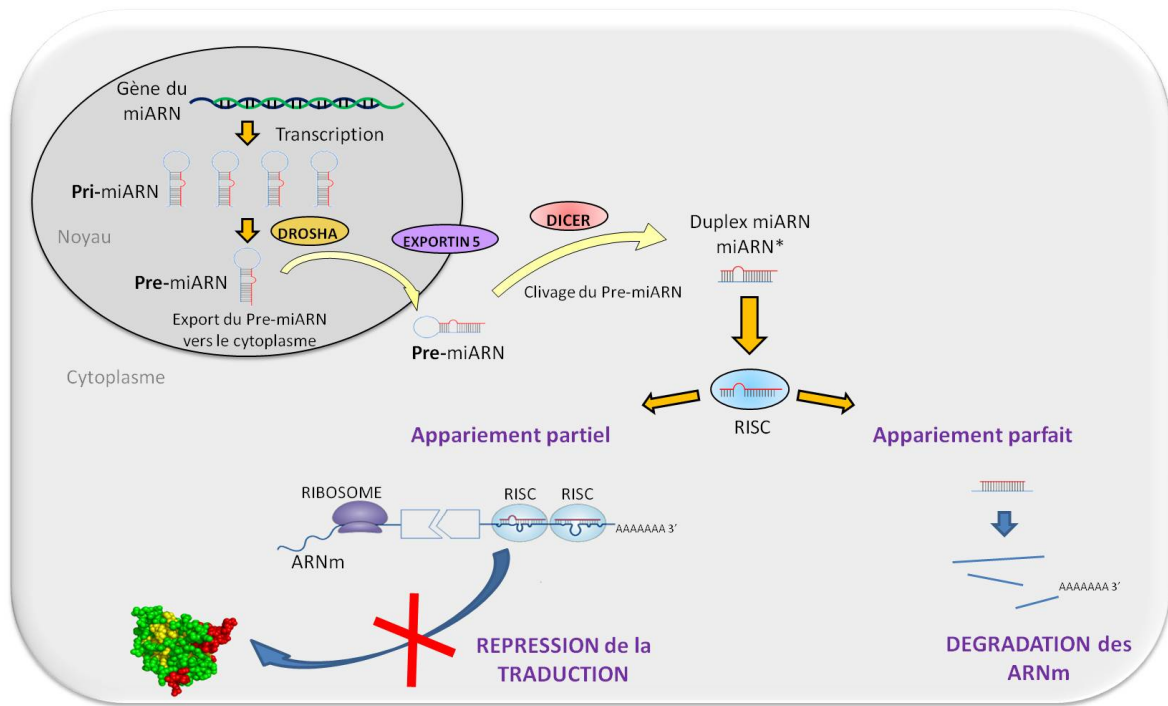


FIGURE 10 – Voie de biosynthèse des microARN et impact sur la traduction des ARNm. Après transcription en Pri-microARN, les extrémités sont clivées pour donner un Pré-microARN. Le Pré-microARN est ensuite exporté vers le cytoplasme grâce à l'exportine 5. Une fois dans le cytoplasme le Pré-microARN est à nouveau clivé au niveau des extrémités, puis le brin mature est intégré à un complexe RISC. Ce complexe, en se fixant sur la partie 3'UTR des ARN messagers spécifiques, mène à une dégradation de l'ARN messager en question lorsque l'appariement est parfait, ou à la répression de sa traduction quand l'appariement est partiel (descriptions détaillées : voir texte).

former le complexe RISC (RNA-induced Silencing Complex). Au cours de la formation de RISC, une hélicase va aider à la séparation des deux brins d'ARN pour ne garder qu'un seul brin. Ce brin sera appelé microARN mature (Winter *et al.*, 2009).

Un ARNm cible est alors chargé au sein du complexe RISC et le microARN peut interagir avec la région UTR en 3' (région non codante) de l'ARNm. Deux voies de « Silencing » sont alors possibles, soit la dégradation de l'ARNm cible, soit la répression de la traduction de ce dernier, en fonction de la force de complémentarité microARN-ARN messager (He et Hannon, 2004).

1.3.1.2 Annotation des microARN

Tous les microARN connus pour 58 espèces sont référencés dans la base miRBase (miR-Base, <http://www.mirbase.org>) et un système d'annotation est donc mis en place pour nommer les différents microARN. Des microARN homologues peuvent être retrouvés dans plusieurs organismes et la nomenclature des microARN permet de bien les identifier. Les

microARN sont identifiés par un numéro précédé de l'abréviation « miR » ou « mir », qui permet une distinction entre le microARN mature (miR) et la boucle précurseur (épinglé à cheveux) du microARN (mir), correspondant respectivement à un numéro d'accèsion MIMAT et MI. Par exemple pour le microARN 21 (miR-21) chez l'homme, le précurseur est noté MI0000077 et le microARN mature MIMAT0000076. Un préfixe de trois ou quatre lettres est utilisé pour distinguer les espèces comme par exemple hsa-miR-101 et mmu-miR-101 pour faire une différence entre le microARN chez l'Homme (hsa : Homo sapiens) et chez la Souris (mmu : Mus musculus) (Griffiths-Jones *et al.*, 2006). Dans certains cas, la boucle précurseur peut donner lieu à la synthèse de deux microARN différents. Le système d'annotation permet la distinction de ces deux microARN : le microARN du côté 5' de la boucle est noté 5p et le microARN du côté 3' est noté 3p. Cette annotation 3p et 5p est utilisée jusqu'à ce que l'abondance de l'une des deux formes soit déterminée. La forme majoritaire sera alors nommée miR et la forme minoritaire miR* (Griffiths-Jones *et al.*, 2008).

Dans certains cas, un microARN mature peut provenir de l'expression de plusieurs régions chromosomiques différentes. Pour ces microARN, il faut donc distinguer leurs précurseurs, et ces microARN seront notés 1, 2, 3, etc, comme par exemple hsa-mir-128-1 (chromosome 2q21.3) et hsa-mir-128-2 (chromosome 3p22.3). Dans cet exemple, les 2 gènes codent pour la même séquence mature. Dans d'autres cas, les microARN matures peuvent être très similaires (quelques bases de différence). Dans ce cas les numéros des microARN sont suivis de a, b, c . . . Par exemple hsa-mir-517a, hsa-mir-517b, hsa-mir-517c sont des microARN dont la séquence mature présente quelques variations. Certains microARN ne suivent pas cette nomenclature, comme par exemple le microARN hsa-let-7.

Actuellement, la base de données qui recense les microARN (Sanger v20.0) identifie 1872 précurseurs de microARN pour l'espèce humaine soit 2578 microARN matures. Le nombre de microARN connus, toutes espèces confondues, est en très forte évolution depuis la découverte de l'existence des microARN. Ces dernières années, l'émergence du séquençage haut-débit a permis un boum de découverte de nouveaux miR qui sont intégrés dans les nouvelles versions de la mirBase (Kozomara et Griffiths-Jones, 2010).

30% de ces microARN sont intergéniques, et parmi les 70% des microARN restant, 80% sont transcrits à partir de la séquence d'introns de gènes (exemple miR-15a et miR-16-1 dans l'ARN non-codant du gène DLEU2). Parmi ces microARN 60% sont localisés dans des introns de gènes codant pour une protéine (exemple miR-106b, miR-93 et miR-25 dans le gène MCM7). D'autres microARN (20%) sont transcrits à partir d'exons de gènes qui ne codent pour aucune protéine (par exemple miR-155 provient d'un transcript appelé BIC non traduit en protéine) (Kim et Nam, 2006).

1.3.1.3 Le rôle des microARN dans le processus de cancérisation

Dans certains cancers, les régions chromosomiques connaissant des modifications génétiques contiennent plus de 50% des microARN (Calin *et al.*, 2004) menant à des dérégulations des profils de microARN notamment dans les gliomes (Lages *et al.*, 2011). Or, certains microARN dérégulés semblent être à l'origine, directement ou indirectement, d'un grand nombre de tumeurs. Suivant le type de cancer, un même microARN semble pouvoir à la fois, être oncogène, ou au contraire contribuer à la suppression tumorale. Ceux qui induisent directement un mécanisme pro-cancéreux sont dits « oncomiR ». Ces oncomiR et miR suppresseurs de tumeur, qui induisent un mécanisme anti-cancéreux, jouent un rôle prépondérant dans la tumorigénèse par le biais de leur fonction de régulation de voies cellulaires majeures telles que le contrôle du cycle cellulaire ou la mort cellulaire (Figure 11).

miR-15a et miR-16 sont considérés comme des suppresseurs de tumeur ; en effet ils induisent l'apoptose en ciblant l'ARNm codant pour BCL2 (B Cell Lymphoma 2), protéine anti-apoptotique ayant un rôle dans plusieurs types de cancers (Cimmino *et al.*, 2005). Une sous-expression de ces microARN dans la majorité des leucémies et des cancers de la prostate (Gregory et Shiekhattar, 2005)), permet une traduction de l'ARNm codant pour BCL2 qui pourra jouer un rôle anti-apoptotique. En revanche, la présence ou l'absence de ces microARN dépend du type de cancer, et pour les glioblastomes ces deux microARN sont retrouvés surexprimés (Lages *et al.*, 2011).

Un autre miR suppresseur de tumeur est le miR-146a. Ce microARN est sous-exprimé dans les gliomes (Permeth-Wey *et al.*, 2011), et dans des cancers affectant différents organes : prostate (Xu *et al.*, 2009), sein (Shen *et al.*, 2008), thyroïde (Jazdzewski *et al.*, 2009), foie (Xu *et al.*, 2008). Or, une de ses cibles directes est l'ARNm codant pour EGFR (Xu *et al.*, 2012). Ainsi, une fois miR-146a sous-exprimé dans les gliomes, le messenger codant pour EGFR ne sera plus soumis à la régulation du miR-146a. EGFR sera alors produit en grande quantité et le « pathway » dépendant d'EGFR sera donc activé.

Les microARN suppresseurs de tumeurs peuvent aussi intervenir dans le contrôle du cycle cellulaire, comme par exemple miR-124, miR-128 et miR-34a (Chiocca et Lawler, 2010; De Smaele *et al.*, 2010). Tous trois sous-exprimés dans les glioblastomes, miR-124 a pour cible directe l'ARNm codant pour CDK6 (Cyclin Dependant Kinase 6), miR-128 cible l'ARNm codant pour Bmi1 (un facteur de renouvellement dans les cellules souches) et miR-34a inhibe la désacétylase SIRT1. Bmi1, CDK6 et SIRT1 participent à l'activation du pathway p16/RB1

(voir figure 11) grâce à CDK6 qui joue le même rôle que CDK4, à Bmi1 qui a la capacité de bloquer p16 et p21 (Chiocca et Lawler, 2010) et à SIRT1 qui bloque l'acétylation de p53 et induit la production de la protéine pro-apoptotique PUMA (p53 Upregulated Modulator of Apoptosis) (Yamakuchi *et al.*, 2008). Une sous-expression de miR-124, miR-128 et/ou miR-34a mène donc à une activation du cycle cellulaire.

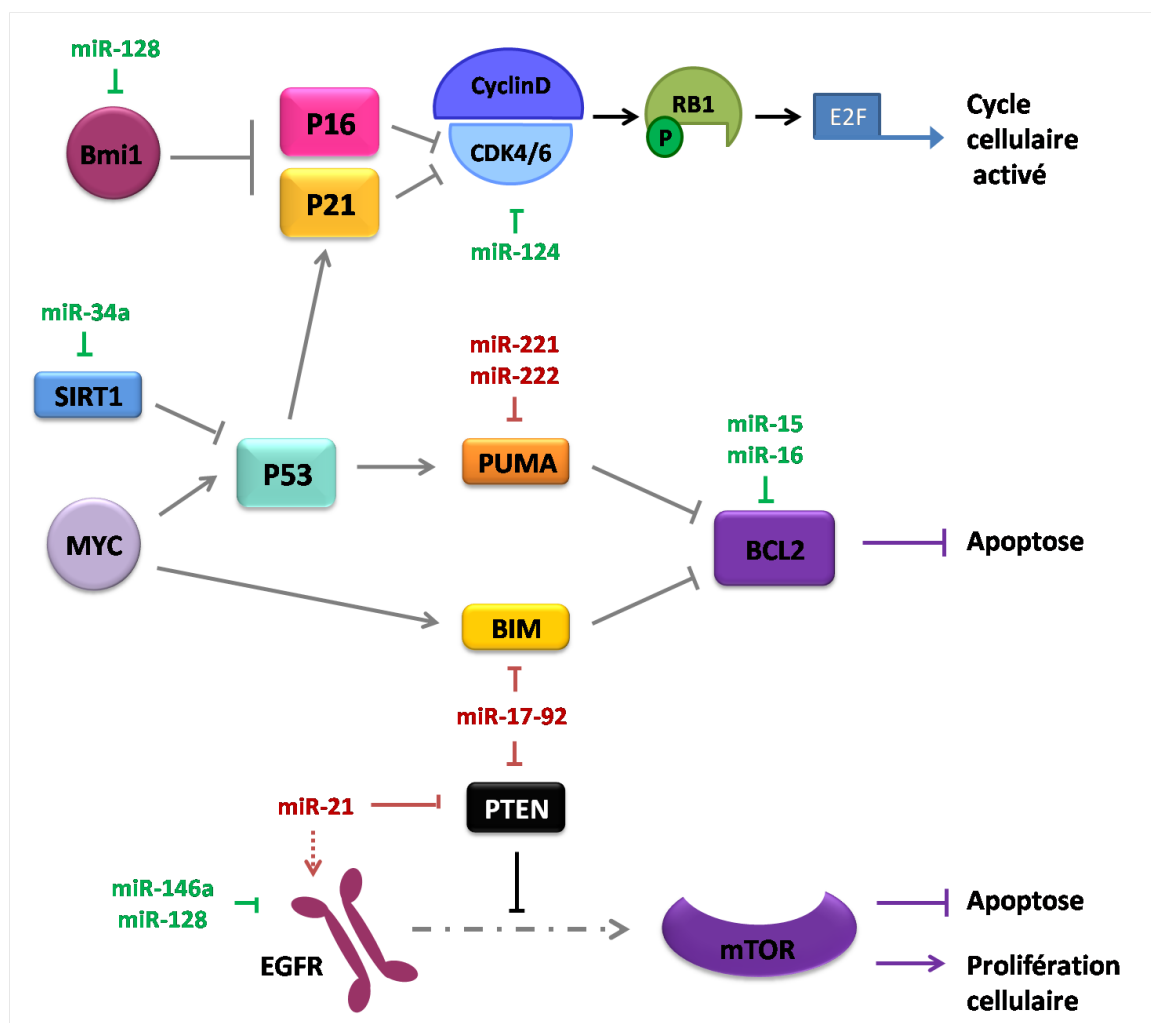


FIGURE 11 – Action des microARN dans la tumorigénèse

Les microARN suppresseurs de tumeur sont indiqués en vert et les oncomiR en rouge. BCL2 : B Cell Lymphoma 2; CDK : Cyclin Dependent Kinase; EGFR : Epidermal Growth Factor Receptor; E2F : Facteur de transcription; MDM2 : Murine double minute 2; mTOR : mammalian Target Of Rapamycin; PTEN : Phosphatase and TENsin homolog; PUMA : P53 Upregulated Modulator of Apoptosis; RB1 : gène 1 du RétinoBlastome; SIRT1 : Sirtuine 1

A l'inverse le cluster miR-17-92 est considéré comme un oncogène. Il est composé de six miARN : miR-17-5p, miR-18a, miR-19a, miR-19b-1, miR-20a et miR-92, fortement surexprimés dans un grand nombre de tumeurs comme par exemple dans les lymphomes des cellules B (He *et al.*, 2005) ou les glioblastomes (Ernst *et al.*, 2010). Parmi les ARNm cibles de ce cluster, se trouvent notamment les ARN messagers codant pour la protéine pro-apoptotique

Bim (Ventura *et al.*, 2008) ou pour la protéine « suppresseur de tumeur » PTEN (Zhang *et al.*, 2013), dont les expressions seront donc réprimées. Un autre oncomiR est miR-21 qui a été décrit comme surexprimé dans 15 types de cancers dont les glioblastomes (Wang et Lee, 2009). miR-21 a pour cible directe PTEN et active indirectement l'expression d'EGFR. La surexpression de ce microARN miR-21 va conduire à une activation du « pathway » EGFR et à une croissance accrue de la tumeur (Zhou *et al.*, 2010). Enfin, une étude récente a mis en évidence que l'ARNm codant pour la protéine pro-apoptotique PUMA serait la cible directe de deux miARN miR-221 et miR-222 dans les cellules de glioblastomes (Zhang *et al.*, 2010).

1.3.2 MicroARN et diagnostic

Les profils de microARN étant dérégulés dans les cancers, la question se pose de leur rôle potentiel en tant que biomarqueurs pour le diagnostic. En effet, utiliser les microARN pourrait permettre d'améliorer le diagnostic de cancers mal définis et de nombreuses équipes travaillent à la généralisation de ce type de diagnostic pour tous types de cancer.

1.3.2.1 Découverte de microARN biomarqueurs

Pour faciliter la découverte de nouveaux microARN et ainsi de nouveaux marqueurs potentiels, de nouvelles techniques de détection ont été développées comme le séquençage haut débit (Stark *et al.*, 2010). Cependant le coût, la quantité monumentale de données générée et le temps nécessaire pour un séquençage ne permettent pas encore d'en faire un outil de routine pour diagnostic rapide. Les techniques de microarrays qui permettent de rechercher tous les miRs connus sur un même échantillon restent encore une approche performante pour un « screening ». A partir de ces données de microarray, 13 miR ont été identifiés pour être dérégulés de manière constante et homogène dans 30 cancers différents; ce sont les miR-29a/b/c, miR-130a, miR-296-5p, miR-338-5p, miR-369-5p, miR-656, miR-760, miR-767-5p, miR-890, miR-939, miR-1275, miR-1276 et miR-1291 (Plaisier *et al.*, 2012).

En revanche, d'autres microARN semblent n'être dérégulés que dans certains cancers et de nombreuses études essaient donc de faire émerger des sous-sélections de biomarqueurs robustes et spécifiques à chaque cancer. Par exemple, chez les patients atteints d'un carcinome épidermoïde de la tête et du cou, 11 microARN sont surexprimés (miR-21, miR-181d, miR-181b, miR-491, miR-455, miR-18a, miR-130b, miR-221, miR-193b, miR-181a, miR-18b) et 1 est sousexprimé (miR-375). De plus le ratio d'expression miR-221/miR-375 se révèle très sensible et spécifique et peut donc être utilisé comme un outil de diagnostic (Avisar *et al.*, 2009). Plus récemment il a été montré que dans le glioblastome certains microARN seraient

retrouvés dans la tumeur issue d'une récurrence (miR-21, miR-10b, miR-181b, miR-181c, miR-195, miR-221, miR-222) avec le même niveau d'expression entre le tissu obtenu lors de la 1ère chirurgie et celui obtenu lors de la 2ème chirurgie (Ilhan-Mutlu *et al.*, 2013). Ces microARN seraient peut-être des marqueurs de récurrence ou encore de potentielles cibles thérapeutiques.

Par ailleurs, certains microARN peuvent, en plus d'être des biomarqueurs de présence d'un cancer, aider à distinguer les sous-types de tumeur et le stade d'avancement de la maladie (Krutovskikh et Herceg, 2010). Ils peuvent aussi se révéler être des outils prédictifs et aider au pronostic (Lu *et al.*, 2005). Aussi, les profils microARN varient en fonction de l'avancée de la tumeur chez les patientes atteintes d'un cancer de l'ovaire (Vaksman *et al.*, 2011), et les microARN miR-146b, miR-221, miR-222, miR-135b se révèlent être de bons biomarqueurs de l'invasion du cancer de la thyroïde et leurs expressions sont corrélées avec la taille de la tumeur et le stade d'avancement de la tumeur et l'apparition éventuelle de métastases (Wang *et al.*, 2013).

Cependant, établir un diagnostic grâce à des microARN utilisés comme biomarqueurs à partir de tissu tumoral peut poser un souci d'invasivité. L'obtention du tissu ne peut en effet se faire que suite à une biopsie ou à une exérèse chirurgicale.

1.3.2.2 Biomarqueurs circulants

Récemment, des microARN ont été retrouvés dans la circulation sanguine périphérique (Lawrie *et al.*, 2008), ouvrant ainsi la voie à une nouvelle gamme de biomarqueurs circulants accessibles par une simple prise de sang. Comme beaucoup d'éléments sont retrouvés dans le sang, les biomarqueurs circulants se doivent d'être robustes et sont donc recherchés dans ce but.

Par exemple les miR-720 et miR-1308 semblent être de bons biomarqueurs du myélome multiple (cancer des cellules sanguines de la moelle épinière) puisqu'ils sont détectés en quantités importantes dans le sang des patients atteints par cette pathologie et ce quels que soient l'âge ou le sexe du patient. Ils sont de plus présents indépendamment de la présence de paraprotéines dans le sang ce qui permettrait un diagnostic plus précoce (Jones *et al.*, 2012). Certains microARN circulants auraient, outre leur statut de biomarqueurs pour le diagnostic, la capacité d'être des biomarqueurs d'intérêt pour le pronostic. En effet, une dizaine de microARN circulants ayant à la fois la capacité de diagnostiquer un cancer de la prostate mais aussi de donner un pronostic de progression du cancer aux patients ont été identifiés (Moltzahn *et al.*, 2011).

Enfin, si les miR ont été retrouvés dans le sang circulant, ils sont aussi présents dans tous les liquides biologiques comme par exemple dans la salive, l'urine, le liquide amniotique ou encore le liquide pleural (Gilad *et al.*, 2008).

1.3.3 MicroARN et thérapie

Les microARN pouvant être dérégulés dans les cellules cancéreuses par rapport aux cellules saines, ils pourraient se révéler être de très bonnes cibles thérapeutiques (Garzon *et al.*, 2009). En effet en dérégulant la quantité de certains microARN au sein de la tumeur, un équilibre pourrait être ré-apporté au sein des cellules tumorales et certaines voies moléculaires affectées pendant la tumorigénèse pourraient ainsi être désactivées. Par exemple abaisser le miR-155 souvent très fort chez les glioblastomes pourrait permettre de réactiver le pathway contrôlé par GABRA1 dont l'ARNm est la cible de miR-155 (Poltronieri *et al.*, 2013).

Pour ce faire, il faut être capable de délivrer au sein des cellules tumorales des antagonistes de microARN pour contrer la surexpression des oncomiR, ou alors des agonistes de microARN pour rééquilibrer le déficit en microARN suppresseurs de tumeur.

Actuellement plusieurs techniques sont en cours de tests. L'une des techniques repose sur l'import d'antagonistes ou d'agonistes de microARN par le biais de nanocapsules lipidiques sur lesquelles ils sont fixés. Ces particules ont la particularité d'être compatibles biologiquement et de pouvoir passer facilement la barrière hémato encéphalique. Les cellules transformées grâce à ces nanocapsules montrent des quantités en microARN rééquilibrées pour des lignées de cellules en culture (Griveau *et al.*, 2013). Un autre moyen est d'utiliser des adénovirus qui vont permettre à la cellule ciblée de réexprimer le microARN suppresseur de tumeur sous-exprimé. Le problème de ces deux techniques est qu'elles permettent d'apporter un changement très fort de quantité d'un microARN donné, mais cet effet est limité par le temps de vie de ces éléments dans le cytoplasme de la cellule ciblée. Une technique permettant une dérégulation à plus long terme réside dans l'utilisation de lentivirus qui vont permettre une incorporation des séquences à exprimer dans le génome de la cellule visée. Le problème de cette dernière technique est que l'expression du microARN voulu reste tout de même faible (Purow, 2011).

Enfin une autre solution de thérapie basée sur les microARN serait d'utiliser des vecteurs suicides sous contrôle de microARN très fortement dérégulés dans les cellules cancéreuses par rapport aux cellules normales. Cela permettrait une spécificité de la thérapie due à une expression du vecteur suicide seulement dans les cellules atteintes. Un exemple de ce type de thérapie a été testé sur les cellules de glioblastome en utilisant un vecteur lentivirus contenant un gène de contrôle de suicide cellulaire, le HSV-TK (herpes simplex virus thymidine

kinase), sous contrôle du miR-128 qui est sous-exprimé dans les glioblastomes. La présence de ganciclovir dans le milieu de culture a provoqué la mort de toutes les cellules transformées par le vecteur (Skalsky et Cullen, 2011).

1.4 Communication des gliomes avec leur microenvironnement

Le principe de la communication cellulaire peut se résumer en un mécanisme constitué d'une cellule émettrice produisant un messager qui est ensuite capturé par le récepteur de la cellule réceptrice. Ce système est en outre basé sur un principe de stéréospécificité et d'affinité fortes entre messagers et récepteurs membranaires qui permet de réguler des réponses cellulaires importantes. Ces réponses s'échelonnent dans le temps et peuvent être de l'ordre de la seconde pour une réponse électro-physiologique via l'activation de canaux ioniques par exemple; de l'ordre de la minute pour une réponse métabolique et enzymatique avec l'apport de modifications post-traductionnelles sur certaines protéines; ou encore de l'ordre de quelques heures pour une réponse transcriptionnelle.

Une bonne communication cellulaire est de la plus haute importance puisque c'est en communiquant entre elles que les cellules de l'organisme s'organisent pour parvenir à un développement tissulaire, à réguler les différentes fonctions, à contrôler la croissance ou à induire la mort cellulaire. S'il est d'ailleurs généralement admis qu'une cellule cancéreuse n'« écoute » plus son environnement et ignore les signaux de mort cellulaire, cette cellule continue de communiquer à sa manière.

Il existe différents types de communication utilisés par les cellules de gliomes (Figure 12), dont quatre majoritaires : la communication autocrine où les cellules émettrices sont aussi les cellules réceptrices ; la communication juxtacrine où les cellules émettrices et réceptrices sont tellement proches qu'elles communiquent par interactions entre leurs membranes plasmiques respectives ; la communication matricrine où la communication se fait avec le microenvironnement des cellules ; et enfin la communication paracrine que les cellules utilisent pour communiquer à plus grande échelle de distance.

1.4.1 Autocrine

Avant tout, les cellules de gliomes communiquent avec leurs pairs et utilisent pour cela un mode de communication autocrine. Ce mode de communication leur permet d'activer et de réguler différentes voies moléculaires impliquées dans la tumorigénèse des gliomes.

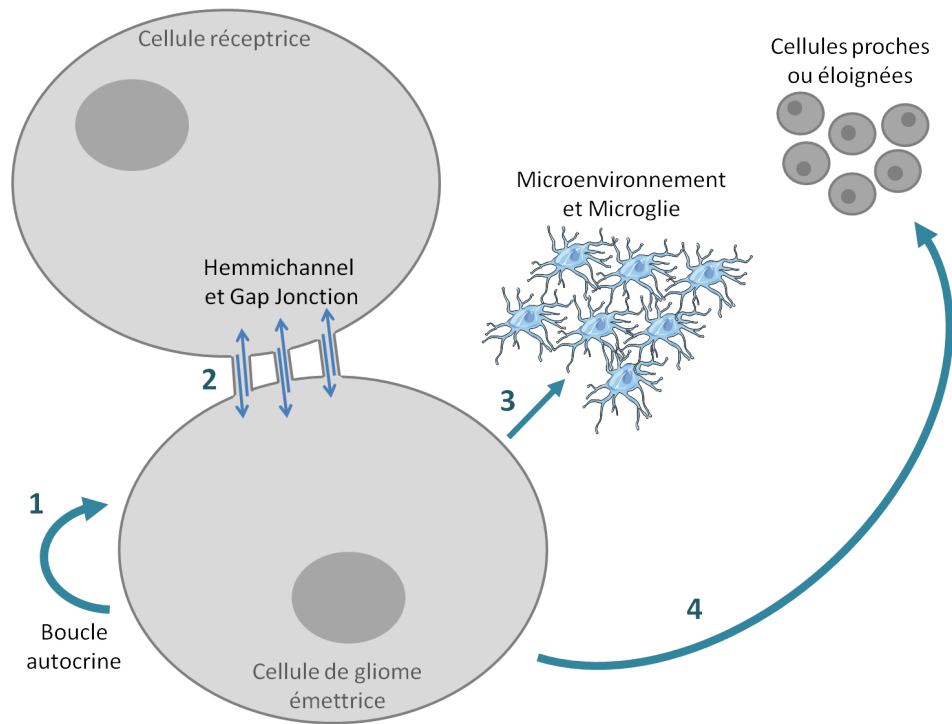


FIGURE 12 – Différents moyens de communication des gliomes.

1. Communication autocrine : mise en place de boucles autocrines
2. Communication juxtacrine par le biais de Gap Jonction et d’Hemichannel
3. Communication matricrine : interactions avec le microenvironnement et la microglie
4. Communication paracrine

Dans les gliomes, la voie moléculaire concernant les cytokines VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) est un exemple de ce type de boucles autocrines.

En effet, chez les astrocytomes VEGF et VEGFR sont retrouvés co-surexprimés. La présence de VEGF exogène capturé par le récepteur VEGFR2 est nécessaire à l’activation de cette boucle autocrine par des glioblastomes en culture ; puis les cellules elles-mêmes produisent du VEGF endogène qu’elles sécrètent. La mise en place de cette boucle autocrine promeut la croissance cellulaire et protège les cellules des effets pro-apoptotiques des traitements par irradiation (Knizetova *et al.*, 2008). Une étude plus récente montre que si le VEGFR2 interne est présent dans une grande partie des cellules d’une masse tumorale, le VEGFR2 de surface est majoritairement présent dans une sous-population de cellules situées proches des vaisseaux. Cette étude révèle aussi la nécessité d’une interaction du complexe VEGF/VEGFR2 avec le co-récepteur NRP1 (Neuropilin-1) pour une véritable activation du pathway VEGF/VEGFR2. Aussi, cibler NRP1 à l’aide de shARN diminue l’activité du complexe VEGF/VEGFR2 et pourrait ainsi permettre une meilleure efficacité des traitements antitumoraux comme la radiothérapie par exemple (Hamerlik *et al.*, 2012).

Une autre voie moléculaire, celle de EGF (Epidermal Growth Factor), très majoritairement activée dans les gliomes est elle aussi régulée par une boucle autocrine. Cette voie moléculaire contrôle en partie la croissance cellulaire et est effectivement mise en place dans les gliomes où l'expression des récepteurs EGFR et de leurs ligands $TGF\alpha$ et HB-EGF est retrouvée accrue. De plus, chez certains gliomes la forme mutée du récepteur EGFR est présente : le mutant, EGFRvIII. Si ce mutant ne lie pas les ligands $TGF\alpha$ et HB-EGF, il est toutefois plus tumorigénique que EGFR non muté et c'est lui qui permet d'activer la surexpression de certains gènes dont $TGF\alpha$ et HB-EGF. Ainsi, la quantité de HB-EGF augmente avec la quantité de EGFRvIII. HB-EGF, lorsqu'il peut-être bloqué par l'utilisation d'anticorps par exemple, amène à une diminution de la prolifération cellulaire. Ainsi EGFR, EGFRvIII, $TGF\alpha$ et HB-EGF semblent créer une boucle autocrine permettant aux gliomes d'activer et de réguler leur prolifération (Ramnarain *et al.*, 2006). Cette même boucle autocrine, par le biais des ligands EGF et bFGF eux aussi produits par les gliomes, aurait la capacité de favoriser la mobilité et l'invasion des gliomes (Li *et al.*, 2009b).

Enfin, différentes voies moléculaires permettant une régulation de la mobilité et donc de la migration ou de l'invasion des cellules de gliomes sont elles aussi soumises au contrôle de boucles autocrines.

Une des premières boucles autocrines mise en évidence concerne les facteurs de croissance G-CSF (Granulocyte Colony Stimulating Factor) et GM-CSF (Granulocyte Macrophage Colony Stimulating Factor) et leurs récepteurs qui sont produits par les gliomes. Les cellules de gliomes s'affranchissent alors d'une régulation normalement paracrine dépendant de la production de ces ligands par les cellules stromales en mettant en place une boucle autocrine pour activer leur croissance et leur migration (Mueller *et al.*, 1999). La migration et l'infiltration des gliomes est aussi activée par la production importante de sémaphorine (Sema3A) par les gliomes ; Sema3A qui est un signal autocrine pour la Neuropilin-1 (NRP1) et qui promeut ainsi la dispersion des glioblastomes en modulant l'adhésion des cellules (Bagci *et al.*, 2009). L'adhésion des cellules est aussi contrôlée par la formation, soumise à une boucle autocrine, du complexe de la nétrine et de son récepteur. Ce complexe permet la maturation des complexes focaux en adhésions focales. Chez les glioblastomes, cette boucle autocrine est inhibée par la diminution de la production de la nétrine et de son récepteur, ce qui permet de diminuer l'adhésion des cellules et de promouvoir la migration cellulaire (Jarjour *et al.*, 2011).

Un dernier exemple concerne le complexe formé par l'endothéline 3 (EDN3) et son récepteur (EDN3RB) ; complexe qui régule des gènes impliqués dans l'organisation du cytosquelette, la pause de la croissance et de la différenciation et la réponse aux dommages à l'ADN.

EDN3 exogène est produit par certaines cellules « indifférenciées » de la masse tumorale ; cellules qui produisent EDN3 en grandes quantités et activent ainsi leur boucle autocrine EDN3/EDN3RB qui leur permet de proliférer et de migrer. Pour la majorité des cellules cancéreuses de la masse tumorale, différenciées par exposition au sérum, la production d'EDN3 diminue et c'est la présence d'EDN3 exogène produit par les cellules « indifférenciées » qui leur permet de maintenir un niveau basal d'activation de la boucle autocrine EDN3/EDN3RB, niveau basal qui mène toujours à une prolifération cellulaire mais ne permet plus une propagation par migration des cellules différenciées. Bloquer ce complexe provoque chez les cellules concernées l'apoptose, l'impossibilité de former des sphères, l'incapacité à la migration et la perte de tumorigénicité. Aussi, ajouter une thérapie permettant de bloquer ce complexe aux thérapies actuelles permettrait d'éviter une rechute par prolifération et migration de ces cellules tumorales « indifférenciées » (Liu *et al.*, 2011).

1.4.2 Juxtacrine

Un deuxième mode de communication est médié par des interactions cellule-cellule. Des cellules très proches sont capables d' « unir » leurs membranes respectives pour former des « tunnels », appelés hemichannels ou gap junctions, qui leur permettent d'échanger des informations facilement. Les cellules d'astrocytes et de gliomes sont toutes deux capables de former ce type de structures pour communiquer, elles peuvent même en former entre cellules saines d'astrocytes et celles cancéreuses de gliomes (Zhang *et al.*, 1999).

Les astrocytes utilisent ce type de structures pour communiquer en propageant une augmentation de concentration en calcium (Ca^{+}) intracellulaire. Cette propagation du signal peut être activée par la présence de quinine, un activateur d'hemichannel ; et inhibée par FFA (Flufenamic Acid), inhibiteur des hemichannels dépendants de la connexine 43 (Cx43). Ainsi cette communication se fait par libération d'ATP à travers des hemichannels dont la mise en place est dépendante de la présence de la connexine 43 (Stout *et al.*, 2002). Dans les astrocytomes, ces vagues de signaux Ca^{+} peuvent aussi être médiées par des gap junctions et sont alors activées par activation du récepteur P2YR (Suadicani *et al.*, 2004).

Deux types de connexines Cx43 et Cx32 sont présentes dans les gliomes. Toutes deux sont capables de créer des hemichannels mais la Cx43 semblerait plus efficace (Goldberg *et al.*, 2000). Ces hemichannels sont alors dépendants de Cx43 ou de Cx32, et une cellule ne comportant que la Cx43 ne sera pas capable de créer un hemichannel avec une cellule ne portant que la Cx32. Ces connexines sont très importantes dans la formation de gap junctions ou hemichannels fonctionnels. Ainsi, une transfection de Cx43 à des cellules incapables de

créer des gap jonctions ou hemichannels lui permet d'en former. Enfin la très grande mobilité des Cx dans la membrane cellulaire permet aux cellules une grande dynamique de formation et dissolution des hemichannels (Cotrina *et al.*, 2008).

Cette communication juxtacrine permet aux cellules de réguler leur cycle cellulaire. En effet, la Cx43 peut inhiber la prolifération cellulaire en réprimant le facteur de croissance MGF-E8 (Goldberg *et al.*, 2000). De plus, dans des cellules de gliomes de rat C6, le fait d'éviter la perte d'expression de Cx43 et des GJIC (Gap Junction Intercellular Communication) stoppe leur prolifération cellulaire (Sánchez-Alvarez *et al.*, 2001). Enfin, cette communication cellule-cellule permet de transmettre un signal d'apoptose à des cellules proches par le biais des gap jonctions et un signal plus étendu allant jusqu'à des cellules plus éloignées par le biais d'hemichannels (Decrock *et al.*, 2009). La transmission de ce signal d'apoptose par les gap jonctions et hemichannels nécessite alors la présence d'IP3 (inositol 1.4.5 triphosphate) (Decrock *et al.*, 2012).

Dans les gliomes la présence de l'ARNm et de la protéine Cx43 n'est détectée que pour des gliomes de bas grade. Lorsque le grade devient plus élevé l'absence de Cx43 entraîne une perte de fonctionnalité des GJIC (Pu, 2012). Dans les glioblastomes (gliomes de haut grade) seul l'ARNm codant pour la Cx43 est fortement détecté et la protéine Cx43 n'est, elle, pas détectée (Caltabiano *et al.*, 2010). Une régulation post-transcriptionnelle de cet ARNm permet à ce que cette protéine soit active et membranaire pour des gliomes de bas grade. Dans les gliomes de haut grade en revanche elle devient cytosolique et inactive, elle ne permet alors plus la mise en place de GJIC (Cottin *et al.*, 2011; Sin *et al.*, 2012).

Cette absence de GJIC fonctionnelles est inversement proportionnelle à la capacité de migration des gliomes (Mc donough 1999). En effet la perte d'expression de Cx43 entraîne une perte de fonctionnalité de GJIC et ainsi une diminution de l'« ancrage » de la cellule. Les cellules sont alors capables de migrer (Strale *et al.*, 2012). De plus, si l'expression de Cx43 est rétablie dans les cellules de gliomes alors il n'y a plus de renouvellement spontané de la tumeur et son invasivité est inhibée (Yu *et al.*, 2012). Ainsi, stopper la migration des gliomes en réactivant la communication intercellulaire par gap jonctions pourrait peut-être augmenter la durée de survie de patients atteints de glioblastomes de 20% (Badoual *et al.*, 2010).

Pour ce faire l'expression de Cx43 doit être rétablie dans les cellules de gliomes. Dans les cellules de glioblastomes, l'expression des microARN miR-221 et miR-222 est augmentée. Ces microARN ayant pour cible Cx43, une transfection d'antimiR mir221/222 permettrait de contrer l'effet inhibiteur des microARN miR-221 et miR-222 sur l'expression de Cx 43 dans la cellule. L'expression de Cx43 ainsi que la mise en place des GJIC seraient alors rétablies.

Testé *in vitro* ce traitement permet de bloquer la croissance des cellules de glioblastomes U251 (Hao *et al.*, 2012).

1.4.3 Matricrine

Dans le cas des gliomes, le microenvironnement constitué de la matrice extracellulaire est modifié. La matrice extracellulaire du tissu tumoral connaît la surexpression de certains de ses éléments dont les protéines SPARC, Tenascin-C, Thrombospondine, ou les MMP (Matrix Metallo-Proteinase ou métalloprotéase matricielle) par exemple. Ces protéines joueraient probablement un rôle dans l'angiogénèse. Les interactions des gliomes avec la matrice extracellulaire se fait par l'intermédiaire des intégrines. Aussi une diminution de l'expression de l'Intégrine $\beta 1$ d'un gliome permet de stopper son adhésion à la matrice extracellulaire, et par là même, sa migration (Bellail *et al.*, 2004).

La dérégulation de la composition de la matrice extracellulaire provient généralement d'une sécrétion accrue de certaines protéines par les gliomes. Ainsi, dans les cellules de glioblastomes en culture U87, la dérégulation de l'ARN messager de SPARC permet une activation de la synthèse de cette protéine. Cette protéine est ensuite sécrétée dans la matrice extracellulaire où elle active la migration cellulaire à travers la formation de fibres de stress et de points de « focal adhésion » (Dejeans *et al.*, 2012).

La modification de la matrice extracellulaire des tissus tumoraux a pour effet d'activer la microglie environnante. Les gliomes produisent et sécrètent dans la matrice extracellulaire des chemokines CCL2. Ces chemokines extracellulaires activent les cellules de la microglie qui se mettent à produire et à sécréter l'interleukine 6 (IL-6) dans la matrice extracellulaire. IL-6 extracellulaire active alors la migration de gliomes (Zhang *et al.*, 2011). Les cellules de microglie activées sécrètent aussi du TGF β 1 ce qui active l'invasivité des gliomes (Ye *et al.*, 2012). Enfin, les gliomes produisent et sécrètent aussi des MMP2 dans la matrice extracellulaire. Ces MMP2 sont ensuite activées par la métallo-protéase MT1-MMP sécrétée par la microglie activée. Ce complexe permet la destruction de la matrice extracellulaire, ce qui permet aux cellules de gliomes de migrer et d'envahir les tissus proches. Cette invasion est néanmoins diminuée par l'absence de microglie (Charles *et al.*, 2011). Par ailleurs, une autre étude a montré que suite à une ablation de la microglie autour d'un gliome, la taille de la tumeur diminue et est corrélée avec une meilleure réponse aux traitements. Au contraire, la microglie péri-tumorale a été activée par la présence d'un facteur soluble produit par des cellules de gliomes en culture, la chemokine CCL21. Dans ce cas la prolifération cellulaire a été accrue et la mort par apoptose inhibée ; ceci conduisant à une augmentation de la taille

de la tumeur (Zhai *et al.*, 2011). La microglie environnante joue donc un rôle prépondérant dans la migration et l'invasivité des gliomes.

Un outil de modélisation a été mis en place par Aubert *et al.* (2008) pour appréhender la migration de gliomes sur un substrat de collagène ou sur des astrocytes. La migration est accrue si les GJIC avec ses pairs sont rompus. Elle est au contraire diminuée quand les interactions avec l'ECM sont inhibées.

1.4.4 Paracrine

Les gliomes communiquent aussi de manière paracrine par le biais des facteurs de croissance qu'ils expriment tels que le VEGF, EGF ou TGF- α . Ces facteurs de croissance s'ils jouent un rôle autocrine (décrit plus haut dans le paragraphe 1.4.1, p 43) en activant la cellule productrice elle-même, jouent aussi un rôle paracrine en activant aussi les autres cellules de la masse tumorale. Ils sont également capables d'activer la prolifération d'autres cellules telles que les cellules endothéliales par le biais du VEGF qu'ils produisent en grandes quantités (Folkens *et al.*, 2009).

Cette communication paracrine peut aussi être médiée par des microvésicules membranaires. Ces vésicules produites par des gliomes sont en effet capables de transporter et de transférer le récepteur oncogène EGFRvIII à d'autres cellules de la masse tumorale des gliomes ne l'exprimant pas (Al-Nedawi *et al.*, 2008). Des microvésicules produites par des oligodendrogliomes sont aussi capables de provoquer une apoptose neurale lorsqu'elles transportent Fas –Ligand (Fas-l), une protéine transmembranaire de type II appartenant à la famille des TNF (tumor Necrosis Factor) (D'Agostino *et al.*, 2006). Ces mêmes microvésicules d'oligodendrogliomes, si elles transportent TRAIL, peuvent aussi induire une apoptose chez les astrocytes (Lo Cicero *et al.*, 2011).

Les gliomes sécrètent de plus des vésicules extracellulaires appelées exosomes (Li *et al.*, 2013a; Skog *et al.*, 2008) dont le rôle dans la communication cellulaire ; à la fois autocrine, matricrine et paracrine ; semble émerger.

2 Les exosomes, moyen de communication

2.1 Que sont les exosomes ?

Les exosomes sont un type de vésicules extracellulaires de taille nanométrique qui jouent un rôle dans la physiopathologie de la tumeur, participent au processus de tumorigénèse et sont des acteurs probables d'un mécanisme de communication intercellulaire.

2.1.1 Découverte des exosomes

Le nom d' « exosome » est proposé en 1981 par Trams *et al.* (1981) pour décrire de petites vésicules cellulaires observées pour la première fois. Cette équipe décrit des vésicules d'un diamètre d'environ 40 nm, sécrétées par différents types cellulaires *in vitro* et ayant une composition lipidique différente de la membrane plasmique ce qui suggère une origine différente et plus complexe qu'un simple bourgeonnement membranaire (Trams *et al.*, 1981). Une origine endocytaire est finalement proposée pour expliquer la formation et la composition des exosomes. Cette hypothèse est étayée par des images en microscopie électronique d'exocytose de petites vésicules d'une cinquantaine de nanomètres (Harding *et al.*, 1983; Pan *et al.*, 1985). C'est finalement en 1987 que le mécanisme de formation des exosomes est observé « par hasard » en suivant l'endocytose du récepteur à la transferrine (TfR) par des réticulocytes en maturation. Les TfR membranaires marquées à l'or colloïdal sont suivies en microscopie électronique et retrouvées tour à tour dans différents compartiments cellulaires. Ils sont d'abord observés à la membrane, puis dans des endosomes précoces, ensuite dans des microvésicules à l'intérieur d'endosomes multivésiculés (MVE) et enfin dans le milieu extracellulaire après fusion des MVE avec la membrane plasmique (Johnstone, 2005; Johnstone *et al.*, 1987) (Figure 13 et paragraphe 2.1.2.1).

Aussi, s'il existe une multitude de vésicules extracellulaires de types différents telles que les microvésicules, les ectosomes, les particules membranaires ou encore les corps apoptotiques, elles ont toutes une origine membranaire alors que les exosomes ont eux une origine

endocytaire et donc intracellulaire (Akers *et al.*, 2013; Théry *et al.*, 2009).

Les exosomes semblent être produits par tout type cellulaire *in vitro*, et s'il est encore impossible de savoir quel type de cellules produisent les exosomes *in vivo* (toutes les cellules ou seules les cellules souffrantes ou en condition de stress), ceux-ci ont été retrouvés dans divers fluides biologiques (Lakkaraju et Rodriguez-Boulan, 2008). Des exosomes sont ainsi retrouvés dans des fluides biologiques tels que le sang (Caby *et al.*, 2005; Gallo *et al.*, 2012; Street *et al.*, 2012; Taylor *et al.*, 2006), l'urine (Gonzales *et al.*, 2009; Michael *et al.*, 2010; Pisitkun *et al.*, 2004), la salive (Ogawa *et al.*, 2008; Palanisamy *et al.*, 2010), le liquide encéphalo-rachidien (Street *et al.*, 2012), le lait maternel (Admyre *et al.*, 2007), ou encore le liquide amniotique (Mincheva-Nilsson et Baranov, 2010; Pisitkun *et al.*, 2004). Des exosomes ont aussi été retrouvés dans le tissu cérébral post mortem (Banigan *et al.*, 2013).

2.1.2 Cycle de vie d'un exosome

2.1.2.1 Biogénèse des exosomes

De petites vésicules intraluminales sont générées durant la maturation des endosomes en endosomes multivésiculés et au cours de ce processus, une petite fraction du cytosol se retrouve piégée à l'intérieur de ces vésicules (Figure 13 a). Au cours des dernières années, plusieurs études ont montré que, outre le fait de pouvoir fusionner avec les lysosomes, les endosomes multivésiculés pouvaient aussi fusionner avec la membrane plasmique. Les vésicules alors sécrétées sont appelées exosomes (Stoorvogel *et al.*, 2002).

L'origine des exosomes réside dans la formation de vésicules intraluminales (ILV) dans les endosomes multivésiculés (MVE). La composition des exosomes produits est ainsi étroitement liée à la machinerie permettant la formation de ces ILV. Différentes équipes se sont penchées sur cette problématique et il apparaîtrait que la formation des exosomes ne résulte pas d'une seule et unique machinerie mais de différents mécanismes indépendants (Keller *et al.*, 2006).

L'un de ces mécanismes est déclenché par la présence à la surface des MVE de récepteurs EGF ubiquitinylés car destinés à la dégradation. La partie cytosolique ubiquitinylée de ce récepteur catalyse la formation des complexes ESCRT (Endosomal Sorting Complex Required for Transport) nécessaires à la déformation et scission de la membrane de l'endosome pour former les ILV (Hurley, 2010) (Figure 13 b).

Tout d'abord le complexe ESCRT 0, constitué de HRS (Hépatocyte Receptor tyrosine kinase

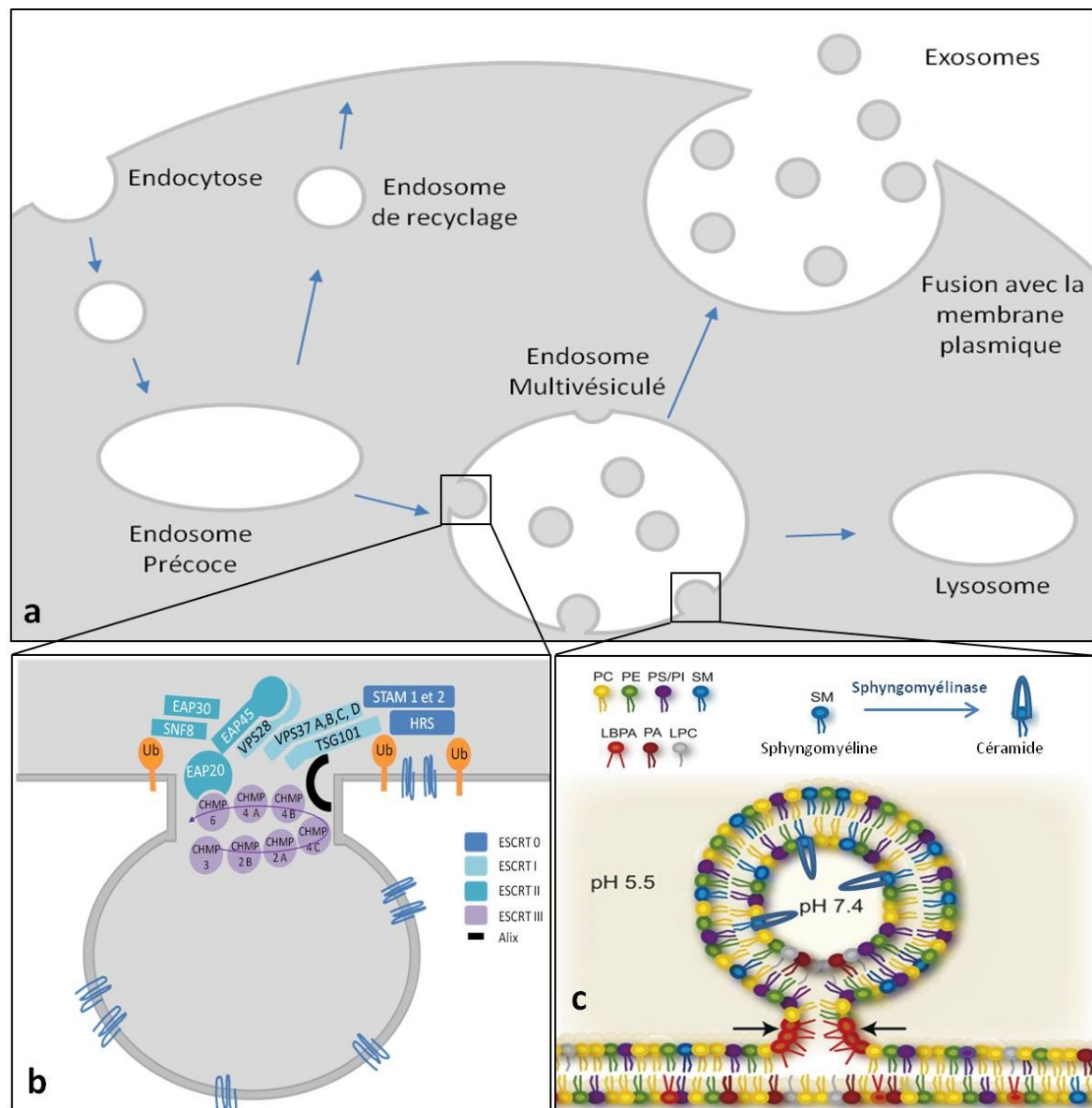


FIGURE 13 – Biosynthèse des exosomes

a. Biosynthèse des exosomes. L'invagination de la membrane des exosomes multivésiculés engendre la formation de vésicules qui peuvent être expulsées de la cellule sous forme d'exosomes.

b. Mécanismes de formation des ILV dépendant des complexes ESCRT

c. Mécanismes de formation des ILV dépendant des céramides

(d'après Akers *et al.*, 2013; Hurley, 2010; Marsh et van Meer, 2008; Simons et Raposo, 2009; Subra *et al.*, 2007)

Substrate) et des protéines STAM 1 et 2 (Signal Transducing Adaptor Molecule), est recruté au niveau de la membrane endocyttaire. Cet amarrage est possible grâce à PI(3)P, présent à la membrane endocyttaire, qui lie HRS et permet ainsi de bloquer les cargos d'ubiquitine dans des microdomaines de la membrane (Katzmann, 2003).

HRS recrute ensuite Tsg101 (Tumour Suceptibility Gene) et permet ainsi l'assemblage du complexe ESCRT I (Bache, 2003). ESCRT I qui est composé de Tsg101, des Vps 37A,B,C,D

(Vacuolar protein sorting) qui permettent au complexe de se fixer à la membrane, et de Vps28 (Katzmann *et al.*, 2001). Tsg101 semble être un élément important à ce processus de formation d'ILV car son inhibition par des siARN provoque une diminution non négligeable de la quantité d'exosomes produits. La protéine Alix, au même titre que Tsg101 semble jouer un rôle de régulateur de cette formation d'ILV (Falguieres *et al.*, 2008).

ESCRT II, tout comme ESCRT 0 et ESCRT I, se fixe aux cargos d'ubiquitine présents à la membrane des endosomes grâce à ses protéines EAP30 (ELL-associated protein of 30 kDa) et SNF8 (Vacuolar protein sorting SNF8). Sa protéine EAP45 (ELL-associated protein of 45 kDa) s'associe à la protéine Vps28 du complexe ESCRT I et permet ainsi un assemblage des deux complexes (Babst *et al.*, 2002b). Cette association ESCRT I et ESCRT II permet la courbure de la membrane endocytaire et les cargos d'ubiquitine sont ainsi pris au piège à l'intérieur de la vésicule qui commence à se former.

ESCRT III (Babst *et al.*, 2002a) est ensuite recruté par la protéine CHMP6 qui se lie à la protéine EAP20 (ELL-associated protein of 20 kDa) du complexe ESCRT II. Cet amarrage est consolidé par Alix qui se lie à Tsg101 du complexe ESCRT I et aux CHMP4 A,B et C du complexe ESCRT III (McCullough *et al.*, 2008). ESCRT III est nécessaire pour permettre la déformation finale de la membrane et la création de la vésicule grâce aux protéines CHMP4 A, B et C, CHMP3, et CHMP2 A et B (Wollert et Hurley, 2010). ESCRT III est ensuite dissocié et recyclé à la membrane de l'endosome grâce à l'action de l'ATPase Vps4/SKD1 recrutée par CHMP2 A et B (Saksena *et al.*, 2009).

Cependant ce mécanisme n'est pas l'unique existant, en effet, même après l'inhibition de tous les complexes ESCRT simultanément à l'aide de shRNA, tous les compartiments de la voie d'endocytose sont intacts et il y a toujours création d'ILV et d'exosomes (Stuffers *et al.*, 2009).

Un autre mécanisme de formation des ILV semble reposer sur la propriété des céramides à induire une invagination de la membrane endocytaire au niveau de microdomaines lipidiques. Les sphingomyélines sont transformées en céramides par la sphingomyélinase. Les céramides, de forme conique, induisent alors l'invagination de la membrane. Ensuite, la scission de la vésicule dans le lumen se produit lorsque les lipides des deux « bouts » de couche lipidique externe de la vésicule sont suffisamment proches pour se mélanger et qu'il y a accumulation de LBPA (Lysobisphosphatidic Acid) au niveau du « cou » de la vésicule (Subra *et al.*, 2007) (Figure 13 c). Ces céramides proviennent de la transformation de la sphingomyéline par une sphingomyélinase (Trajkovic *et al.*, 2008). Il existe en effet à la membrane exosomale des rafts lipidiques contenant des flotillines (De Gassart *et al.*, 2003). Ces microdomaines sont enrichis en cholestérol, sphingomyéline et ganglioside GM3 et sont associés à des tétraspanines (Wub-

bolts *et al.*, 2003). Les tétraspanines sont des protéines transmembranaires qui lient à la fois le cholestérol et l'actine. Ainsi la tétraspanine CD82 permet aux rafts lipidiques des exosomes de s'amarrer au cytosquelette d'actine (Delaguillaumie, 2004). La tétraspanine CD63 jouerait aussi un rôle de tri permettant de distinguer les protéines intégrant des vésicules formées par les complexes ESCRT ou des vésicules formées indépendamment de la machinerie ESCRT (Van Niel *et al.*, 2011).

Une fois les ILV formées, elles doivent, pour devenir des exosomes, être libérées dans le milieu extracellulaire. Cette libération implique tout d'abord un transport de l'endosome multivésiculé jusqu'à la membrane plasmique de la cellule, puis une fusion membranaire qui permettra alors la sécrétion des ILV dans le milieu extracellulaire.

Le transport du MVE se fait grâce à des kinésines (protéines jouant un rôle de moteur moléculaire) et à des protéines du cytosquelette telles que l'actine. Ce trajet est initié et contrôlé par des protéines appelées Rab (Figure 14 a). Les Rab sont des GTPases cytosoliques présentes à la membrane des différents compartiments cellulaires. Elles contrôlent le trafic membranaire intracellulaire par le biais de leurs interactions avec les kinésines ou encore les SNARE (SNAP (Soluble NSF (N-ethylmaleimide Sensitive Fusion protein) Attachment Protein) REceptor) (Stenmark, 2009). La famille des Rab se compose d'une soixantaine de protéines mais seulement quelques unes d'entre elles ont été décrites pour jouer un rôle dans les processus d'endocytose et d'exocytose. Rab5 initie le processus d'endocytose en contrôlant le transport des vésicules d'endocytose jusqu'à l'endosome précoce (Gao *et al.*, 2012; Spang, 2009). Au niveau de l'endosome précoce c'est ensuite Rab 4 (Hendrix et Hume, 2011) et Rab 11 (Lakkaraju et Rodriguez-Boulan, 2008) qui vont se charger du retour à la membrane des endosomes de recyclage ; et Rab7, par sa conversion en Rab5, va accompagner la maturation de l'endosome précoce en endosome multivésiculé (Spang, 2009). Le retour vers la membrane de l'endosome multivésiculé est médié par Rab 35 (Hsu *et al.*, 2010), ainsi que par les Rab 27 a et b et leurs effecteurs respectifs Slp4 et Slac2-b (Bobrie *et al.*, 2012; Ostrowski *et al.*, 2009).

Lorsque le MVE est au contact de la membrane plasmique ce sont les SNARE qui entrent en jeu. Spécialisées dans la fusion de bi-couches lipidiques, elles vont participer à l'amarrage des MVE sur la membrane plasmique puis à la fusion des membranes plasmique et endocytaire pour permettre la libération de ILV dans le milieu extracellulaire (Figure 14 b). Il est possible de distinguer deux types de SNARE en fonction de leur localisation, les SNARE vésiculaires (ou v-SNARES) localisées à la surface des MVE, et les t-SNARE ou SNARE cibles (target en anglais) qui sont elles localisées sur la membrane du compartiment receveur, ici la membrane plasmique (Li *et al.*, 2007; Zylbersztejn et Galli, 2011). Les SNARE sont composées

d' α -hélices transmembranaires qui vont avec l'aide de la SNARE SNAP 25 (protéine à double α -hélice présente à la périphérie de la membrane) créer un complexe de 4 α -hélices positionnées parallèlement aux membranes de manière à les rapprocher.

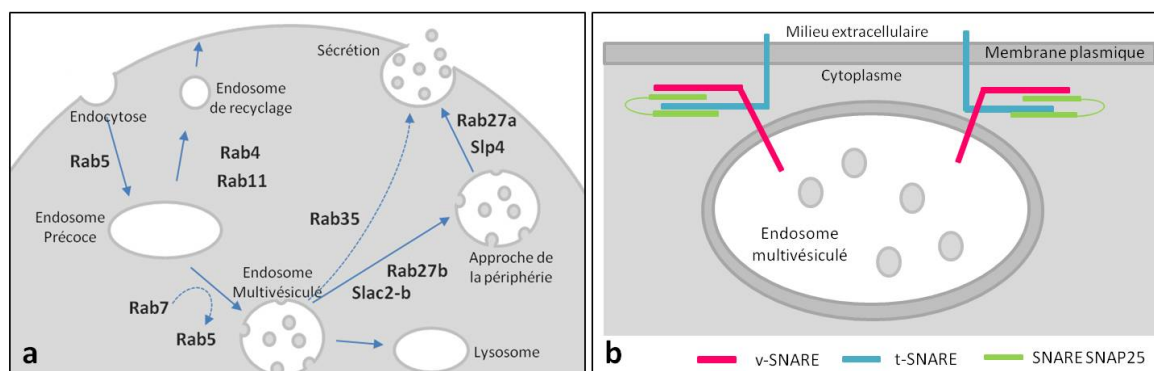


FIGURE 14 – Libération des exosomes

a. Actions des protéines Rab dans le trafic intracellulaire de membranes (d'après Hendrix et Hume, 2011)

b. Mode d'action des SNARE pour la fusion de bicouches lipidiques

En définitive, cette sécrétion d'exosomes est un mécanisme complexe dépendant d'acteurs protéiques et lipidiques multiples. Cette production est donc régulée par différents facteurs cellulaires et extracellulaires. Parmi ces facteurs, la concentration en calcium cytosolique agit directement sur la quantité d'exosomes produits (Krämer-Albers *et al.*, 2007; Savina *et al.*, 2003) et la diminution de cholestérol conduirait à une augmentation de la production d'exosomes (Llorente *et al.*, 2007; Stoeck *et al.*, 2006). Enfin, la production d'exosomes est également régulée par TSAP6, elle-même activée par p53, et la production d'exosomes est augmentée de manière conséquente en réponse à un stress extérieur (Amzallag *et al.*, 2004; Lehmann *et al.*, 2008; Lespagnol *et al.*, 2008; Yu *et al.*, 2006).

2.1.2.2 Recapture

Agents de communication, une fois libérés dans le milieu extracellulaire, les exosomes ont la capacité d'interagir avec d'autres cellules de l'organisme, les cellules réceptrices. S'il est prouvé que des interactions exosomes - cellules réceptrices ont lieu, les mécanismes cellulaires impliqués dans ce processus sont encore flous. Il est en effet difficile d'observer ces phénomènes compte tenu des limitations techniques dues en partie à la petite taille des exosomes. Quelques pistes sont cependant envisageables et proposent actuellement quatre mécanismes d'interactions possibles (Figure 15).

Ces interactions peuvent rester en surface de la cellule réceptrice par le biais de récepteurs

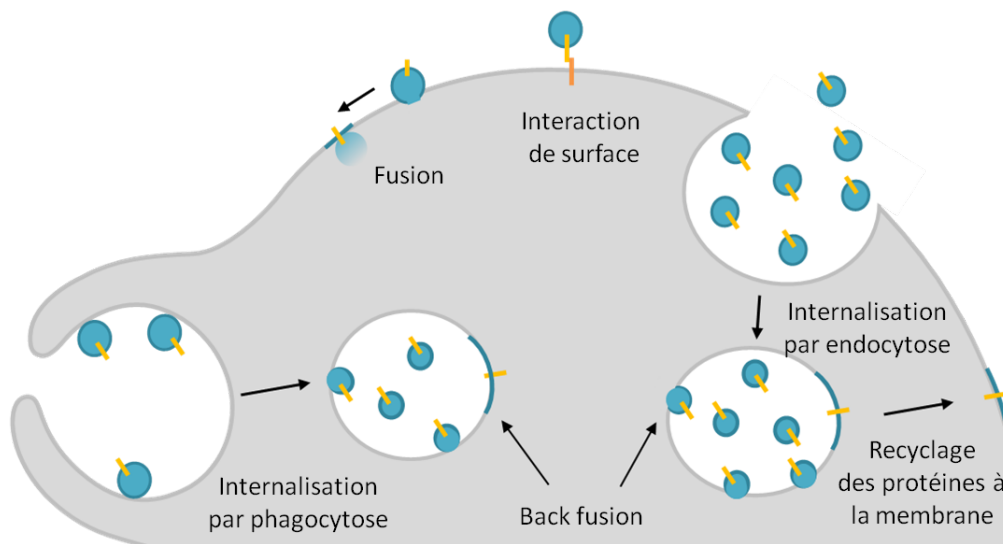


FIGURE 15 – Recapture des exosomes par les cellules environnantes

membranaires. Aussi, des exosomes des lymphocytes B portant les intégrines $\beta 1$, $\beta 2$ ou $\alpha 4$ sont capables de se fixer au collagène, à la fibronectine, et de manière très forte à des fibroblastes activés au TNF- α chez lesquels ils provoquent des variations de calcium cytosolique (Clayton *et al.*, 2004). L'activation des lymphocytes T par les cellules dendritiques semble elle aussi dépendre de la fixation des exosomes porteurs de complexe CMH-antigène sur les cellules dendritiques. Cette fixation implique la formation du complexe liant ICAM-1 présent sur les exosomes et son récepteur LFA-1 sur la membrane de cellules dendritiques. Ici une internalisation des exosomes n'est pas nécessaire (Segura *et al.*, 2007). Enfin, si une internalisation des exosomes n'est pas toujours nécessaire, elle est possible. En effet, si les exosomes émis par les cellules de l'épithélium intestinal sont seulement fixés sur les lymphocytes B et T, ils sont retrouvés fixés et internalisés pour les cellules dendritiques immatures (Mallegol *et al.*, 2007).

Les interactions exosomes - cellules réceptrices nécessitent parfois une internalisation du contenu intraluminal des exosomes dans le cytoplasme de la cellule réceptrice. Cet import du contenu exosomal pourrait alors se faire par fusion complète ou partielle (hémifusion) de la membrane exosomale avec la membrane plasmique. Dans ce cas, la présence de microdomaines lipidiques enrichis en cholestérol est indispensable puisque un traitement à la filipine qui séquestre le cholestérol perturbe fortement la fusion ou l'hémifusion des membranes exosomale et plasmique, pour des cellules réceptrices étant des cellules de mélanomes (Parolini *et al.*, 2009), ou des cellules dendritiques (Montecalvo *et al.*, 2011). Une fois les membranes fusionnées le contenu intraluminal de l'exosome peut alors se déverser dans le cytosol de la cellule réceptrice et y être actif, comme en témoigne la luminescence observée dans des cellules dendritiques transformées pour exprimer la luciférase. Luciférase dont le substrat, la lucifé-

rine, encapsulée dans des exosomes captés par des cellules dendritiques et qui se retrouvent dans le cytoplasme (Montecalvo *et al.*, 2011).

Un autre mécanisme possible d'internalisation du contenu intraluminal exosomal est l'endocytose des exosomes par la cellule réceptrice. En effet, des exosomes fluorescents (marqués à la PKH67) de cellules dendritiques incubés sur des cellules dendritiques sont retrouvés colocalisés, dans un premier temps avec le signal transferrine des endosomes précoces, puis avec le signal Lamp-1 au niveau des endosomes plus tardifs (Morelli *et al.*, 2004). Les mêmes résultats de colocalisation sont obtenus pour des cellules cancéreuses PCI2 de phéochromocytome de rat (Tian *et al.*, 2013), ou de mélanomes pour lesquelles les lipides sont marqués au PKH67 et les exosomes à la NHS-rhodamine. Dans ce cas, la sécrétion et la réception semblent favorisées et amplifiées par la nature acide du microenvironnement tumoral (Parolini *et al.*, 2009).

Enfin, le mécanisme de phagocytose semble aussi impliqué dans l'import des exosomes à l'intérieur des cellules sécrétrices. Aussi les exosomes seraient internalisés plus efficacement par des phagocytes que par des cellules non-phagocytaires. Les exosomes de cellules K562 semblent pouvoir se fixer sur des prolongements cellulaires qui les entourent et les incluent dans de larges phagosomes dont les marqueurs membranaires sont colocalisés avec ceux des exosomes. Cette hypothèse est d'autant plus confortée que l'internalisation des exosomes est inhibée par un abaissement de l'expression de la dynamine 2 qui joue un rôle primordial dans le mécanisme de phagocytose (Feng *et al.*, 2010). Cette observation a aussi été faite en microscopie électronique : pour des cellules dendritiques, une partie des exosomes est retrouvée dans les phagosomes (Montecalvo *et al.*, 2011).

Pour les deux derniers mécanismes d'internalisation que sont l'endocytose et la phagocytose, un dernier mécanisme dit de « back fusion » est nécessaire pour libérer le contenu exosomal dans le cytosol de la cellule réceptrice en permettant à la membrane de l'exosome de fusionner avec la membrane de l'endosome multivésiculé ou du phagosome. Ce mécanisme semble possible puisque les protéines membranaires exosomales sont retrouvées dans la membrane plasmique des cellules les ayant endocytées (Montecalvo *et al.*, 2008; Morelli *et al.*, 2004).

2.1.3 Composition

Depuis la découverte des exosomes, de nombreuses équipes se sont intéressées à la caractérisation de leur composition et de leur contenu. Avec l'évolution des différentes techniques

de nombreuses données concernant les exosomes ont été collectées et s'accumulent depuis les années 2000. Les exosomes contiennent en effet à la fois des protéines, des lipides et des acides nucléiques. Une base de donnée , « Exocarta » (<http://www.exocarta.org/>), a donc été créée pour répertorier toutes ces données (Mathivanan *et al.*, 2011; Simpson *et al.*, 2012).

2.1.3.1 Protéines

Les exosomes contiennent des protéines, certaines spécifiques au type cellulaire d'origine et d'autres communes à tous les types cellulaires. Une étude réalisée en 2009 répertorie les protéines majoritairement retrouvées dans les exosomes, quelles que soient les cellules productrices (Théry *et al.*, 2009).

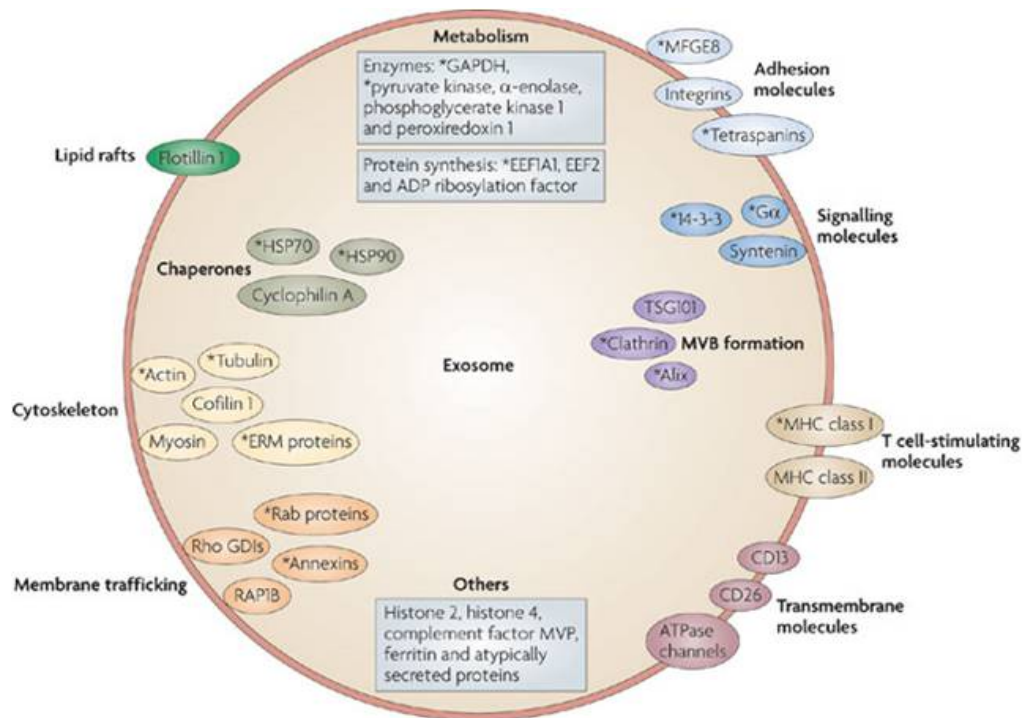


FIGURE 16 – Protéines majoritairement retrouvées dans les exosomes
Protéines trouvées dans environ 30% des exosomes répertoriés dans la littérature. Les protéines portant un astérisque sont quant à elle trouvées dans environ 50% des cas (Théry *et al.*, 2009).

A la membrane des exosomes sont présentes des protéines d'adhésion comme les intégrines et les tétraspanines, des protéines de signalisation intracellulaire comme les synténines, des protéines impliquées dans la présentation des antigènes comme les CMH I et II (Lamparski *et al.*, 2002; Lynch *et al.*, 2009), des molécules transmembranaires ou encore la flotilline 1 (Street *et al.*, 2012) présente dans les rafts lipidiques.

D'autres protéines sont elles à l'intérieur des exosomes, c'est le cas des chaperones HSP70

et 90 (Kang *et al.*, 2008) et de certaines protéines du cytosquelette telles que les actines, les tubulines ou encore les myosines comme MYH9 (Gonzales *et al.*, 2009). C'est aussi le cas de certaines Rab, d'histones, d'enzymes du métabolisme cellulaire comme la GAPDH, ou encore de protéines jouant un rôle dans l'initiation de la synthèse protéique. Enfin les exosomes contiennent aussi les protéines jouant un rôle dans la formation des ILV au niveau des MVE telles que Alix ou les protéines des complexes ESCRT (Gonzales *et al.*, 2009) (Figure 16).

Cependant certaines cellules produisent des populations d'exosomes non homogènes qu'il est possible de distinguer grâce à des protéines présentes exclusivement dans l'une ou l'autre des populations. Par exemple une lignée de mastocyte de rat (RBL-2H3) produit une population d'exosomes composée de 47% d'exosomes positifs pour la tétraspanine CD63, 32% d'exosomes positifs pour CMH II et 21% d'exosomes positifs pour la tétraspanine CD81 (Laulagnier *et al.*, 2005).

De plus certaines cellules cancéreuses peuvent être amenées à produire des exosomes enrichis en différentes protéines. Les cellules HeLa produisent des exosomes enrichis en survivine (Khan *et al.*, 2010), et les cellules de cancer de l'ovaire des exosomes enrichis en claudine-4 (Li *et al.*, 2009c).

2.1.3.2 Lipides

Bien que moins d'études soient consacrées à la composition lipidique des exosomes, certains lipides ont été décrits comme des éléments prépondérants de la composition des exosomes.

Ainsi les exosomes contiennent des phospholipides, des shingomyélines, du cholestérol et des gangliosides GM3 (Wubbolts *et al.*, 2003). Ils contiendraient aussi des céramides (Trajkovic *et al.*, 2008) et auraient une composition proche de celles des rafts lipidiques par la présence de gangliosides et de flotilline (de Gassart *et al.*, 2003). Un grand nombre de glycérophospholipides, de phospholipides insaturés et de phosphatidyléthanolamines ont aussi été retrouvés dans les exosomes (Subra *et al.*, 2007). De plus la phosphatidyléthanolamine semble être répartie de manière homogène entre les deux feuillets de la membrane exosomale contrairement à la membrane plasmique où elle est concentrée dans le feuillet interne (Laulagnier *et al.*, 2004).

2.1.3.3 Acides nucléiques

C'est en 2007 qu'il a été rapporté pour la première fois la présence d'un contingent d'ARN dans les exosomes. D'après cette étude, les exosomes de mastocytes de souris contiendraient

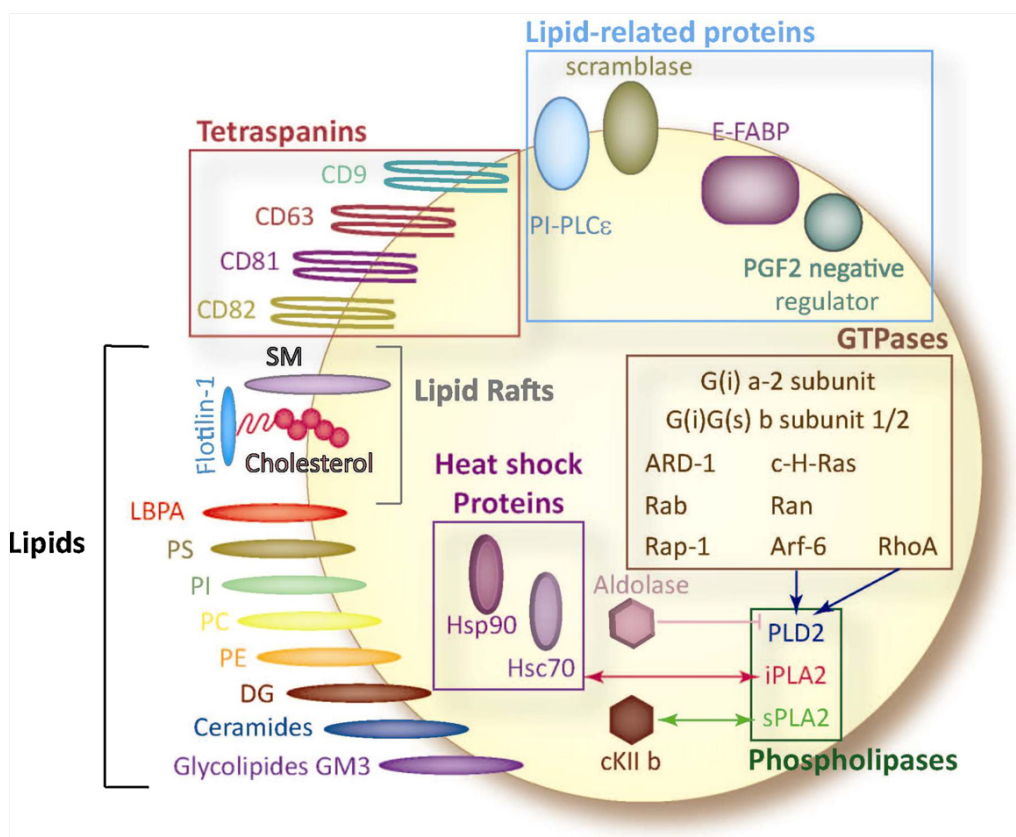


FIGURE 17 – Lipides et protéines associés fréquemment présentes dans les exosomes. SM : Sphingomyéline (Record *et al.*, 2011)

121 microARN et 1272 ARNm. Quelques uns de ces microARN seraient enrichis dans les exosomes et certains ARNm exosomaux seraient encore intacts et fonctionnels (Valadi *et al.*, 2007). Une deuxième étude réalisée en 2008 sur des cellules de glioblastomes humains confirme la présence d'ARN dans les exosomes. Cette fois 4700 ARNm sont détectés et leurs proportions exosomales semblent refléter leurs proportions cellulaires. Ici seulement 11 microARN connus pour être abondants dans les glioblastomes ont été recherchés dans les exosomes. Malgré des quantités exosomales moindres, ces 11 microARN sont détectés et affichent un profil similaire à leur profil cellulaire (Skog *et al.*, 2008).

Si ces deux études montrent un profil d'ARN exosomal très proche du profil cellulaire, une autre étude montre que dans les exosomes produits par des cellules de cancer colorectal 241 ARNm sont en plus grande quantité que dans les cellules (Hong *et al.*, 2009). De même, si la famille des microARN let-7 semble elle aussi enrichie dans les exosomes produits par des cellules de cancer gastrique métastatique (Ohshima *et al.*, 2010), dans des cellules souches mésenchymateuses elle semble simplement refléter la surexpression cellulaire de cette famille de microARN (Koh *et al.*, 2010). Ainsi les exosomes ne semblent pas toujours refléter parfaitement le contenu cellulaire mais pourraient contenir un contingent de miR spécifiques (Wang

et al., 2010). Cette sécrétion spécifique peut dépendre du type cellulaire et de l'état des cellules productrices puisque les microARN exosomaux sécrétés par des cellules cancéreuses du sein sont différents de ceux sécrétés par des cellules saines (Palma *et al.*, 2012; Pigati *et al.*, 2010).

Outre les ARNm et les microARN une équipe a rapporté la présence de pré-microARN dans les exosomes de cellules souches cancéreuses (Chen *et al.*, 2009). Cette présence a été confirmée plus récemment par une technique de séquençage haut débit qui a aussi mis en évidence la présence dans les exosomes d'ARNt, de vault-ARN et autres petits ARN non codants de toutes tailles dont des isomiR (Nolte-'t Hoen *et al.*, 2012).

Enfin, si les molécules d'ADN sont bien trop volumineuses pour être empaquetées dans les exosomes, des molécules d'ADN mitochondrial, bien plus petites, ont été retrouvées dans les exosomes produit par des cellules de glioblastomes et d'astrocytes (Guescini *et al.*, 2010). Des séquences d'ADN simple brin sont aussi trouvées dans les exosomes et sont enrichies dans les exosomes provenant de cellules cancéreuses comparées à ceux de cellules saines. Ces séquences d'ADN correspondent à des éléments rétrotransposables et séquences oncogènes amplifiées (Balaj *et al.*, 2011).

La présence d'ARN dans les exosomes peut s'expliquer par le fait que lors de la formation des ILV une partie du cytoplasme se retrouve piégée à l'intérieur des futurs exosomes. Ceci en revanche n'explique pas une sécrétion d'ARN spécifique. Une potentielle sélection des microARN sécrétés pourrait éventuellement s'expliquer par les interactions du complexe RISC, impliqué dans l'action des microARN, avec les complexes ESCRT au moment de la formation des ILV (Gibbings *et al.*, 2009; Siomi et Siomi, 2009) (Figure 18).

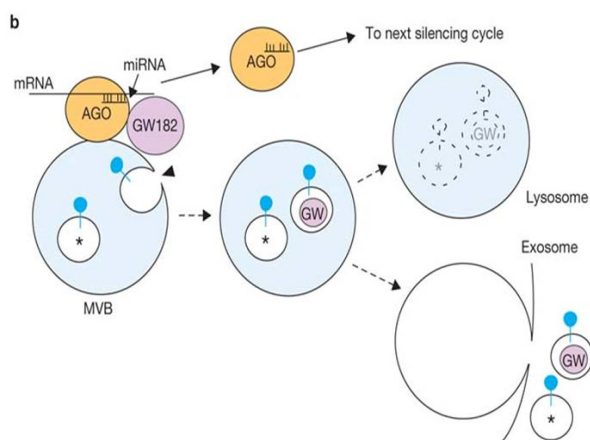


FIGURE 18 – Association des endosomes avec le complexe RISC et formation des exosomes (Siomi et Siomi, 2009)

La formation ou dissociation du complexe RISC se fait apparemment en étroite relation avec les complexes multi vésiculaires. Les agrégats GW182 (ici, GW) sont souvent localisés à proximité des endosomes multi vésiculaires (MVE). Le fait de bloquer la fusion des MVE avec les lysosomes ou la membrane plasmique stimule l'activité du complexe RISC. En revanche, le fait de bloquer la formation

des MVE à partir des endosomes précoces inhibe cette activité. Les astérisques (*) représentent les protéines cargos contenues dans les exosomes.

2.2 Fonctions des exosomes : communication intercellulaire

Compte tenu de leur origine endocytaire les exosomes ont d'abord été considérés comme un moyen d'éliminer des protéines indésirables. Les exosomes seraient alors apparentés à des vésicules d'élimination pour les globules rouges durant la différenciation des réticulocytes en érythrocytes (Johnstone, 2006; Vidal *et al.*, 1997). Puis au fil des différentes études qui les ont observés, les exosomes se sont petit à petit révélés comme des vésicules dotées d'un rôle clé dans la communication intercellulaire et la diffusion de messages importants dans l'organisme (Nieuwland et Sturk, 2010; Pap *et al.*, 2009).

2.2.1 Communication intercellulaire du système nerveux

Si le rôle des exosomes dans la communication cellulaire a été démontré dans bien des domaines allant de l'acceptation de maternité par l'organisme (Luo *et al.*, 2009) à la communication de cellules cancéreuses (Kharaziha *et al.*, 2012); leur rôle est aussi prépondérant dans le système nerveux central. Chaque type de cellules du système nerveux central semble sécréter des exosomes qui agissent tant de manière constitutionnelle normale que de manière dérégulée lors de la présence de pathologies (Vos *et al.*, 2011).

Les neurones augmentent leur sécrétion d'exosomes lorsqu'ils sont stimulés par exposition à un antagoniste du récepteur GABA_A. Les exosomes joueraient donc un rôle dans la régulation et la modulation des neurotransmetteurs (Lachenal *et al.*, 2011). Les exosomes permettent aussi la communication entre les neurones et la microglie (Frühbeis *et al.*, 2012).

Durant le développement des neurones, les oligodendrocytes semblent eux sécréter des exosomes dans le but de stopper la myélinisation jusqu'au signal approprié des neurones (Bakhti *et al.*, 2010). Quant aux cellules de Schwann elles sont aptes à délivrer, par le biais de leurs exosomes, des ARNm capables de réactiver la synthèse de protéines dans des axones endommagés (Court *et al.*, 2008).

Les exosomes peuvent aussi diffuser des protéines neurotoxiques telles que la β -amyloïde dans la maladie d'Alzheimer (Aguzzi et Rajendran, 2009), ou des signaux inflammatoires. Aussi, lors de lésion du cerveau les astrocytes relâchent de l'ATP dans le milieu extracellulaire et activent ainsi la production d'exosomes par les cellules de microglie. Ces exosomes contiennent entre autre l'interleukine IL-1 β ; interleukine qui peut alors causer une réponse inflammatoire pouvant endommager les tissus neurologiques (Bianco *et al.*, 2009).

2.2.2 Communication par transfert d'information

Depuis plusieurs années déjà différentes équipes se posent la question du mode d'action des exosomes. Il apparaîtrait que ce qui leur confère ce rôle de « messagers » dans la communication inter-cellulaire serait entre autre leur capacité à véhiculer des ARN dans le cytoplasme des cellules receveuses (Stoorvogel, 2012).

La première étude ayant fait état de cette possibilité s'intéressait aux cellules de mastocytes et a montré que les exosomes de mastocytes murins incubés avec des mastocytes humains induisaient la production de protéines murines par les cellules réceptrices humaines. Ces protéines proviendraient de l'expression des ARNm murins contenus dans les exosomes incubés dans le cytoplasme de la cellule humaine. Etant donné que des exosomes de mastocytes ne transfèreraient pas leur matériel aux cellules murines CD4+, ce transfert de matériel par les exosomes serait spécifique du type cellulaire mais pas de l'espèce (Valadi *et al.*, 2007).

Par la suite il a été montré que des exosomes de glioblastomes sont capables de transférer leurs ARNm dans des cellules vasculaires endothéliales qui les traduisent alors en protéines. Parmi les ARNm exosomaux des glioblastomes, l'un code pour l'EGFR (acteur de la prolifération des cellules, voir paragraphe 1.2.1.1 p 27) ce qui pourrait expliquer l'observation faite qu'une incubation d'exosomes de glioblastomes avec des cellules endothéliales induirait une prolifération accrue de ces cellules (Skog *et al.*, 2008).

Si des ARNm exosomaux peuvent être transmis et être fonctionnels dans les cellules réceptrices, c'est aussi le cas des microARN. En effet, des cellules dendritiques transfectées avec un vecteur luciférase sous le contrôle négatif des microARN miR-148a et miR-451 (absents de ce type de cellule) cessent d'exprimer la luciférase lorsqu'elles sont mises en contacts avec des exosomes produits par d'autres cellules dendritiques, exosomes qui eux contiennent les microARN miR-148a et miR-451. Un contrôle négatif a été réalisé à l'aide de vecteurs luciférase sous contrôle de séquences inverses par rapport aux séquences des microARN miR-148a et miR-451. Seules les cellules transfectées avec les vecteurs luciférase sous le contrôle des séquences des microARN miR-148a, miR-451 montrent un abaissement de l'expression de la luciférase. Les exosomes ont donc bien véhiculé des microARN fonctionnels (Montecalvo *et al.*, 2011). Une autre expérience similaire réalisée sur des cellules de glioblastomes apporte les mêmes conclusions (Katakowski *et al.*, 2010). Enfin, une étude récente a montré que les microARN miR-92 transportés dans des exosomes de cellules de leucémie, ont la capacité de réduire dans les cellules réceptrices l'expression de l'intégrine $\alpha 5$ dont l'ARN messager est la cible du microARN miR92 (Umezumi *et al.*, 2012).

De plus, une transformation des cellules par des plasmides permettant de produire des microARN spécifiques permet une sécrétion de ces microARN spécifiques en grande quantité dans les exosomes. Ici le microARN miR-146a a été choisi car il est connu pour être un suppresseur de tumeur dont l'une des cibles connues est l'EGFR (voir paragraphe 1.3.1.3, p 38). Les exosomes enrichis avec ce microARN miR-146a sont incubés avec des cellules en culture de cancer de la prostate. Ces cellules connaissent alors une diminution de leur prolifération. Le microARN miR-146a est donc transféré de manière fonctionnelle dans le cytoplasme des cellules réceptrices (Kosaka *et al.*, 2010). Ces observations faites avec des exosomes de cellules d'épithélium rénal humain ont été confirmées récemment à l'aide d'exosomes de cellules stromales de la moelle osseuse surexprimant le miR-146b. Les incubations de ces exosomes avec des cellules tumorales de rat (modèle 9L) ont montré les mêmes résultats d'abaissement de la prolifération cellulaire (Katakowski *et al.*, 2013).

Des microARN d'origine virale seraient aussi transportés et délivrés par des exosomes. Les lymphocytes B activés par infection du virus EBV (Epstein Barr Virus) produisent des exosomes contenant des microARN viraux. Ces microARN viraux sont aussi retrouvés dans des monocytes non infectés, témoignant ainsi du transfert de microARN exosomaux dans ces cellules (Pegtel *et al.*, 2010; Zomer *et al.*, 2010). De plus, les exosomes contenant les ARN viraux incubés avec des cellules exprimant le gène immunostimulateur CXCL11 inhibent son expression de 60% environ (Pegtel *et al.*, 2010).

2.2.3 Effet des exosomes sur leur environnement

2.2.3.1 Système immunitaire

Dans les années 1990, les premiers effets des exosomes ont été mis en évidence. Une étude réalisée sur des exosomes de cellules du système immunitaire a montré que les exosomes produits par les lymphocytes B contenaient des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMHII) et étaient capables d'activer la prolifération des lymphocytes TCD4+ en culture lorsque les lymphocytes B les ayant produits avaient été en contact avec des antigènes de mycobactéries. Les exosomes produits par des lymphocytes B naïfs contiennent eux aussi CMHII mais ne sont pas capables d'activer la prolifération des lymphocytes. Les exosomes seraient donc capables de transmettre un message aux cellules réceptrices (Raposo *et al.*, 1996).

Suite à cette observation, une étude a montré que des cellules dendritiques produisent des exosomes. Une fois les cellules dendritiques activées, elles présentent à leur membrane les

complexes CMHI et II et les antigènes pour activer les lymphocytes T. De plus, ces cellules sont aussi capables de sécréter l'antigène en association avec les complexes CMHI et II à la membrane des exosomes qu'elles produisent. Ces exosomes contiennent aussi des CD80 et CD86, facteurs de costimulation nécessaires au déclenchement d'une réponse immunitaire (Zitvogel *et al.*, 1998).

De plus, les exosomes de cellules dendritiques peuvent aussi transmettre de manière active leur CMH II (Théry *et al.*, 2002), ou leur CMH I (Lynch *et al.*, 2009), à des cellules dendritiques n'en possédant pas pour leur permettre d'activer les lymphocytes T CD4+.

Des mastocytes mis en présence d'antigènes peuvent eux aussi transmettre une information en sécrétant des exosomes contenant ces antigènes associés aux protéines chaperonnes Hsp60 et Hsp70. Ces exosomes sont alors capables d'activer des cellules dendritiques *in vivo* chez des souris naïves, cellules dendritiques qui vont elles-mêmes activer les lymphocytes de la souris pour déclencher une réponse immunitaire (Skokos *et al.*, 2003).

Depuis, de nombreuses études se sont intéressées à la sécrétion des Dex, exosomes de cellules dendritique, et au rôle éventuel qu'ils pourraient jouer dans la vaccination et dans le processus de cancérisation. En effet, les exosomes faisant partie des processus de présentation des antigènes tumoraux au système immunitaire (Théry *et al.*, 2009), ils pourraient être un soutien pour la défense de l'organisme contre les tumeurs.

2.2.3.2 Rôles des exosomes dans le processus de tumorigénèse

Les cellules cancéreuses, comme tout autre type de cellules, produisent des exosomes. Ils sont appelés Tex pour « Tumor-derived exosomes ». Ces exosomes contiennent entre autres des chaperonnes Hsp70, des complexes CMH I et des antigènes (Andre *et al.*, 2002). Ils ont en premier lieu été étudiés comme des agents de l'immunité capables de moduler les effets anti-tumoraux des lymphocytes T en transférant leurs antigènes aux cellules dendritiques (Wolfers *et al.*, 2001). La présence de la chaperonne Hsp70 à leur surface induirait même l'activation de la migration et de l'activité cytotoxique des cellules tueuses NK (Natural Killer) (Gastpar *et al.*, 2005).

In vivo en revanche, l'activité cytotoxique des NK est inhibée par la présence de Tex (Liu *et al.*, 2006). De plus, des exosomes cancéreux contenant du TNF β (Tumour growth Factor β) seraient capables de réduire la prolifération des lymphocytes T et ainsi d'inhiber la réponse immunitaire antitumorale (Clayton *et al.*, 2007). Les Tex seraient ainsi à la fois capables d'activer et d'inhiber la réponse immunitaire anti-tumorale.

Les Tex ne jouent pas seulement un rôle dans la régulation du système immunitaire. Mis en contact avec des cellules tumorales en culture les Tex sont capables d'en induire l'activité proliférative. L'activation de la prolifération de ces cellules s'accompagne entre autre d'une augmentation de la phosphorylation de AKT, ce qui laisse présager une activation de la voie PI3/AKT, voie jouant un rôle important dans le contrôle de la prolifération cellulaire (cf paragraphe 1.2.1.1, p 27) (Qu *et al.*, 2009).

Les Tex produits par les cellules cancéreuses sont aussi capables de refléter une réalité environnementale. Les Tex produits par des cellules cancéreuses en conditions d'hypoxie ont ainsi un contenu différents de celui des exosomes produits par ces mêmes cellules dans des conditions de normoxie. Ces Tex hypoxiques auraient alors la capacité d'activer l'angiogénèse et le développement de la tumeur (Kucharzewska *et al.*, 2013; Park *et al.*, 2010).

Les Tex peuvent également témoigner d'un stress extérieur et jouer un rôle de communication en modifiant le contenu de la matrice extracellulaire. Par exemple, les Tex provenant de cellules HeLa (cancer du pancreas) peuvent être des vecteurs de survivine, une protéine à la fois présente sur leur surface membranaire et dans leur espace intra-vésiculaire. La survivine présente à la surface des exosomes est active et a la capacité, tout comme la survivine extracellulaire, d'inhiber la mort cellulaire. De plus, lors du traitement des cellules tumorales par irradiation, si la quantité d'exosomes produite n'est pas affectée, le contenu en survivine est très fortement augmenté. La sécrétion d'exosomes contenant plus de survivine pourraient donc entraîner une résistance aux traitements par irradiation (Khan *et al.*, 2010).

Les exosomes relargués dans le milieu extracellulaire peuvent donc constituer un danger potentiel pour les tissus environnant la tumeur. En effet, les exosomes, précédemment décrits comme un moyen d'échange d'ARNm et de microARN entre cellules, peuvent, en fusionnant avec des cellules réceptrices, libérer dans leur cytoplasme des ARN ou protéines tumorales.

Les exosomes tumoraux pourraient alors prendre le « contrôle » de la machinerie cellulaire des cellules « réceptrices ». Cette information est assez alarmante puisqu'elle présente les exosomes comme des véhicules d'informations moléculaires d'origine tumorale ; cela pouvant s'avérer dangereux lorsque ces exosomes fusionnent avec les cellules saines des tissus avoisinant la tumeur. Les exosomes seraient de ce fait capables de générer des niches prémétastatiques comme proposé par Jung *et al.* (2009).

En 2009, une étude a montré que des exosomes de tumeur hépatique joueraient un rôle dans la mise en place d'une niche prémétastatique et nécessiteraient pour ce faire de la

présence d'un facteur soluble de la matrice extracellulaire. L'établissement de cette niche serait en outre régulé par CD44v6 (Jung *et al.*, 2009).

Des études plus récentes confirment cette notion d'établissement d'une niche pré-métastatique médiée par des exosomes cancéreux. Des exosomes provenant de cellules tumorales de rein incubés *in vitro* avec des cellules HUVEC déclenchent une augmentation de l'angiogénèse et la formation de capillaires. Ces HUVEC pré-incubées sont ensuite injectés conjointement à des exosomes cancéreux en sous-cutané à des souris. Un réseau de capillaires, raccordé à celui de la souris hôte, apparaît alors à l'endroit de l'injection. Si des exosomes sont injectés aussi en intraveineux il est observé alors la formation de métastases dans les poumons de la souris. Ainsi des exosomes de cancer du rein auraient la capacité de provoquer la mise en place d'une niche pré-métastatique dans les poumons (Grange *et al.*, 2011).

Ces mêmes résultats ont été confirmés avec des exosomes de mélanomes capables de faciliter l'apparition de tumeur chez les souris, et ce essentiellement au niveau des poumons. Cette dernière étude va même plus loin en observant qu'il est possible d'« éduquer » les cellules de la moelle osseuse de souris naïves à l'aide d'exosomes cancéreux. Ces souris dont les cellules de la moelle osseuse ont été mises en contact avec des exosomes cancéreux, sont ensuite injectées avec une tumeur. Ces souris montrent alors une forte propension pour l'apparition « spontanée » de métastases (Peinado *et al.*, 2012).

Les exosomes se révèlent donc tenir un rôle clé dans le processus de tumorigénèse, que cela soit en apportant un effet néfaste, tumorigène et pré-métastatique ou plutôt un effet anti-tumoral en stimulant le système immunitaire.

2.3 Utilisation comme biomarqueurs ou agents thérapeutiques

Les gliomes produisent des exosomes contenant un contingent de microARN et ARNm protégé des dégradations. Ces exosomes peuvent facilement se retrouver dans des fluides biologiques et être capturés par des cellules autres que la cellule productrice. L'étude de ces exosomes et de leur contingent ARN peut alors se révéler très intéressante pour le diagnostic de différentes pathologies. Cela offrirait en effet des perspectives d'un diagnostic non invasif par simple prélèvement sanguin par exemple, et ayant toute la précision du diagnostic biomoléculaire. Les exosomes pourraient aussi être de très bons vecteurs de thérapies. Ils permettraient de protéger les molécules à l'intérieur de leur membrane, seraient biocompatibles et capables de libérer leur contenu directement dans le cytoplasme des cellules.

2.3.1 Exosomes vecteurs de biomarqueurs

Une fois sécrétés les exosomes se retrouvent dans le milieu extracellulaire et dans certains fluides biologiques. La majorité des microARN extracellulaires est libre et protégée de la dégradation par association avec la nucléophosmine (Wang *et al.*, 2010) ou avec la protéine AGO2 qui apporte stabilité à ce complexe. Cependant ces microARN semblent être majoritairement des microARN relâchés par lyse cellulaire par exemple et ne correspondraient pas à une sécrétion spécifique (Turchinovich *et al.*, 2011). Les ARN retrouvés dans les exosomes ne sont pas naturellement protégés car, une fois sortis de leur capsule et replacés dans le plasma, ils sont dégradés. Ils sont donc protégés de la dégradation médiée par les RNAses extracellulaires grâce à la membrane exosomale (Arroyo *et al.*, 2011).

Ces ARN sont donc stables et peuvent être retrouvés intacts dans des exosomes de salive (Michael *et al.*, 2010; Palanisamy *et al.*, 2010), ou même dans des exosomes circulants (Gao *et al.*, 2012; Hunter *et al.*, 2008).

Les exosomes retrouvés dans le sang peuvent refléter l'état général de la personne. En effet, une étude s'intéressant aux rôles des exosomes dans la maternité a montré que des exosomes porteurs de microARN spécifiques du placenta ont été retrouvés dans le sang circulant de la mère. Les taux de ces microARN exosomaux restent constants puis chutent et disparaissent après la naissance de l'enfant (Luo *et al.*, 2009). Les exosomes sanguins pourraient alors permettre un diagnostic, un pronostic puis un suivi au cours du temps de différentes pathologies et notamment de différents cancers.

Pour le cancer de la prostate par exemple les exosomes produits par la lignée de cellules de cancer de la prostate métastatique PC3 contiennent 36 microARN reconnus comme des biomarqueurs potentiels pour le diagnostic de cette pathologie (Hessvik *et al.*, 2013).

Les microARN biomarqueurs sont aussi retrouvés dans des microvésicules et exosomes récoltés dans l'urine. 11 microARN permettraient le diagnostic d'un cancer de la prostate puisqu'ils sont exprimés différemment entre les patients sains ou atteints d'un cancer de la prostate. Deux microARN seraient considérés comme les meilleurs marqueurs car les plus exprimés dans les exosomes cancéreux : le miR-107 et le miR-574-3p. Enfin 16 microARN seraient retrouvés en quantités accrues dans les exosomes de patients présentant des métastases, et seraient alors de bons marqueurs de pronostic (Bryant *et al.*, 2012). Dans les exosomes d'urine récoltés chez les patients atteints d'un cancer de la prostate sont aussi retrouvés des ARNm considérés comme des biomarqueurs tumoraux de cette pathologie, PCA-3 et TMPRSS2 :ERG. Ces biomarqueurs sont spécifiques car ils ne sont plus retrouvés dans les

exosomes des patients répondant au traitement et présentant une diminution de la tumeur ou chez des patients ayant subi une castration médicale ou une prostatectomie (Nilsson *et al.*, 2009).

Enfin, les cellules de différentes lignées de cancer de la prostate dont la sénescence prématurée a été induite par irradiation des cellules, produisent des exosomes qui contiennent des quantités accrues de certaines protéines, les B7H3 (ou CD276). Ces protéines pourraient jouer un rôle de biomarqueur pronostic car elles ne seraient présentes qu'en cas de réponse au traitement et elles prédiraient ainsi l'efficacité du traitement (Lehmann *et al.*, 2008).

Pour le cancer du poumon, 12 microARN tumoraux seraient retrouvés dans les exosomes circulants des patients atteints et pas dans les exosomes de patients sains. Ces microARN seraient alors potentiellement des biomarqueurs permettant un diagnostic du cancer du poumon (Rabinowits *et al.*, 2009).

Dans le cas du cancer de l'œsophage, le microARN miR-21 est très différentiellement exprimé dans les exosomes récoltés dans le sérum des patients. L'augmentation de l'expression de ce microARN dans les exosomes est corrélée avec l'évolution de la tumeur (Tanaka *et al.*, 2013).

Le cancer de l'ovaire ne dérogerait pas à la règle et pourrait lui aussi être diagnostiqué grâce à des exosomes vecteurs de biomarqueurs. En effet les exosomes circulants dans le sang des patientes contiendraient 8 microARN (miR-21, miR-141, miR-200a, miR-200b, miR-200c, miR-203, miR-205 et miR-214) exprimés dans les cellules tumorales. Deux de ces microARN, miR-200c et miR-214, permettraient aussi de suivre la progression du cancer puisqu'ils sont faiblement exprimés dans des exosomes de patientes présentant une lésion de bas grade, et fortement exprimés pour des patientes atteintes d'un stade de cancer plus élevé (Taylor et Gercel-Taylor, 2008). Les exosomes ne seraient pas seulement les vecteurs de biomarqueurs microARN mais aussi des biomarqueurs protéiques. Les exosomes sanguins des patientes atteintes contiendraient la claudine-4 alors que les exosomes sanguins des personnes ne présentant pas de cancer n'en contiennent pas. L'expression de cette protéine dans les exosomes est corrélée avec la présence de CA125 (biomarqueur tissulaire) au niveau de la tumeur. La claudine-4 pourrait alors être un biomarqueur diagnostique (Li *et al.*, 2009c).

Dans le cas des cancers de la tête et du cou, le fluide le plus approprié serait la salive. Ce liquide est facilement récolté et est à proximité des tumeurs. De plus la salive contiendrait des exosomes tumoraux transportant des biomarqueurs de ce type de cancer, les protéines

CD44 ET CD95L (Principe *et al.*, 2013).

Enfin dans le cas des glioblastomes les exosomes sanguins seraient aussi les vecteurs de microARN ayant le potentiel d'être des biomarqueurs comme miR-21 par exemple (Skog *et al.*, 2008). Le liquide cérébro-spinal contiendrait lui aussi des exosomes tumoraux provenant du tumeur du SNC (Balaj *et al.*, 2011).

2.3.2 Exosomes vecteurs de thérapie

2.3.2.1 Exosomes, vecteurs de molécules thérapeutiques

Les exosomes contiennent des ARN et des protéines qu'ils protègent grâce à leur membrane exosomale. Les exosomes peuvent en outre libérer leur contenu dans des cellules réceptrices qui peuvent être ciblées. Les exosomes apparaissent alors comme des vecteurs potentiels de molécules thérapeutiques vers des cellules cibles et ces dernières années différentes équipes se sont penchées sur cette question.

Des macrophages transfectés avec des molécules du microARN miR-143 modifiées chimiquement pour être plus stables (appelés miR-143BP) sécrètent miR-143BP dans les exosomes. Ces macrophages ont été injectés dans la circulation sanguine de souris où ils ont sécrété des exosomes contenant les microARN chimiquement modifiés. Après injection de ces macrophages transfectés les microARN modifiés ont été détectés intacts dans le sérum, les tumeurs et le rein des animaux hôtes (Akao *et al.*, 2010). Aussi, modifier les taux de microARN exosomaux *ex vivo* pourrait être une solution pour délivrer des microARN dans les cellules cibles tout en les préservant de la dégradation grâce la membrane exosomale (Kosaka *et al.*, 2013). Pour ce faire, la manière la plus efficace de chargement des siRNA ou miRNA à l'intérieur des vésicules est l'électroporation des exosomes en présence des ARN à transfecter (Kosaka *et al.*, 2013; Lakhali et Wood, 2011).

Les exosomes présentent aussi le très grand avantage de pouvoir faciliter le passage de la barrière hémato-encéphalique pour délivrer les ARN directement dans le cerveau. En effet, des ARN thérapeutiques injectés directement dans la circulation sanguines se retrouvent essentiellement dans la rate, le foie et les reins ; alors que s'ils sont véhiculés dans des exosomes leur taux d'action dans les cellules cérébrales atteint 60% d'efficacité (Lakhali et Wood, 2011). Ainsi des cellules dendritiques modifiées sécrètent des exosomes portant à leur surface la protéine Lamp2 associée un peptide aidant à la pénétration dans les neurones. Les exosomes produits par ces cellules ont été électroporés *ex vivo* pour les charger en siRNA ciblant

la protéase BACE1. Ces exosomes injectés dans la circulation sanguine de souris, passent la barrière hémato encéphalique et provoquent un abaissement drastique de l'expression de cette protéase et de la quantité de l'ARNm la codant et ce spécifiquement dans les neurones, les cellules de microglie et les olidodendrocytes. De plus, comme la protéase BACE1 est responsable du clivage de l'APP (Amyloïd Precursor Protein) en N-terminal et de la libération du peptide β -amyloïde qui s'accumule dans la maladie d'Alzheimer ; arriver à abaisser son expression à l'aide de siARN transportés dans les exosomes serait un nouvel espoir de thérapie (Alvarez-Erviti *et al.*, 2011).

2.3.2.2 Exosomes, vecteurs modulant l'action du système immunitaire

Les exosomes étant capables de présenter des antigènes aux lymphocytes et ainsi d'activer une réponse immunitaire, ils pourraient être utilisés comme des agents thérapeutiques permettant de présenter des antigènes sélectionnés au système immunitaire. Des antigènes tumoraux pourraient ainsi être présentés au système immunitaire pour déclencher une réponse immunitaire contre la tumeur alors considérée comme du non soi (Chaput et Théry, 2010).

La première étude menée dans ce sens là a montré que les exosomes pouvaient médier la suppression de la progression tumorale chez une souris. Des cellules dendritiques d'une souris ayant une tumeur ont été prélevées puis incubées avec des peptides tumoraux de cette tumeur. Les exosomes produits par ces cellules dendritiques activées ont ensuite été injectés en sous cutanée sur la même souris. Après 60 jours une réponse immunitaire contre la tumeur était observable (Zitvogel *et al.*, 1998). Depuis, l'idée a fait son chemin et a conduit des essais cliniques en phase I pour un traitement des mélanomes à l'aide d'exosomes de Dex (exosomes de cellules dendritiques) portant l'antigène de mélanome MAGE3. Le traitement est non toxique et ne provoque pas d'effets indésirables, mais n'est partiellement efficace que pour un nombre réduit de patients (Escudier *et al.*, 2005). Ce vaccin était basé sur des exosomes de cellules dendritiques immatures, cellules qui, finalement, apparaîtrait plutôt induire une tolérance du système immunitaire. Une seconde génération de Dex, provenant de cellules dendritiques préalablement activées à l'interféron g, les g-Dex, font actuellement l'objet des essais cliniques en phase II (Viaud *et al.*, 2011). Les Tex (exosomes tumoraux) seraient théoriquement tout indiqués pour ce genre de traitement puisqu'ils présentent déjà les antigènes tumoraux sur leur membrane (Andre *et al.*, 2004) ; cependant actuellement aucun traitement d'immunothérapie reposant sur l'utilisation de Tex n'a encore été testé en phase clinique. En effet, si les Tex peuvent activer une réponse immunitaire, ils semblent tout aussi capables de l'inhiber.

Les exosomes peuvent aussi être utilisés pour rendre le système immunitaire plus tolérant. Lors des transplantations le risque majeur reste le rejet de la greffe par le patient. Pour prévenir ce rejet il faut d'abord pouvoir en détecter les premiers signes et les exosomes sanguins pourraient jouer un rôle important de vecteur de biomarqueurs. Les exosomes pourraient alors être utilisés comme agents de régulation pour le système immunitaire. Une injection d'exosomes de cellules dendritiques du donneur pourrait permettre de rendre le système immunitaire de receveur plus tolérant pour qu'il ne considère pas le transplant comme du non soi. Cela préviendrait ainsi un rejet de transplantation (Fleissner *et al.*, 2012; Pêche *et al.*, 2003).

2.3.2.3 Exosomes, vecteurs de vaccination

Les exosomes produits par les cellules transformées par le virus EBV (Epstein Barr Virus) expriment à leur surface la protéine structurale du virus : gp350. Ces exosomes sont alors capables de cibler spécifiquement les lymphocytes B. Une préincubation des lymphocytes B avec ces exosomes réduit très fortement le taux d'infection des lymphocytes B par EBV. Des exosomes exprimant la protéine gp350 ou une protéine virale à leur surface pourraient alors être utilisés comme vaccins exosomaux (Vallhov *et al.*, 2010).

Enfin , dans le cadre des cancers, les exosomes tumoraux sont produits en grande quantité et sont capables de véhiculer des signaux de croissance cellulaire. Les exosomes cancéreux, en grande quantité dans les fluides biologiques dont le sang, sont aussi capables de se lier aux anticorps des immunothérapies les rendant ainsi bien moins efficaces. Retirer les exosomes du sang circulant permettrait d'éviter la propagation tumorale via les exosomes et de rendre plus efficaces les thérapies (Marleau *et al.*, 2012).

3 Objectifs

Les constats relevés par cet état de l'art pourraient se résumer ainsi :

- Le diagnostic des gliomes n'est pas encore parfait et les microARN pourraient constituer des biomarqueurs supplémentaires pour améliorer le diagnostic de ce type de pathologie.
- Les cellules tumorales produisent des exosomes accessibles dans les fluides biologiques.
- Ces exosomes tumoraux sont « chargés » d'un contingent de microARN qui pourrait être un reflet du contingent des cellules tumorales qui les produisent.
- Les exosomes libérés dans le milieu environnant, dont le rôle dans la communication entre cellules et la tumorigénèse est probablement majeur mais peu connu, seraient susceptibles de promouvoir des réponses dans les cellules saines péri-tumorales afin de faciliter le développement et la migration de la tumeur.

De ces observations et hypothèses émergent plusieurs questions fondamentales :

1. Les microARN peuvent-ils être de bons biomarqueurs pour aider au diagnostic des gliomes ?
2. Quelle est la composition en microARN des exosomes de cellules saines et quelles sont les différences majeures avec celle des exosomes de tumeurs gliales ?
3. Est-il possible de perturber le processus de production des exosomes ainsi que leur contenu en microARN ?
4. Les exosomes de cellules de glioblastomes ont-ils un effet sur les cellules saines péri-tumorales ?

Pour tenter de répondre à ces questions le projet a été divisé en 4 axes qui comportent les objectifs décrits ci-après.

– 1er axe : Diagnostic tissulaire grâce à des microARN :

1. Etudier les différences d'expression des miARN dans des tissus cérébraux « sains » et dans deux types de tumeurs gliales, les oligodendrogliomes et les glioblastomes.

2. Proposer des applications potentielles pour le diagnostic tissulaire permettant la distinction de ces deux types de tumeurs grâce à leurs signatures biomoléculaires spécifiques.
 3. Sélectionner des modèles cellulaires « sains » et de glioblastomes mimant les tissus pour aborder l'étude *in vitro* de caractérisation des exosomes produits par les cellules gliales.
- 2ème axe : Caractérisation des exosomes de cellules gliales :
1. Caractériser la production d'exosomes *in vitro* par des cellules gliales saines et des cellules de glioblastomes (modèles cellulaires).
 2. Mettre au point des méthodes de normalisation pour l'analyse transcriptomique microarray à partir d'échantillons cellulaires et exosomaux.
 3. Etablir les profils microARN et ARNm des échantillons cellulaires et exosomaux des cellules gliales saines et cancéreuses et analyser les variations d'expression de ces ARN entre cellules productrices et exosomes.
 4. Evaluer le potentiel des exosomes en tant que vecteurs de microARN ayant un rôle de biomarqueurs tissulaires.
- 3ème axe : Effets de stress extérieurs sur la production d'exosomes par des cellules de glioblastomes en culture :
1. Mesurer les effets de conditions de culture hypoxiques sur la quantité d'exosomes produite par des cellules de glioblastomes.
 2. Recenser les éventuelles dérégulations des profils ARN exosomaux dues à l'hypoxie.
 3. Déterminer les effets de composés pharmacologiques visant à déréguler la quantité d'exosomes produite par les cellules de glioblastomes.
 4. Valider la capacité de ces composés pharmacologiques à induire une dérégulation.
- 4ème axe : Effets des exosomes de gliomes sur les cellules environnantes :
1. Vérifier l'internalisation des exosomes de glioblastomes par des cellules gliales saines ou tumorales.
 2. Observer la cinétique d'internalisation de ces exosomes dans des cellules réceptrices saines ou de glioblastomes.
 3. Définir les effets de ces exosomes internalisés sur les profils microARN des cellules réceptrices.

II Matériels et Méthodes

1 Matériels Biologiques

1.1 Echantillons tissulaires

Les échantillons tissulaires utilisés dans cette étude proviennent du bloc opératoire du Département de Neurochirurgie du CHU de Grenoble. Ils ont été obtenus par exérèse et sont conservés à -80°C . Les tissus dits « sains » ou « normaux » sont récupérés suite à une cortectomie sur des patients atteints d'épilepsie. Quant aux tissus tumoraux, oligodendrogliomes ou glioblastomes, leur nature a été préétablie par le département d'anatomopathologie du CHU, en accord avec la classification de l'OMS (Louis *et al.*, 2007) et Saint-Anne (Daumas-Duport *et al.*, 2000) suite à des analyses de type histologique et immunohistochimique. Ces échantillons étant des échantillons humains, les projets de recherche ont été au préalable approuvés par le comité d'éthique, et les consentements écrits des patients ou de leurs familles ont été récoltés. Tous ces échantillons sont anonymés, stockés et répertoriés dans la tumorothèque du CRB (Centre de Ressources Biologiques) du CHU de Grenoble.

1.2 Lignées cellulaires

Les lignées cellulaires humaines de glioblastomes U87 MG (Human Glioblastoma-Astrocytoma) et d'astrocytes primaires HA (Human Astrocytes) ont été obtenues respectivement auprès de l'ATCC (American Type Culture Collection, ATCC-HTB-14, lot numéro 58492108) et auprès de la société ScienCell (ScienCell Research Laboratories, 1800, lot numéro 5054). Les cellules de gliomes humains HS683 ont été elles-aussi acquises auprès de l'ATCC (ATCC-HTB-138, lot numéro 3322349). Enfin les cellules Gli06 sont des cellules de glioblastomes primaires remises en culture au laboratoire.

2 Méthodes

2.1 Cultures et tests cellulaires

2.1.1 Culture cellulaire

Les cultures de U87 MG (glioblastomes) et de HS683 (gliomes), sont réalisées en milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium à 4,5 g/L de glucose, Invitrogen) complété avec du sérum de veau foetal (SVF), 10% en concentration (Gibco). Ces cellules sont adhérentes et sont donc cultivées dans des boîtes ou plaques traitées spécifiquement pour permettre une meilleure adhérence des cellules (BD).

Les cellules HA sont elles cultivées dans un milieu AM (Astrocyte Medium, ScienCell) contenant entre autre 10% de SVF, du supplément de croissance pour Astrocytes (AGS) au 1X, 100 U/mL de pénicilline et 100 mg/mL de streptomycine. La culture de ces cellules, adhérentes elles aussi, nécessite un pré-coating des boîtes de cultures à la poly-D-lysine (Poly-D-Lysine hydrobromide, Sigma).

Les cultures de cellules primaires, Glio 6, sont réalisées en milieu spécifique, sans SVF.

Toutes ces cultures sont réalisées à 37°C et 5% de CO₂ et à différents taux d'oxygénation, 0,3%, 3% ou 21% d'oxygène en incubateur ou en enceinte à hypoxie (IN VIVO2 400, Runskinn). Une fois à confluence, les cellules sont lavées au PBS 1X (Phosphate-Buffered Saline, Sigma) et détachées en utilisant la trypsine 2 min à 37°C (Trypsine-EDTA 0,25%, 1X, Gibco). Elles sont ensuite réensemencées au dixième.

2.1.2 Marquages au PKH67 ou au PKH26

La PKH est un composé extrêmement lipophile développé par Paul Horan et ses collègues à Zynaxis Cell Science (US). Ces propriétés extrêmement lipophiles lui permettent un marquage fluorescent très homogène des membranes cellulaires dans des conditions isosmotiques et sans sel facilitant ainsi une intercalation rapide et stable du composé dans la bicouche lipidique grâce à de fortes interactions non covalentes. Il est couramment utilisé pour suivre la prolifération de cellules *in vivo* ou *in vitro* (Wallace *et al.*, 2008)

Deux PKH ont été utilisées, la PKH67 (MINI67, PKH67 Green Fluorescent Cell Linker Mini Kit, Sigma) fluoresçant dans le vert et la PKH26 (MINI26, PKH26 Red Fluorescent Cell Linker Mini Kit, Sigma) fluoresçant dans le rouge.

Marquage des cellules :

Les cellules U87 MG sont traitées à la trypsine, lavées dans leur milieu de culture contenant 10% de SVF pour inhiber les effets de la trypsine, puis comptées. 10^6 cellules sont lavées au PBS 1X stérile et centrifugées à 200 rpm pendant 5 min à trois reprises pour éliminer toutes traces de SVF. Le culot de cellules est ensuite repris dans 100 μ l de « diluent C » (fourni dans le kit). 4 μ l de colorant PKH sont dilués dans 96 μ l de « diluent C ». Les 100 μ l de PKH diluée sont mélangés au 100 μ l de « diluent C » contenant les cellules pour une incubation de 5 min à température ambiante. La réaction est stoppée en ajoutant 10 mL de milieu de culture contenant 10% de SVF. Les cellules sont enfin lavées à trois reprises dans du milieu de culture contenant 10% de SVF, et réensemencées normalement. Les exosomes qu'elles produiront contiendront eux aussi la PKH dans leur membrane, et seront donc fluorescents.

Marquage des exosomes :

Les culots 100 000 g d'exosomes de U87 MG (exosomes produits par environ $2 \cdot 10^8$ cellules) sont repris dans 180 μ l de PBS 1X. 1 μ l de colorant PKH est dilué dans 49 μ l de « diluent C ». 20 μ l de PKH diluée sont mélangés au 180 μ l de PBS 1X contenant les exosomes pour une incubation de 3 min à température ambiante. La réaction est stoppée en ajoutant 10 mL de milieu de culture contenant 10% de SVF. Les exosomes sont enfin centrifugés à 70 000 g pendant 1 h. Les exosomes contenant la PKH dans leur membrane, et donc fluorescents, sont ensuite repris dans 180 μ l de PBS 1X et incubés sur les cellules réceptrices.

En parallèle, un échantillon dépourvu d'exosomes (PBS1X seul) qui a subi les mêmes étapes de coloration est utilisé comme contrôle négatif.

2.1.3 Cytométrie en flux

Afin de ne pas perdre les cellules mortes flottantes, les surnageants de cultures sont récupérés dans un tube Falcon. Après décollement des cellules, celles-ci sont récupérées et reprises dans le surnageant de culture récupéré au préalable. Les tubes Falcon sont ensuite centrifugés 5 min à 500 rpm à 4°C et les culots de cellules repris dans 30 à 40 μ l de milieu de culture. Les cellules sont ensuite passées au cytomètre en flux BD FACS Canto II pour analyser leur cycle cellulaire et marquées à l'Annexine V-FITC pour analyser l'apoptose.

2.1.4 Incubation d'exosomes ou de nanocapsules lipidiques

Pour étudier l'effet des exosomes de tumeurs sur leur environnement, des exosomes de U87 sont mis en contact pendant 1 h à 24 h avec les cellules réceptrices qui sont des HA ou des U87. Les exosomes sont incubés dans une proportion d'environ 1000 exosomes par cellules réceptrices. Un contrôle positif est réalisé en incubant des nanocapsules lipidiques sur les cellules réceptrices dans les mêmes proportions que pour les exosomes. Un contrôle négatif consiste à incuber les cellules réceptrices avec le même volume de PBS 1X ne contenant ni exosomes ni nanocapsules lipidiques.

Les nanocapsules utilisées ici ont été produites par les soins d'Audrey Griveau au Laboratoire de Emmanuel Garcion à Angers. Elles ont une taille d'environ 60 nm de diamètre, sont composées d'un cœur lipidique stabilisé par une coque tensioactive et des sondes fluoresçant dans le rouge, DiI et DiO, y sont incorporées.

2.1.5 Fixation, coloration et visualisation des cellules

Les membranes cellulaires sont colorées au WGA (Wheat Germ Agglutinin Oregon Green 488 Conjugate ou Texas Red-X Conjugate, Invitrogen) et fluoresceront dans le vert ou le rouge. Les cellules sont ensuite fixées au PFA (Paraformaldéhyde) 4X. Les noyaux sont marqués au Hoechst et fluoresceront dans le bleu. Les lames ont ensuite été observées au microscope confocal Zeiss LSM, avec un objectif 63xoil.

2.1.6 Transfection d'agonistes ou antagonistes de microARN

Les transfections sont réalisées d'après les recommandations du fournisseur, en utilisant les agents de transfection SIPORE-NEOFX et RNAimax, les agonistes premiR ou mimics et les antagonistes antimiR ou miR inhibitor commercialisés par la société Ambion. Des contrôles agonistes et antagonistes négatifs, eux aussi proposés par Ambion, ont été testés en parallèle.

2.2 Production et caractérisation d'exosomes

2.2.1 Production d'exosomes

Dans le but d'éviter une contamination par des exosomes de SVF, le milieu de culture des cellules productrices est retiré, les cellules lavées au PBS 1X, puis le milieu changé pour

un milieu de culture non supplémenté en SVF. Les surnageants de culture sont récupérés après une durée comprise entre 1 h et 48 h, dans la majorité des cas, 24 h. Les exosomes sont récoltés dans ces surnageants comme indiqué ci-après.

2.2.2 Collecte d'exosomes

La collecte d'exosomes se fait par centrifugations différentielles. Le surnageant de culture est d'abord centrifugé 10 min à 2000 g à 4°C, puis 20 min à 20 000 g à 4°C, il est ensuite filtré sur une membrane poreuse (pores de 0,2 µm de diamètre), et enfin ultracentrifugé 2 h à 150 000 g à 4°C (Ultracentrifugeuse Beckman avec rotor SW41 ou SW32, Beckman). Une étape de lavage peut être ajoutée suite à cette dernière étape, le culot enrichi en exosomes est alors remis en suspension dans du PBS 1X et centrifugé 2 h à 150 000 g à 4°C. Les culots d'exosomes sont ensuite repris dans du PBS 1X ou directement dans du tampon Laemmli 1X.

Pour une plus grande pureté des exosomes, il est possible de les fractionner en réalisant un gradient continu de sucrose allant de 8% à 60% de sucrose (0,3 M à 1,4 M de sucrose dans de l'imidazole 3 mM pH 7,4).

Gradient classique : le gradient de 10 mL est coulé dans un tube Beckman SW41 à l'aide d'une pompe qui dépose les densités de sucrose directement au fond du tube et en continu, des moins denses (8% de sucrose), aux plus denses (60% de sucrose). Les densités les plus faibles remontent petit à petit à la surface pour donner un gradient de densité continu. Les échantillons repris dans 200 µl de sucrose 8% sont déposés à la surface du gradient puis le tube est ultracentrifugé à 100 000 g pendant 18 h.

Gradient inverse : Les échantillons d'exosomes sont repris dans 300 µl de sucrose 60% et sont déposés au fond d'un tube Beckman SW41. Le gradient de 10 mL est coulé au dessus de cet échantillon à l'aide d'une pompe équipée d'une sonde qui dépose les densités de sucrose en continu, des plus denses (40% de sucrose) aux moins denses (8% de sucrose), à la surface du liquide. Ainsi, les densités les plus fortes restent au fond et les plus faibles densités dans le haut du gradient, le tout s'équilibre naturellement pour donner un gradient de densité continu. Le tube est ensuite ultracentrifugé à 100 000 g pendant 18 h.

Après ultracentrifugation des gradients, des fractions de 1 mL (10 à 11 fractions, la fraction 1 étant la moins dense) sont prélevées. Leur densité en sucrose est vérifiée à l'aide d'un réfractomètre, puis chacune est diluée dans 10 mL d'imidazole 3 mM pH 7,4 et ultracentrifugée

à 100 000 g pendant 1 h.

Les culots de chaque fraction sont ensuite repris directement dans du tampon Laemmli pour être analysés en Western Blot. Pour les culots d'exosomes destinés à être dosés au Nanosight ou transfectés sur cellules en culture, les culots des fractions proches de 30% de sucrose sont mélangés. Ce sont généralement les fractions 4, 5 et 6 dans le cas d'un gradient classique, et les fractions 5, 6 et 7 pour un gradient inverse, qui contiennent les exosomes.

2.2.3 Microscopie électronique

La qualité des préparations d'exosomes peut-être vérifiée par microscopie électronique à transmission qui permet de conclure sur l'intégrité des vésicules et sur le niveau et la nature des contaminations environnantes.

Les culots d'exosomes sont resuspendus dans 50 à 100 μ l de PFA (Paraformaldéhyde) 2%. 5 μ l de la suspension sont alors déposés sur la membrane d'une grille préalablement recouverte de formvar-carbone. Les grilles sont laissées 20 min dans un environnement sec pour permettre à la membrane d'adsorber la suspension puis lavées au PBS 1X, et transférées dans du glutaraldéhyde 1% pendant 5 min pour permettre la fixation. Après un lavage à l'eau distillée, les objets sont imprégnés d'uranyl oxalate puis de méthyl cellulose-UA (100 μ l d'uranyl acétate 4% et 900 μ l de méthyl cellulose 2%) pendant 10 min sur la glace. Le surplus de liquide est enlevé à l'aide de papier Whatman, et les grilles sont ensuite séchées à l'air libre. L'observation se fait au microscope électronique à transmission (JEOL 1200EX) à 80 kV (Théry *et al.*, 2006).

2.2.4 Quantification des exosomes au Nanosight

Les culots d'exosomes obtenus par ultracentrifugation sont resuspendus dans 500 μ l de PBS 1X stérile. Si nécessaire les échantillons peuvent être ensuite dilués pour obtenir une concentration optimale de dosage proche de 10^8 exosomes/mL.

Les 500 μ l d'échantillons contenant les exosomes sont ensuite injectés dans la « chambre optique » de l'appareil Nanosight LM10. Cet appareil est composé d'un microscope optique conventionnel équipé d'une caméra, ainsi que d'une source laser de 640nm. La diffusion du laser engendrée par la présence de petites particules de diamètre compris entre 30 et 500 nm est détectée et permet la quantification des particules présentes dans l'échantillon étudié.

Grâce à la caméra une séquence d'acquisition de 30 s à température ambiante est réalisée. Après avoir réglé les trois paramètres « brightness », « gain » et « blur » respectivement

de 3 à -6, de 0,5 à 2,0 et de 3x3 à 5x5, les séquences d'acquisition sont traitées grâce au logiciel NTA Build 0329 software (version 2.0) qui permet de calculer la taille des particules en présence grâce à la mesure de leur mouvement Brownien.

2.2.5 Diffusion dynamique de lumière (Dynamic Light Scattering, DLS)

Les culots d'exosomes obtenus par ultracentrifugation sont resuspendus dans 500 µl de PBS 1X stérile. Les 500 µl d'échantillons contenant les exosomes sont ensuite transférés dans un tube à hémolyse placé au centre du dispositif composé essentiellement d'un laser et d'un détecteur de photon. L'échantillon est illuminé par un rayon laser et les fluctuations de l'angle de diffusion de la lumière sont détectées par le détecteur de photon. Après analyse des résultats par le logiciel (AVL-7004), on obtient une courbe de distribution de la taille des particules et une intensité de signal proportionnelle au nombre de particules présentes dans l'échantillon, ce qui permet une comparaison relative du nombre de particules dans un échantillon par rapport à un autre.

2.2.6 Quantification des exosomes au qNano

Les échantillons d'exosomes sont repris dans du PBS 1X et placés dans la cage de Faraday de l'appareil qNano (IZON). La concentration et la taille des exosomes de chaque échantillon sont ici mesurées en utilisant le principe de Coulter. Les exosomes passent à travers un nano pore et le passage de chacun génère un signal qui est enregistré. La magnitude de chaque signal renseigne sur la taille de la particule en question et la fréquence d'enregistrement de ces signaux est directement proportionnelle à la concentration de l'échantillon mesuré. La mesure de standards permet donc d'obtenir une valeur réelle de taille et de concentration des particules (ici des exosomes) pour chacun des échantillons.

2.2.7 Western blot

Les échantillons protéiques sont préparés à partir de culots de cellules, ou de culots d'exosomes. Pour les échantillons cellulaires, une lyse est réalisée avec le tampon de lyse (Promega) auquel sont ajoutées des anti-protéases (Roche), ou à l'aide de 500 µl de tampon de lyse RIPA (RIPA : 1% de NP-40 ; 0,5% de Désoxycholate ; 0,1% de Sodium Dodécyl Sulfate (SDS) ; 150 mM de NaCl). Les tubes sont placés sur la glace pendant 30 min et vortexés toutes les 5

min. Le tout est ensuite centrifugé 10 min à 10 000g et à 4°C pour récupérer le surnageant contenant les protéines. Les échantillons sont stockés à -20°C.

Les échantillons cellulaires, dosés par la méthode de Bradford, sont préparés dans du tampon Laemmli (Laemmli, 1970) en quantité protéique à peu près égale : 10 µg pour les cellules ou la totalité des exosomes contenus soit dans un culot 100 000g, soit dans un input de 10% d'un gradient de sucrose, soit dans chaque fraction d'un gradient de sucrose. Les échantillons préparés sont chauffés à 100°C pendant 10 min puis déposés sur un gel de polyacrylamide 10%. La migration est réalisée dans du tampon de migration sous 90 Volts, 51,5 mA jusqu'à ce que les échantillons aient atteint le gel de séparation, puis sous 130 Volts, 51,5 mA pendant environ 90 min. Une fois la migration terminée, une étape de transfert semi sec est réalisée sous 20V à ampérage constant de 500mA pendant 90min. Elle permet le transfert des protéines du gel de polyacrylamide vers une membrane PVDF (Polyvinylidene difluoride, GE, UK) immergée 10 secondes dans de l'isopropanol pur puis 30 minutes dans le tampon de transfert préalablement au transfert. L'efficacité du transfert est vérifiée en colorant la membrane au rouge ponceau et le gel au bleu de Coomassie.

Tampon Laemmli	2% de SDS ; 10% de Glycérol ; 62,5 mM de Tris HCl au pH 6,8 ; 5% de β -mercapto-éthanol ; 0,002% de Bleu de Bromophénol
Tampon de migration	250 mM de Tris HCl ; 192 mM de Glycine ; 0,1% de SDS (p/v)
Tampon de transfert	25 mM de Tris HCl ; 192 mM Glycine ; 10% d'isopropanol ; 0,04% SDS (p/v)
TBST (Tris Buffer Saline Tween)	20 mM de Tris HCl au pH 7,6 ; 0,8% de NaCl (p/v)

Les membranes sont ensuite mises à équilibrer et saturer dans la solution de TBST Lait 5% (Tris-Buffered Saline Tween) pendant 30 minutes à température ambiante, puis transférées dans du TBST Lait 5% contenant l'anticorps primaire à la bonne dilution (tableau 1), et laissées avec agitation à température ambiante pendant une heure ou bien en chambre froide (4°C) une nuit. Après trois lavages de 10 minutes dans du TBST 0,1%, la membrane est incubée 1 heure avec agitation à température ambiante dans du TBST Lait 5% contenant l'anticorps secondaire couplé à la HRP à la bonne dilution (tableau 1). S'ensuivent alors six lavages de 5 minutes dans le TBST 0,1%. Les membranes sont incubées dans le réactif chimio luminescent ECL (Enhanced Chemiluminescence, Millipore) pendant 1 minute dans le noir puis leurs signaux luminescents sont révélés en chambre noire ou au Chemidoc (Biorad, Hercules, CA). Les signaux sont analysés avec le logiciel Image Lab (Bio-Rad) ou le logiciel Image J.

	Nom	Espèce	PM (kDa)	Dilution utilisée	Fournisseur	Référence
Anticorps	anti-Flotilline 1	Souris (monoclonal)	48	1/1000	BD Transduction Lab	610820
Primaires	anti-Alix	Lapin (polyclonal)	91-93	1/10000	Covalab	Pab0204

TABLE 1 – Anticorps

2.3 Préparations et analyses d'acides nucléiques

2.3.1 Préparation d'acides nucléiques

ARN :

Les extractions d'ARN sont réalisées à l'aide du kit mirVana (mirVanaTM miRNA Isolation Kit, Ambion), à la fois sur des coupes de tissus de 20 μm (environ 25 mg), sur des culots de cellules ($2 \cdot 10^6$ cellules) ou sur des culots d'exosomes (environ 10^9 exosomes).

Les cellules sont d'abord lysées dans un tampon dénaturant, puis l'ajout de Phénol-Chloroforme acidifié permet une extraction aisée des ARN. En effet, ceux-ci sont resuspendus en phase aqueuse alors que les protéines restent dans la phase organique (phénol), et l'ADN précipite à l'interface. Les ARN contenus dans la phase aqueuse sont ensuite purifiés sur colonne de silice. Cette purification se base sur le principe de la solubilité spécifique de chaque molécule pour un solvant donné. Les ARN sont fixés sur la colonne et différents éluants permettent d'éliminer les contaminants avant d'éluer les ARN dans 100 μl de solution d'élution. Le kit mirVana permet aussi une séparation des ARN « courts » (inférieurs à 200pb) et des ARN « longs », en utilisant des quantités d'éthanol plus ou moins importantes permettant de fixer des fractions d'ARN de différentes tailles sur les colonnes.

La concentration en ARN de chaque échantillon est quantifiée par absorption UV (Nanodrop, Thermo Scientific). La qualité des ARN extraits est ensuite contrôlée par une migration électrophorétique miniaturisée réalisée sur « RNA Lab Chip » (bioanalyseur Agilent 2100) suivant les instructions du fournisseur. Un marquage fluorescent des échantillons en fonction de leur taille permet l'obtention de spectres dont les temps de rétention et l'intensité de fluorescence permettent d'extraire des données qualitatives et quantitatives afin de valider la qualité des préparations (technologie décrite en Annexe A.1, page 197).

Les préparations d'exosomes ne contenant que de faibles quantités de microARN, il n'est

pas toujours envisageable, sans risque de perte considérable de matériel sur les colonnes de purification d'ARN, d'extraire les microARN par le procédé décrit ci-dessus. Dans ces cas là, la solution commerciale « Cell to CT for microRNA » (Ambion) a donc été choisie. Elle permet, directement à partir de cellules, ou d'exosomes, de réaliser une lyse et de pouvoir effectuer par la suite l'étape de « reverse transcription » et PCR quantitative sur le lysat.

ADN :

Les extractions d'ADN sont réalisées sur coupes de tissu (congelé ou fixé à la paraffine (FFPE : Formalin Fixed Paraffin Embedded)) ou sur culots de cellules, à l'aide du kit QIAmp DNA mini kit (Qiagen, Valencia, CA) et en suivant les instructions du fournisseur.

2.3.2 PCR (Polymerase Chain Reaction)

Les PCR sont réalisées à partir de 25ng d'ADN. Les amplicons de ces PCR ainsi qu'un marqueur « 100pb » de Promega sont ensuite déposés sur un gel d'agarose 2% contenant du BET (Bromure d'ethidium) et mis à migrer. Les gels sont alors révélés au Chemidoc (Biorad, Hercules, CA), par fluorescence sous rayonnement UV.

Le séquençage des produits PCR est réalisé par la société Cogenics selon la méthode de terminaison de polymérisation de Sanger.

Pour le gène IDH1 les séquences des primers de PCR et de séquençage sont celles décrites dans la publication de Bleeker *et al.* (2009) :

Sens : 5'- AATGAGCTCTATATGCCATCACTG - 3'

Antisens : 5'- TTCATACCTTGCTTAATGGGTGT - 3'

Séquençage : 5'- GCCATCACTGCAGTTGTAGGTTA - 3'

2.3.3 RT-qPCR

La RT-qPCR se décompose en deux étapes : une première étape de RT (Reverse Transcription) ou transcription inverse, puis une seconde étape de qPCR (quantitative Polymerase Chain Reaction).

« Reverse transcription »

La « reverse transcription » a pour but de rétrotranscrire des ARN en ADN complémentaires (ADNc), elle est réalisée à l'aide du kit MiR TaqMan Individual Assay (Applied Biosystem), spécifique aux microARN, (technologie décrite en Annexe A.2, page 198). L'originalité de la

technique consiste à utiliser une amorce d'oligonucléotide d'un type particulier, qui, contrairement à une amorce ordinaire, est en forme de boucle (Chen *et al.*, 2005). Cette propriété de l'amorce permet une « reverse transcription » spécifique des microARN matures. Le pré-microARN étant plus grand en extrémité 3' que le microARN mature, l'hybridation de la partie complémentaire du primer avec le pré-microARN ne peut pas avoir lieu. La réaction nécessite alors des amorces spécifiques à chaque microARN donné.

Les éléments du milieu réactionnel nécessaires à la synthèse de l'ADNc sont la « reverse transcriptase » (et sa solution tampon), les amorces spécifiques, les 4 dNTP et un inhibiteur de RNase (RNAsin). Cet inhibiteur est incorporé au mélange réactionnel afin d'éviter toute dégradation de l'ARN avant ou durant la RT. Un cycle d'incubation est ensuite lancé sur un thermocycleur et se déroule en trois étapes : l'hybridation des amorces (30 minutes à 16°C) ; la fixation de l'enzyme et la phase d'amplification (30 minutes à 42°C) et enfin l'inactivation de l'enzyme (5 minutes à 85°C). Le cycle se termine enfin par un maintien à 4°C.

Des contrôles négatifs sont aussi réalisés pour chaque échantillon en omettant la reverse transcriptase. Il sera alors possible de vérifier que les amplifications observées en qPCR ne sont pas des amplifications d'ADN génomique résiduel.

PCR quantitative

La qPCR ou PCR quantitative est une PCR suivie en temps réel permettant de quantifier l'ADN double brin présent dans les échantillons testés. Les sondes TaqMan (TaqMan probe), ici utilisées, permettent ce suivi de fluorescence grâce à l'utilisation du phénomène FRET (Fluorescent Resonance Energy Transfert). Plusieurs contrôles négatifs sont réalisés pour chaque expérience pour s'assurer que le mélange réactionnel n'est pas contaminé par une partie des matrices, ou par de l'ADN génomique. Les qPCR sont réalisées grâce aux appareils Mx Pro 3005 de la société Stratagene ou CFX de la société Biorad. Une première étape de 10 minutes à 95°C permet la dénaturation des matrices et l'activation de l'enzyme. Elle est suivie de 45 cycles identiques : 15 secondes à 95°C pour permettre la dénaturation ; puis 60 secondes à 60°C pour réaliser l'hybridation et l'amplification.

Lorsque la valeur de fluorescence d'un échantillon dépasse un seuil minimal, le cycle en cours est désigné comme le Ct (cycle de seuil ou Cycle threshold ou encore Cq pour cycle de quantification) de l'échantillon en question et est caractéristique de sa quantité initiale d'ADNc. Une normalisation est effectuée afin de corriger les biais entre analyses. Pour ce faire, un même calibrateur a été testé sur l'ensemble des analyses réalisées. Ce calibrateur est RNU24, un petit ARN nucléaire (75 bases) dont l'expression est constante pour tous les échantillons cellulaires et tissulaires et toutes les conditions. Dans le cas des exosomes aucun

calibrateur présentant les caractéristiques indiquées ci-dessus n'est connu à ce jour.

L'analyse de l'expression génique est faite selon la méthode des $\Delta\Delta\text{CT}$ (Livak et Schmittgen, 2001). Pour chaque échantillon, le Ct du microARN d'intérêt est normalisé par celui de RNU24. Une deuxième normalisation compare ensuite les échantillons entre eux avec la relation suivante :

$$N_iA/N_iB = (1 + \text{Efficacité})^{-(\text{Ct}_{\text{gène}XA} - \text{Ct}_{\text{gène}XB})}$$

2.3.4 QuantiGene

QuantiGene est une méthode de quantification directe des ARN utilisant la technique d'amplification des signaux à l'aide de « branched DNA » (ADN ramifié), (technologie décrite en Annexe A.3, page 198).

Les analyses QuantiGene ont été réalisées d'après le protocole QuantiGene 2.0 miRNA Assay (Affymetrix) sur des ARN courts purifiés ou directement sur des ARN non purifiés de lysats de cellules U87 MG ou de leur exosomes (lysés grâce au tampon de lyse fourni par QuantiGene). Les sondes spécifiques au miR d'intérêt sont construites et hybridées au fond de chaque puits. Puis les échantillons lysés sont hybridés pendant 16 heures à 46°C. Le signal d'amplification est ensuite construit en hybridant d'abord le preAmplificateur (PreAmp) puis l'amplificateur (Amp) et enfin la sonde de marquage phosphatase alcaline (AP-LP). Les signaux de luminescence sont mesurés sur un PHERAstar FS (BMG LABTECH).

2.3.5 Marquage et hybridation sur Affymetrix (microARN et ARNm)

microARN :

Les puces utilisées (microARN Genechip Affymetrix), sont réalisées par synthèse de sondes d'acides nucléiques ou d'oligonucléotides directement sur la puce par photolithographie. Elles sont composées de dizaines de milliers de « probesets » (ou sondes), représentant les séquences des microARN et d'autres petits ARN non codants. Les séquences de ces sondes, d'environ 25 nucléotides de longs, correspondent aux séquences de la base de données Sanger MiRbase pour les microARN et Ensembl (<http://www.ensembl.org>) et SnoRNABase (<http://www.snorna.biotoul.fr>) pour le reste. Sur la puce, plusieurs séquences contrôles sont présentes et servent de contrôle qualité, (technologie décrite en Annexe A.4, page 199).

La découverte de nouveaux microARN grâce au séquençage de nouvelle génération permet de faire évoluer la liste, de plus en plus longue, des microARN connus. Ainsi la base de données mirBase ne cesse d'être implémentée. Aussi pour suivre cette évolution, trois versions de puces microARN Affymetrix successives ont été créées : la version 1 (v1) basée sur la version 11 de miRbase, la version 2 (v2) basée sur la version 15 de miRbase et enfin la version 3 (v3, version actuelle) basée sur la version 17 de miRbase.

Les dosages de microARN par puces à ADN sont réalisés à partir des fractions d'ARN « courts ». 200 ng d'ARN courts subissent d'abord un marquage (Genisphere, USA). Ce marquage se réalise en deux temps : une première étape consiste à ajouter une extrémité poly-A en position 3' des ARN, puis une seconde à réaliser une réaction de ligature permettant d'ajouter aux ARN un complexe multi-biotinylé, (technologie décrite en Annexe A.4.1, page 200). Les échantillons marqués sont ensuite hybridés sur la puce à 48°C pendant 16 h.

ARN messagers (ARNm) :

100 ng d'ARN longs sont utilisés pour la synthèse du premier brin d'ADNc en présence d'amorce T7 oligo(dT) selon le protocole Genechip® 3' IVT Express kit (Affymetrix), (technologie décrite en Annexe A.4.2, page 201). Après synthèse du second brin, une réaction de transcription *in vitro* est réalisée à 37°C pendant 16 heures, permettant l'amplification et le marquage à la biotine de l'ARNc. Les ARN amplifiés ainsi obtenus sont purifiés sur billes magnétiques puis quantifiés au Nanodrop. Environ 15 µg d'ARN amplifiés sont ensuite fragmentés à 94°C pendant 35 minutes en présence d'ions Mg²⁺. Un contrôle qualité de la fragmentation est effectué sur Bioanalyseur 2100 (Agilent). Le produit de fragmentation biotinylé est ensuite hybridé sur puce Genechip® Human Genome U133 Plus 2.0 (Affymetrix) à 45°C pendant 16 heures.

Après hybridation, des lavages ainsi qu'une étape d'amplification du marquage par incubation avec la streptavidine couplée à la phycoérythrine sont réalisés. La puce est ensuite scannée et l'image de chaque puce est traitée pour avoir une valeur d'intensité correspondant à l'hybridation ARN/Sonde pour chaque probeset.

2.3.6 Analyses et statistiques

2.3.6.1 Ré-annotation de la puce Affymetrix microARN

La puce Affymetrix microARN a la particularité d'être multi-espèces, et contient ainsi, outre les séquences complémentaires des microARN humains, les séquences complémentaires de microARN d'autres espèces. Certains de ces microARN présentent une séquence qui est conservée pour différentes espèces, d'autres sont totalement spécifiques d'une espèce donnée. En outre, pour certains des microARN d'espèce non humaine, leur séquence est parfaitement identique à la séquence du microARN humain mais avec quelques bases nucléiques en moins ou au contraire quelques bases nucléiques en plus qui correspondent à des bases de la séquence du pré-miR humain. Ces séquences là correspondent à des isomiR de microARN humains. Les isomiR résultent d'une différence de splicing au moment de la maturation du microARN et ont été révélés grâce au séquençage haut débit qui a mis en lumière l'existence de séquences très proches du microARN mature mais possédant quelques bases nucléiques en plus ou en moins (Figure 19).

C AGCUACAUCUGGCUACUGGGU CUCU	Séquence du pré-mir hsa-pré-miR-222
C AGCUACAUCUGGCUACUGGGU	hsa-miR-222-5I+C
AGCUACAUCUGGCUACUGGGU	hsa-miR-222
AGCUACAUCUGGCUACUGGGU C	hsa-miR-222-3I+C
AGCUACAUCUGGCUACUGGGU CU	hsa-miR-222-3I+CU
AGCUACAUCUGGCUACUGGGU CUC	hsa-miR-222-3I+CUC
AGCUACAUCUGGCUACUGGGU CUCU	hsa-miR-222-3I+CUCU
_GCUACAUCUGGCUACUGGGU	hsa-miR-222-5I-A
AGCUACAUCUGGCUACUGGG_	hsa-miR-222-3I-U

FIGURE 19 – Exemple du miR-222 et de ses isomiR

Obtenir des informations sur la présence éventuelle d'isomiR dans nos échantillons serait intéressant et est en partie possible en ré-annotant la totalité de la puce Affymetrix, ce que nous avons entrepris au laboratoire. La ré-annotation a été réalisée en comparant chaque séquence complémentaire présente sur la puce avec les séquences des microARN humains présents sur la miRBase 19. Chaque séquence exactement similaire à la séquence humaine a été ré-annotée hsa-miR-xx et chaque séquence pouvant éventuellement correspondre à la séquence d'un isomiR humain a été ré-annotée hsa-miR-xx-3I-zz, hsa-miR-3I+zz, hsa-miR-5I-zz ou hsa-miR-5I+zz, où « xx » correspond au nom du microARN, « zz » au nom des bases nucléiques manquantes si précédées d'un « - » ou en surplus si précédées d'un « + », et où 3I signifie que c'est un isomiR en 3' et 5I que c'est un isomiR en 5'.

2.3.6.2 Adaptation des techniques de normalisation à l'étude des ARN exosomaux

De manière classique, la première étape de l'analyse de ces valeurs brutes est l'ajustement des données par rapport au bruit de fond, puis la normalisation des données par la méthode quantile (Irizarry *et al.*, 2003). Cela est effectué avec l'environnement R en utilisant l'algorithme RMA (Robust Multi-array Average). Les sondes sont ensuite annotées ou ré-annotées avec les noms des miR ou ARNm correspondants.

Après avoir réalisé une première puce Affymetrix sur un extrait d'ARN courts exosomaux, il s'est avéré que les intensités de détection sur la puce étaient bien moindre comparées à celles obtenues pour un extrait d'ARN courts de cellules. Une normalisation RMA pure et simple telle que l'on peut l'utiliser pour des lots d'échantillons cellulaires n'est plus applicable pour des lots d'échantillons mixtes contenant à la fois des échantillons cellulaires et exosomaux.

Pour chaque expérience, il est alors nécessaire de dissocier les échantillons en deux lots avant normalisation. Une normalisation Loess est ensuite appliquée sur les échantillons cellulaires puis sur les échantillons exosomaux séparément. Les données sont ensuite ré-annotées et certains microARN ayant une séquence conservée pour différentes espèces sont alors détectés sur les différents probesets correspondants. Les intensités des différents probesets correspondant à la même séquence de microARN sont moyennées. Enfin, afin de s'affranchir des valeurs trop proches du bruit de fond, un seuil est fixé à une intensité de 64, soit environ 30 fois le bruit de fond. Les probesets retenus ont donc une moyenne supérieure à 64 pour au moins l'une des conditions, cellulaire ou exosomale.

Tout comme pour les microARN une méthode de normalisation spécifique s'impose une fois de plus pour pallier la présence de types d'échantillons très différents (cellules et exosomes) dans l'analyse des ARNm. Les échantillons sont aussi séparés en deux lots avant normalisation. Une normalisation RMA est ensuite appliquée sur les échantillons cellulaires puis sur les échantillons exosomaux séparément. Enfin, afin de s'affranchir des valeurs trop proches du bruit de fond, un seuil est fixé à une intensité de 256, soit environ 30 fois le bruit de fond. Les probesets retenus présentent donc des intensités moyennes supérieures à 256 pour au moins l'une des conditions, cellulaire ou exosomale.

2.3.7 Rationalisation des données et recherche *in silico* des ARNm cibles

Les résultats obtenus concernant les miARN et ARNm marqueurs des gliomes ou d'exosomes ont pu être rationalisés grâce au logiciel Ingenuity Pathway Analysis (IPA). Ce logiciel permet de répertorier une quantité importante de données connues dans la littérature concernant ces ARN spécifiques ainsi que les données des outils bioinformatiques permettant de trouver *in silico* les cibles ARNm potentielles pour chaque miARN comme TargetCombo, TargetScan ou miRanda. DAVID (Database for Annotations Visualisation and Integrated Discovery) est une autre ressource permettant de rationaliser les résultats transcriptomiques obtenus.

III Résultats

1 Caractérisation des microARN de gliomes

Dans le cadre de cette étude, la première étape fut de caractériser plus précisément le modèle d'étude des gliomes, et en particulier et de manière détaillée, leur contenu en microARN.

1.1 Caractérisation biomoléculaire des tumeurs

L'étude portant sur les gliomes, il a fallu dans un premier temps caractériser les profils microARN de ces cellules pathologiques et ce pour différents types de tumeurs et tissus « normaux » de références. Le but étant ici de déterminer si les microARN peuvent être utilisés comme biomarqueurs pour diagnostiquer les gliomes et pour permettre de distinguer aisément les grades Oligodendrogliomes et Glioblastomes.

1.1.1 Sélection d'échantillons pertinents

Deux groupes d'échantillons tumoraux ont été établis représentant respectivement les Oligodendrogliomes (ODG) et les Glioblastomes (GBM). Ce tri a été réalisé à l'aide de deux techniques. Une première technique qui permet de trier les groupes tumoraux en se basant sur les profils d'ARN messagers. Pour cela les profils ARN messagers ont été obtenus pour chacun des échantillons par la méthode d'hybridation sur puces Affymetrix (Genechip HgU133Plus) puis analysés selon les référentiels décrits par les travaux de Li *et al.* (2009a), Phillips *et al.* (2006), et Verhaak *et al.* (2010). La deuxième technique, complémentaire à la première, se base sur l'analyse de paramètres génomiques de ces tumeurs et permet de différencier les oligodendrogliomes des glioblastomes en fonction de la présence ou de l'absence de la codélétion du chromosome 1p19q ou les mutations des gènes codant pour IDH1 ou IDH2. Pour obtenir ces informations génomiques, les ADN de chaque échantillon ont été extraits. Les mutations des gènes codant pour IDH1 ou IDH2 ont ensuite été recherchées par PCR génomique puis par séquençage des séquences amplifiées. Quant à la codélétion 1p19q elle a été détectée grâce à la technique FISH (Fluorescence In Situ Hybridization) par les soins de l'équipe du Pr Godfraind à Louvain, Belgique.

Un troisième groupe d'échantillons « normaux » ou « sains » a été constitué avec des tissus de patients atteints d'épilepsie.

Chacun des groupes tumoraux, ODG et GBM, comprend 12 patients. Le groupe « normal » comprend 4 patients.

1.1.2 Analyse de l'expression des microARN des échantillons précédemment sélectionnés

Les deux groupes Oligodendrogliomes et Glioblastomes étant bien définis, il convient de s'intéresser à leurs profils microARN. Ces profils ont donc été obtenus pour chacun des échantillons de chaque groupe par la méthode d'hybridation sur puces Affymetrix microARN v1.

Les microARN sont sélectionnés sur la base des ratios (ODG/N et GBM/N) calculés en rapportant les intensités de détection des microARN des tissus tumoraux sur les intensités de détection des microARN des tissus normaux.

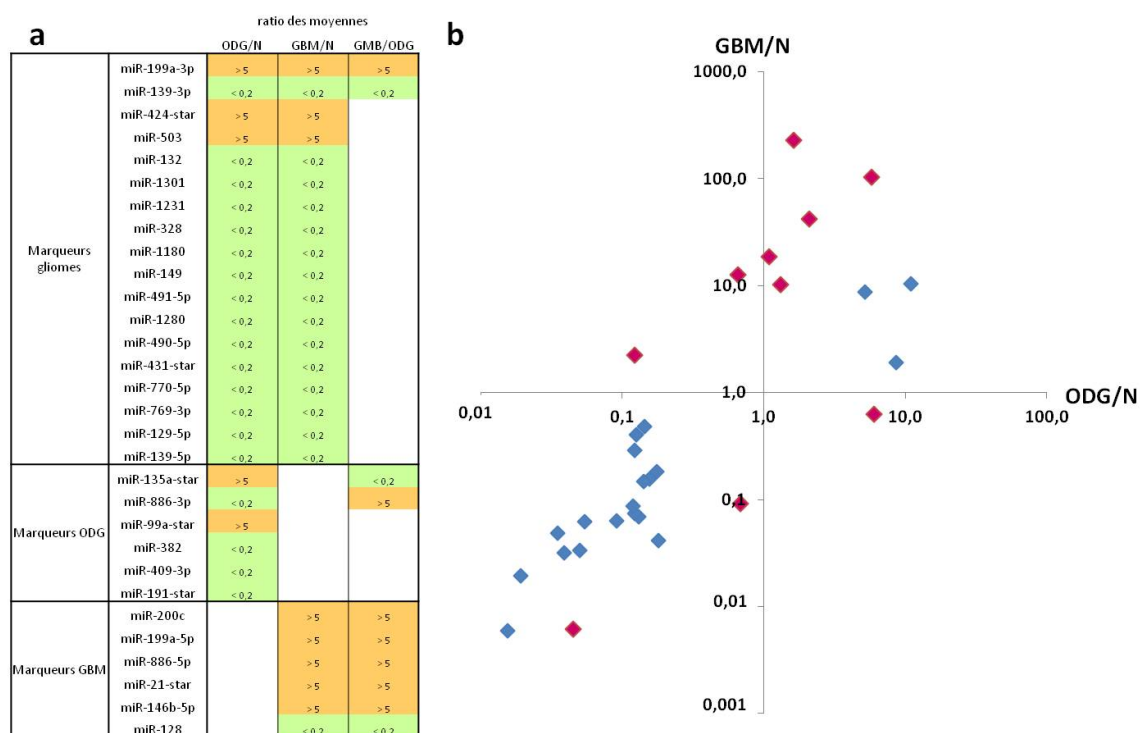


FIGURE 20 – Biomarqueurs microARN permettant un diagnostic inter-tissulaire
Trois types d'échantillon tissulaire : N = Normal ; GBM = Glioblastome ; ODG = Oligodendrogliome

a. Tableau présentant les 30 microARN permettant un diagnostic inter-tissulaire. En orange les ratio supérieurs à 5 et en vert ceux inférieurs à 0,2. L'absence de données correspond à des valeurs de ratio comprise entre 0,5 et 2 ($>0,5$ et <2).

b. Représentation graphique des ratios de ces 30 microARN. En bleu sont représentés les microARN dérégulés dans les gliomes et permettant de distinguer une tumeur d'un tissu sain, et en rose sont représentés les microARN qui permettent en plus de distinguer les glioblastomes des oligodendrogliomes.

Le tableau a (Figure 20) montre 30 microARN qui ont tous au moins l'un des « ratios

tumoraux » (ODG/N ou GBM/N) supérieurs à 5 ou inférieurs à 0,2.

Ces 30 marqueurs utilisés simultanément permettent de distinguer le type de tumeur ; chacun étant spécifique d'un ou des deux types de tumeur. Pour cela, un tissu suspecté tumoral doit être analysé en parallèle de 3 tissus de référence (Normal, ODG et GBM). Le diagnostic est porté par la comparaison des ratios obtenus pour le tissu à étudier par rapport à ceux établis pour les tissus de référence.

Une autre manière de se servir de ces biomarqueurs est de créer des indicateurs intra-tissulaires. Dans cette approche, des dosages sont réalisés sur le tissu suspecté uniquement et des ratios d'intensité de signaux de différents microARN (intensité de signal microARN-a/ intensité de signal microARN-b) contenus dans ce même tissu sont calculés. Ces ratios sont des signatures spécifiques d'un type de tissu puisque les ratios retenus seront toujours supérieurs à 1 dans un tissu tumoral et inférieurs à 1 dans un tissu normal ou inversement, ou encore supérieurs à 1 dans un tissu tumoral ODG et inférieurs à 1 dans un tissu tumoral GBM ou inversement. La distinction entre les tissus est donc indépendante d'une gamme de dosage de chacun des microARN dans des tissus de références.

Une méthode d'utilisation de ces ratios a été évaluée, permettant une lecture plus immédiate et visuelle qui consiste à ne doser que quelques microARN dans le tissu suspecté et réaliser des représentations graphiques simples (Figure 21).

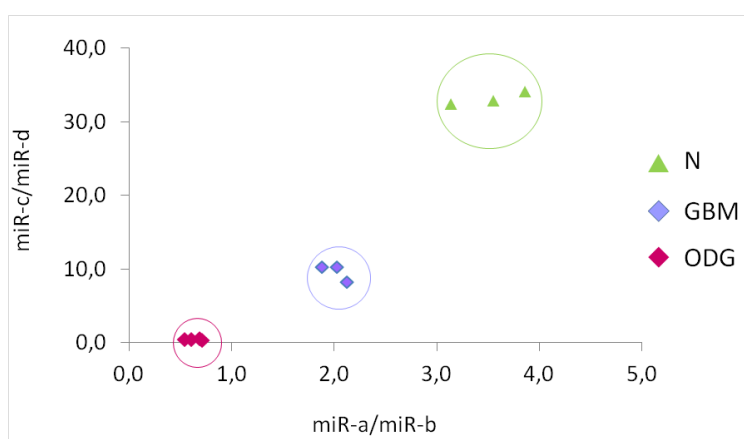


FIGURE 21 – Biomarqueurs microARN permettant un diagnostic intra-tissulaire
Trois types d'échantillons tissulaires :
N = Normal
GBM = Glioblastome
ODG = Oligodendrogliome

Ces microARN ainsi que ces méthodes de dosage ont fait l'objet du dépôt de deux brevets :
- Méthode de diagnostic *in vitro* intra-tissulaire pour diagnostiquer les tumeurs du cerveau
FR 10/60278 déposée le 8 décembre 2010 ; PCT/FR2011/052910 - WO/2012/076823
- Méthode de diagnostic *in vitro* inter-tissulaire pour diagnostiquer les tumeurs du cerveau
FR 10/60279 déposée le 8 décembre 2010 ; PCT/FR2011/052904 - WO/2012/076821

1.2 Caractérisation des modèles de lignées cellulaires *in vitro*

Les microARN peuvent donc être de bons biomarqueurs tissulaires permettant de distinguer deux sous-groupes de gliomes. Ce diagnostic ne peut cependant être établi qu'après une exérèse ou une biopsie.

Les exosomes contiennent des microARN et sont présents dans les fluides biologiques. Il pourrait donc être envisageable de retrouver ces microARN tissulaires dans les exosomes circulants et ainsi réaliser un diagnostic de tumeur du cerveau sur un prélèvement biologique minimalement invasif. Pour pouvoir utiliser ces biomarqueurs microARN définis sur des échantillons tissulaires, il est impératif que les contingents microARN des exosomes produits soient le reflet des contingents microARN de leurs cellules sécrétrices.

Pour vérifier cette éventualité il faut tout d'abord définir les contenus ARN des exosomes produits par des cellules gliales saines et cancéreuses. Comme *in vivo* il est impossible de récolter les exosomes provenant d'un seul et unique type cellulaire, il est nécessaire de choisir des modèles cellulaires *in vitro* qui permettraient de mimer les cellules gliales humaines saines ou cancéreuses.

1.2.1 Choix des modèles *in vitro*

Afin de valider si les modèles cellulaires pouvaient représenter les échantillons tissulaires et donc les cellules *in vivo*, quatre types cellulaires ont été analysés en appliquant les méthodes intra-tissulaires des brevets décrits ci-dessus (page 101). Ces quatre types cellulaires sont les cellules d'astrocytes humains ou HA (culture primaire de cellules gliales saines), les cellules Glioblastoma (culture primaire de cellules de glioblastomes), les cellules HS683 (lignée cellulaire de gliomes) et les cellules U87 (lignée cellulaire de glioblastomes) (cf pages 79 et 81).

Les profils microARN de ces cellules respectives ont été analysés sur puces Affymetrix microARN v1. Ces profils ont ensuite été comparés aux profils typiques obtenus pour des biopsies de tissu cérébral sain, ou de tumeurs gliales de type oligodendrogliome ou glioblastome. Confronter des profils microARN de cellules en culture à des profils microARN de tissus ne peut se faire en utilisant des méthodes intertissulaires car le type d'échantillons n'est pas le même (tissulaire ou cellulaire), aussi, ici seules les méthodes intra-tissulaires ont été utilisées.

Les pourcentages de corrélation ont été calculés entre les profils microARN de chaque type cellulaire étudié et les profils microARN de chacun des types de tissu Normal (N), ou de gliomes de bas grade (oligodendrogliomes, ODG) ou de haut grade (glioblastomes, GBM). Ils sont présentés sur le tableau de la figure 22 a. Les ratios intra-tissulaires ont aussi été représentés graphiquement comme proposé page 101 et un exemple est tracé sur la figure 22 b.

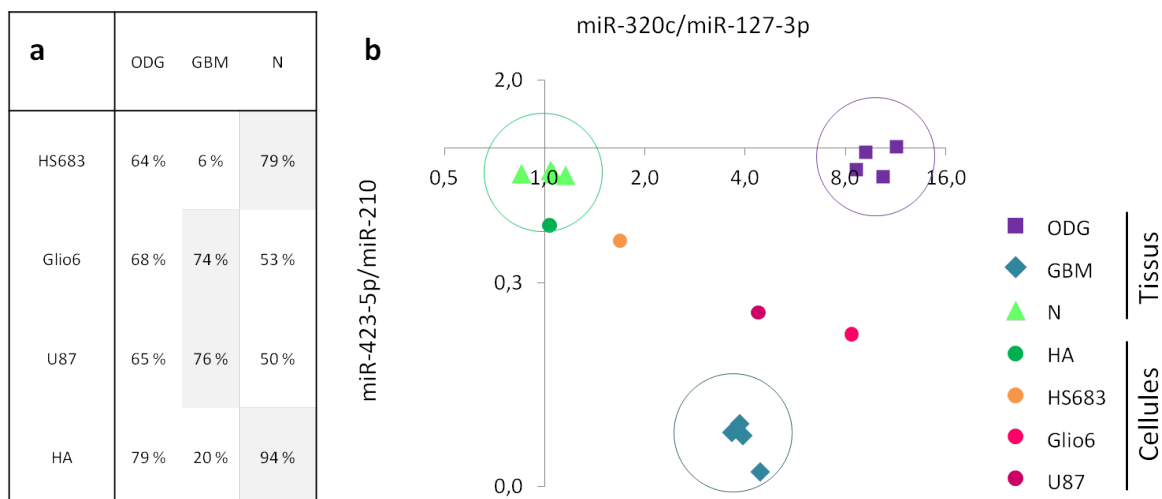


FIGURE 22 – Comparaison des profils microARN des modèles cellulaires potentiels et des tissus cérébraux sains ou cancéreux

a. Le tableau présente les coefficients de corrélation (en pourcentage) calculés entre les profils microARN des modèles cellulaires potentiels et les profils microARN des tissus « normaux » (N), oligodendrogliomes (ODG) ou glioblastomes (GBM). Pour chaque modèle cellulaire le coefficient le plus élevé est grisé.

b. La figure à droite est un exemple de représentation graphique présentant de manière visuelle les résultats du tableau a. Pour chaque point sont reportées les valeurs de ratios miR-320c/miR-127-3 en abscisses et miR-423-5p/miR-210 en ordonnées.

Le profil microARN des cellules HA présente son plus fort coefficient de corrélation, 94%, avec les profils microARN des échantillons tissulaires normaux. Le graphique de la figure 22 a permet aussi de visualiser que les cellules HA se rapprochent effectivement des tissus normaux.

Les cellules HS683 présentent elles aussi leur coefficient de corrélation le plus élevé avec les tissus normaux, celui-ci n'est cependant que de 79% et ces cellules ne sont pas des cellules normales. Leur coefficient de corrélation étant de 6% avec les GBM, ces cellules ne peuvent être considérées comme des GBM. Enfin, leur coefficient de corrélation avec les ODG étant à 64%, elles ne sont pas non plus de bons modèles pour représenter des ODG. Sur le graphique ces cellules semblent en effet plus proches des tissus normaux sans pour autant pouvoir être étiquetées comme « normales », elles semblent être des cellules tumorales moins agressives, sans doute d'un grade faible.

Les cellules Glio6 et U87 seraient, elles, plus proches des tissus de glioblastomes avec des coefficients de 74% et 76% respectivement. Si elles apparaissent plus proches des tissus de GBM il est cependant impossible de les étiqueter parfaitement. En revanche ces deux cellules sont définitivement des gliomes agressifs de haut grade.

Que les cellules ne représentent pas exactement les échantillons tissulaires et ne présentent pas des coefficients de corrélation toujours supérieurs à 80% n'est pas étonnant ni drama-

tique. Cela peut s'expliquer facilement par le fait que les échantillons tissulaires ne sont pas parfaitement homogènes et peuvent contenir différents types de cellules contrairement aux échantillons cellulaires qui ne contiennent qu'un seul et unique type de cellule. Par ailleurs, et surtout, les conditions de croissance des cellules tumorales *in vivo* et *in vitro* sont quand même très différentes.

Pour la suite de ce projet les cellules HA ont été choisies pour représenter un modèle de cellules « saines » et les cellules U87 pour le modèle de glioblastomes. Les cellules de Gliob n'ont pas été choisies car ces cellules mises en culture au laboratoire ne sont pas validées par l'ATCC contrairement aux U87. Pour finir, les cellules HS683 qui auraient dû représenter un modèle d'oligodendrogliome ont été écartées de l'étude. Les lignées de cellules ou cultures primaires d'oligodendrogliomes étant très difficiles à établir, cette étude ne comporte donc pas de composante oligodendrogliale pour la partie *in vitro* concernant les exosomes.

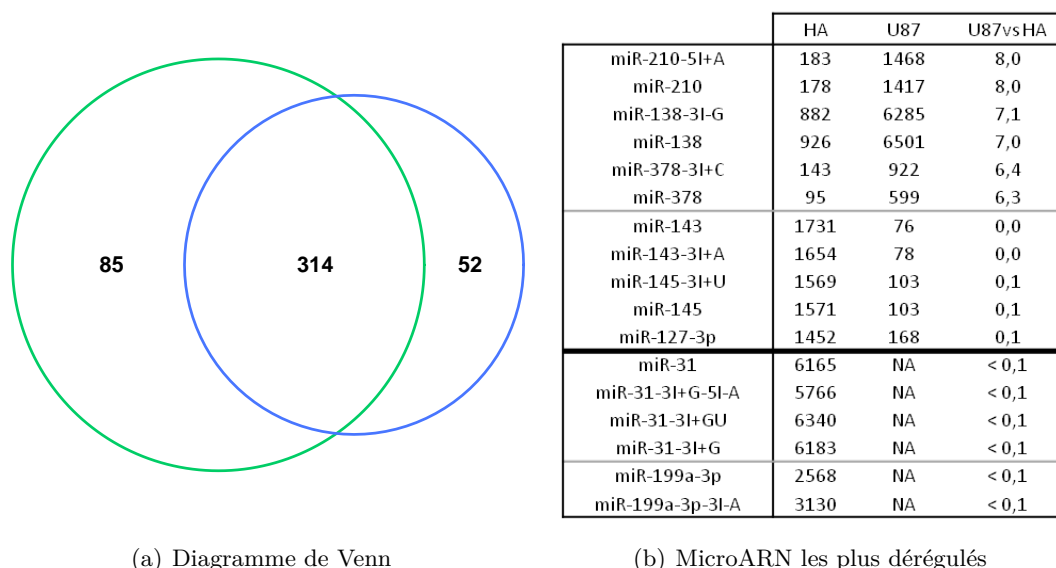
1.2.2 Caractérisation des profils microARN des modèles *in vitro*

Les profils microARN des modèles cellulaires choisis, cellules HA pour les cellules saines et cellules U87 pour les cellules cancéreuses de glioblastomes, ont ensuite été analysés sur puce Affymetrix v2 (Figure 23).

Les cellules HA et U87, toutes deux des cellules de type astrocytaire, expriment 314 microARN communs, les cellules HA expriment différenciellement 85 microARN qui ne sont pas détectés dans les cellules U87 (Figure 23 a). Les cellules U87, cellules d'astrocytomes et donc de type astrocytaire mais cancéreuses expriment constitutionnellement 314 microARN « normaux ». En revanche, elles n'expriment plus 85 microARN « normaux » détecté dans les HA mais en expriment 52 autres, spécifiques.

Parmi les 314 microARN détectés dans ces deux types de cellules, certains sont tout de même différenciellement exprimés. Quelques exemples des microARN les plus différenciellement exprimés entre les cellules HA et U87 sont présentés dans la partie haute du tableau de la figure 23 b. Les microARN les plus dérégulés ne sont pas uniquement des microARN matures mais aussi leurs isomiR associés comme le miR-210 et son isomiR, miR-210-5I+A.

Les microARN connus dans la littérature et les brevets présentés plus haut pour différencier les tissus de glioblastomes des tissus sains, comme le miR-210 ou le miR-127-3p par exemple (figure 23 b), sont retrouvés différenciellement exprimés entre les cellules HA et les cellules U87. Cependant d'autres microARN apparaissent parmi les microARN les plus dé-



(a) Diagramme de Venn

(b) MicroARN les plus dérégulés

FIGURE 23 – Profils microARN des modèles cellulaires HA et U87.

a. Diagramme de Venn des microARN exosomaux et cellulaires des cellules U87 et HA

Le cercle vert représente le nombre de microARN détectés dans les cellules HA

Le cercle bleu représente le nombre de microARN détectés dans les cellules U87

b. Tableau présentant les microARN les plus dérégulés entre les cellules HA et U87

Pour chacun d’eux sont détaillées les valeurs moyennes d’intensités de détection sur puces Affymetrix v2 pour chaque modèle cellulaire (colonnes HA et U87) et les valeurs de ratios des intensités détectées pour les cellules U87 sur les intensités détectées pour les cellules HA (colonne U87 vs HA).

régulés comme par exemple les microARN matures miR-138, miR-378, miR-143, miR-145, miR-31, miR-199-5p et leurs isomiR respectifs présentés dans la partie basse du tableau de la figure 23 b.

2 ARN exosomaux de gliomes

Les Gliomes sécrètent des exosomes contenant des ARN. Afin d'étudier la sécrétion de ces ARN véhiculés via les exosomes, il a été nécessaire de bien caractériser tout d'abord la production d'exosomes par les gliomes.

2.1 Les cellules de gliomes en culture produisent des exosomes

2.1.1 Production d'exosomes par la lignée de glioblastomes en culture U87

2.1.1.1 Conditions de production

Dans les cultures de cellules *in vitro* l'apport de sérum de veau foetal (SVF) peut représenter une source de contamination par des exosomes bovins. Afin de s'affranchir des exosomes et microvésicules diverses présentes dans le SVF, les cellules cultivées pour la production des exosomes sont donc débarrassées du SVF résiduel par lavages puis placées dans un milieu de culture sans SVF pendant la durée de production et récolte des exosomes (voir paragraphe 2.2.1, page 83). La durée la plus longue étant de 24h, il est important de s'assurer que ce manque de sérum ne perturbe pas les cellules productrices dans leur métabolisme. Aussi, les effets de cette carence temporaire en sérum sur les cellules de U87 ont été évalués en cytométrie en flux (voir paragraphe 2.1.3, page 82). La question d'induction de l'apoptose est adressée en réalisant un test Annexine-V, et le cycle cellulaire est lui aussi analysé.

En l'absence de SVF pendant 24h, le taux d'apoptose des cellules U87 en culture connaît une très légère augmentation de 1,8% en passant de 3,8% en conditions normales de culture, à 5,6% en absence de SVF (Figure 24 a), les tendances de répartition dans les différentes phases du cycle cellulaire restent inchangées, avec environ 60% de cellules en phase G0/G1 et environ 22% en phase G2M (Figure 24 b).

Le fait de « sevrer » les cellules en SVF pendant la période de production n'engendre donc aucun effet indésirable majeur, et leur production d'exosomes ne devrait pas en être affectée.

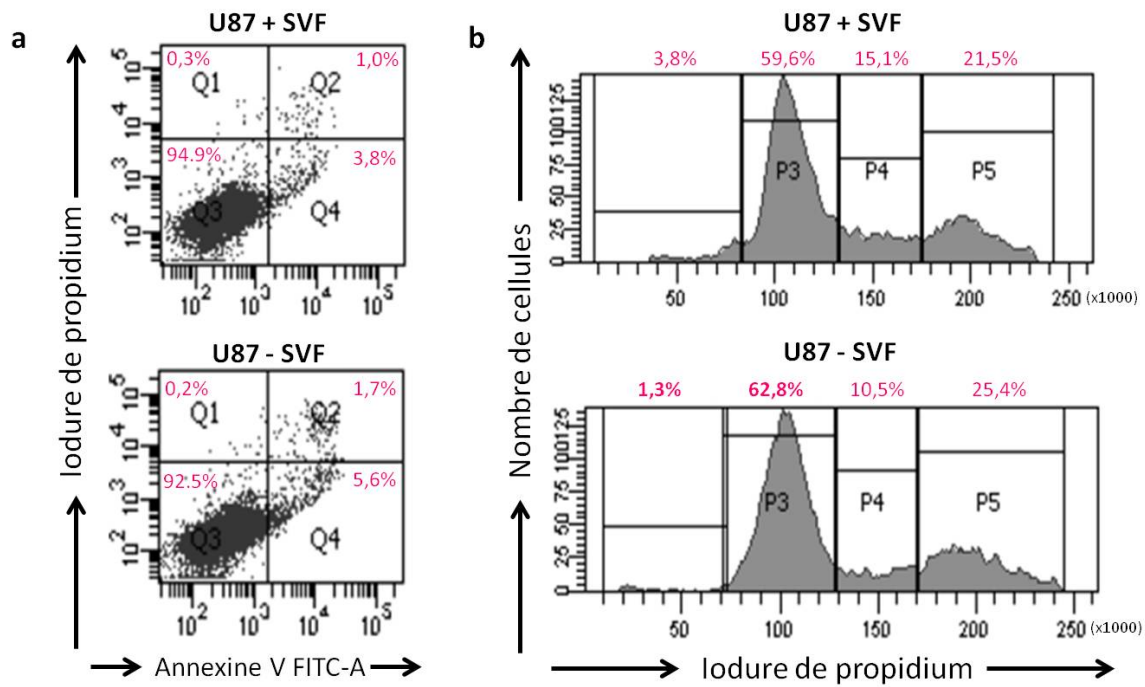


FIGURE 24 – Effets d’une carence en SVF pendant 24h sur les cellules U87 en culture
 a. Test apoptose, Cellules U87 cultivées dans des conditions normales sans carence en SVF et Cellules U87 cultivées sans SVF pendant 24h ; Q1 : Annexin-PI+ ; Q2 : Annexin+PI+ ; Q3 : Annexin-PI- ; Q4 : Annexin+PI- = cellules en apoptose
 b. Cycle cellulaire, Cellules U87 cultivées dans des conditions normales sans carence en SVF et Cellules U87 cultivées sans SVF pendant 24h ; P3 : G1 ; P4 : S ; P5 : G2-M

2.1.1.2 Caractéristiques des exosomes produits

La méthode de production étant définie et validée, les objets microvésiculaires sécrétés par les cellules de U87 ont été analysés et caractérisés.

Un premier test, réalisé à l’aide de la méthode de diffusion de la lumière (DLS) (Figure 25 a), révèle une population de vésicules sécrétées ayant un diamètre moyen d’environ 120 nm. Cependant cette technique ne permet ni de visualiser les vésicules en question ni de distinguer dans un mélange hétérogène des populations de tailles différentes. Le test suivant a donc été l’observation en microscopie électronique à transmission (Figure 25 b). Cette fois-ci, une seule population d’un diamètre d’environ 100 à 120 nm a été observée. De plus, les objets observés ont la forme caractéristique des exosomes. Deux autres validations de la taille de ces vésicules ont été faites au qNano (Figure 25 c) et au Nanosight (Figure 25 d), et ont toutes deux confirmé une population de taille homogène, avec un diamètre d’environ 100 à 120nm. Enfin, les marqueurs Alix et Flotilline-1, marqueurs exosomaux, ont été testés en Western Blot (Figure 25 e). Ces marqueurs sont bien retrouvés dans les culots 100 000 g des préparations d’échantillons exosomaux, et dans les fractions d’environ 35% de su-

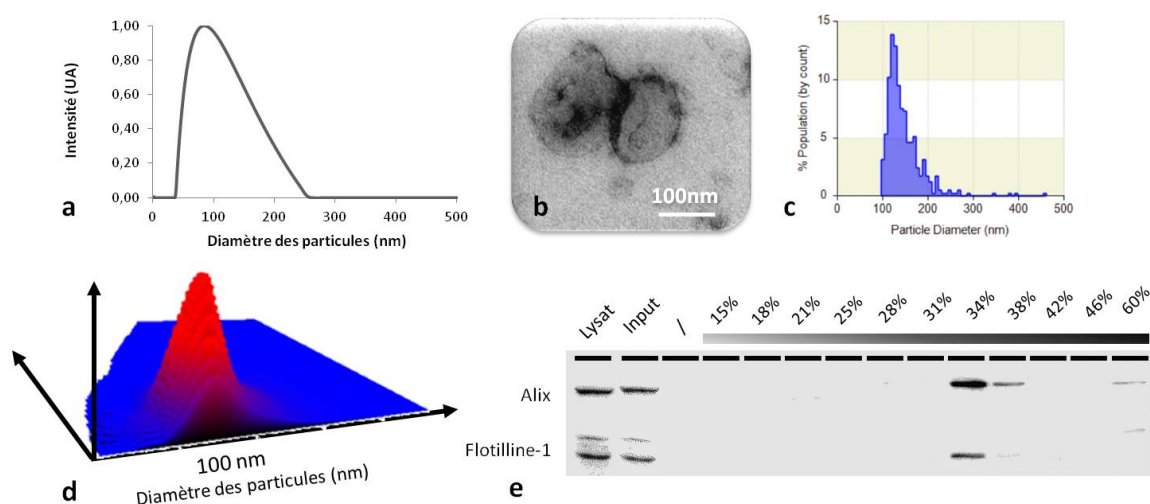


FIGURE 25 – Caractérisation des préparations d’exosomes de gliomes : Analyse de la taille des vésicules purifiées (a, b ,c, d), analyse morphologique (b), analyse de marqueurs protéiques d’exosomes (e).

- a. DLS (Dynamic Light Scattering) : profil de taille des vésicules exosomales
- b. Vésicules exosomales visualisées par Microscopie électronique à Transmission (TEM)
- c. qNano : profil de taille des vésicules exosomales
- d. Nanosight : profil de taille des vésicules exosomales
- e. Détection par Western blot des marqueurs des vésicules exosomales dans les fractions d’un gradient de densité utilisé pour la purification des exosomes par centrifugation

crose d’un gradient de densité pour purification par centrifugation isopycnique. Les vésicules sécrétées sont donc bien des exosomes de taille homogène d’environ 100 à 120nm de diamètre.

2.1.2 Les cellules gliales en culture produisent des exosomes en quantité importante

Afin de caractériser de manière quantitative la production d’exosomes par les cellules de glioblastomes U87, une cinétique de production a été réalisée. Pour ce faire, les exosomes de U87 ont été récoltés au bout de 1h, 3h, 6h, 12h, 18h, et 24h de production dans un milieu déplété en SVF. Les différents échantillons exosomaux ont ensuite été analysés au Nanosight.

Les cellules de U87 produisent des exosomes dans le temps et non pas seulement au moment du changement de milieu qui pourrait être considéré comme un signal de stress aigu. Aussi, si au bout d’une heure de changement de milieu, chaque cellule a produit en moyenne un millier d’exosomes, cette quantité d’exosomes produits augmente au cours du temps. Et au bout d’une vingtaine d’heures de production chaque cellule de U87 a été capable de produire en moyenne 2500 exosomes (Figure 26 a). Etonnamment cette augmentation d’exosomes récoltés pour des temps de production plus longs n’est aucunement proportionnelle au temps

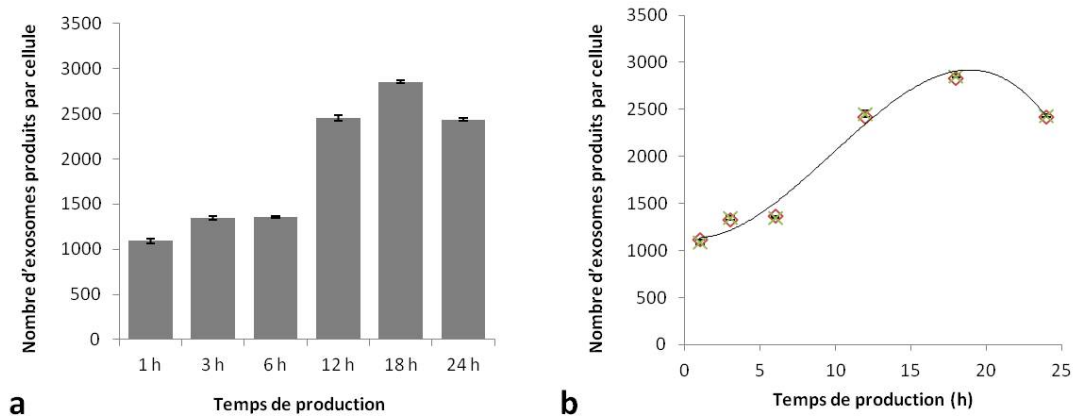


FIGURE 26 – Cinétique de production d'exosomes par les cellules U87
 Dosage par Nanosight des quantités d'exosomes sécrétées par des cellules de U87 en culture à différents temps de production.

de production (Figure 26 b). La plus grande quantité d'exosomes recueillie l'est pour un temps de 18h de production et la cinétique de production semble ensuite atteindre un plateau. Le temps de production d'exosomes choisi par la suite est de 24h pour des questions de facilité de mise en oeuvre des expérimentations et pour maximiser la quantité d'exosomes présents dans les échantillons d'exosomes préparés.

La quantité d'exosomes produite dans le milieu extracellulaire semble stagner voire légèrement diminuer au-delà d'un temps de production d'une vingtaine d'heures. Cela semblerait suggérer une éventuelle recapture des exosomes sécrétés par les cellules de U87, une potentielle dégradation de ces exosomes une fois ceux-ci présents dans le milieu extracellulaire, une régulation de la quantité d'exosomes extracellulaire, ou encore une cinétique de production dépendante du cycle cellulaire, mais cette hypothèse impliquerait que toutes les cellules soient synchronisées dans leur cycle et dans leur production.

Les cellules de U87 produisent donc des exosomes en quantités importantes et il est légitime de s'intéresser à la production d'exosomes par d'autres souches de cellules gliales. La production d'exosomes de U87 au bout de 24h a donc été comparée à la production d'exosomes par les cellules HS683 et Gliob6 qui sont elles aussi des cellules de gliomes et HA qui sont des astrocytes humains primaires.

Les cellules gliales HA et de glioblastomes HS683, Gliob6 et U87 produisent toutes environ 2500 exosomes par cellule en 24h (Figure 27 a). Contrairement aux idées reçues concernant une production d'exosomes plus forte par des cellules cancéreuses que par des cellules normales, dans le cas des cellules gliales en culture - qu'elles soient cancéreuses ou saines - la quantité d'exosomes au bout de 24h de production est très similaire. Pour s'assurer que cette

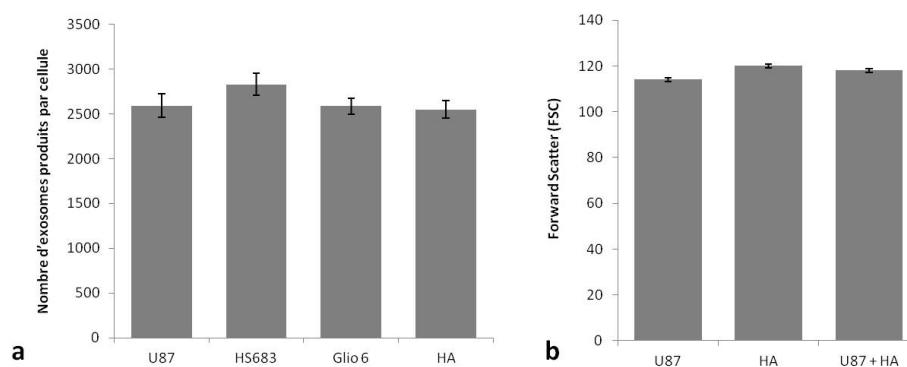


FIGURE 27 – Production d'exosomes par les cellules gliales

a. Dosage des quantités d'exosomes sécrétées en 24h par des cellules en culture de gliomes HS683 et Glio 6 par Nanosight ; et de cellules de gliomes U87 et d'astrocytes humains HA par Nanosight et DLS.

b. Mesure du diamètre relatif des cellules U87 et HA en cytométrie en flux. Les cellules U87 et HA ont aussi été mélangées (U87 + HA) pour vérifier leur similitude de taille.

similarité dans les quantités de production d'exosomes ne viendrait pas d'une différence de taille majeure entre les cellules qui permettrait éventuellement à une cellule plus grande de produire plus d'exosomes grâce à une superficie membranaire plus importante, la taille des cellules de U87 et de HA a été mesurée par cytomètre en flux (Figure 27 b). Les cellules de U87, astrocytome, et de HA, astrocyte, mesurent environ 100 FSC de diamètre, qu'elles soient seules ou en mélange. Elles ont donc une taille identique. Aussi, des cellules gliales en culture produisent des quantités d'exosomes similaires qu'elles soient cancéreuses ou pas.

2.2 Caractérisation qualitative des exosomes produits

Après s'être assurés d'être en présence d'une sécrétion de microvésicules exosomales et d'en avoir caractérisé quantitativement la production, l'étude du contenu moléculaire de ces vésicules peut commencer.

2.2.1 Effets de la durée de production des exosomes

Précédemment, un temps de 24h de production a été choisi pour récolter les exosomes en raison d'une quantité d'exosomes élevée à ce temps là. Cependant, comme il s'agit ici d'une étude du contenu transcriptomique des exosomes, il est important de vérifier que les exosomes récoltés à 24h ne contiennent pas seulement des ARN dégradés en raison d'une période de latence trop longue dans le milieu extracellulaire. Il est également important de s'assurer que le contingent d'ARN contenu dans les exosomes produits et récoltés rapidement ne diffère pas de celui des exosomes récoltés plus tardivement. Pour cela des exosomes de U87

ont été récoltés pour des temps de productions court et long : 1h et 24h ; et leurs contenus en microARN ont été analysés sur des puces Affymetrix miR 2.0 (figure 28).

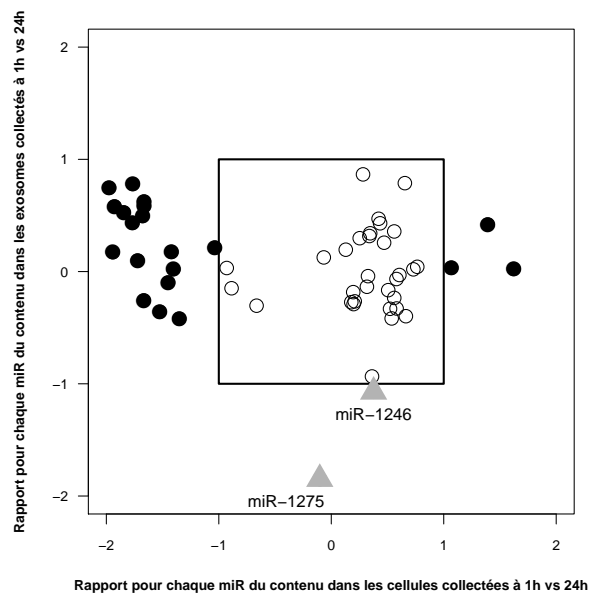


FIGURE 28 – Comparaison des contingents microARN contenus dans les productions d'exosomes à 1h et 24h.

Chaque point correspond à un microARN détecté à la fois dans les cellules et dans les exosomes. les ratios d'expression d'un microARN dans les exosomes entre les conditions de production de 1h et de 24h sont reportées en ordonnées. Les ratios d'expression de ce microARN dans les cellules entre les conditions de production de 1h et de 24h sont reportés en abscisses. Les échelles sont en \log_2 .

Les points blancs à l'intérieur du cadre noir correspondent aux microARN dont la quantité reste équivalente entre les conditions de production de 1h et de 24h,

à la fois pour les cellules et pour les exosomes qu'elles ont produits.

Les points noirs correspondent aux microARN dont la quantité cellulaire est dérégulée entre les conditions 1h et 24h.

Les triangles gris correspondent aux microARN dont la quantité exosomale est dérégulée entre les conditions 1h et 24h.

Premièrement, la quantité d'ARN recueillie pour des exosomes produits en 24h est similaire à celle obtenue pour une même quantité d'exosomes produits en 1h. Il ne semble donc pas y avoir de dégradation importante du contenu ARN des exosomes récoltés à 24h. De plus, après analyse du contingent microARN contenu dans les exosomes après 1h ou 24h de production celui-ci ne semble que peu affecté. En effet, dans des exosomes recueillis après 24h de production, seuls deux microARN, hsa-miR-1246 et hsa-miR-1275, sont retrouvés en plus fortes quantités (facteur de variation moyen de 4) que dans les exosomes recueillis après 1h.

Le fait de récolter les exosomes après 24h de production pour réaliser nos analyses de contenus en microARN n'est donc pas compromis.

En revanche, après analyse du contingent microARN contenu dans les cellules après une heure dans le milieu sans SVF comparé à celui de cellules après 24h dans ce milieu, 20 microARN sur 51 microARN détectés dans tous les cas ressortent comme fortement dérégulés, soit 39% de différence. Trois de ces microARN seraient plus exprimés dans les cellules privées de SVF pendant 1h, et 17 lorsque la privation de SVF est de 24h. La dérégulation de ces microARN témoigne sans doute de l'adaptation de la cellule à son nouvel environnement.

De cette comparaison se dégage en outre le fait que si le contenu microARN des cellules est modifié entre 1h et 24h de changement de milieu, le contenu microARN des exosomes qu'elles produisent reste lui quasiment inchangé. Ceci laisse présager que le contenu des exosomes ne serait pas un simple reflet du contenu cellulaire - auquel cas le contenu microARN des exosomes aurait été modifié de manière similaire à celui des cellules - mais que ce contenu serait régulé.

2.2.2 Contenu microARN des exosomes de U87 et de HA

Maintenant les méthodes de normalisation optimisées et les temps de production définis, le contenu en microARN des exosomes peut être étudié. Ce contenu en microARN a été étudié pour les exosomes produits en 24h par les cellules de U87 et de HA, les modèles cellulaires sélectionnés précédemment.

Après récolte des exosomes et traitement à la RNase A pour éliminer les ARN extérieurs aux exosomes ; les ARN exosomaux ont été extraits et la fraction courte de ces ARN a été isolée. En parallèle les ARN des cellules productrices ont aussi été extraits et leur fraction courte purifiée. Les ARN courts de chaque échantillon exosomal ou cellulaire ont été préparés en triplicat et hybridés sur une puce Affymetrix V2.

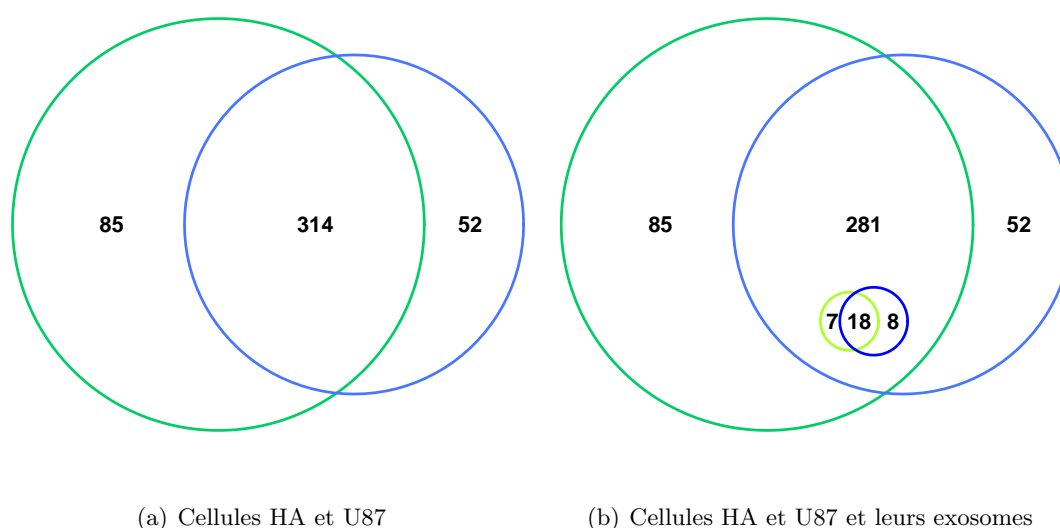


FIGURE 29 – Diagramme de Venn des microARN exosomaux et cellulaires des cellules U87 et HA

Les cercles vert foncé représentent le nombre de microARN détectés dans les cellules HA
 Le cercle vert pâle représente le nombre de microARN détectés dans les exosomes de HA
 Les cercles bleu pâle représentent le nombre de microARN détectés dans les cellules U87
 Le cercle bleu foncé représente le nombre de microARN détectés dans les exosomes de U87

Les profils microARN des cellules HA et U87 (Figure 29 a, cf le paragraphe 1.2.2 p 104) sont très différents et si 314 microARN sont à la fois caractéristiques de ces deux types cellulaires, 85 sont spécifiques des cellules HA et 52 sont spécifiques des cellules U87. En revanche, la totalité des microARN retrouvés dans les exosomes produits par les cellules de U87 ou HA est parfaitement et exactement retrouvée dans les microARN communs aux cellules HA et U87 (Figure 29 b). Tous ces microARN exosomaux sont donc des microARN présents à la fois dans des cellules d'astrocytes saines et cancéreuses. Toutefois, le contingent microARN retrouvé dans les exosomes est bien moindre que le contingent microARN cellulaire car seulement 26 microARN sont détectés pour des exosomes de U87 et 25 microARN pour les exosomes de HA. Parmi ces microARN 18 sont communs aux deux types d'exosomes, 7 sont spécifiques des exosomes de HA et 8 sont spécifiques des exosomes de U87. Aussi, si ces exosomes ne contiennent pas les microARN spécifiques de leur cellule d'origine, leurs contingents microARN sont tout de même distincts.

Sous cet angle, il apparaîtrait que les exosomes ne reflètent pas la spécificité de leur cellule productrice puisque aucun de leur microARN spécifiques ne sont retrouvés dans les exosomes. Les exosomes ne sont sans doute pas seulement formés en emportant simplement une partie du cytoplasme mais il y aurait alors sans doute une régulation du chargement des microARN dans les exosomes. Ces deux types de cellules (U87 et HA) étant des cellules astrocytaires, l'une cancéreuse et l'autre saine, ce contenu constant de 18 microARN dans les exosomes produits par ces cellules viendrait peut-être d'un mécanisme actif commun pour les cellules astrocytaires.

Toutefois, si pour 18 d'entre eux ce sont les mêmes microARN qui sont retrouvés à la fois dans les exosomes de HA et de U87, leurs profils d'expression sont potentiellement distincts. Les profils des 33 microARN exosomaux dans les exosomes de HA et de U87 sont montrés sur la figure 30 a.

Les profils d'expression de ces microARN exosomaux (figure 30 a) se révèlent être un peu différents avec quelques uns de ces microARN qui sont en plus grandes proportions dans les exosomes de U87 que dans ceux de HA comme par exemple les microARN hsa-miR-1915 ou hsa-miR-1469 et inversement en plus grandes proportions dans les exosomes de HA comme pour les microARN hsa-miR-1246 ou hsa-miR-1275. Pour chacun de ces microARN les profils cellulaires HA et U87 sont comparables. Aussi, les exosomes produits par les cellules cancéreuses U87 diffèrent des exosomes produits par les cellules saines HA par leur contenu en microARN et surtout par les proportions respectives de ces microARN.

De plus, sur cette même figure 30 a, une forte différence d'intensité de détection de chaque microARN est visible entre les exosomes produits par les cellules HA ou U87. Comme

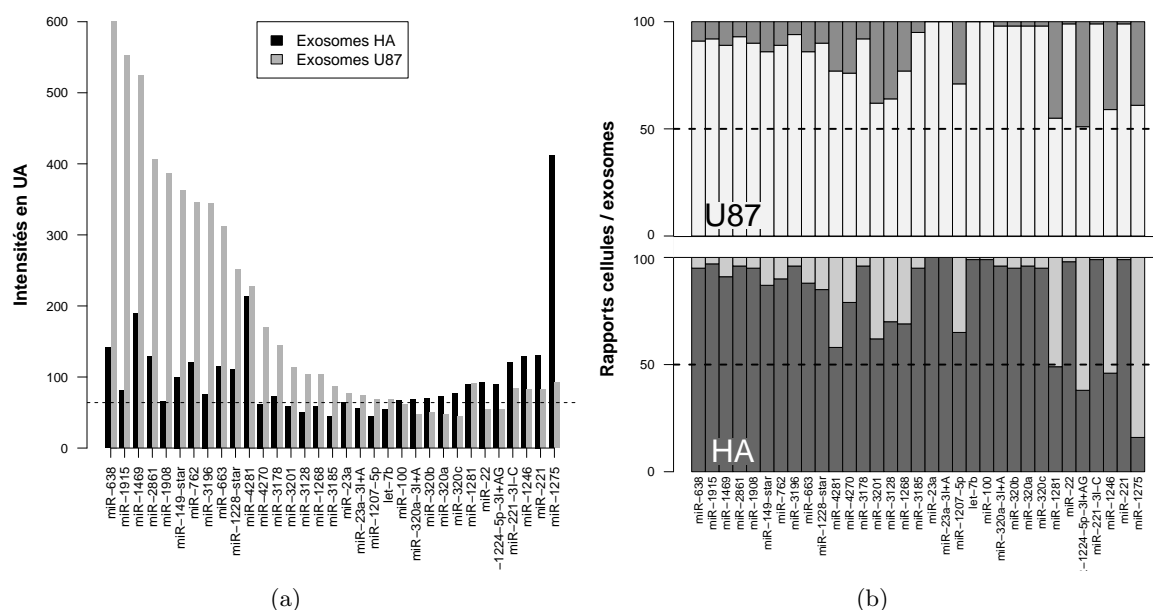


FIGURE 30 – Profils microARN des exosomes et des cellules U87 et HA

a. Profils microARN des exosomes produits par les cellules U87 et HA

Chaque barre correspond à l'intensité de détection sur la puce Affymetrix correspondant à un microARN. Les barres colorées en gris clair correspondent aux microARN des exosomes produits par les cellules U87 et celles colorées en gris foncé à ceux des exosomes produits par les cellules HA. Les pointillés représentent le seuil de détection égal à une intensité de 64 UA. Expériences réalisées en triplicats.

b. Profils microARN cellulaires et exosomaux des cellules U87 et HA

Pour pouvoir comparer les profil microARN des cellules HA et U87, pour chaque miR, la somme des intensités mesurées dans les cellules et dans les exosomes a été calculée et toutes les valeurs des sommes obtenues ont été normalisées à la valeur de 100 pour les cellules U87 et les cellules HA. Dans la partie haute de la figure est représentée cette répartition entre cellules U87 (gris clair) et exosomes de U87 (gris foncé). Dans la partie basse est représentée cette répartition pour les cellules HA (gris foncé) et exosomes de HA (gris clair). Expériences réalisées en triplicats.

les conditions expérimentales sont les mêmes, cela signifierait que dans 200ng d'ARN courts d'exosomes de HA il y a moins de microARN que dans 200ng d'ARN courts d'exosomes de U87. Ainsi les exosomes de U87 contiendrait une proportion plus grande de microARN que les exosomes de HA.

Pour vérifier si les différences de proportions de ces microARN dans les exosomes reflètent aussi des différences de proportions dans les cellules productrices, le contenu microARN des cellules productrices et de leurs exosomes produits en 24h ont été comparés pour les cellules U87 d'un côté et les cellules HA d'un autre côté. Pour ce faire ces comparaisons de proportions ont été réalisées en pourcentages. L'intensité de détection du microARN pour l'échantillon exosomal et pour l'échantillon cellulaire a été ramené à la somme de ces deux intensités, pour les cellules U87 et pour les cellules HA (Figure 30 b).

Si les deux profils de proportions de microARN exosomaux sont voisins entre U87 et HA, des différences apparaissent tout de même. En effet, si les microARN détectés dans les exosomes de U87 sont en quantités plus faibles que dans les cellules U87, quatre d'entre eux, les microARN hsa-miR-1281, hsa-miR-1246 et hsa-miR-1275 ainsi que l'isomiR-1224 sont mieux détectés dans les exosomes de HA que dans les cellules HA. Ainsi les exosomes produits par les cellules U87 et HA ne reflètent pas totalement le contenu de leurs cellules productrices. Le chargement des exosomes en microARN semble donc être un mécanisme actif et contrôlé.

En outre si les contenus en microARN des exosomes diffèrent des contenus de leurs cellules productrices, l'utilisation des exosomes comme biomarqueurs pour le diagnostic de pathologies devient plus complexe. En effet, les biomarqueurs cancéreux tissulaires bien définis et connus comme les microARN miR-21 ou miR-16 par exemple, s'ils sont présents dans les cellules cancéreuses U87, ne sont plus retrouvés dans les exosomes qu'elles produisent et de ce fait ne pourraient plus être utilisés comme biomarqueurs s'ils étaient recherchés dans des exosomes sanguins ou dans un autre fluide biologique.

Les profils d'expression des microARN contenus dans les exosomes sont tout de même différents entre HA et U87. Aussi, un diagnostic basé sur les microARN exosomaux pourrait permettre de différencier des tissus sains et cancéreux, mais il faudra pour cela recréer un référentiel et d'identifier les microARN exosomaux ayant un potentiel de biomarqueurs.

2.2.3 Contenu ARNm

Tout comme le contingent microARN des exosomes de cellules U87 et HA, le contingent ARNm de ces mêmes exosomes a été analysé. Ce contenu en ARNm a été étudié pour les exosomes produits en 24h par les cellules U87 et HA, les modèles cellulaires sélectionnés précédemment. Les ARN des exosomes des cellules productrices ont été extraits et la fraction longue de ces ARN a été purifiée pour cette étude. Les ARN longs des échantillons exosomaux ou cellulaires ont été préparés en triplicats et hybridés sur puces Affymetrix HgU133Plus2. Les profils ARNm cellulaires et exosomaux des types cellulaires HA et U87 sont ensuite comparés.

Tout comme leurs profils microARN, les profils des probesets Affymetrix d'ARNm des cellules HA et U87 (Figure 31 a) montrent des différences marquées. 8198 ARNm sont communs mais 1828 sont spécifiques des cellules de HA et 2194 spécifiques des cellules U87. Les profils des probesets Affymetrix d'ARNm des exosomes sont moins nombreux, seulement 311 et sont tous détectés dans les cellules HA et U87. Ces 311 probesets d'ARNm détectés

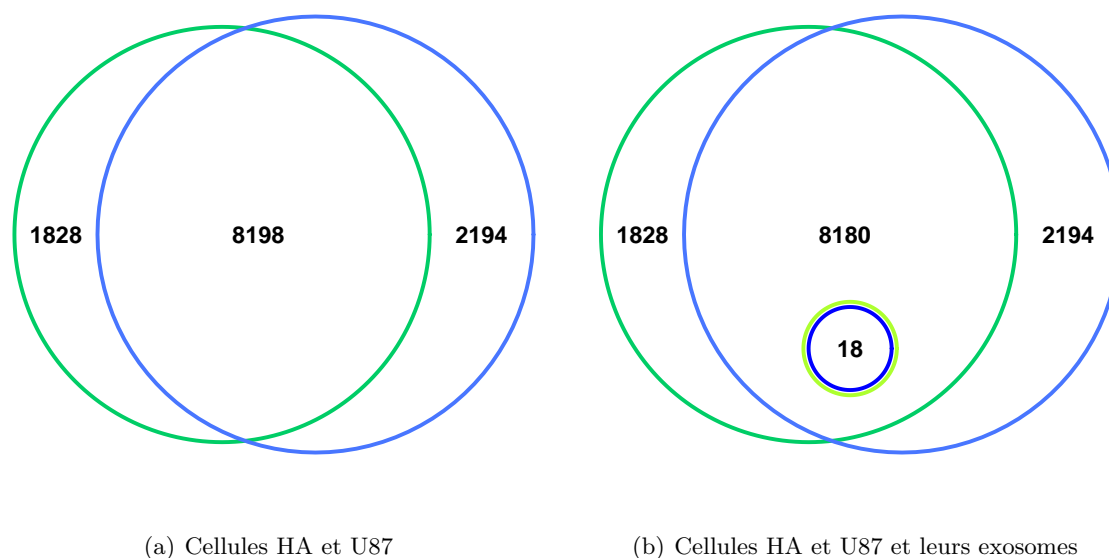


FIGURE 31 – Diagramme de Venn des probesets Affymetrix d'ARNm exosomaux et cellulaires des cellules U87 et HA

Les cercles vert foncé représentent le nombre de probesets détectés dans les cellules HA
 Le cercle vert pâle représente le nombre probesets détectés dans les exosomes de HA
 Les cercles bleu pâle représentent le nombre probesets détectés dans les cellules U87
 Le cercle bleu foncé représente le nombre probesets détectés dans les exosomes de U87

dans les exosomes de HA ou de U87 ont ensuite été recherchés sur la base de donnée Adapt (<http://bioinformatics.picr.man.ac.uk/adapt/Welcome.adapt>) qui permet de cartographier les probesets Affymetrix dans les bases de données de séquences d'ARNm et d'ADNc RefSeq et Ensembl et de valider les probesets ayant une signification biologique suffisante. Dans notre cas seuls 18 probesets sont validés (Figure 31 b).

Ces 18 probesets correspondent aux 18 ARNm dont les intensités sont représentées sur la figure 32.

La première information qui se dégage de la figure 32 est le fait que les ARNm détectés à la fois dans tous les échantillons ont un profil cellulaire très similaire avec des intensités de détection toujours très fortes. Un seul ARNm, MT2A est abaissé d'environ 5,8 fois (soit 2,5 en \log_2) dans les cellules HA par rapport aux cellules U87. La deuxième information est que les intensités de détection de 15 de ces ARNm sont plus fortes d'un facteur moyen de 5 pour les exosomes de HA que pour les exosomes de U87. Par contre, les ARNm ANP32B et RAB13, ils sont aussi bien détectés à la fois dans les exosomes de U87 et de HA. De plus, leurs intensités de détection dans les exosomes sont au même niveau que pour les échantillons cellulaires et ces 2 ARNm semblent donc chargés en forte quantité dans les exosomes. Enfin, MT2A est lui mieux détecté dans les exosomes de U87 que dans les exosomes de HA d'un

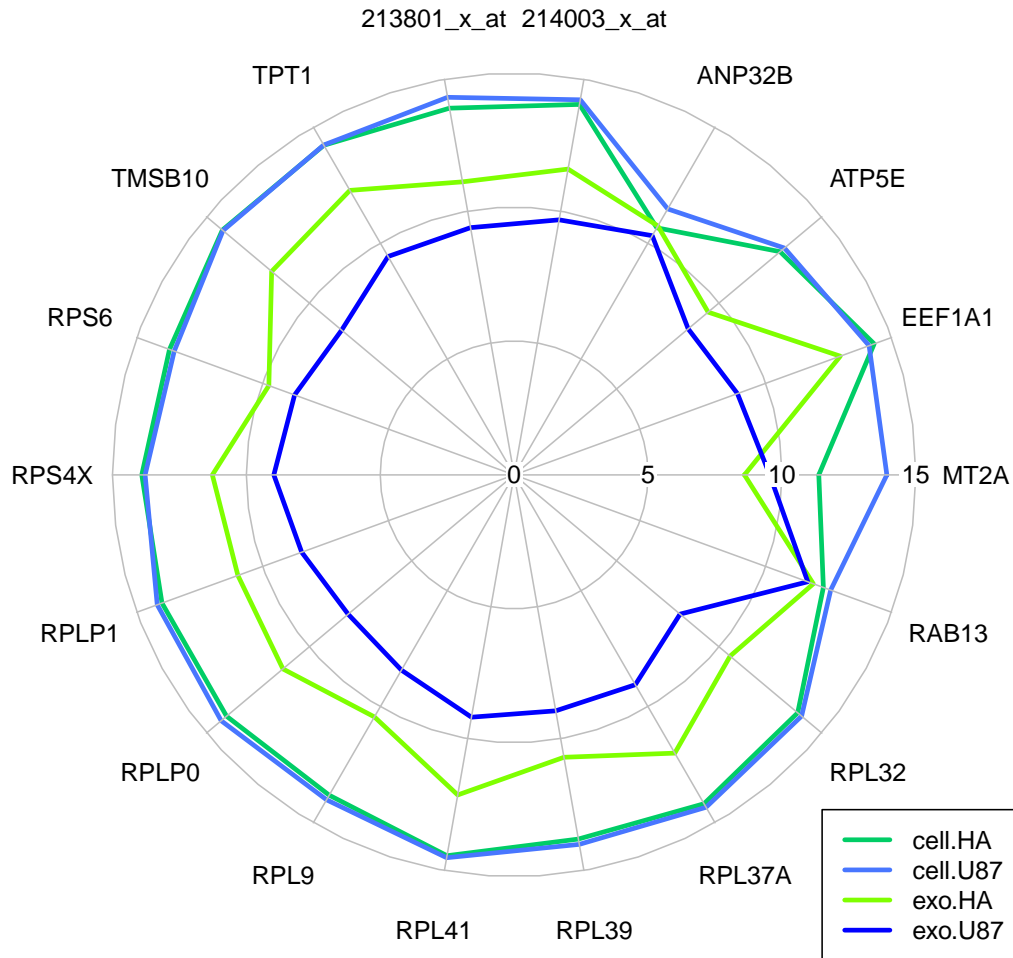


FIGURE 32 – ARNm exosomaux et cellulaires des cellules U87 et HA

Le cercle vert foncé représente les intensités d'ARNm détectés dans les cellules HA
 Le cercle vert pâle représente les intensités d'ARNm détectés dans les exosomes de HA
 Le cercle bleu pâle représente les intensités d'ARNm détectés dans les cellules U87
 Le cercle bleu foncé représente les intensités d'ARNm détectés dans les exosomes de U87
 Les intensités sont représentées en \log_2 .

facteur 2 environ (soit environ 1 en \log_2); il est cependant en quantité plus faible dans les exosomes de U87 ou de HA que dans les cellules U87 et HA.

Le contenu des ARNm messagers dans les exosomes diffère donc pour les cellules HA et U87. En effet si ce sont les mêmes ARNm qui sont présents dans les exosomes, leurs quantités respectives sont majoritairement plus fortes dans les exosomes de HA que dans ceux de U87. En revanche, le contenu en ARNm des exosomes à l'exception de ANP32B, RAB13 et MT2A semble plutôt bien refléter le contenu cellulaire des cellules sécrétrices.

Le contenu des ARNm dans les exosomes semble donc lui aussi régulé, mais à moindre mesure que le contenu en microARN.

3 Contrôle expérimental de la sécrétion des ARN exosomaux

Le chargement du contenu des exosomes et leur sécrétion par les gliomes semble être un mécanisme actif puisque le contenu ARN des exosomes ne reflète pas celui de la cellule qui les a produits. Ce mécanisme est donc probablement régulé. Pour montrer l'existence d'une telle régulation, il faut envisager de provoquer *in vitro* une dérégulation de cette sécrétion d'exosomes et de leurs contenus en ARN. Cette potentielle dérégulation a été testée en soumettant les cellules de glioblastomes U87 à deux éléments de stress extérieur, l'hypoxie d'une part et l'utilisation de molécules inhibitrices d'autre part.

3.1 L'hypoxie affecte la sécrétion d'exosomes par les cellules de U87

Le premier stress à avoir été testé est l'hypoxie. En effet, il est classiquement admis que lors de la prolifération des tumeurs, les cellules au centre de la masse tumorale sont de moins en moins bien oxygénées et connaissent ainsi des conditions d'hypoxie. Dans le contexte des glioblastomes l'hypoxie représenterait un facteur très important qui accroît la croissance de la tumeur. Il est donc important de s'intéresser à une éventuelle différence de production d'exosomes par des cellules cancéreuses qui seraient soumises à un stress hypoxique important comparé à des cellules en condition de normoxie.

3.1.1 Effet de l'hypoxie sur les cellules

La première chose à tester est l'effet de l'hypoxie sur la survie et la prolifération des cellules U87. Pour cela des cellules cultivées à des conditions de 0,3%, 3% et 20% de dioxygène sont analysées en cytométrie en flux. L'induction de l'apoptose et l'analyse du cycle cellulaire sont réalisées selon les conditions décrites au paragraphe 2.1.3, page 82 (Figure 33).

Le passage d'une condition de 20% de dioxygène à une condition de 3% en dioxygène ne semble pas causer une mort cellulaire par apoptose puisque le taux d'apoptose reste stable : 3,8% et 4,0%. En revanche ce taux augmente et triple presque pour atteindre 11% lorsque ces mêmes cellules sont cultivées sous une condition de 0,3% de dioxygène (Figure 33 a). Quant au cycle cellulaire (Figure 33 b), les tendances restent inchangées quelles que soient les conditions d'hypoxie infligées aux cellules. Aussi, environ 60% de cellules sont en phase G0/G1 et environ 22% en phase G2M.

Les conditions d'hypoxie, même stringentes comme le 0,3%, ne semblent pas affecter trop violemment les cellules qui les subissent, et tout changement dans la production d'exosomes ne sera pas dû à un dérèglement complet de la physiologie cellulaire.

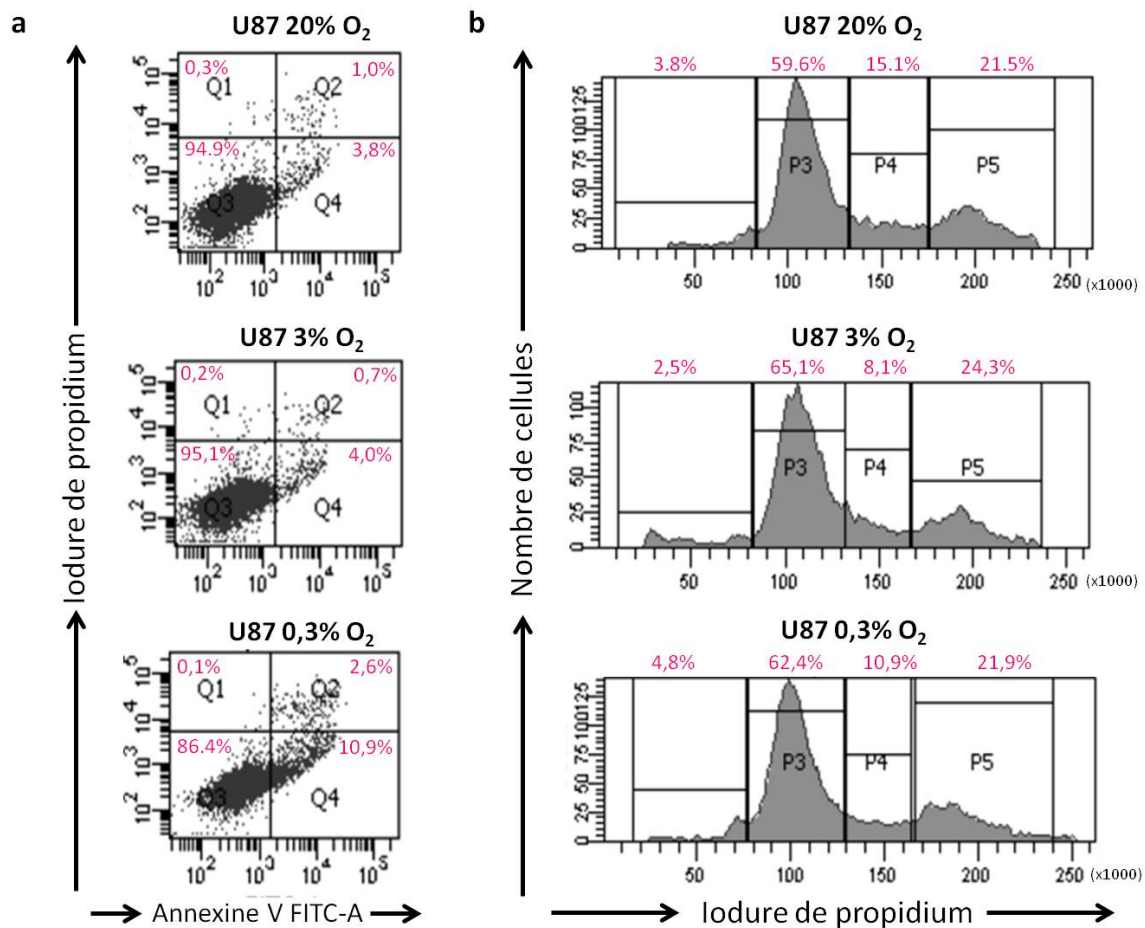


FIGURE 33 – Effets de l'hypoxie sur les cellules U87 en culture
 a. Test apoptose, Cellules à 20%, 3% et 0,3% O₂ ;
 Q1 : Annexin-PI+ ; Q2 : Annexin+PI+ ; Q3 : Annexin-PI- ; Q4 : Annexin+PI-
 b. Cycle cellulaire, Cellules à 20%, 3% et 0,3% O₂ ;
 P3 : G1 ; P4 : S ; P5 : G2-M

Les conditions d'hypoxie n'affectent donc pas la survie ou la prolifération des cellules U87. Par contre, ces mêmes conditions d'hypoxie sont connues pour affecter le contingent

d'ARNm de la cellule (Nissou *et al.*, 2013), mais aussi leur miRnome (Lages *et al.*, 2011). Pour évaluer l'effet de ces conditions hypoxiques sur les cellules U87, une analyse transcriptomique sur des puces Affymetrix microARN et ARNm a été réalisée sur des échantillons d'ARN « courts » ou « longs » obtenus à partir de cellules U87 cultivées dans les différentes conditions d'oxygénation, 0,3% ; 3% ou 20% de dioxygène.

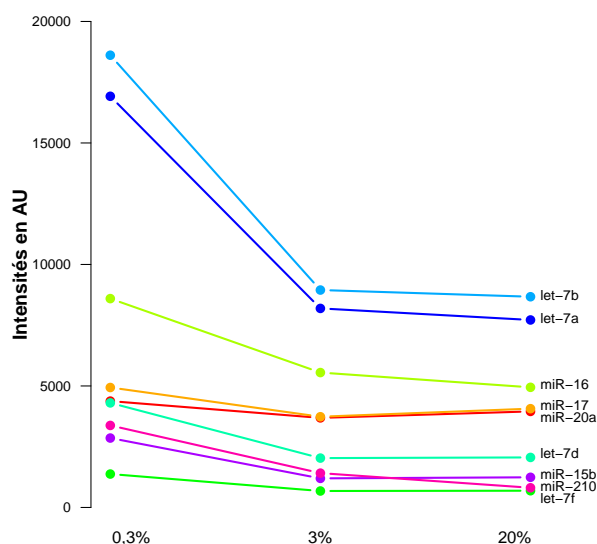


FIGURE 34 – Dérégulations des profils transcriptomiques par les conditions hypoxiques

Effets des conditions hypoxiques sur les profils microARN. Représentation graphique des intensités de détection sur la puce Affymetrix de chaque microARN décrit pour être affecté par l'hypoxie (Lages *et al.*, 2011).

Les profils microARN des 9 microARN sensibles aux conditions hypoxiques ont été analysés (Figure 34). Deux d'entre eux, le miR-17 et le miR-20a, ne semblent pas affectés dans les conditions présentes. En revanche pour les 7 autres l'abaissement de la concentration de dioxygène à 0,3% entraîne une augmentation de leur quantité dans le contenu cellulaire en microARN (augmentation du taux lors du passage de 20% à 3% de dioxygène et également lors du passage de 3% à 0,3% de dioxygène). Le miR-210, lui, varie de manière continue entre 20% et 0,3% de dioxygène. Une validation de ces dérégulations a été réalisée en qPCR et donne les mêmes tendances. Quant au miR-210, le microARN « typique » de l'hypoxie, la variation de son nombre de copie a été mesurée grâce à la méthode Quantigene (cf paragraphe 2.3.4 p 91). Lors d'un passage des conditions d'oxygénation de 20% à de 3% de dioxygène, le nombre de copies du miR-210 est doublé. L'expression du miR-21, censée être stable quelle que soit la condition d'hypoxie, a aussi été mesurée par la méthode Quantigene et le nombre de copie dosé entre ces deux conditions reste stable.

L'effet des conditions hypoxiques sur les profils ARNm a été analysé en comparant les intensités de détection obtenues sur puces Affymetrix de chacun des 42 ARNm décrits pour être affectés par l'hypoxie (Nissou *et al.*, 2013) pour des conditions de 0,3% et 20% de dioxygène. 91% des ARNm normalement affectés par l'hypoxie, le sont aussi dans ces conditions

expérimentales puisque seules les expressions de 4 de ces 42 ARNm ne sont pas affectés.

L'hypoxie affecte donc les cellules U87 au niveau de leur contingent microARN et ARNm. Il est maintenant intéressant de valider si l'hypoxie affecte la production des exosomes et leur contingent en ARN.

3.1.2 L'hypoxie n'affecte pas la quantité d'exosomes produits

La première question qui se pose concernant la potentielle dérégulation de la production d'exosomes par des cellules de U87 sous conditions hypoxiques concerne la quantité d'exosomes produits. Pour répondre à cette question, les exosomes produits en 24h par des cellules U87 cultivées à 0,3%, 3% et 20% de dioxygène ont été récoltés et quantifiés grâce au Nanosight (Figure 35).

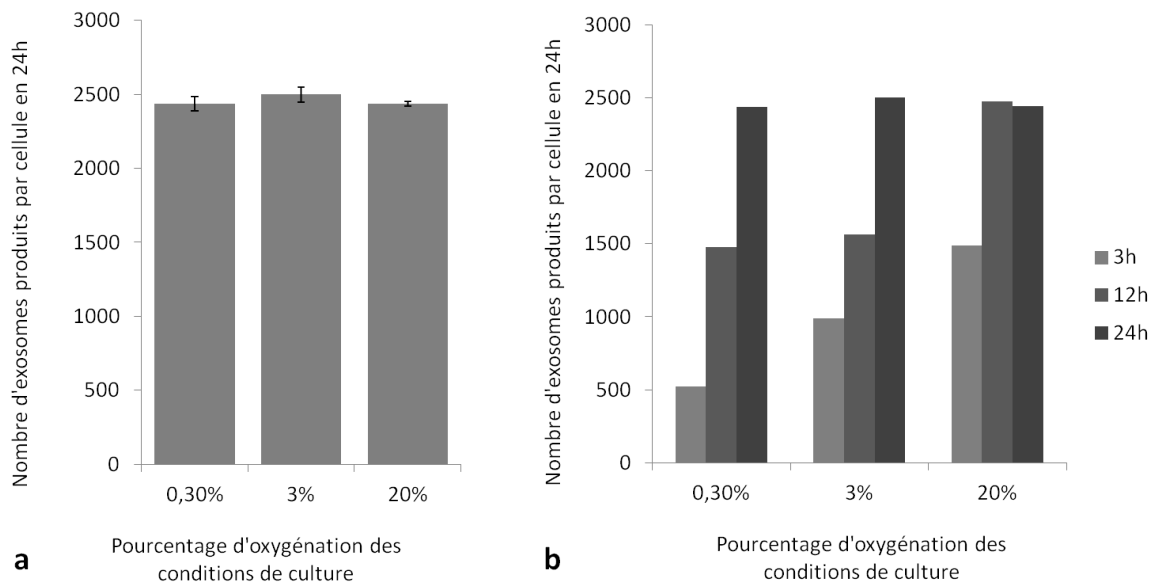


FIGURE 35 – Production d'exosomes en condition d'hypoxie

a. Dosage au Nanosight des quantités d'exosomes sécrétées en 24h par des cellules U87 en culture sous 0,3%, 3%, 20% de dioxygène.

b. Dosage au Nanosight des quantités d'exosomes sécrétées en 3h, 12h, 24h par des cellules U87 en culture sous 0,3%, 3%, 20% de dioxygène.

Les quantités d'exosomes produites par des cellules U87 ne varient pas en fonction des conditions d'hypoxie de la culture. Que les cellules soient cultivées dans un environnement riche en dioxygène, 20%, normoxique, 3%, ou très hypoxique, 0,3%, la quantité d'exosomes produite en 24h reste équivalente, soit environ 2500 exosomes par cellule (Figure 35 a). Il semblerait que les conditions d'hypoxie, si elles ne modifient pas la quantité d'exosomes pro-

duite en 24h retardent un petit peu la production des exosomes (Figure 35 b). En effet, sous conditions d'hypoxie de 0,3% et 3% de dioxygène, les quantités d'exosomes produites en 3h et 12h sont plus faibles qu'à 20% de dioxygène au même temps de production.

3.1.3 L'hypoxie affecte le contenu en ARN des exosomes produits

L'hypoxie n'affecte pas la production d'exosomes en terme de quantité d'exosomes produite, il est cependant important de se pencher sur la modification potentielle que pourrait engendrer les conditions hypoxiques sur le contenu de ces exosomes en microARN.

3.1.3.1 Le contenu en microARN

Les ARN exosomaux ont été extraits en parallèle des ARN des cellules sécrétrices. Chaque échantillon a ensuite été hybridé sur puces Affymetrix microARN v2. Après normalisation des différentes puces les profils microARN exosomaux et cellulaires obtenus pour les différentes concentrations de dioxygène ont été comparés.

Pour mettre en évidence un éventuel effet de l'hypoxie sur le contingent en microARN des exosomes produits, les profils microARN exosomaux produits sous différentes conditions d'oxygénation ont été comparés entre eux (Figure 36).

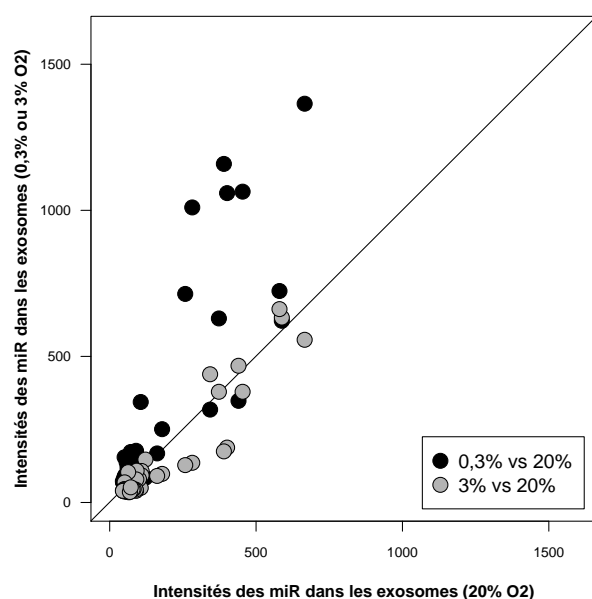


FIGURE 36 – Profils microARN exosomaux hypoxiques

Comparaison des profils des intensités de détection sur la puce Affymetrix obtenus pour des conditions d'oxygénation des cultures à 0,3% (points noirs) et 3% (points gris) de dioxygène par rapport à une condition d'oxygénation de 20% de dioxygène.

Les quantités des microARN exosomaux semblent être stables quand la condition d'oxygénation est abaissée de 20% à 3% de dioxygène, et le même nombre de microARN est détecté

dans les conditions d’oxygénation de 20% et 0,3% de dioxygène. En revanche à 0,3% de dioxygène les quantités de 7 de ces microARN (miR-638, miR-2861, miR-149-star, miR-762, miR-1228-star, miR-3196 et miR4281) exosomaux augmentent fortement pour atteindre des intensités en moyenne 3 fois plus fortes qu’à 20% de dioxygène. Une condition hypoxique de 0,3% de dioxygène induirait donc une charge spécifique des exosomes en certains microARN.

Une condition hypoxique extrême semble donc pouvoir modifier le contingent en microARN des exosomes produits. Pour s’assurer que ce changement ne reflète pas simplement un changement du contingent microARN des cellules qui les produisent, les profils microARN des exosomes hypoxiques ont donc été comparés aux profils microARN des cellules qui les ont produits (Figure 37).

Grâce à cette comparaison quatre catégories de microARN se dégagent.

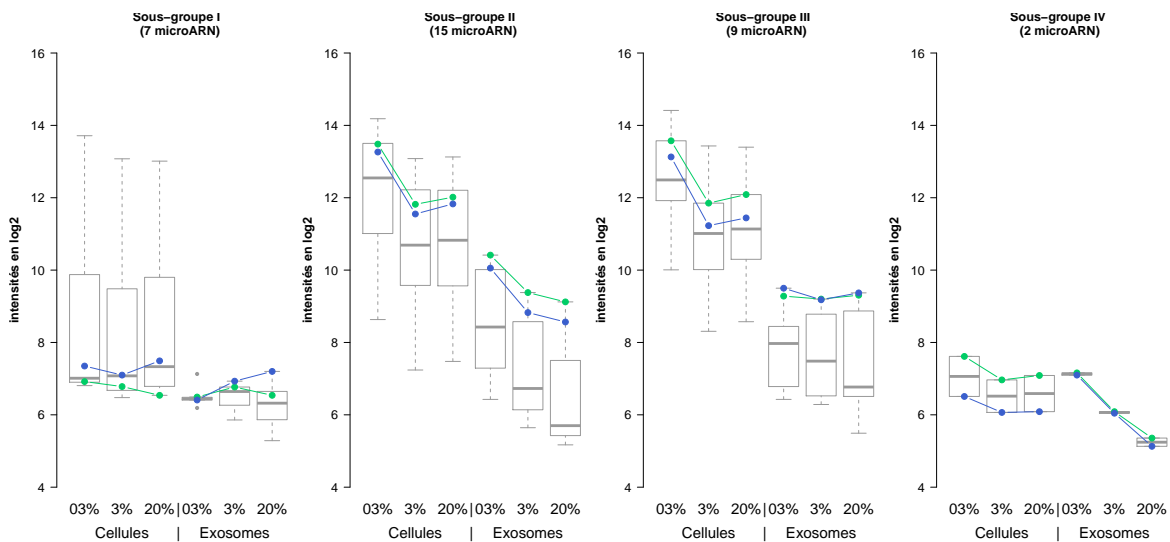


FIGURE 37 – Profils microARN cellulaires et exosomaux obtenus en conditions hypoxiques
Représentation graphique des intensités de détection sur la puce Affymetrix pour des microARN cellulaires et exosomaux pour des conditions d’oxygénation des cultures à 0,3%, 3% et 20% de dioxygène.

La figure 37 présente ces quatre sous-groupes de microARN présents dans les exosomes produits en conditions d’hypoxie. Premièrement sont détectés 7 microARN dont l’expression reste constante dans les cellules et dans leurs exosomes quelle que soit la condition d’hypoxie. Deuxièmement sont identifiés 15 microARN dont la quantité exosomale à 0,3% d’oxygénation est augmentée et pour lesquels une augmentation est aussi notable dans les cellules sécrétrices à 0,3% (les 7 microARN identifiés à la figure 36 sont tous retrouvés dans cette catégorie). Les profils exosomaux de ces 22 microARN reflètent bien leur profil cellulaire. Troisièmement 9 microARN montrent une augmentation de leur quantité cellulaire à 0,3% de dioxygène mais

leurs taux de détection dans les exosomes ne varient pas malgré les changements d'oxygénation. Et enfin, pour seulement 2 microARN la quantité exosomale est augmentée en conditions hypoxiques quand bien même leur quantité cellulaire reste relativement stable.

Si 22 microARN, soit deux tiers des microARN détectés dans les exosomes (sous-groupes I et II), semblent refléter leur profil cellulaire, 11 (sous-groupes III et IV) eux ne reflètent aucunement leur profil cellulaire. L'hypoxie est donc un paramètre qui peut jouer un rôle dans le chargement spécifique en microARN des exosomes.

3.1.3.2 Le contenu en ARNm

Les effets potentiels de l'hypoxie sur le chargement en ARNm dans les exosomes ont aussi été étudiés. Pour cela la fraction d'ARN « longs » correspondant à la fraction d'ARN « courts » utilisée précédemment a été analysée sur puce Affymetrix HgU133Plus2. Les probesets sont ensuite validés sur Adapt et les profils d'ARNm de chacun des échantillons aux trois conditions hypoxiques sont comparés (Tableau 2).

La première partie du tableau 2 présente 6 ARNm dont la quantité cellulaire reste stable malgré les conditions d'hypoxie mais dont la quantité exosomale augmente fortement et devient détectable pour une condition de 0,3% de dioxygène. Pour les deux ARNm suivants, l'augmentation de la quantité cellulaire au fur et à mesure de la diminution du pourcentage de dioxygène est reflétée par une augmentation de la quantité exosomale. Enfin pour les 18 ARNm restants, une quantité stable dans les cellules quelle que soit la condition d'oxygénation n'est pas reflétée par leur quantité exosomale qui diminue fortement à 0,3% de dioxygène. Aussi, les ARNm détectés dans les exosomes ne reflètent pas leurs contenus cellulaires.

La détection des 6 premiers ARNm présentés sur le tableau 2 pourrait éventuellement provenir du fait que seulement 10 ARNm sont détectés à 0,3% de dioxygène, contre 19 à 20% de dioxygène. La soudaine détection de ces 6 ARNm sur la puce Affymetrix pourrait alors éventuellement être due au fait que leurs proportions dans les exosomes sont plus grandes par défaut de chargement des autres ARNm dans les exosomes. La quantité en elle-même de ces 6 ARNm empaquetée dans les exosomes produits en conditions d'hypoxie n'est pas nécessairement augmentée. L'hypoxie est un paramètre qui pourrait jouer un rôle dans le chargement des ARN (microARN et ARNm) dans les exosomes des cellules de gliomes U87.

	Cellules			Exosomes		
	0,3%	3%	20%	0,3%	3%	20%
SLC25A16	562	417	387	291	0	0
PRKAR2A	602	580	751	355	0	0
UBXN2A	534	501	508	553	277	0
C9orf64	636	609	579	715	312	0
HAUS2	319	263	290	598	0	0
OCIAD1	431	408	320	556	274	0
PDE4C	1268	896	735	946	368	0
OPHN1	1063	862	644	911	446	272
RPL9	13736	16035	16488	0	0	342
RPL32	11784	14445	16516	0	337	272
RPLP1	17072	18224	18603	0	305	348
RPLP0	18640	19756	19901	0	326	273
EEF1A1	19952	19810	17622	0	331	469
RPS6	8597	11268	11652	0	476	423
RPL41	21616	23678	23417	0	588	583
RPL39	15449	16743	16492	0	630	493
RPS4X	12162	13597	14074	0	527	503
ATP5E	6591	9391	9265	0	526	358
MT2A	16832	15688	15479	0	838	747
TPT1	20720	21288	19118	0	855	683
RPL37A	19925	20740	20612	0	839	529
213801_x_at	16936	18866	20414	0	736	664
214003_x_at	18047	19828	19115	0	710	815
TMSB10	20234	20443	18713	0	957	340
RAB13	5850	6519	6113	750	3404	3254
ANP32B	2445	2305	2833	277	1746	1273

TABLE 2 – ARNm exosomaux et cellulaires des cellules U87 en conditions hypoxiques
 Les zéro (0) correspondent à des valeurs d'intensité inférieures au seuil de détection fixé à 256 UA ; le dégradé de vert représente la gamme d'intensités de détection de ces ARNm sur les puces Affymetrix.

3.2 Impacts de composés pharmacologiques sur la sécrétion et le contenu des exosomes produits par les cellules U87

Un deuxième stress extérieur a été testé, l'effet de deux composés pharmacologiques (GW4869 et 5-Aza-2'-désoxycytidine) sur la production d'exosomes par des cellules U87. En effet, ces deux composés ont été montrés capables d'affecter la quantité d'exosomes produite par des cellules en culture (cellules embryonnaires de rein et des cellules hépatiques). GW4869 diminue la production d'exosomes (Kosaka *et al.*, 2010), au contraire la 5-Aza-2'-désoxycytidine l'augmente (Xiao *et al.*, 2010). Aussi, il paraissait intéressant de connaître l'effet de ces deux composés dans le contexte des glioblastomes. Ces composés pharmacologiques peuvent-ils provoquer une différence de production d'exosomes par des cellules cancéreuses U87 ?

3.2.1 Effet sur les cellules U87

Tout comme pour l'effet de l'hypoxie, la première chose testée ici est l'effet de ces deux composés pharmacologiques sur la survie et la prolifération des cellules U87. Pour cela des cellules U87 sont cultivées dans des conditions avec et sans composés pharmacologiques, puis sont analysées en cytométrie en flux (Figure 38).

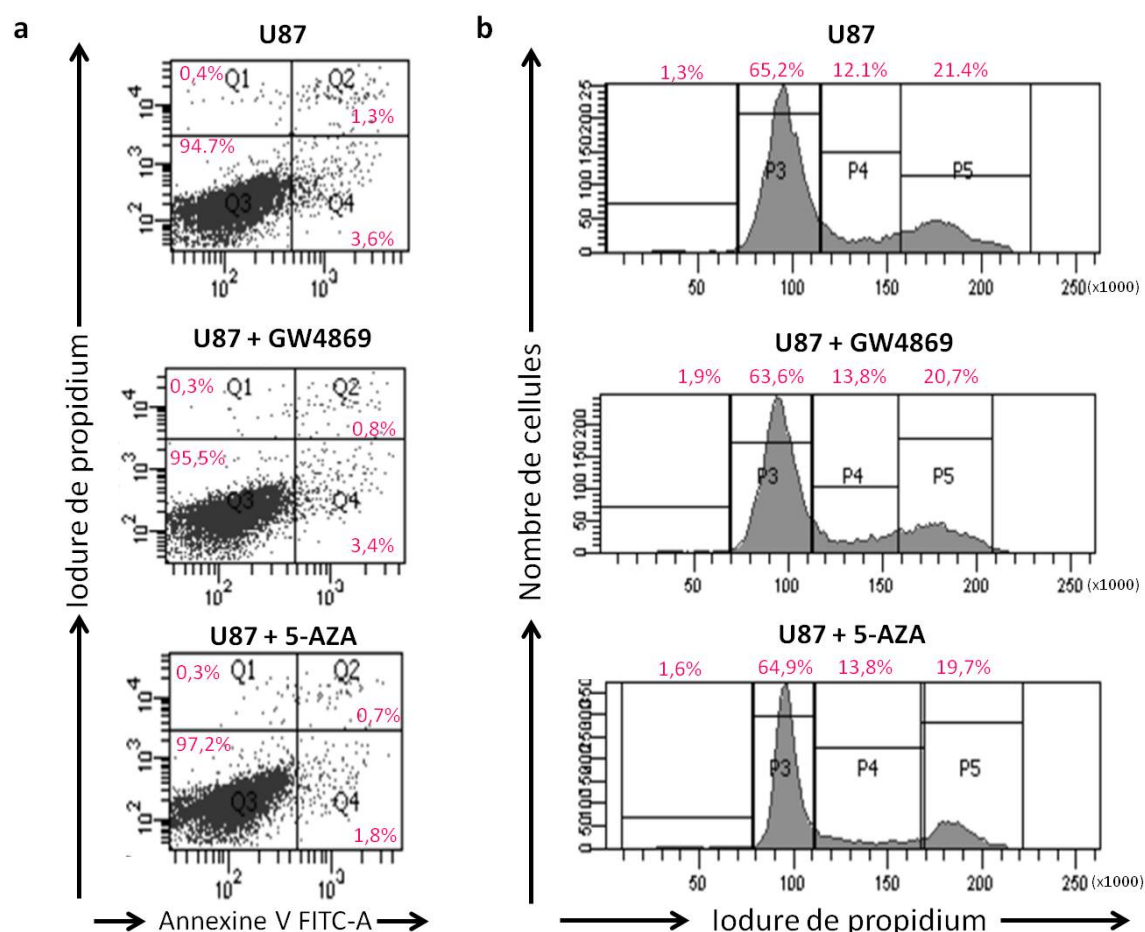


FIGURE 38 – Effets d’une incubation de composés pharmacologiques GW4869 ou 5-Aza-2’-désoxycytidine sur les cellules U87 en culture

a. Test apoptose, Cellules U87 et Cellules U87 en présence de GW4869 ou de 5-Aza-2’-désoxycytidine pendant 72h

Q1 : Annexin-PI+ ; Q2 : Annexin+PI+ ; Q3 : Annexin-PI- ; Q4 : Annexin+PI-

b. Cycle cellulaire, Cellules U87 et Cellules U87 en présence de GW4869 ou de 5-Aza-2’-désoxycytidine pendant 72h

P3 : G1 ; P4 : S ; P5 : G2-M

L’addition des composés pharmacologiques au milieu de culture, que ce soit la GW4869 ou la 5-Aza-2’-désoxycytidine, ne semble pas causer de mort cellulaire par apoptose. Le taux d’apoptose reste en effet pratiquement stable, avec un taux de 3,6% en conditions normales, de 3,4% en présence de GW4869 et de 1,6% en présence de 5-Aza-2’-désoxycytidine (Figure 38 a).

Quant au cycle cellulaire (Figure 38 b), les tendances restent inchangées quelles que soient les conditions de culture des cellules (environ 60% de cellules sont en phase G0/G1 et environ 21% en phase G2M).

Les composés pharmacologiques ne semblent pas affecter trop violemment les cellules U87, et tout changement dans la production d'exosomes ne sera pas dû à un impact sur la survie cellulaire.

Si l'utilisation de ces composés pharmacologiques n'affecte ni la survie ni la prolifération des cellules de U87, il est important de s'intéresser à leur effet potentiel sur le miRnome de ces cellules. Des analyses sur puces Affymetrix microARN ont été réalisées sur des échantillons d'ARN « courts » obtenus à partir de cellules U87 cultivées avec et sans composés pharmacologiques (Tableau 3).

	U87	U87+5-AZA	U87+GW4869	U87+5-AZA vs U87	U87+GW4869 vs U87
miR-4298	105	NA	NA	<0,5	<0,5
miR-1260b	278	121	163	0,40	0,60
miR-1280	312	151	192	0,50	0,60
miR-4668-5p	1467	1889	3015	1,30	2,10
miR-3613-3p	1125	1546	2515	1,40	2,20
miR-4484	198	173	1334	0,90	6,70
miR-3201	146	178	299	1,20	2,10
miR-3128	74	138	169	1,90	2,30

TABLE 3 – Dérégulations transcriptomiques dans les cellules dues à l'utilisation de composés pharmacologiques GW4869 ou 5-Aza-2'-désoxycytidine
 Intensités de détection sur la puce Affymetrix en UA et ratios d'expression entre les conditions avec et composés pharmacologiques. Ici seuls les microARN dont l'un des ratios est inférieur à 0,5 ou supérieur à 2 sont représentés. Les intensités non détectées (inférieures à 64) sont marquées NA, les ratios calculés ne sont alors pas exacts mais donnent une tendance et sont ici marqués <0,5.

L'utilisation de composés pharmacologiques semble avoir un effet sur l'expression de certains microARN cellulaires (Tableau 3). Ainsi, suite au traitement avec la 5-Aza-2'-désoxycytidine l'expression des microARN miR-4298, miR-1260b et miR-1280 est abaissée par rapport à leur expression dans des cellules non traitées (taux de variation supérieurs à 2 avec des ratios inférieurs à 0,5). L'utilisation de GW4869 semble provoquer la même tendance vers une moindre expression de ces trois microARN là. En revanche l'expression de 5 autres microARN (miR-4668-5p, miR-3613-3p, miR-4484, miR-3201 et miR-3128) dont le taux peu affecté montre une légère tendance à la hausse lors de l'utilisation de 5-Aza-2'-désoxycytidine, est augmentée en présence de GW4869 (taux de variation supérieurs à 2 avec des ratios supérieurs à 2).

Ainsi, tout comme l'hypoxie, ces composés pharmacologiques affectent les cellules U87 au niveau de leur contingent microARN. Il est maintenant intéressant de valider s'ils affectent également la production des exosomes et leur contingent en microARN.

3.2.2 Les composés pharmacologiques GW4869 et 5-Aza-2'-désoxycytidine n'affectent pas la quantité d'exosomes produits par les cellules U87

La première question qui se pose ici concerne la capacité de ces deux composés pharmacologiques à déréguler la quantité d'exosomes produits par des cellules U87. Pour répondre à cette question, les exosomes produits en 24h par des cellules U87 cultivées avec et sans composés pharmacologiques ont été récoltés et quantifiés grâce au Nanosight et à la technique de DLS (Figure 39).

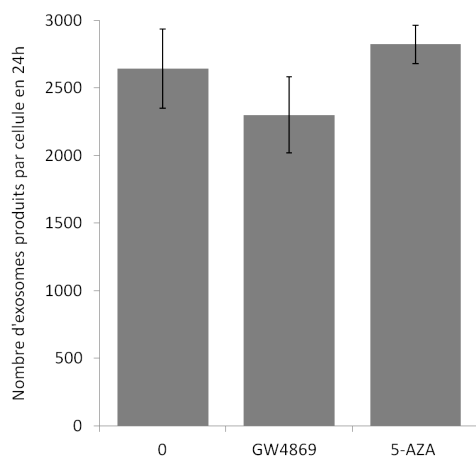


FIGURE 39 – Production d'exosomes par des cellules traitées avec des composés pharmacologiques
Moyennes des valeurs obtenues pour des dosages en triplicat au Nanosight et par DLS des quantités d'exosomes sécrétés en 24h par des cellules U87 en culture avec ou sans composés pharmacologiques. Ici 5-AZA pour 5-Aza-2'-désoxycytidine.

Les quantités d'exosomes produites par des cellules U87 ne varient que très faiblement et de manière non significative entre des conditions de culture sans ou avec composés pharmacologiques. Que les cellules soient cultivées en présence de GW4869 ou de 5-Aza-2'-désoxycytidine la quantité d'exosomes produite en 24h reste équivalente, soit environ 2500 exosomes par cellule et en 24h (Figure 39). Il semblerait donc que ces deux composés pharmacologiques n'aient pas exactement le même effet sur des cellules de glioblastome que ceux observés sur des cellules de reins pour GW4869 (Kosaka *et al.*, 2010) et des cellules d'hépatomes pour la 5-Aza-2'-désoxycytidine (Xiao *et al.*, 2010).

3.2.3 GW4869 et 5-Aza-2'-désoxycytidine affectent le contenu en microARN des exosomes produits

Les ARN exosomaux ont été extraits en parallèle des ARN des cellules sécrétrices. Les fractions d'ARN « courts » ont ensuite été hybridées sur puces Affymetrix microARN v3. Après normalisation des différentes données, les profils microARN exosomaux et cellulaires obtenus pour les différentes conditions avec et sans composés pharmacologiques ont été comparés. Les puces v3 contiennent plus de probsets que les puces v2 (annexe A.4.1, page 200) et un plus grand nombre de microARN a été donc détecté dans les exosomes de cellules U87 non traitées : 93 microARN sont détectés sur les puces v3 et comprennent les 26 microARN exosomaux de U87 déjà détectés sur les puces v2 (figure 29). Les microARN dont l'expression connaît une dérégulation suite aux traitements des cellules sont présentés dans le tableau 4).

	Cellules			Exosomes			Cellules		Exosomes	
	Ctl	5-AZA	GW4869	Ctl	5-AZA	GW4869	5-AZA vs Ctl	GW4869 vs Ctl	5-AZA vs Ctl	GW4869 vs Ctl
miR-4298	105	NA	NA	NA	NA	NA	<0.5	<0.5	NA	NA
miR-1280	312	151	192	NA	NA	NA	0.50	0.60	NA	NA
miR-1260b	278	121	163	NA	NA	NA	0.40	0.60	NA	NA
miR-4484	198	173	1334	1863	1722	1697	0.90	6.70	0.90	0.90
miR-3128	74	138	169	66	100	94	1.90	2.30	1,8	1,7
miR-3201	146	178	299	72	144	115	1.20	2.10	2.00	1.60
miR-4668-5p	1467	1889	3015	382	714	901	1.30	2.10	1.90	2.40
miR-3613-3p	1125	1546	2515	312	599	788	1.40	2.20	1.90	2.50
miR-4530	1141	933	798	336	134	290	0.80	0.70	0.40	0.90
miR-3178	671	456	603	185	267	381	0.70	0.90	1.40	2.10
miR-4463	391	253	295	141	268	295	0.60	0.80	1.90	2.10
miR-4433	74	71	70	70	118	151	1.00	0.90	1.70	2.10
miR-4649-5p	73	70	71	NA	80	107	1.00	1.00	>1,5	>2

TABLE 4 – Profils microARN cellulaires et exosomaux en présence ou en absence de GW4869 ou 5-Aza-2'-désoxycytidine

Intensités de détection sur les puces Affymetrix en UA et ratios d'expression entre les conditions avec et sans composés pharmacologiques

Ctl : Cellules U87 non traitées ; 5-Aza : Cellules U87 traitées à la 5-Aza-2'-désoxycytidine ; GW4869 : Cellules traitées à la GW4869

Seuls les microARN dont l'un des ratios (cellulaire ou exosomal) est inférieur à 0,5 ou supérieur à 2 sont représentés. Les intensités non détectées (inférieures à 64) sont marquées NA, les ratios calculés ne sont alors pas exacts mais donnent une tendance et sont ici marqués <0,5, >1,5 ou >2.

Parmi les 8 microARN dérégulés dans les cellules traitées à la GW4869 ou à la 5-Aza-2'-désoxycytidine (en haut du tableau 4), tous ne sont pas dérégulés dans les exosomes produits. L'expression des 3 premiers microARN du tableau, miR-4298, miR-1280 et miR-1260b est

diminuée dans les cellules U87 traitées à la GW4869 ou à la 5-Aza-2'-désoxycytidine. Cependant, aucun de ces microARN ne semblent détectés dans les exosomes produits par les cellules traitées ou non traitées. Le miR-4484 qui était très fortement augmenté dans les cellules traitées à la GW4869 est détecté fortement dans les exosomes de toutes les cellules, traitées ou non, mais les quantités dans les exosomes produits par les cellules traitées au GW4869 restent inchangées. Enfin pour les 4 microARN miR-3128, miR-3201, miR-4668-5p et miR-3613-3p leur expression connaît une tendance à la hausse dans les exosomes des cellules traitées, que ce soit à la GW4869 ou à la 5-Aza-2'-désoxycytidine.

D'autres microARN dont le taux cellulaire n'est pas affecté par l'utilisation des GW4869 et 5-Aza-2'-désoxycytidine sont tout de même différentiellement sécrétés dans les exosomes produits (bas du tableau 4). Après traitement à la 5-Aza-2'-désoxycytidine le miR-4530 reste stable dans les cellules mais est moins sécrété dans les exosomes. Ce même microARN n'est pas différentiellement sécrété après traitement à la GW4869. Les expressions des miR-3178, miR-4463, miR-4433 et miR-4649-5p quant à elles montrent une tendance à la hausse dans les exosomes produits par les cellules traitées.

La GW4869 et la 5-Aza-2'-désoxycytidine ne dérèglent pas complètement le miRnome des cellules U87 traitées et de leurs exosomes. En revanche, les taux de sécrétion de 9 microARN semblent modifiés : 4 sont augmentés à la fois dans les cellules productrices traitées à la GW4869 ou à la 5-Aza-2'-désoxycytidine et dans leurs exosomes (miR-3128 , miR-3201, miR-4668-5p et miR-3613-3p); et 5 autres sont dérégulés quand bien même leurs expressions cellulaires ne sont pas affectées (miR-4530, miR-3178, miR-4463, miR-4433 et miR-4649-5p). Aussi il est possible de déréguler la composition en microARN des exosomes sécrétés par des cellules U87.

4 Effets des exosomes de gliomes sur des cellules saines

Les cellules de gliomes produisant une quantité très importante d'exosomes tumoraux, les cellules « normales » voisines sont « bombardées » d'exosomes tumoraux en permanence. Ces exosomes sont-ils acteurs d'un stimulus quelconque pour les cellules péri-tumorales ? Peuvent-ils être létaux pour les cellules ? Peuvent-ils aider à la création d'une niche pré-métastatique ? Les cellules de gliomes étant très invasives, il est important de caractériser l'effet éventuel de leur production d'exosomes sur leur environnement.

4.1 Les exosomes des glioblastomes sont internalisés dans les cellules voisines

4.1.1 Observation de l'internalisation d'exosomes de U87 dans des cellules HA ou U87

La première étape est de vérifier l'« uptake » d'exosomes par des cellules d'astrocytes ou de glioblastomes humains en culture. Pour ce faire, des incubations d'une durée de 24 heures ont été réalisées avec des cellules HA et U87, de manière à mettre en contact environ 1000 exosomes par cellule réceptrice (cellules U87 ou HA).

Les exosomes utilisés ont été purifiés à partir d'une production de 24h par des cellules de U87 au préalable marquées à la PKH67 ou à la PKH26. Les exosomes contiennent eux aussi la PKH67 ou la PKH26 dans leur membrane et fluorescent dans le vert (PKH67) ou dans le rouge (PKH26). Pour s'affranchir d'éventuels agrégats de PKH qui pourraient être à l'origine de la fluorescence que l'on voit, un gradient inverse a été réalisé sur les exosomes fluorescents. Seuls ceux-ci ayant la capacité de « flotter » jusqu'à la fraction du gradient d'environ 35% de sucrose, les exosomes utilisés sont donc débarrassés des éventuels agrégats de PKH.

Après contact des cellules avec les exosomes marqués par la PKH67, les membranes des cellules ont été colorées au WGA Texas Red-X (fluoresce dans le rouge) (ou au WGA Green Oregon qui fluoresce dans le vert si des exosomes marqués à la PKH26 ont été utilisés). Puis les cellules sont fixées, et enfin les noyaux colorés au Hoeschst (fluorescent dans le bleu). Les lames ont ensuite été observées au microscope confocal.

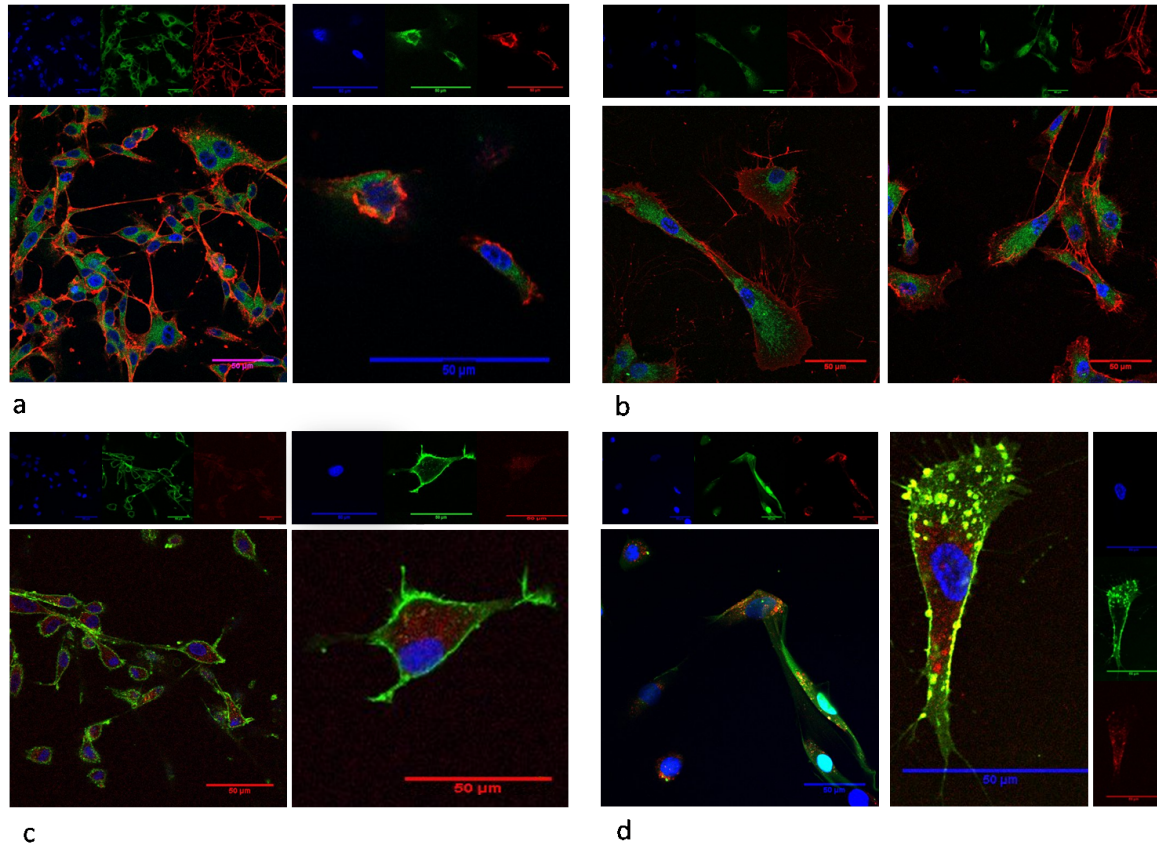


FIGURE 40 – Uptake des exosomes de glioblastomes par des cellules gliales
Uptake d'exosomes de glioblastomes U87 par des cellules de glioblastomes U87 (a et c) et d'astrocytes humains HA (b et d).

Les noyaux sont marqués en bleu, les membranes en rouge et les exosomes en vert (a et b) ou les membranes en vert et les exosomes en rouge (c et d).

a. Cellules U87 incubées avec des exosomes de U87 marqués à la PKH67

b. Cellules HA, incubées avec des exosomes de U87 marqués à la PKH67

c. Cellules U87 incubées avec des exosomes de U87 marqués à la PKH26

d. Cellules HA incubées avec des exosomes de U87 marqués à la PKH26 ; sur l'image de gauche les cellules incubées sont des HA-GFP

À en juger par la fluorescence verte fortement détectée à l'intérieur des cellules U87, les exosomes marqués à la PKH67 semblent être entrés dans le cytoplasme des cellules U87 incubées (Figure 40 a). De plus cette fluorescence verte n'est colocalisée ni avec la fluorescence bleue attestant d'une absence d'exosomes dans le noyau ; ni avec la fluorescence rouge ce qui laisse penser que les exosomes ne sont fixés ni sur les membranes à l'extérieur des cellules, ni

dans la membrane plasmique. Les colorations rouge ou verte des exosomes ne sont pas complètement diffuses mais présentent un aspect granuleux qui laisse penser que la coloration des exosomes n'a pas été libérée dans le cytoplasme et qu'une partie au moins des exosomes est encore intègre.

L'absence de colocalisation de couleurs rouge et verte laisse présager un « uptake » des exosomes par un phénomène autre que par fusion membranaire. En effet une fusion membranaire conduirait à une inclusion de la membrane des exosomes marqués en vert par la présence de PKH67 dans la membrane cellulaire elle-même déjà colorée en rouge. Toutes ces observations sont aussi visibles pour les cellules d'astrocytes humains HA (Figure 40 b).

Afin de s'assurer qu'il n'y a pas un biais expérimental dû aux caractéristiques spectrales respectives de WGA et PKH, la même expérience a été réalisée en utilisant d'autres traceurs fluorescents. Les exosomes et les membranes des cellules ont été marqués avec des marqueurs PKH26 et WGA Green Oregon qui ont des longueurs d'ondes d'émissions différentes de celles des PKH67 et WGA Texas Red (Figure 40 c et d). De plus le marquage des membranes des cellules HA par WGA a été supprimé au profit de l'utilisation du marqueur GFP exprimé de manière constitutive par une cellule HA-GFP (Figure 40 d). Les observations précédentes d'import des exosomes ne sont pas remises en question par ces nouvelles analyses. De plus l'utilisation des cellules HA-GFP confirme l'import des exosomes dans le cytoplasme. En effet l'incubation des exosomes marqués à la PKH26 (fluorescence rouge) avec les cellules HA-GFP dont le cytoplasme est entièrement fluorescent dans le vert conduit à la détection d'une fluorescence « jaune » ce qui témoigne d'une localisation des exosomes dans le cytoplasme.

Ainsi, après une incubation de 24h, les exosomes de U87 sont importés massivement à l'intérieur des cellules incubées ; qu'il s'agisse de cellules de glioblastomes humains (U87) ou d'astrocytes humains (HA).

4.1.2 Comparaison de l'internalisation des exosomes de glioblastomes et des nanocapsules lipidiques

Des cellules de U87 ont été mises en contact avec des nanocapsules lipidiques de taille comparables aux exosomes afin d'évaluer s'il existe des similitudes sur le mode d'import de ces composants dans les cellules U87. Les incubations, d'une durée de 24h, ont été réalisées

de manière à mettre en contact environ 1000 objets -nanocapsules ou exosomes - par cellules réceptrices (cellules U87).

Les exosomes utilisés ont été purifiés à partir d'une production de 24h par des cellules de U87 au préalable marquées à la PKH26. Ils fluorescent dans le rouge.

Les nanocapsules utilisées, LNC-DiI et LNC-DiO, ont été produites par les soins d'Audrey Griveau à Angers (équipe d'Emmanuel Garcion). De diamètre de 60 nm environ, elles fluorescent dans le rouge.

Au bout de 24h les membranes des cellules U87 mises en contact avec les exosomes ou les nanocapsules ont été colorées au WGA Green Oregon (fluorescent dans le vert), puis les cellules fixées, et enfin les noyaux colorés au Hoechst (fluorescent dans le bleu). Les lames ont ensuite été observées au microscope confocal.

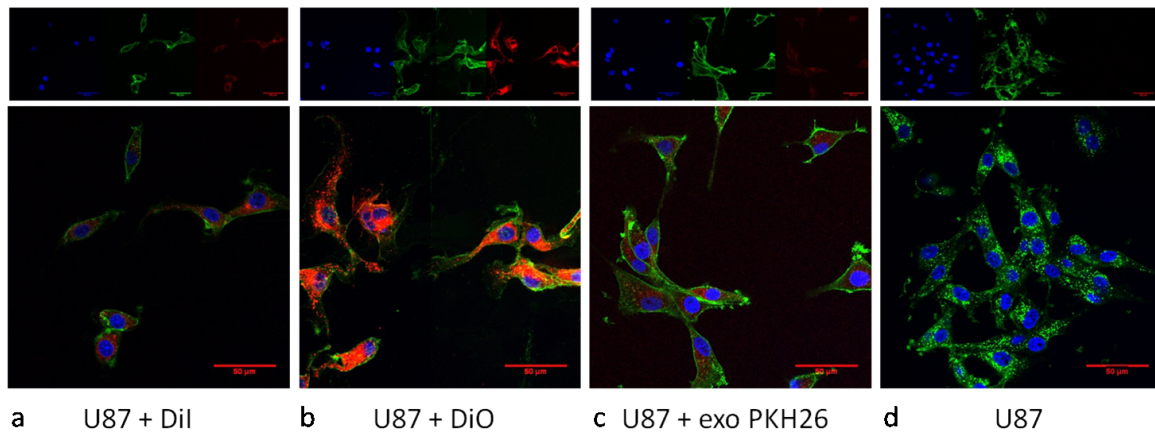


FIGURE 41 – Uptake d'exosomes de glioblastomes U87 et de Nanocapsule DiO et DiI par des cellules de glioblastomes

Les noyaux sont marqués en bleu, les membranes en vert et les exosomes et nanocapsules en rouge.

- a. Cellules de U87 incubées avec des Nanocapsules DiI
- b. Cellules de U87 incubées avec des Nanocapsules DiO
- c. Cellules de U87 incubées avec des exosomes de U87 marqués à la PKH26
- d. Cellules de U87 incubées avec du PBS ne contenant ni exosomes ni Nanocapsules

La figure 41 montre qu'après 24 h une fluorescence rouge est détectée à l'intérieur des cellules incubées avec des nanocapsules DiI (a) ou DiO (b), ou avec des exosomes marqués à la PKH26 (c). En comparaison de l'image des cellules n'ayant pas été mis en contact avec des nanocapsules ou des exosomes marqués (d). Il apparaît que les nanoparticules lipidiques DiI et DiO ainsi que les exosomes sont entrés dans le cytoplasme des cellules réceptrices.

Les nanoparticules DiO (b) semblent avoir été importées en très grandes quantités, ou

contenir plus de marqueur fluorescent ou avoir un meilleur rendement quantique que les nanoparticules DiI (a). Pour les nanocapsules DiO (b), l'enregistrement de pixels « jaunes » témoigne d'une colocalisation des nanocapsules (rouge) avec les membranes (vert). Les Nanoparticules DiO se retrouvent donc dans le cytoplasme et une petite proportion reste fixée sur la membrane. A l'inverse, ni les nanoparticules marquées DiI, ni les exosomes ne sont présents dans les membranes. Ces nanoparticules et exosomes sont exclusivement localisés à l'intérieur des cellules U87.

L'entrée des nanocapsules lipidiques DiO et DiI utilisées ici est très similaire à celle des exosomes de U87 ; l'entrée des nanocapsules DiI en étant la plus proche.

4.1.3 Cinétique d'entrée des exosomes dans les cellules réceptrices

Sachant maintenant que les exosomes ont la capacité d'entrer dans les cellules réceptrices au bout de 24h, il est important de s'intéresser à leur cinétique d'entrée. Pour cela environ 1000 exosomes de U87 colorés à la PKH67 (fluorescent dans le vert) ont été incubés par cellule HA ou U87 pendant différentes durées comprises entre 10 min et 48h. A la fin des incubations, les membranes des cellules ont été colorées au WGA Texas Red-X (fluoresce dans le rouge), puis les cellules fixées, et enfin les noyaux colorés au Hoechst (fluorescent dans le bleu). Les lames ont ensuite été observées au microscope confocal (Figures 42 et 43).

Les exosomes de U87 semblent entrer facilement aussi bien dans les cellules saines HA (Figure 42 a) que dans des cellules cancéreuses U87 (Figure 43) puisque quels que soient les temps d'incubation, la coloration verte témoignant de la présence des exosomes de U87 marqués à la PKH67 est détectée dans le cytoplasme des cellules.

Pour les cellules d'astrocytes humains, HA (Figure 42), cette internalisation commence déjà dès 10 min d'incubation des exosomes de U87 avec les cellules réceptrices. En effet la coloration verte portée par les exosomes marqués à la PHK67 est déjà visible dans le cytoplasme des cellules, bien que faiblement, à ce temps court d'incubation. L'intensité de la coloration augmente petit à petit avec l'augmentation du temps d'incubation. Par la suite, après plus de 36 h d'incubation la coloration s'estompe pour n'être que faiblement détectable à 48h d'incubation. Dans les cellules HA le traceur PKH67 et les exosomes sont probablement dégradés.

Pour les cellules U87 (Figure 43), l'internalisation commence aussi dès 10 min d'incuba-

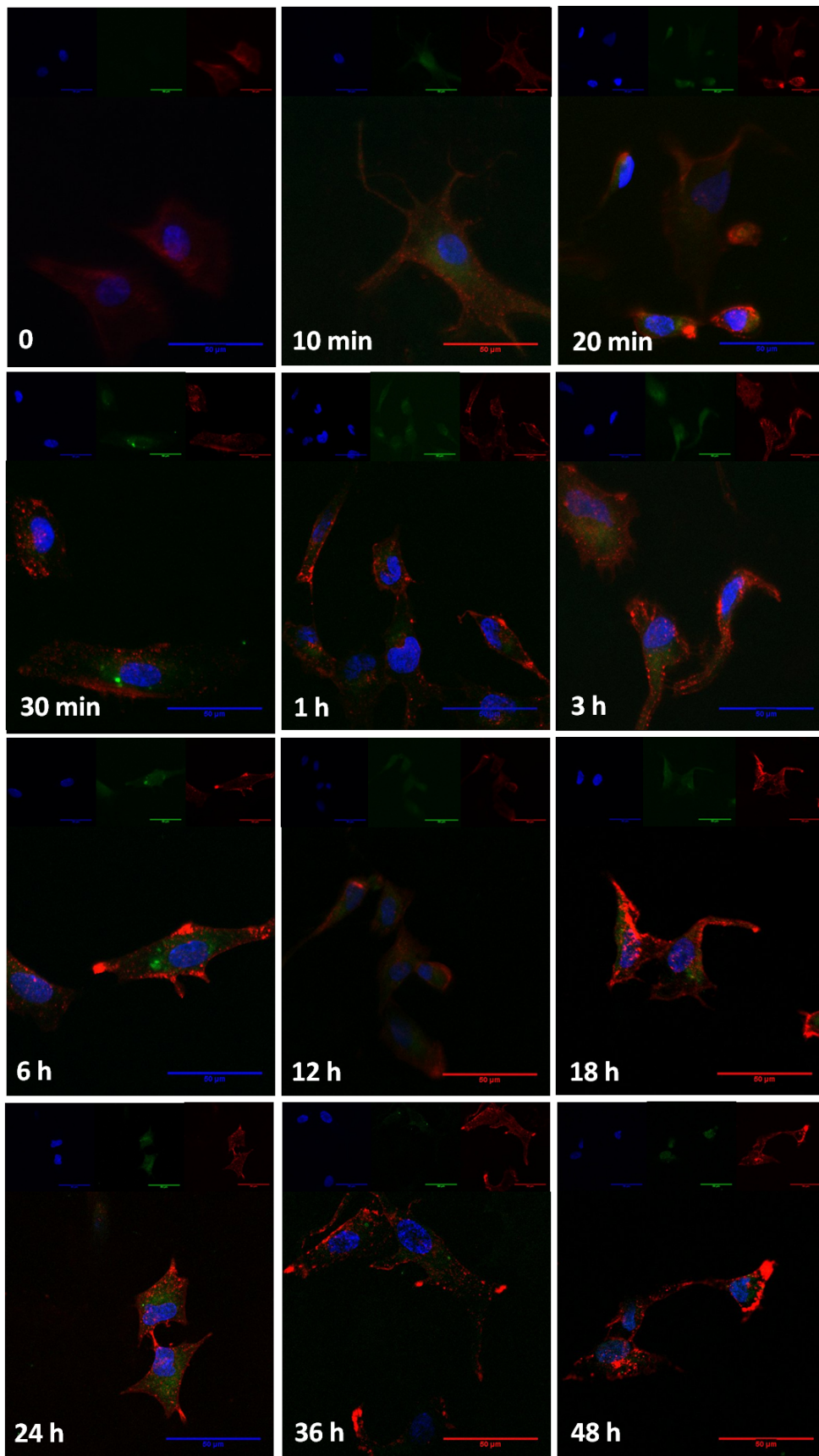


FIGURE 42 – Cinétique d’entrée des exosomes de U87 dans des cellules gliales HA
 Les noyaux sont marqués en bleu, les membranes en rouge et les exosomes en vert.

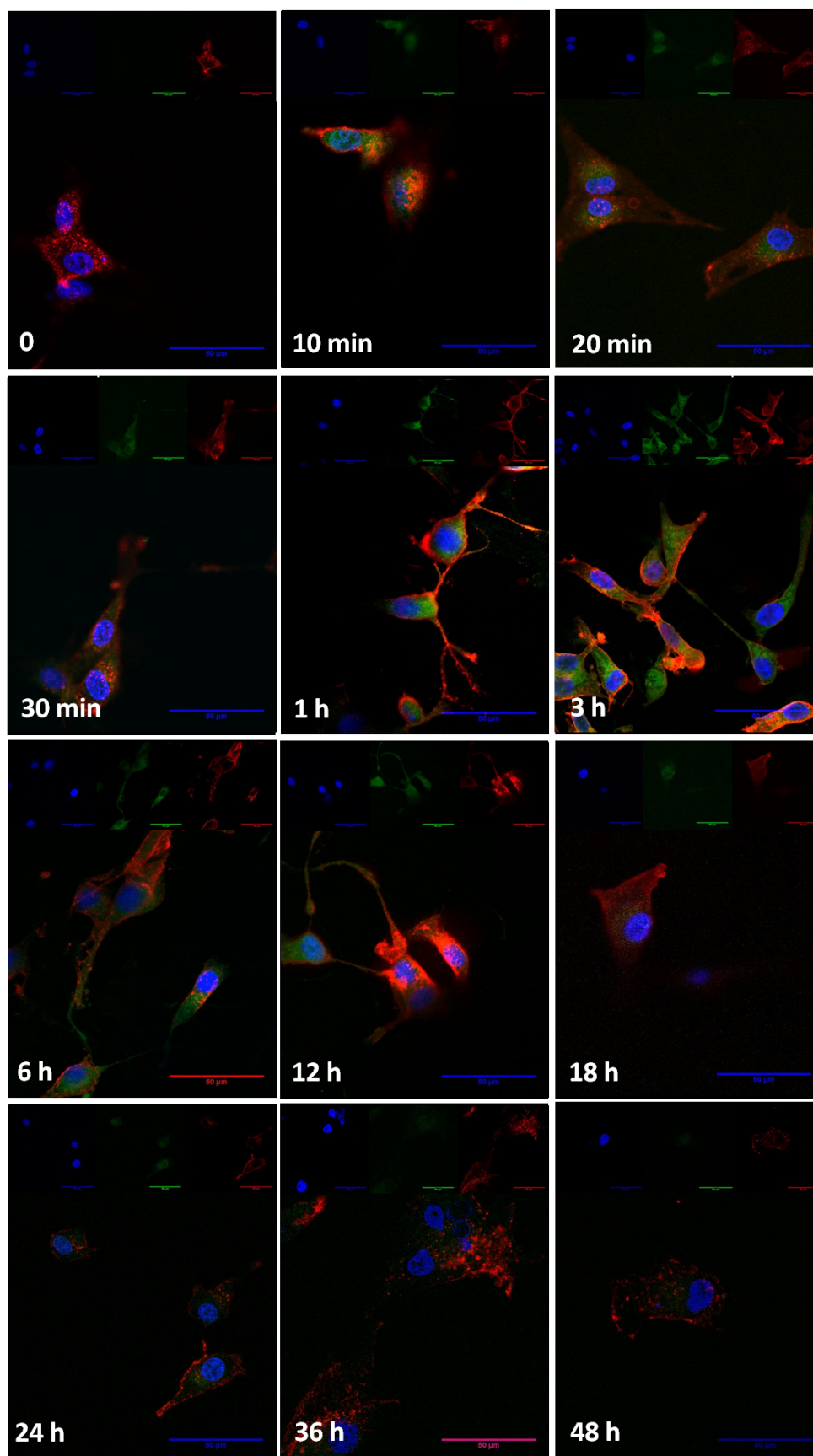


FIGURE 43 – Cinétique d'entrée des exosomes de U87 dans des cellules de gliomes U87
Les noyaux sont marqués en bleu, les membranes en rouge et les exosomes en vert.

tion. En revanche, contrairement aux cellules HA, pour lesquelles aucune coloration jaune n'est détectée quel que soit le temps d'incubation, pour les cellules de U87 une fluorescence jaune apparaît pour les temps d'incubation de 10 min à 6 h avec un maximum d'intensité entre 1h et 3h. Cette coloration jaune témoignant d'une colocalisation de la coloration verte des exosomes marqués au PKH67 et de la coloration rouge de la membrane plasmique de la cellule réceptrice, il apparaîtrait que les exosomes de U87 peuvent être présents à proximité de la membrane plasmique des cellules réceptrices U87, simplement adsorbés ou bien « entourés » de membrane plasmique. Pour des cellules HA, au contraire, les exosomes de U87 ne semblent pas être adsorbés sur la membrane plasmique mais être internalisés directement et être présents exclusivement à l'intérieur des cellules réceptrices. Dans le cas des cellules U87, les exosomes pourraient être adsorbés, endocytés ou phagocytés, mécanismes qui requièrent tous une proximité voire une interaction des membranes exosomales et cellulaires. Après 12h cette colocalisation n'apparaît plus et seule une coloration verte à l'intérieur des membranes plasmiques (rouge) subsiste. Les exosomes sont donc tous internalisés à ce temps d'incubation. Enfin, tout comme pour les HA, après 36h d'incubation la coloration verte s'estompe faisant penser à une évacuation de la PKH67 par les cellules.

4.2 Effets des exosomes tumoraux sur les cellules réceptrices

4.2.1 Recherche d'un effet proapoptotique *in vitro*

Les exosomes étant importés à l'intérieur des cellules voisines, il est primordial d'étudier les effets qu'ils pourraient y provoquer. La première question adressée ici est celle du caractère létal que pourraient manifester les exosomes une fois importés.

Les effets létaux potentiels des exosomes tumoraux de U87 sur les cellules réceptrices « normales » HA ont été testés en cytométrie en flux. Les cellules ont été incubées pendant 24h avec environ 1000 exosomes par cellule réceptrice.

Les exosomes de U87 n'ont pas d'effet majeur sur l'induction d'apoptose. Au contraire, si le taux basal d'apoptose des cellules HA est de 2,1% ; après une incubation de 24h avec des exosomes de U87, ce taux est de 0,9%, soit une diminution de 1,2% (Figure 44 a). Pour ce qui est du cycle cellulaire, s'il y a très peu de différence après incubation d'exosomes pendant 24h, la tendance est une diminution des pourcentages des phases S et G2M de 0,7% et de 1,6% respectivement ; et une augmentation du pourcentage de la phase GO/G1 de 2,3% (Figure 44 b).

Les exosomes tumoraux n'ont donc pas d'effet létal sur les cellules saines en culture.

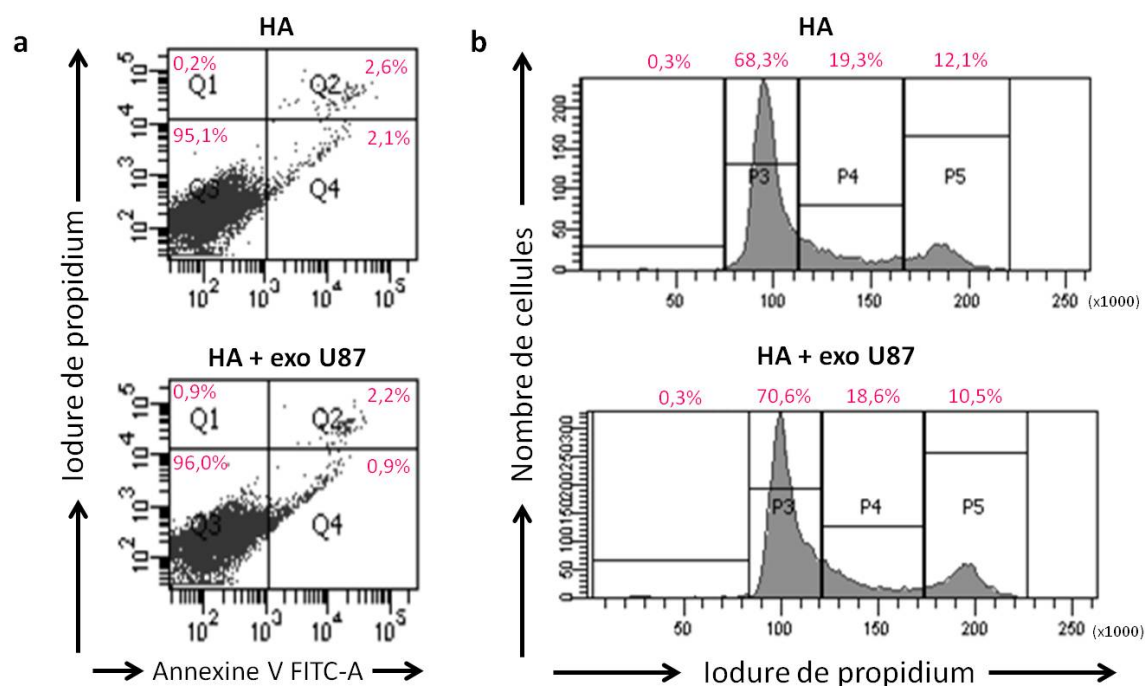


FIGURE 44 – Effets d’une incubation d’exosomes de U87 sur des cellules HA en culture
 a. Test apoptose, Cellules HA seules ou incubées avec des exosomes de U87 pendant 24h
 Q1 : Annexin-PI+ ; Q2 : Annexin+PI+ ; Q3 : Annexin-PI- ; Q4 : Annexin+PI-
 b. Cycle cellulaire, Cellules HA seules ou incubées avec des exosomes de U87 pendant 24h
 P2 : G0 ; P3 : G1 ; P4 : S ; P5 : G2-M

4.2.2 Recherche d’un effet des exosomes *in vivo*

Une première expérimentation préliminaire a été menée *in vivo*, des exosomes de glioblastomes ont été injectés en intracérébral chez des souris immunodéprimées (souris nues). Aucun effet notable n’a été remarqué : pas de changement de durée de survie et aucune mort prématurée n’est survenue ; pas de changement visible sur coupes histologiques des cerveaux post mortem, ni apparition de tumeur, ni début de vascularisation.

Les exosomes tumoraux ne semblent donc pas avoir la capacité ni de créer d’effet létal sur les cellules voisines, ni de déclencher l’apparition d’une tumeur *de novo* suite à une unique injection d’exosomes dans le parenchyme sain.

4.3 Les exosomes de glioblastomes affectent le miRnome des cellules réceptrices

Sachant que les exosomes sont internalisés dans les cellules HA et U87, il est important de s’attacher à observer les effets éventuels que ces exosomes de U87 pourraient avoir sur les

cellules réceptrices. Les exosomes produits en 24h par des cellules U87 sont récoltés et mis en contact avec les cellules HA ou U87 à raison d'environ 1000 exosomes par cellules réceptrices. Pour comparer les effets d'une internalisation d'exosomes contenant des microARN et ARNm à une internalisation de composés lipidiques n'en contenant pas, des nanocapsules lipidiques fluorescentes DiO (cf page 135) ont été mises en contact avec des cellules U87 et HA à hauteur de 1000 nanocapsules lipidiques par cellule réceptrice en remplacement des exosomes. Au contraire, pour observer les effets d'une internalisation d'ARN sans exosomes, les cellules HA ont aussi été incubées pendant 24h avec des exosomes de U87 lysés. Pour faciliter l'entrée des ARN libérés par la lyse des exosomes, un agent de transfection (AT) est ajouté. Ces effets spécifiques sur le miRnome des cellules réceptrices sont donc aussi testés.

Les cellules incubées sont récupérées au bout de 24 h pour s'assurer que les exosomes, nanocapsules lipidiques et ARN soient bien internalisés par les cellules à analyser. Les profils microARN des cellules réceptrices sont ensuite analysés sur puces Affymetrix microARN v3 (Figures 45 et 46).

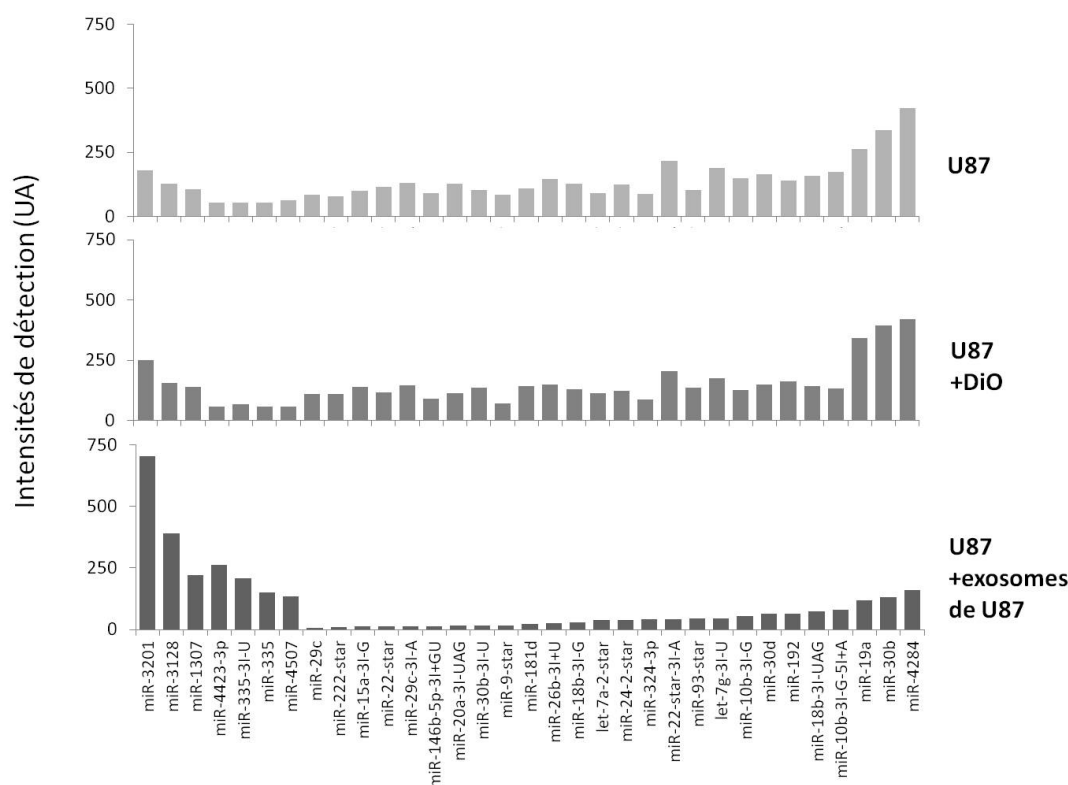


FIGURE 45 – Effets d'une incubation d'exosomes de U87 sur le miRnome des cellules U87 en culture. Seuls les microARN dont l'expression est affectée en présence d'exosomes de U87 sont représentés.

En gris, du plus clair au plus foncé, sont représentées les intensités de détection des microARN détectés dans les U87 seules, les U87 incubées avec des nanocapsules lipidiques DiO, ou les U87 mises en contact avec les exosomes de U87.

	miR-4270	miR-4463	miR-149-star
HA	196	166	1102
HA + AT	184	115	988
HA + DiO	109	138	813
HA + AT + ARN libres	73	79	633
HA + exosomes de U87	78	74	529

FIGURE 46 – Effets d’une incubation d’exosomes de U87 sur le miRnome des cellules HA en culture. Seuls les microARN dont l’expression est affectée en présence d’exosomes de U87 sont représentés.

Les valeurs d’intensités de détection de 3 microARN sur la puce Affymetrix sont rapportées. Les colorations de vert, du plus clair au plus foncé, suivent les variations d’intensités de la plus faible à la plus élevée. AT= Agent de Transfection.

Les cellules U87 semblent les plus affectées par l’incubation d’exosomes de U87 avec l’expression de 33 microARN affectés sur 366 microARN détectés (soit 9%) (Figure 45). Pour les cellules HA, l’expression de 3 microARN seulement est affectée sur 399 microARN détectés (soit un peu moins de 1%) (Figure 46).

Parmi ces 36 microARN dont l’expression est modifiée suite à l’ajout d’exosomes de U87 (33 dans les cellules U87, 3 dans les cellules HA), 29 appartiennent au sous-ensemble de 314 microARN communs aux cellules U87 et aux cellules HA et 3 microARN (miR-192, miR-10b-3I-G et miR-10b-3I-G-5I+A) appartiennent au sous-ensemble des 52 microARN qui ne sont détectés que dans les U87 (Figure 29 a). Le microARN let-7a-star n’était pas détecté sur des versions v2 des puces Affymetrix mais est détecté sur des puces v3. Enfin, les 3 microARN miR-4423-3p, miR-4507 et miR-4463 sont des microARN récemment découverts et pour lesquels il n’existait pas de probesets sur des puces Affymetrix v2.

Pour les cellules U87 (Figure 45), 7 microARN sont surexprimés lors de l’incubation des exosomes de U87 et 26 sont sousexprimés. Pour tous ces microARN les effets des nanocapsules lipidiques DiO sont négligeables. Aussi les effets observés proviennent des exosomes et/ou de leur contenu en ARN. Deux des microARN, les miR-3201 et miR-3128, dont l’expression est augmentée d’un facteur 3 environ par l’ajout d’exosomes sont des miR présents dans ces mêmes exosomes de U87. Cependant la quantité d’ARN transférée du contenu exosomal de U87 dans le cytoplasme de ces cellules U87 n’est pas suffisante pour expliquer une telle augmentation de détection dans les cellules incubées avec des exosomes de U87.

Pour les cellules HA (Figure 46) seules les expressions de trois microARN sont affectées, les microARN miR-4463, miR-149-star et miR-4270. Les expressions de ces microARN ne sont que peu affectées par la présence de nanocapsules DiO ou d’agent de transfection (AT),

elles diminuent cependant en présence d'exosomes de U87 ou de leur ARN libres. L'expression de ces 3 microARN semble donc régulée par le contenu microARN des exosomes autant que par l'entité exosome.

Il est alors intéressant de noter que deux de ces microARN, miR-149-star et miR-4270, sont présents dans le contenu des exosomes de U87 et qu'ils ont donc été transmis aux cellules sécrétrices. Il est alors curieux d'observer une diminution de ces microARN au sein des cellules réceptrices après qu'elles aient été incubées avec des exosomes contenant ces microARN là.

IV Discussion

1 Les microARN peuvent-ils être de bons biomarqueurs pour aider au diagnostic des gliomes ?

La classification des gliomes en oligodendrogliomes ou en glioblastomes pose encore quelques problèmes. Comme les traitements administrés aux patients diffèrent grandement entre glioblastomes et oligodendrogliomes, la justesse du premier diagnostic est prépondérante. Le diagnostic de départ se doit donc d'être le plus véridique possible pour donner en première intention le meilleur traitement pour le patient en question. Pour apporter plus de précision à ce diagnostic, l'étude des microARN peut se révéler utile. Plusieurs études mettent déjà en évidence une différence d'expression de certains microARN entre les tissus cancéreux de gliomes et les tissus cérébraux sains. Certaines études portant sur le diagnostic des astrocytomes (Ciafrè *et al.*, 2005; Lavon *et al.*, 2010), d'autres sur les oligodendrogliomes (Li *et al.*, 2013b; Silber *et al.*, 2008), mais très peu s'intéressent réellement à la distinction oligodendrogliomes versus glioblastomes de la manière dont nous l'avons fait au laboratoire (Lages *et al.*, 2011, Brevets cf page 100). Les microARN peuvent alors jouer un rôle de biomarqueurs tissulaires et aider au diagnostic à partir de tissus prélevés grâce à une exérèse ou à une biopsie.

Ce type de diagnostic est donc invasif, et dans le cas des cancers du SNC, très invasif voire, dans certains cas, impraticable du fait de la localisation de la tumeur. C'est de plus un examen très impressionnant pour le patient par le simple fait qu'il faille s'introduire dans son cerveau.

Pour rendre ce diagnostic plus aisé, moins impressionnant pour le patient et moins invasif, des biomarqueurs sanguins seraient l'idéal.

Les microARN peuvent être récoltés dans le sang circulant du patient, intègres, car protégés par des protéines (Turchinovich *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2010). Ces deux dernières années quelques équipes se sont penchées sur la question d'un diagnostic des gliomes à partir d'un prélèvement sanguin. L'une de ces équipes propose l'utilisation du microARN mir-21 en tant

que biomarqueur sanguin de gliomes car ce microARN est retrouvé très fortement surexprimé dans le sang des patients atteints d'un gliome (Ilhan-Mutlu *et al.*, 2012). Le souci à mon sens est que le microARN miR-21 est certes un très bon biomarqueur sanguin de cancers, mais de cancers en général et n'est absolument pas spécifique d'un cancer du cerveau. Le microARN miR-21 est en effet très surexprimé dans grands nombres de cancers dont les gliomes, et il est aussi retrouvé dans le sang de patients atteints d'un cancer colorectal (Menéndez *et al.*, 2013), ou du sein (Kumar *et al.*, 2013) à titre d'exemple. L'information sera donc que le patient présente un cancer. En revanche, quel type de cancer ? Là restera la question.

Deux autres équipes proposent d'autres biomarqueurs sanguins sous forme de microARN. Une augmentation de miR-21 associée à une diminution de miR-128 et miR-342-3p serait prédictive d'un astrocytome, et plus la quantité de miR-128 et miR-342-3p serait diminuée, plus le grade de cet astrocytome serait haut (Wang *et al.*, 2012). Une autre équipe propose 7 biomarqueurs dont la présence ne serait plus détectée dans le sang des patients atteints d'un glioblastome (Yang *et al.*, 2013). Aucun de ces biomarqueurs sanguins décrits n'est un des microARN des brevets de l'équipe.

Ces deux équipes se basent donc sur une absence de certains microARN « normaux » dans le sang circulant, plutôt que sur la recherche de microARN « tumoraux » en excès. Est-ce que parmi les microARN libres circulants, les microARN « tumoraux » intègres sont présents en petites quantités, ou bien est-ce que les microARN de gliomes passent difficilement la barrière hémato encéphalique (BHE) ?

Pour s'assurer de l'intégrité des microARN sanguins utilisés pour le diagnostic, une solution serait de rechercher les microARN biomarqueurs dans les exosomes circulants. La membrane exosomale protège en effet les microARN transportés au sein de ces vésicules (Turchinovich *et al.*, 2011; Wang *et al.*, 2010). L'avantage des exosomes dans le cadre du diagnostic du cancer du cerveau est qu'ils ont la capacité de franchir la BHE (Alvarez-Erviti *et al.*, 2011) et que les exosomes de gliomes contenant les biomarqueurs de gliomes potentiels seraient donc présents dans le sang circulant.

Un autre avantage souvent mis en avant pour l'utilisation des exosomes circulants comme vecteurs de biomarqueurs diagnostiques est le fait que les cellules cancéreuses produiraient plus d'exosomes que les cellules saines ; par exemple dans le cancer de l'ovaire (Gercel-Taylor *et al.*, 2012). Il y aurait donc plus d'exosomes présents dans le sang des patients atteints d'un cancer et plus de biomarqueurs à portée de main. De plus les contenus exosomaux seraient le reflet des cellules productrices (Skog *et al.*, 2008), et les exosomes de cellules cancéreuses auraient un contenu microARN qui diffère des exosomes normaux (Palma *et al.*, 2012; Pigati *et al.*, 2010) ; ainsi, les exosomes sanguins récoltés devraient pouvoir révéler les profils dérég-

guls des cellules cancéreuses dont ils sont issus.

Dans notre cas, les exosomes ne contiennent qu'une très petite sous-population des microARN cellulaires et ne sont donc pas le reflet de leur cellule d'origine. En outre, aucun des microARN biomarqueurs tissulaires définis au laboratoire (Lages *et al.*, 2011, Brevets cf page 100) n'est détecté dans les exosomes. De plus, si les cellules en culture de gliomes *in vitro* produisent de grandes quantités d'exosomes, les cellules en culture *in vitro* d'astrocytes sains en produisent des quantités comparables. Il ne devrait donc pas y avoir plus d'exosomes de glioblastomes que d'exosomes normaux dans le sang des patients cancéreux. Comme toutes les cellules produisent des exosomes, les exosomes sanguins produits par les gliomes seraient alors perdus dans la masse d'exosomes sanguins normaux et toute dérégulation de leur contenu serait sans doute masquée par le poids des contenus normaux. D'autant plus que les contenus microARN des exosomes produits par les cellules cancéreuses U87 et les cellules saines HA ne contiennent que des microARN à la fois détectés dans les deux types cellulaires, et que 18 de ces microARN exosomaux (soit 70%) sont communs aux exosomes cancéreux et aux exosomes sains.

Cependant, 30% du contenu exosomal reste spécifique des exosomes cancéreux ou tumoraux et les profils des microARN exosomaux sont très différents entre exosomes tumoraux et sains. Un diagnostic basé sur des microARN exosomaux reste en principe envisageable. Des biomarqueurs microARN présents dans les exosomes, et indicateurs de tumeurs, devront alors être identifiés à nouveau dans ces vésicules puisque les microARN biomarqueurs tissulaires déjà reconnus ne sont pas sécrétés dans les exosomes. Pour s'assurer d'une meilleure efficacité du diagnostic il faudrait trouver un moyen de distinguer les exosomes tumoraux circulants des autres exosomes normaux circulants. Peut-être grâce à un marqueur protéique spécifique, marqueur qu'il faudra tout d'abord identifier car aucun n'est encore connu à ce jour.

Un autre moyen de s'affranchir de trop de contaminations et de concentrer les biomarqueurs potentiels des gliomes serait de s'intéresser à un autre fluide biologique que le sang. Dans le cas de gliomes le liquide céphalo-rachidien semble être une possibilité. De plus, des microARN biomarqueurs de gliomes ou de cancer tels que les microARN miR-10b, miR-15b et miR-21 ont été retrouvés enrichis dans les liquides céphalo-rachidiens de patients présentant un gliome (Baraniskin *et al.*, 2011; Teplyuk *et al.*, 2012). Des exosomes porteurs de biomarqueurs de glioblastomes semblent aussi y être présents (Balaj *et al.*, 2011).

Finalement, quel que soit le fluide biologique choisi pour la recherche de biomarqueurs, les objets étudiés : microARN libres, exosomaux, microvésiculaires ou la totalité de ces 3 sous-populations ainsi que les techniques de dosage devront être bien définies et standardisées afin d'éviter tout risque de biais dans les futurs diagnostics (Inal *et al.*, 2013).

2 Quelle est la composition en microARN des exosomes de cellules saines et quelles sont les différences majeures avec celle des exosomes de tumeurs gliales ?

Etant donné le mode de formation des exosomes, une partie du cytoplasme est emportée à l'intérieur des ILV, et se retrouve sécrétée dans les exosomes. Les exosomes contiennent donc une fraction du contenu cellulaire. De ce fait de nombreuses équipes se sont penchées sur l'analyse de la composition des exosomes afin de déterminer s'ils reflétaient la composition de la cellule d'origine.

Etudier le contenu des exosomes exige de définir les protocoles expérimentaux précis pour s'affranchir de tout élément extérieur qui viendrait perturber l'analyse. Pour toutes les expériences réalisées *in vitro*, un paramètre est communément admis : la nécessité de se débarrasser de la présence des exosomes contenus dans le SVF. Certaines équipes choisissent d'éliminer les exosomes du SVF en réalisant une ultracentrifugation du SVF, d'autres choisissent simplement de récolter des exosomes produits dans un milieu de culture sans SVF. Pour s'assurer qu'aucun exosome de SVF ne soit présent dans le milieu de culture, nous avons opté pour la deuxième option, les cellules sont donc privées de SVF pendant toute la durée de production des exosomes. Cependant sevrer des cellules en SVF n'est pas complètement anodin et les conditions de collecte des exosomes *in vitro* doivent être validées.

Une autre équipe s'est penchée sur cette question de privation de SVF et a obtenu des résultats étonnants. Ils se sont intéressés à différents types de cellules dont des cellules d'hépatocytes, d'adénocarcinomes ou encore de glioblastomes T98. Après privation de SVF la quantité de certains microARN est fortement augmentée dans le milieu extracellulaire, à la fois à l'intérieur et à l'extérieur des vésicules et atteint un maximum au bout d'une heure de sécrétion. Elle diminue ensuite progressivement jusqu'à se stabiliser aux alentours de 24h de production. A l'inverse l'expression cellulaire de ces microARN subit une diminution forte

atteignant un minimum au bout de 1h de privation de SVF pour ensuite se stabiliser aux alentours de 24h de production sécrétion (Wang *et al.*, 2010).

Si dans notre cas aussi l'expression de certains microARN cellulaires est augmentée après 24h de production par rapport à une production de 1h ; leur sécrétion exosomale, elle, ne semble pas affectée puisque seuls 2 microARN sont plus abondants dans les exosomes collectés à 24h par rapport à 1h. La sécrétion majeure de microARN décrite par l'équipe Wang *et al.* (2010) serait peut-être alors réalisée sous forme d'ARN libres ou microvésiculaires mais ne serait pas médiée par les exosomes.

Quoi qu'il en soit une récolte après 24h de privation de sérum semble toute indiquée.

Les exosomes récoltés, la problématique technique suivante concerne l'extraction de leurs ARN. En effet, d'après une étude menée récemment, le kit commercial d'extraction d'ARN utilisé pourrait affecter les quantités d'ARN récoltées (Eldh *et al.*, 2012). Aussi une méthode alliant une séparation par phase phénol et une purification sur une seule colonne de type MirVana aurait tendance à enrichir la quantité d'ARN courts et de diminuer la quantité d'ARN longs récoltés dans une fraction totale d'ARN.

Dans notre protocole expérimental, nous avons choisi de séparer les fractions d'ARN courts des fractions d'ARN longs. Pour cela nous réalisons une extraction à l'aide du kit MiRvana et nous séparons les ARNs longs des ARNs courts. Ils sont élués sur deux colonnes séparées, et sont ainsi récoltés dans deux fractions différentes. Tout enrichissement d'ARN courts par rapport à des ARN longs est ainsi évité. Les rendements d'extractions pourraient tout de même être différents et c'est pourquoi aucune comparaison de quantités d'ARN n'est réalisée entre les microARN exosomaux et les ARNm exosomaux.

Ces dernières années, de nombreuses équipes se sont penchées sur le contenu ARN des exosomes. Beaucoup d'entre elles se focalisent sur les microARN et les ARNm dont les structures et rôles respectifs sont bien connus. Avec le temps, de nouvelles techniques d'exploration ont vu le jour, et permettent d'aller plus loin dans l'analyse du contenu exosomal. Le séquençage haut débit a ainsi révélé l'existence de toute une multitude de petits ARN.

Appliquée au contenu des exosomes, cette technique a mis en lumière la richesse de la composition en ARN des exosomes et décrit la présence d'une multitude d'ARN de tailles et de fonctions différentes tels que des microARN, des ARN vault, des ARNt, ARN Y, snoARN et scaARN (Nolte-t Hoen *et al.*, 2012) . Dans notre étude, le contenu des exosomes détaillé dans les résultats ne fait volontairement état que des microARN et des ARNm. Cependant,

le fait d'avoir réannoté les puces Affymetrix avec lesquelles nous travaillons nous a donné la possibilité d'accéder à la détection d'une multitude de séquences n'étant pas des microARN. Nous retrouvons ainsi dans les exosomes des cellules astrocytaires saines et cancéreuses des microARN, des isomiR, des vault-ARN, des ARNt mais aussi des ARNm, des fragments de Y-ARN ou d'ARNr (Figure 47). Une telle diversité de types d'ARN présents dans les exosomes permet de supposer que les exosomes contiennent peut-être aussi des ARN comportant des changements post-transcriptionnels qui feraient qu'il est impossible de les doser par des méthodes traditionnelles.

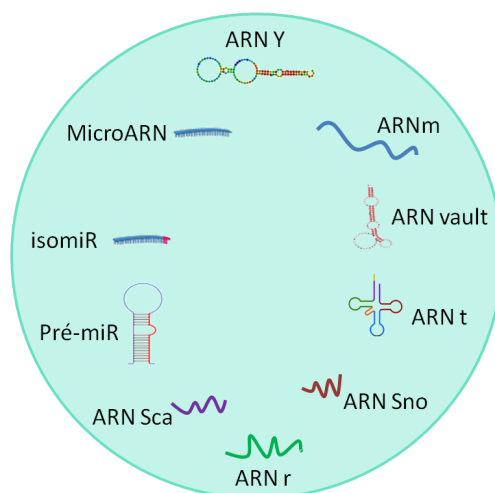


FIGURE 47 – Types d'ARN détectés dans les exosomes

ARN r : ARN ribosomique ; ARN sca : small Cajal body-specific ARN ; ARN sno : small nucleolar ARN ; ARN t : ARN de transfert ; ARN vault : ARN ayant un rôle dans la résistance aux traitements de par leur interaction avec les complexes ribonucléoprotéiques Vault ; ARN Y : petits ARN composant le complexe ribonucléoprotéique Ro.

Durant ces 6 dernières années, suite à la découverte d'un contenu ARN dans les exosomes (Valadi *et al.*, 2007), les contenus en ARN et protéines des exosomes produits par des cellules de types très différents ont été étudiés. Il apparaîtrait alors que dans le cas de cancer, les contenus cellulaires et exosomaux ne seraient pas toujours identiques (Kogure *et al.*, 2011). Les contenus en microARN des exosomes cancéreux ont été étudiés pour différents types de cancer et les listes comparées (Chen *et al.*, 2012; Hu *et al.*, 2012). Cependant, parmi tous les microARN que nous retrouvons dans les exosomes de cellules HA ou U87 (figure 30), 10 microARN ont été décrits comme détectés dans les exosomes d'autres types cellulaires : les microARN miR-100, let-7b, miR-638, miR-1915, miR-23a, miR-320a miR-1246, miR-663, miR-149-star et miR-1275.

Les miR-100 et let7b ont déjà été décrits comme présents dans les exosomes de cellules de carcinome du rein par l'équipe de Grange *et al.* (2011).

9 de ces 10 microARN (tous exceptés le miR-100) ont été décrits dans les exosomes de cellules du cancer du sein (Palma *et al.*, 2012; Pigati *et al.*, 2010). Dans ce type cellulaire, les miR-638, miR-1915, miR-23a, miR-320a et let-7b semblent exprimés de manière constante entre les exosomes et les cellules qui les produisent et les miR-1246, miR-663, miR-149-star et miR-1275, eux, seraient sélectivement sécrétés dans les exosomes.

Dans notre cas, nous ne faisons pas état d'enrichissement de microARN dans les exosomes par rapport au contenu cellulaire. Il nous semble en effet délicat de comparer des quantités d'ARN cellulaires à des quantités d'ARN exosomales, nous parlons donc de microARN détectés. Aussi, dans notre étude, ces 9 microARN ont été détectés à la fois dans les cellules d'astrocytes sains (HA) et cancéreux (U87). En revanche, nous pouvons comparer le contenu microARN dans les exosomes sains comparés au contenu microARN dans les exosomes cancéreux. Nous observons alors le miR-1246, miR-1275 et miR-320a qui seraient plus exprimés dans les exosomes normaux que dans les exosomes cancéreux. Le miR-23a serait en quantités identiques. Quant aux miR-638, miR-1915, miR-149-star, et miR-663, ils seraient, eux, plus présents dans les exosomes cancéreux que dans les exosomes normaux. Dans l'étude précédente concernant le cancer du sein, seule l'expression du miR-1246 diffèrerait entre les deux types d'exosomes. Contrairement à ce que nous observons, il serait plus présent dans les exosomes cancéreux que dans les exosomes sains. Ce résultat contradictoire pourrait sans doute s'expliquer par la différence de type cellulaire.

Si nous comparons maintenant les microARN détectés en commun avec deux autres études concernant les microARN dans les exosomes de glioblastomes en culture de lignées U87 (Skog *et al.*, 2008) ou U251 (Li *et al.*, 2013a), aucun n'est retrouvé en commun pour toutes ces études et aucun n'est commun entre l'étude de Skog *et al.* (2008) et notre étude. Deux microARN exosomaux sont communs entre ces deux études, miR-21 et miR-15b, mais ne sont pas détectés par notre technique de dosage Affymetrix, et enfin 4 sont communs entre notre étude et celle de Li *et al.* (2013a) (miR-23a, miR-100, let-7b et miR-1246) (Figure 48).

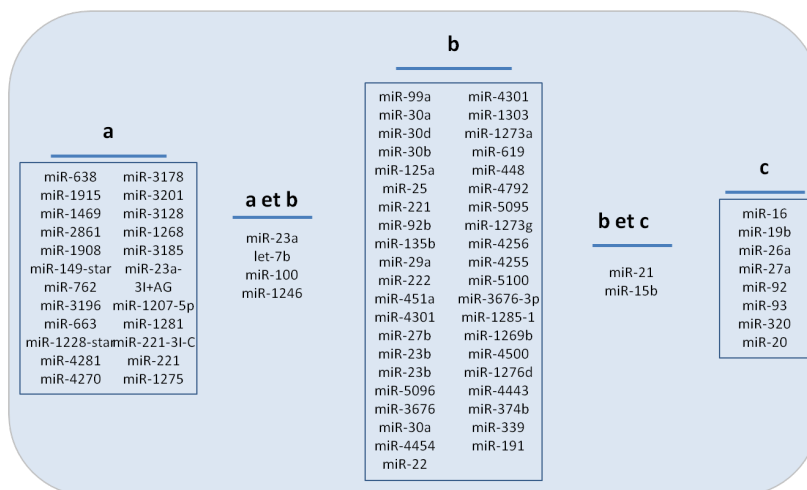


FIGURE 48 – MicroARN détectés dans les exosomes de Glioblastomes en culture
a. Notre étude; b. étude de Li *et al.* (2013a); c. étude de Skog *et al.* (2008)

A l'aide d'IPA (Ingenuity Pathway Analysis) nous avons recherché quelles étaient les cibles potentielles des microARN contenus dans les exosomes, les cibles les plus vraisemblables et le réseau qu'elles forment sont représentés sur la figure 49.

Il est intéressant de noter qu'a priori, aucun des ARNm empaquetés dans les exosomes ne serait la cible directe des microARN eux aussi embarqués dans les exosomes. Cette information prend tout son sens si nous considérons les exosomes comme des vecteurs de communication. En effet quel serait alors l'intérêt d'embarquer dans les exosomes à la fois un ARNm fonctionnel et le microARN empêchant son expression ?

Des 33 microARN détectés dans les exosomes des cellules HA ou U87, seuls 14 sont reconnus par IPA pour avoir des cibles. Pour cette étape, IPA se base sur les données de plusieurs bases de données *in silico* recensant les cibles potentielles des microARN, dont PicTar et TargetScan. Parmi les cibles potentielles de ces 14 microARN exosomaux de HA et U87 sont retrouvées des ARNm codant pour des protéines intervenant dans des voies moléculaires activées dans la plupart des cellules cancéreuses telles que mTor, PIK3 ou CDK. L'ARNm codant pour EEF1A1, présent dans les exosomes, n'est pas une cible directe des microARN exosomaux mais interagirait avec MRM1 dont l'ARNm est, lui, une cible directe. D'autres protéines sont impliquées dans la formation des exosomes, Vsp37D (page 53).

Les microARN étant en quantité plus importante dans les exosomes de U87 par rapport aux exosomes de HA sont indiqués en rose sur la figure 49). Ces 8 microARN (miR-3178, miR-2861, miR-762, miR-1908, miR-4281, miR-1915, miR-3185, miR-4270) ciblent essentiellement des protéines transmembranaires ou ayant un rôle dans le transport comme par exemple CLCN7 qui est une protéine constituante des « channels chlorides », ou TMEM120B protéine

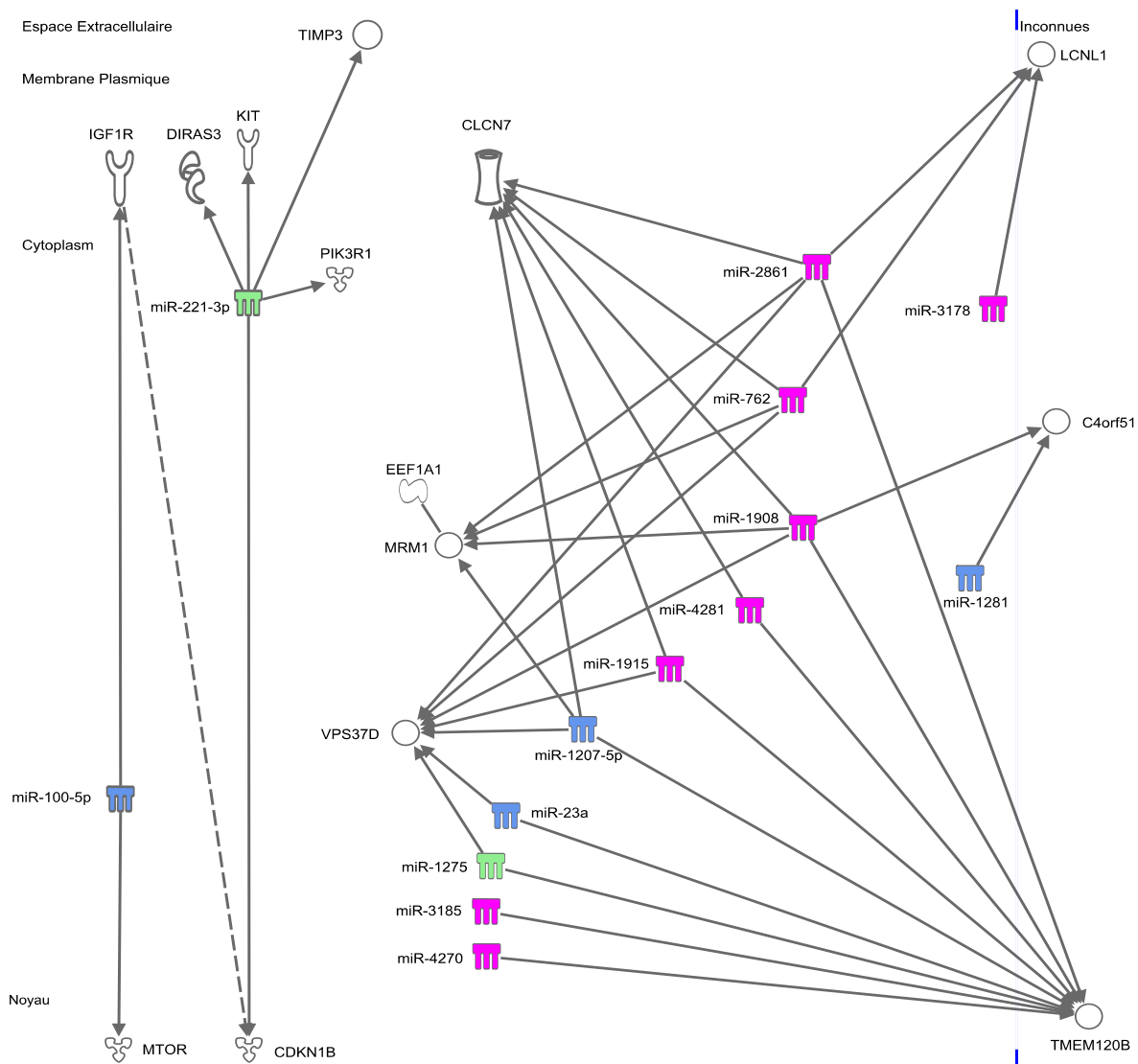


FIGURE 49 – Cibles les plus vraisemblables des microARN exosomaux

En rose, les microARN plus présents dans les exosomes de U87, en vert les microARN plus présents dans les exosomes de HA et en bleu les microARN présents en quantités égales dans les exosomes de HA et de U87.

C4orf51 : Chromosome 4 open reading frame 51 ; CDKN1B : Cyclin-Depent Kinase Inhibitor P27 ; CLCN7 : Chloride Channel, Voltage-sensitive 7 ; DIRAS3 : DIRAS Family, GTP-binding RAS-like 3 ; EEF1A1 : Eukaryotic translation Elongation Factor 1 Alpha 1 ; IGF1R : Insulin-like Growth Factor 1 Receptor ; KIT : Plasma Membrane transmembrane receptor dasatinib ; LCNL1 : Lipocalin-like 1 ; MRM1 : Mitochondrial rRNA Methyltransferase 1 ; mTOR : mammalian Target Of Rapamycin ; PIK3R1 : Phosphoinositide-3-Kinase, Regulatory subunit 1 ; TIMP3 : metallopeptidase inhibitor 3 ; TMEM120B : Transmembrane protein 120B unknown ; VPS37D : Vacuolar Protein Sorting 37 homolog D

Inconnues : localisations sub-cellulaires non définies pour LCNL1, C4orf51 et TMEM120B

membranaire dont le rôle exact est encore inconnu. Une autre de leurs cibles potentielles est MRM1, une méthyltransférase mitochondriale qui serait capable de s'associer à EEF1A1 dont le messager est véhiculé dans les exosomes.

Les exosomes d'astrocytes sains et cancéreux contiennent donc tous deux, bien que dans des proportions variables, des microARN qui cibleraient des ARNm codant pour des oncopro-

téines. Nous pouvons alors nous interroger sur la possibilité que ces microARN soient sécrétés par les cellules HA car inutiles, le messenger en question n'étant pas présent ; et sécrétés par les cellules U87 pour autoriser l'expression de ces oncoprotéines ? Quant aux 8 microARN "roses", fortement présent dans les exosomes de U87, ils auraient alors éventuellement la possibilité de contrôler l'expression de ces protéines cibles dans des cellules réceptrices si tant est que leurs contenus en ARN y est déversé.

Toujours à l'aide d'IPA nous avons recherché quelles pouvaient être les fonctions potentielles des ARNm présents dans les exosomes. Les 3 principales fonctions représentées par ces ARNm sont liées au cancer ou à la profération cellulaire (tableau 5).

EIF2 Signaling	RPS6,RPS4X,RPL37A,RPL39,RPL32,RPL9,RPS20 (214003), RPLP0,RPLP1,RPL41
Regulation of eIF4 and p70S6K Signaling	RPS6,RPS4X,RPS20 (214003)
mTOR Signaling	RPS6,RPS4X,RPS20 (214003)

TABLE 5 – Fonctions canoniques des ARNm exosomaux

Les deux premières, sont des voies de contrôle de l'expression des facteurs de transcription, dont EIF2 qui joue un rôle prépondérant dans l'activation du cycle cellulaire et donc dans l'étape de déclenchement de la prolifération cellulaire. La dernière concerne l'expression de l'oncoprotéine mTOR (voir p 28). Les ARNm transportés dans les exosomes d'astrocytes sains et cancéreux seraient potentiellement actifs dans des processus menant à la tumorigénèse.

D'après IPA, 13 des 18 ARNm exosomaux que nous détectons dans les exosomes de HA et de U87 appartiennent au réseau "Cancer" comprenant 33 acteurs et représenté sur la figure 50. Ces 13 ARN messagers exosomaux seraient donc impliqués dans l'expression de protéines appartenant à un réseau de protéines jouant un rôle important dans le processus de tumorigénèse telles que p53, myc, ou encore KRAS. Mise à part ANP32B, toutes ces protéines sont des protéines cytosoliques, et les ARNm codant pour celles-ci seraient donc traduits dans le cytoplasme. Comme de plus beaucoup de ces protéines semblent interagir par des liaisons protéine- protéine, il est possible que ces ARNm soient traduits à proximité les uns des autres, et seraient donc tous proches les uns des autres ce qui permettrait de les encapsuler facilement tous ensembles dans les exosomes.

Ici beaucoup de protéines sont colorées en vert, ce qui signifie que les ARNm qui codent pour celles-ci sont détectés en de bien plus grandes quantités dans des exosomes de HA. Les exosomes de HA comporteraient donc plus d'ARNm parmi les ARN longs que les exosomes de U87. Au contraire, dans la population d'ARN courts les exosomes de U87 sembleraient contenir plus de microARN que les exosomes de HA.

En conclusion, le contenu ARN des exosomes de HA est différent de celui des exosomes de U87. De plus, les contenus en ARN des exosomes diffèrent des contenus cellulaires puisque seule une sous-population d'ARN est empaquetée dans les exosomes. Le contenu en ARN des exosomes est donc sans doute régulé par un mécanisme actif qui ne permet pas à n'importe quel ARN d'être internalisé dans un exosome mais permet une sélection des ARN qui doivent être sécrétés hors de la cellule.

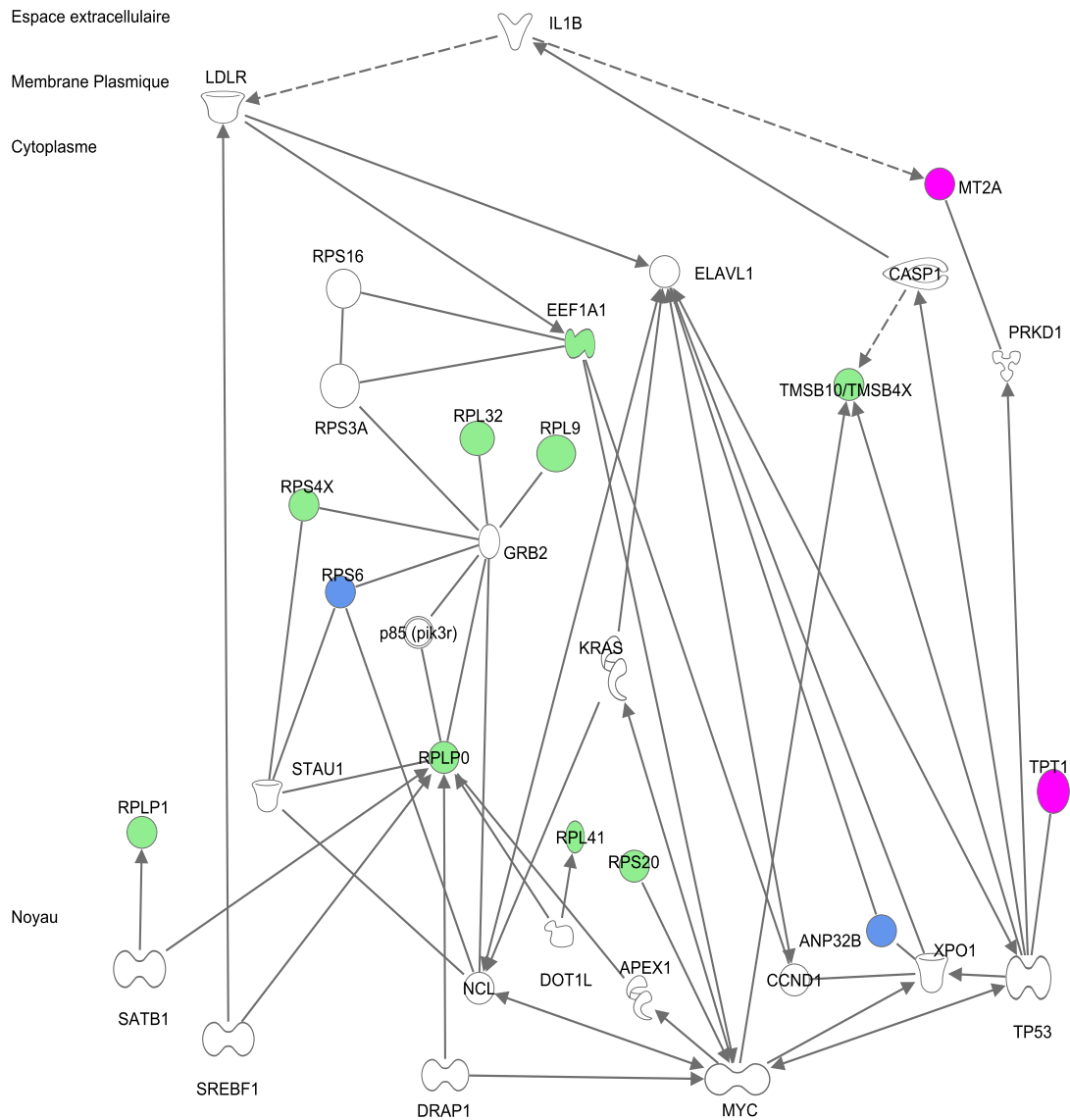


FIGURE 50 – Network dans lequel les ARNm exosomaux sont impliqués

En rose sont représentés les ARNm les plus présents dans les exosomes de U87, en vert ceux qui sont plus présents dans les exosomes de HA, enfin, en bleu ceux qui sont dans des proportions comparables entre les exosomes de HA et de U87.

ANP32B : Acidic Nuclear Phosphoprotein 32 family, member B; APEX1 : APEX nuclease (multifunctional DNA repair enzyme) 1; CASP1 : Caspase 1; CCND1 : Cyclin D1; DOT1L : DOT1-like histone; DRAP1 : DR1-associated protein 1 (negative cofactor 2 alpha); EEF1A1 : Eukaryotic translation Elongation Factor 1 Alpha 1; ELAVL1 : Embryonic Lethal Abnormal Vision-like 1; GRB2 : Growth factor Receptor-Bound protein 2; IL1B : Interleukin 1 Beta; KRAS : Kirsten Rat Sarcoma; LDLR : Low Density Lipoprotein Receptor; MT2A : Metallo Thionein 2A; MYC : MYeloCytomatosis; NCL : Nucleolin; p85 (pik3r) : p85 Pi3kinase regulator; PRKD1 : PRotein Kinase D1; RPL32 : Ribosomal Protein L32; RPL41 : Ribosomal Protein L41; RPL9 : Ribosomal Protein L9; RPLP0 : Ribosomal Protein LP0; RPLP1 : Ribosomal Protein LP1; RPS16 : Ribosomal Protein S16; RPS20 : Ribosomal Protein S20; RPS3A : Ribosomal Protein S3A; RPS4X : Ribosomal Protein S4 X-linked; RPS6 : Ribosomal Protein S6; SATB1 : SATB homeobox 1; SREBF1 : Sterol Regulatory Element Binding Transcription Factor 1; STAU1 : Staufen double-stranded RNA binding protein 1; TMSB10/TMSB4X : Thymosin beta 10 / Thymosin beta 4, X chromosome; TP53 : Tumor Protein p53; TPT1 : Tumor Protein Translationally-controlled 1; XPO1 : Exportin 1

3 Est-il possible de perturber le processus de production des exosomes ainsi que leur contenu en microARN ?

Le contenu des exosomes semble donc être régulé et diffère en fonction de la cellule productrice. Aussi des cellules dendritiques matures et immatures produisent des exosomes dont les contenus diffèrent (Montecalvo *et al.*, 2011). Il semblerait qu'un mécanisme actif soit alors à l'origine du chargement des exosomes en ARN. Qui dit mécanisme actif dit sans doute régulation. Si ce mécanisme est régulé, alors il doit être possible de le déréguler. Ainsi différentes études essaient de comprendre ce mécanisme de production des exosomes.

Les glioblastomes étant des tumeurs particulièrement hypoxiques, et l'hypoxie étant connue pour modifier certaines fonctions cellulaires, nous nous sommes intéressés à son effet potentiel sur la production d'exosomes. D'autres équipes ont aussi étudié les effets de l'hypoxie et ont montré que la production d'exosomes par des cellules U87 en conditions hypoxiques était activée (Park *et al.*, 2010). Ces exosomes hypoxiques auraient un contenu ARNm reflétant les conditions hypoxiques. Ils seraient en outre capables d'activer l'angiogénèse en transférant leur contenu à des cellules vasculaires (Kucharzewska *et al.*, 2013). A l'inverse, dans notre cas, la quantité d'exosomes n'est pas modifiée en conditions hypoxiques. En revanche les contenus microARN et ARN messagers exosomaux sont eux modifiés. Ces contenus exosomaux ne reflètent cependant pas les changements transcriptomiques cellulaires apportés par l'hypoxie.

Comme précédemment nous avons analysé nos données grâce à IPA. La liste des microARN détectés en conditions d'hypoxie est presque entièrement identique à celle des microARN exosomaux détectés en normoxie. Parmi les 3 microARN qui apparaissent comme détectés pour des conditions de 0,3% d'oxygène, aucun ne semblent avoir de cibles potentielles connues. Le réseau présenté sur la figure 51 est donc exactement le même que précédemment mais permet de visualiser les microARN affectés par l'hypoxie et leurs cibles potentielles respectives.

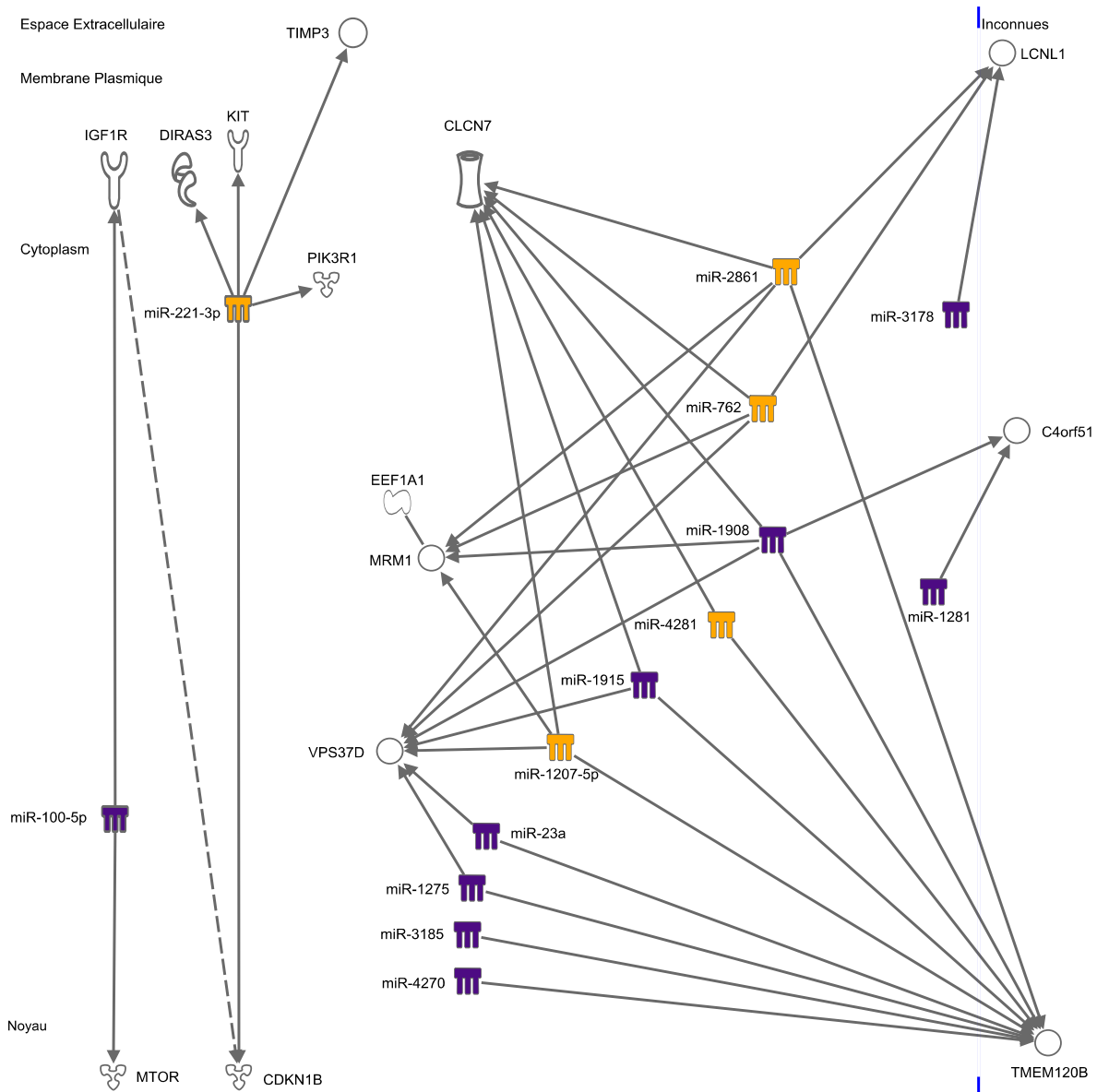


FIGURE 51 – MicroARN détectés dans les exosomes de U87 en conditions hypoxiques
En violet foncé sont représentés les microARN dont l'expression exosomale n'est pas affectée par l'hypoxie et en jaune sont représentés les microARN dont l'expression exosomale est augmentée dans des conditions d'hypoxie.

C4orf51 : Chromosome 4 open reading frame 51 ; CDKN1B : Cyclin-Depent Kinase Inhibitor P27 ; CLCN7 : Chloride Channel, Voltage-sensitive 7 ; DIRAS3 : GTP-binding RAS-like 3 ; EEF1A1 : Eukaryotic translation Elongation Factor 1 Alpha 1 ; IGF1R : Insulin-like Growth Factor 1 Receptor ; KIT : Plasma Membrane transmembrane receptor dasatinib ; LCNL1 : Lipocalin-like 1 ; MRM1 : Mitochondrial rRNA Methyltransferase 1 ; mTOR : mammalian Target Of Rapamycin ; PIK3R1 : Phosphoinositide-3-Kinase, Regulatory subunit 1 ; TIMP3 : metallopeptidase inhibitor 3 ; TMEM120B : Transmembrane protein 120B unknown ; VPS37D : Vacuolar Protein Sorting 37 homolog D

Inconnues : localisations sub-cellulaires non définies pour LCNL1, C4orf51 et TMEM120B

Les microARN dont l'expression est augmentée en conditions hypoxiques sont représentés en jaune (Figure 51). Il semblerait que se soit des microARN qui ciblent tous les ARNm codant pour les protéines transmembranaires CLCN7 et TEM120B. Excepté miR-221, ces

microARN, miR-2861, miR-762, miR-4281 et miR1207-5p, étaient déjà majoritairement présents dans les exosomes de U87. Sont-ils alors le reflet d'un état cancéreux de la cellule ? La gradation de leur détection dans les exosomes suit-elle l'évolution d'une cellule saine en cellule cancéreuse ? Représentent-ils une cellule saine lorsqu'ils sont faiblement détectés puis une cellule cancéreuse quand ils sont plus fortement détectés, et enfin une cellule cancéreuse très fortement agressive et hypoxique quand ils sont très fortement détectés ?

Pour les ARNm, les mêmes fonctions que pour des exosomes de U87 en normoxie sont représentées au sein des exosomes, mais une nouvelle fonction apparaît, celle d'une réponse à un stress oxydatif, marquée par la présence des ARNm codant pour l'UBB (Ubiquitine B), la FTL (Ferritine light), l'ACTG1 (Actine Gamma 1), la FTH1 (Ferritine Heavy). 12 ARNm sur les 26 détectés en conditions hypoxiques ou normoxiques appartiennent aux pathways IPA « Cancer » et « Prolifération cellulaire » représentés sur la figure 52.

Seul un ARNm codant pour la protéine PRKAR2A (Protein Kinase A, RII-Alpha Subunit) est augmenté en hypoxie. En revanche, 11 ARNm ne sont plus présents dans les exosomes produits en conditions d'hypoxie, les protéines pour lesquelles ils codent sont colorées en mauve. Ces ARN participant aux pathway « Cancer » et « prolifération cellulaire » ne sont donc plus sécrétés dans les exosomes de U87 à 0,3% d'oxygénation. Est-ce qu'ils sont alors utilisés par la cellule productrice ? En tout cas, étant absents des exosomes, ils ne seront plus libérés dans les cellules voisines.

Comparé aux profils microARN exosomaux, le profil d'expression de ces 11 ARNm semble pouvoir aussi refléter une évolution de la cellule saine vers une cellule cancéreuse et hypoxique. Ils ont en effet très présents dans les exosomes normaux, puis moins présents mais toujours détectés dans des exosomes de cellules cancéreuses et enfin, ils ne sont plus du tout détectable dans des exosomes de cellules cancéreuses hypoxiques. Pourraient-ils alors être utilisés comme des marqueurs tumoraux ou de pronostic ?

Les contenus des exosomes produits en conditions hypoxiques ne reflètent donc pas ceux des cellules productrices. Le contenu en ARN des exosomes varie et laisse présager un tri sélectif des ARN présents dans les exosomes sécrétés. Identifier ce mécanisme de chargement des exosomes pourrait alors être une grande avancée dans la compréhension de la communication des cellules cancéreuses.

Comprendre le mécanisme de sécrétion est donc une étape primordiale et pour mieux y parvenir, il faudrait déjà être capable d'identifier des acteurs permettant de réguler cette sécrétion. Le rôle de quelques protéines telles que la protéine Rab27a dans la sécrétion d'exosomes commence à être mis en lumière (Bobrie *et al.*, 2012)).

Les effets de composés pharmaceutiques ciblant différentes protéines ont été étudiés sur les productions d'exosomes de cellules cancéreuses.

La GW4869 cible la sphingomyélinase qui est alors incapable de transformer la sphingomyéline en céramide et bloque ainsi la sécrétion d'exosomes médiée par cette voie là. La production d'exosomes par la voie des ESCRT n'est pas affectée et produit toujours des exosomes (Trajkovic *et al.*, 2008). Utilisée sur des cellules embryonnaires de rein, la GW4869 diminue le nombre d'exosomes produits (Kosaka *et al.*, 2010).

Dans notre cas, la sécrétion des exosomes suite à un traitement des cellules avec ce composé pharmacologique ne permet pas une véritable diminution du nombre d'exosomes produits. Cela signifie peut-être que les exosomes produits par des cellules U87 sont essentiellement produits par une voie ESCRT, ou bien que la production des exosomes par la voie ESCRT est activée pour compenser le déficit de production dû à la GW4869. Les contenus microARN des exosomes produits, en revanche, sont légèrement affectés par l'utilisation de GW4869, témoignant une fois de plus d'un contenu microARN exosomal contrôlé.

Un deuxième composé pharmacologique, la 5-aza-2-déoxycytidine, permet lui d'augmenter la production d'exosomes de cellules d'hépatomes traitées (Xiao *et al.*, 2010). Le mécanisme d'action de la 5-aza-2-déoxycytidine sur la production d'exosomes n'est pas bien connu, cependant, ce composé pharmacologique est considéré comme un anticancéreux puisqu'il est capable d'inhiber une ADN méthyltransférase, et ainsi d'activer p53 (Karpf *et al.*, 2001). De plus une activation de p53 provoque une augmentation du nombre d'exosomes produits (Lehmann *et al.*, 2008).

Une fois encore, sur des cellules en culture de U87 une très légère augmentation de la production d'exosomes induite par 5-aza-2-déoxycytidine est loin d'être significative. De même que pour la GW4869, les contenus en microARN exosomaux sont eux légèrement modifiés. Si les variations apportées par les composés pharmacologiques aux contenus exosomaux sont assez similaires, elles ne sont pas parfaitement identiques. Voici encore un indice étayant l'hypothèse d'un mécanisme actif de tri et de chargement des exosomes en ARN.

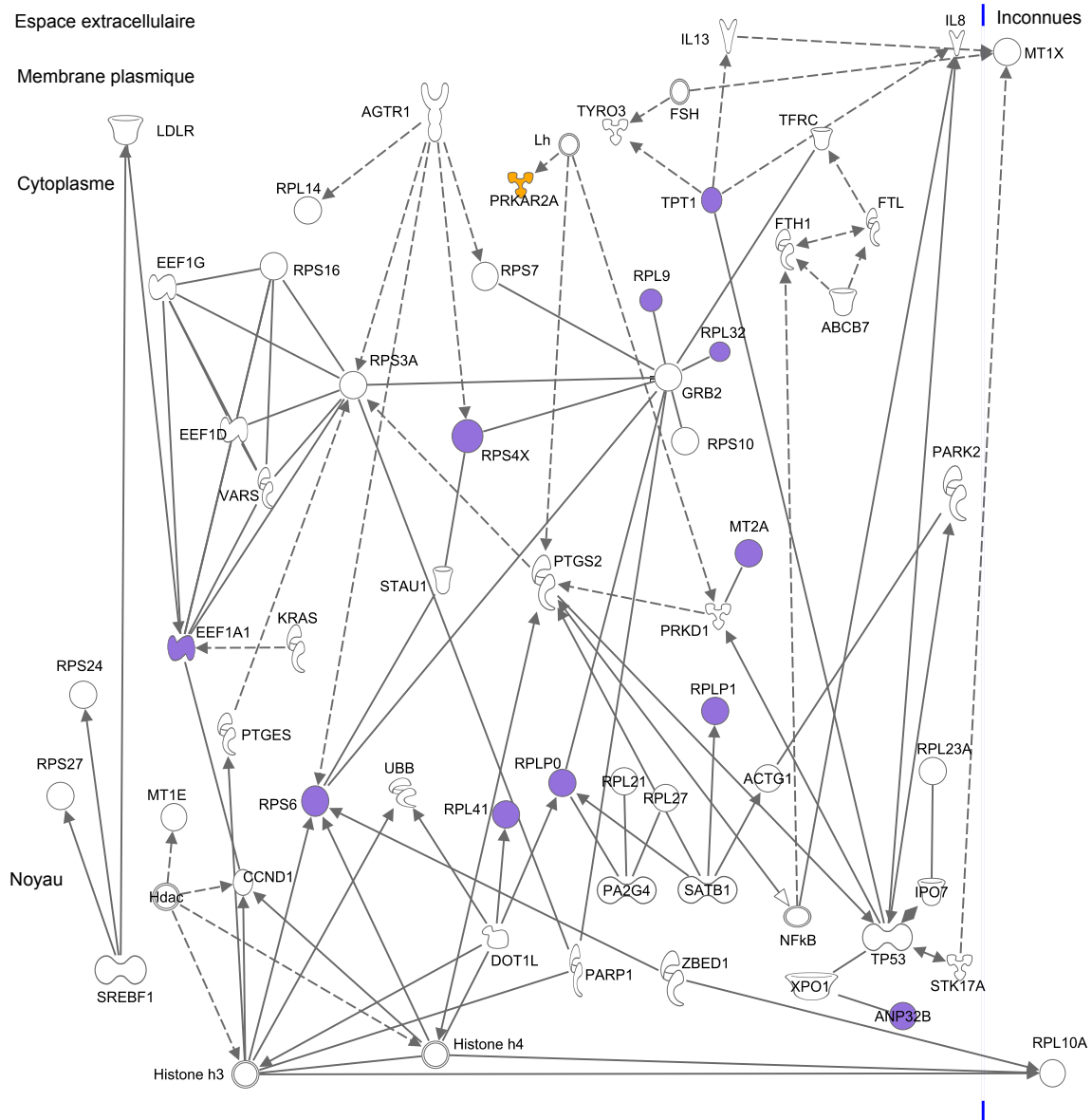


FIGURE 52 – Network dans lequel les ARNm exosomaux hypoxiques sont impliqués
 En jaune sont représentés les ARNm plus présents dans les exosomes de U87 en conditions hypoxiques et en mauve ceux dont la quantité exosomale diminue en conditions d'hypoxie.
 ABCB7 : ATP-Binding Cassette, sub-family B7; ACTG1 : Actin Gamma 1; AGTR1 : Angiotensin II receptor type 1; ANP32B : Acidic Nuclear Phosphoprotein 32B; CCND1 : Cyclin D1; EEF1 (A1, D, G) : Eukaryotic translation Elongation Factor 1 (Alpha 1, Delta, Gamma); FSH : Follicle-Stimulating Hormone; FTH1 : Ferritin Heavy polypeptide 1; FTL : Ferritin Light polypeptide; GRB2 : Growth factor Receptor-Bound protein 2; Hdac : Histone deacetyltransferase; IL : Interleukin; IPO7 : Importin 7; KRAS : Kirsten Rat Sarcoma; LDLR : Low Density Lipoprotein Receptor; Lh : Luteinizing Hormone; MT : MetalloThioïne; NFkB : NF-KAPPA B; PA2G4 : Proliferation-Associated 2G4; PARK2 : Parkinson protein 2; PARP1 : Poly ADP-Ribose Polymerase 1; PRKAR2A : Protein Kinase cAMP-dependent Regulatory type II Alpha; PRKD1 : Protein Kinase D1; PTGES : Prostaglandin Endoperoxide synthase; PTGS2 : Prostaglandin Endoperoxide Synthase 2; RP : Ribosomal Protein; SATB1 : SATB homeobox 1; SREBF1 : Sterol Regulatory Element Binding transcription Factor 1; STAU1 : Staufen 1; STK17A : Serine/Threonine Kinase 17a; TFRC : Transferrin Receptor; TP53 : Tumor Protein p53; TPT1 : Tumor Protein Translationally-controlled 1; TYRO3 : Protein Tyrosine Kinase 3; UBB : Ubiquitin B; VARS : Valyl-tRNA Synthetase; XPO1 : Exportin 1; ZBED1 : Zinc finger BED-type 1
 Inconnues : localisations sub-cellulaires non définies pour MT1X et RPL10A

4 Les exosomes de cellules de glioblastomes ont-ils un effet sur les cellules voisines ?

Depuis leur découverte, les exosomes passionnent et commencent à s'imposer en maîtres dans le domaine de la communication inter-cellulaire. Les exosomes sont en effet aujourd'hui décrits comme des vésicules capables de véhiculer de l'information sous forme d'ARN ou de protéine par exemple. Ils seraient ensuite capables de libérer ces éléments d'information dans le cytoplasme de cellules réceptrices où ils pourraient être pris en compte (Valadi *et al.*, 2007). Comme les exosomes produits par les cellules cancéreuses semblent véhiculer des ARN ou protéines spécifiques au cancer, il est important de s'intéresser aux effets potentiels qu'ils pourraient engendrer dans les cellules péri-tumorales saines.

Notre étude porte sur les cellules de glioblastomes en culture, les cellules U87. Nous avons mesuré que ces cellules sont capables de produire des quantités non négligeables d'exosomes, exosomes qui pourraient avoir un effet sur les cellules saines péri-tumorales ou à distance. Comme les glioblastomes ne sont pas connus pour former des métastases mais ont tout de même une forte propension à récidiver dans le même organe qu'est le cerveau, il est inutile de rechercher un effet prémétastatique éventuel sur des cellules extérieures au cerveau. Aussi, nous nous sommes intéressés à l'effet que peuvent avoir ces exosomes de glioblastomes sur leur environnement proche ; c'est pourquoi *in vitro* les effets des exosomes de U87 ont donc été testés sur les cellules U87 elles-mêmes et sur les cellules d'astrocytes normaux, les HA.

Etudier l'effet de ces exosomes sur leur environnement n'a de sens que si ces exosomes interagissent avec les cellules voisines. Aussi, différentes équipes se sont intéressées aux modes d'interactions exosomes-cellules (voir paragraphe 2.1.2.2, p 56). Les exosomes étant des objets de taille nanométrique, visualiser leurs interactions et leur mode d'action sur les cellules voisines relève du défi. La microscopie électronique permet bien évidemment de visualiser ces vésicules, mais sa mise en place coûteuse et délicate n'en fait pas la méthode la plus utilisée. Un moyen de substitution repose sur l'utilisation de molécules fluorescentes qui, embarquées dans les exosomes, permettent de visualiser leur localisation.

Pour étudier l'entrée des exosomes dans les cellules incubées, nous avons donc choisi de

« colorer » les exosomes utilisés à l'aide des fluorochromes PKH. Cette méthode est aussi utilisée par différentes équipes dans le même but (Pegtel *et al.*, 2010; Wallace *et al.*, 2008, pour ne citer qu'eux). Pour éviter la présence de tout agrégat de PHK dans nos préparations ce sont les cellules productrices qui ont été marquées à la PKH (cf p 81), les exosomes récoltés ont ensuite été « purifiés » sur un gradient de sucrose inverse (cf p 84).

Notre intérêt ici était de valider l'import des exosomes à l'intérieur des cellules réceptrices, ce que nous avons pu facilement visualiser. Nous n'avions pas pour prétention de caractériser le mode d'import de ces exosomes dans les cellules. Ceci étant dit, la question est intéressante. Les cellules normales et les cellules cancéreuses auraient-elles le même mode d'import des exosomes ?

Aucune colocalisation des exosomes avec la membrane cellulaire des HA n'est observée. Pour les cellules U87 quelques points de colocalisation peuvent être aperçus pour des temps d'incubation de 1h à 6h. Le fait de ne voir que très peu, voire aucun, points de colocalisation des colorations, pourrait faire pencher pour un mécanisme d'import par endocytose plutôt que par phagocytose ou hemifusion membranaire (voir paragraphe 2.1.2.2, p 56). Ceci n'est par contre qu'une hypothèse qu'il faudrait valider en utilisant des anticorps fluorescents contre des protéines connues des endosomes multivésiculés, tels que des anti-LBPA, pour visualiser des colocalisations de fluorescence potentielles. L'utilisation d'inhibiteurs des phénomènes de phagocytose ou d'endocytose pourraient aussi apporter des informations complémentaires.

La capacité des exosomes de transporter des éléments d'information génétiques tels que des ARN fait d'eux de potentiels vecteurs d'agents thérapeutiques. L'utilisation des nanocapsules lipidiques porteuses de microARN spécifiques pourrait être une solution de substitution à l'utilisation d'exosome pour délivrer des microARN dans les cellules tumorales. Dans ce cadre d'étude, nous nous sommes donc aussi intéressés à l'import de nanocapsules fluorescentes à l'intérieur des cellules réceptrices. Nous avons ainsi validé leur import dans les cellules U87. Pour aller plus loin et réellement comparer l'import d'exosomes à celui des nanocapsules lipidiques une expérience pourrait être réalisée en incubant conjointement les exosomes colorés (vert) avec les nanocapsules lipidiques (rouge) sur des cellules en culture. Si le mécanisme d'import est réellement le même, alors il pourrait y avoir colocalisation des deux signaux de fluorescence.

Dans notre cas, les exosomes de cellules de glioblastomes U87 semblent internalisés en quantités non négligeables dans les cellules d'astrocytes sains (HA) et cancéreux (U87) ; ils pourraient alors avoir un effet sur les cellules les ayant importés. Cependant dans notre étude, aucun effet majeur provoqué par des exosomes de U87 sur les cellules en culture n'est détecté. Ni le mécanisme de mort par apoptose ni le cycle cellulaire ne semblent affectés. Les exosomes

de U87 produits dans nos conditions ne sont donc pas capables d'induire d'effets létaux dans les cellules réceptrices.

Cependant, les exosomes contiennent des microARN qui pourraient avoir une action plus ténue et ciblée une fois libérés dans le cytoplasme de la cellule réceptrice. Nous nous sommes donc intéressés aux effets que pourraient avoir les exosomes sur le miRnome des cellules réceptrices, et ces effets restent minimes.

Quelques variations sont tout de même visibles sur le miRnome, témoignant d'un effet des exosomes sur les cellules réceptrices. Cet effet serait probablement dû au contenu en ARN des exosomes puisque la transfection du contenu ARN des exosomes sur les cellules a le même effet que l'incubation des exosomes eux-mêmes. Cet effet, très restreint sur les cellules HA, peut peut-être s'expliquer par le fait que les exosomes de U87 ne contiennent que des microARN « normaux » et déjà exprimés par les cellules de HA (figure 29, p 113). En effet, les exosomes de U87 ne diffèrent que de 30% des exosomes de HA auxquels les cellules sont déjà habituées. L'effet un peu plus conséquent sur les cellules de U87 vient peut-être du fait d'une quantité accrue d'exosomes auxquelles elles seraient plus sensibles que les cellules de HA. Il pourrait éventuellement s'agir d'une boucle autocrine médiée par les exosomes U87. Une mise en contact prolongée et répétée avec les exosomes de U87 permettrait d'évaluer les effets à plus long terme que ces exosomes pourraient déclencher dans les cellules HA et U87.

Les exosomes de U87 ont donc un effet potentiel sur les cellules HA ou U87. Pour aller plus loin sur l'analyse de ces effets, il pourrait être intéressant d'observer les effets des exosomes lors de traitement des cellules par irradiation. Effectivement, une équipe s'étant intéressée à la production d'exosomes par des cellules HeLa soumises à des irradiations, a montré que si la sécrétion exosomale de ces cellules reste inchangée en terme de quantités d'exosomes produites, en revanche, la concentration exosomale en survivine explose entraînant ainsi une résistance au traitement (Khan *et al.*, 2010). Aussi, qu'en est-il pour des cellules de glioblastomes ? Les exosomes de U87 seraient-ils capables d'induire, dans des cellules U87, une résistance au traitement par irradiation comme l'a montré Khan *et al.* (2010) ? Les exosomes pourraient-ils réactiver la prolifération des cellules U87 lorsque celle-ci a été bloquée ?

Les cellules d'astrocytes sont connues pour sécréter des exosomes (Taylor *et al.*, 2007) mais jusqu'à présent les cellules cancéreuses étaient considérées comme produisant plus d'exosomes que les cellules saines (Gercel-Taylor *et al.*, 2012), et les cellules saines péri-tumorales seraient alors « bombardées » par des exosomes tumoraux. Dans notre cas en revanche, les cellules d'astrocytes produisant autant d'exosomes que les cellules U87, les cellules tumorales seraient donc elles aussi « bombardées » par des exosomes « sains » dont il serait tout aussi important d'étudier les effets que d'étudier ceux des exosomes cancéreux sur des cellules saines.

Actuellement la majorité des tests réalisés pour évaluer les effets éventuels des exosomes sur des cellules sont réalisés *in vitro*, et la pertinence de ces tests pour mimer les effets physiologiques des exosomes pourrait néanmoins être questionnée (Théry, 2011).

L'une des premières questions concerne la quantité d'ARN réellement transférée dans les cellules réceptrices par les exosomes. D'après Pegtel *et al.* (2010), comme des milliers de copies de chaque microARN sont retrouvées dans seulement 0,5ng d'ARN d'exosomes et qu'il n'en faut que 100 copies environ pour déréguler un ARNm (Brown *et al.*, 2007), les quantités contenues dans les exosomes seraient suffisantes pour induire un effet dans la cellule réceptrice.

D'après nos calculs, une cellule (considérée sphérique) aurait un volume 10 000 fois plus important que celui d'un exosome. Ainsi, ajouter des exosomes à des cellules, à hauteur de 1000 exosomes par cellules reviendrait - à supposer que tous les exosomes soient internalisés - à apporter 10% environ du volume de la cellule. Par ailleurs, à masse égale d'ARN courts, les exosomes contiennent un nombre plus faible de microARN (un dixième seulement des microARN contenus dans les cellules). De plus, la densité d'ARN courts dans les exosomes serait 100 fois plus faible que dans les cellules.

Si l'hypothèse est faite que tous les exosomes sont internalisés apportant ainsi 10% du volume cellulaire, et que les proportions de microARN respectifs contenus dans les exosomes sont les mêmes, alors chacun de ces microARN sera importé dans une proportion de 1 molécule pour 10 déjà présentes dans la cellule. L'expression des 26 microARN détectés dans les exosomes de U87 ne devrait alors pas être modifiée dans les cellules réceptrices. Or l'expression de 4 de ces microARN est modifiée, 2 sont diminuées dans les cellules HA et 2 sont augmentées dans les cellules U87 (Figures 45, p 142 et 46, p 143).

Nous savons cependant que les proportions de microARN dans les exosomes ne reflètent pas les proportions de ces mêmes microARN cellulaires (Figure 30). L'expression des microARN miR-3201 et miR-3128, pourtant présents dans des proportions moyennes dans les exosomes, est anormalement augmentée dans les cellules réceptrices ayant importées des exosomes U87. Cette augmentation ne reflète donc pas seulement la somme de leurs quantités cellulaires initiales et de leurs quantités exosomales ajoutées. Quite à observer une augmentation de la quantité de certains microARN, nous nous serions plutôt attendus à des microARN très fortement présents dans les exosomes. Le microARN miR-638 par exemple, mais son expression cellulaire après incubation reste pourtant stable. Au contraire, d'autres microARN présents dans les exosomes, miR-149-star et miR-4270, présentent eux une diminution d'ex-

pression après incubation des exosomes les contenant avec des cellules HA.

L'étude des effets des exosomes sur le miRnome des cellules réceptrices révèle donc un effet plus complexe qu'un simple import de microARN. Le contenu exosomal est alors capable de déréguler la transcription ou la dégradation de certains microARN pour parvenir à la dérégulation de certains microARN que nous avons observée dans les cellules réceptrices. Un effet plus important sur les cellules de U87 pourrait éventuellement s'expliquer par un import de plus d'exosomes dans les cellules U87 que dans les cellules HA. Une autre hypothèse pourrait aussi être une différence d'internalisation des contenus. Imaginons que les cellules réceptrices internalisent toutes deux les exosomes par endocytose, mais dans les cellules HA le phénomène de back fusion pourrait ne plus avoir lieu et au lieu de libérer le contenu des exosomes dans le cytoplasme de la cellule ceux-ci seraient dégradés dans les lysosomes.

Les exosomes pourraient alors avoir un effet sur les cellules réceptrices. Bien que tenu au départ, il pourrait se révéler plus marqué à plus long terme.

En conclusion, les microARN connus pour jouer un rôle prépondérant dans la traduction des ARNm et dans le processus de tumorigénèse recèlent de nombreuses autres facettes. Ils ont en effet la capacité d'être de bons marqueurs diagnostiques, et sans doute, des acteurs majeurs de communication véhiculés dans les exosomes.

Dans le cas des gliomes, ces microARN ont un pouvoir diagnostique certain permettant de différencier les oligodendrogliomes des glioblastomes. Certains de ces microARN sont sécrétés dans les exosomes produits par les cellules gliales. Les contenus exosomaux en ARN sont différents des contenus ARN des cellules qui les produisent. Ces contenus ARN exosomaux permettent cependant de distinguer des exosomes sains d'exosomes cancéreux. Le chargement des microARN dans les exosomes semble donc reposer sur un mécanisme actif. Le contenu exosomal en certains microARN et ARNm semble être modifié en fonction de l'état physiopathologique des cellules, avec des différences marquées entre des cellules astrocytaires saines, des cellules astrocytaires cancéreuses et des cellules astrocytaires cancéreuses et hypoxiques. Ainsi, ces ARN exosomaux pourraient éventuellement jouer un rôle de diagnostic et de pronostic du stade tumoral. Enfin, aucun des microARN embarqués dans les exosomes n'a pour cible les ARNm trouvés dans les exosomes. Cette observation serait alors en accord avec un

rôle émergent des exosomes qui est le transfert d'informations fonctionnelles.

Pour finir, les exosomes de gliomes semblent être capables de déclencher une très légère modification du miRnome des cellules réceptrices en seulement 24h, ce qui pourrait laisser présager un effet plus marqué pour des cellules péri-tumorales subissant une exposition répétée et prolongée.

Les microARN sont des acteurs de premier plan dans la physiopathologie des gliomes et ce à plusieurs niveaux. Ils sont à la fois acteurs dans la mise en place du processus de tumorigénèse ; acteurs dans leur rôle de biomarqueurs pour le diagnostic et le pronostic ; et enfin, grâce à leur capacité à être véhiculés dans des exosomes et potentiellement actifs dans des cellules réceptrices, ils sont aussi des acteurs dans la communication intercellulaire.

Bibliographie

- ABELOOS, L., BROTCHE, J. et DE WITTE, O. (2007). [management of low-grade glioma : a retrospective study concerning 201 patients]. *Neuro-Chirurgie*, 53(4):277–283. PMID : 17585954.
- ADMYRE, C., JOHANSSON, S. M., QAZI, K. R., FILÉN, J.-J., LAHESMAA, R., NORMAN, M., NEVE, E. P. A., SCHEYNIUS, A. et GABRIELSSON, S. (2007). Exosomes with immune modulatory features are present in human breast milk. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 179(3):1969–1978. PMID : 17641064.
- AGHILI, M., ZAHEDI, F. et RAFIEE, E. (2009). Hydroxyglutaric aciduria and malignant brain tumor : a case report and literature review. *Journal of neuro-oncology*, 91(2):233–236. PMID : 18931888.
- AGUZZI, A. et RAJENDRAN, L. (2009). The transcellular spread of cytosolic amyloids, prions, and prionoids. *Neuron*, 64(6):783–790.
- AKAO, Y., IIO, A., ITOH, T., NOGUCHI, S., ITOH, Y., OHTSUKI, Y. et NAOE, T. (2010). Microvesicle-mediated RNA molecule delivery system using Monocytes/Macrophages. *Molecular Therapy*, 19(2):395–399.
- AKERS, J. C., GONDA, D., KIM, R., CARTER, B. S. et CHEN, C. C. (2013). Biogenesis of extracellular vesicles (EV) : exosomes, microvesicles, retrovirus-like vesicles, and apoptotic bodies. *Journal of Neuro-Oncology*, 113(1):1–11.
- AL-NEDAWI, K., MEEHAN, B., MICALLEF, J., LHOTAK, V., MAY, L., GUHA, A. et RAK, J. (2008). Intercellular transfer of the oncogenic receptor EGFRvIII by microvesicles derived from tumour cells. *Nature Cell Biology*, 10(5):619–624.
- ALVAREZ-ERVITI, L., SEOW, Y., YIN, H., BETTS, C., LAKHAL, S. et WOOD, M. J. A. (2011). Delivery of siRNA to the mouse brain by systemic injection of targeted exosomes. *Nature Biotechnology*, 29(4):341–345.
- AMMIRATI, M., VICK, N., LIAO, Y. L., CIRIC, I. et MIKHAEL, M. (1987). Effect of the extent of surgical resection on survival and quality of life in patients with supratentorial glioblastomas and anaplastic astrocytomas. *Neurosurgery*, 21(2):201–206. PMID : 2821446.
- AMZALLAG, N., PASSER, B. J., ALLANIC, D., SEGURA, E., THÉRY, C., GOUD, B., AMSON, R. et TELERMAN, A. (2004). TSAP6 facilitates the secretion of translationally controlled tumor protein/histamine-releasing factor via a nonclassical pathway. *The Journal of biological chemistry*, 279(44):46104–46112. PMID : 15319436.
- ANDRE, F., ESCUDIER, B., ANGEVIN, E., TURSZA, T. et ZITVOGEL, L. (2004). Exosomes for cancer immunotherapy. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*, 15 Suppl 4:iv141–144. PMID : 15477298.
- ANDRE, F., SCHARTZ, N. E. C., MOVASSAGH, M., FLAMENT, C., PAUTIER, P., MORICE, P., POMEL, C., LHOMME, C., ESCUDIER, B., LE CHEVALIER, T., TURSZA, T., AMIGORENA, S., RAPOSO, G., ANGEVIN, E. et ZITVOGEL, L. (2002). Malignant effusions and immunogenic tumour-derived exosomes. *Lancet*, 360(9329):295–305. PMID : 12147373.
- ARROYO, J. D., CHEVILLET, J. R., KROH, E. M., RUF, I. K., PRITCHARD, C. C., GIBSON, D. F., MITCHELL, P. S., BENNETT, C. F., POGOSOVA-AGADJANYAN, E. L., STIREWALT,

- D. L., TAIT, J. F. et TEWARI, M. (2011). Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(12):5003–5008.
- AUBERT, M., BADOUAL, M., CHRISTOV, C. et GRAMMATICOS, B. (2008). A model for glioma cell migration on collagen and astrocytes. *Journal of the Royal Society, Interface / the Royal Society*, 5(18):75–83. PMID : 17567554.
- AVISSAR, M., CHRISTENSEN, B. C., KELSEY, K. T. et MARSIT, C. J. (2009). MicroRNA expression ratio is predictive of head and neck squamous cell carcinoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 15(8):2850–2855. PMID : 19351747.
- BABST, M., KATZMANN, D. J., ESTEPA-SABAL, E. J., MEERLOO, T. et EMR, S. D. (2002a). Escrt-III : an endosome-associated heterooligomeric protein complex required for mvb sorting. *Developmental cell*, 3(2):271–282. PMID : 12194857.
- BABST, M., KATZMANN, D. J., SNYDER, W. B., WENDLAND, B. et EMR, S. D. (2002b). Endosome-associated complex, ESCRT-II, recruits transport machinery for protein sorting at the multivesicular body. *Developmental cell*, 3(2):283–289. PMID : 12194858.
- BACHE, K. G. (2003). Hrs regulates multivesicular body formation via ESCRT recruitment to endosomes. *The Journal of Cell Biology*, 162(3):435–442.
- BADOUAL, M., DEROULERS, C., AUBERT, M. et GRAMMATICOS, B. (2010). Modelling inter-cellular communication and its effects on tumour invasion. *Physical biology*, 7(4):046013. PMID : 21178241.
- BAGCI, T., WU, J. K., PFANNL, R., ILAG, L. L. et JAY, D. G. (2009). Autocrine semaphorin 3A signaling promotes glioblastoma dispersal. *Oncogene*, 28(40):3537–3550.
- BAKHTI, M., WINTER, C. et SIMONS, M. (2010). Inhibition of myelin membrane sheath formation by oligodendrocyte-derived exosome-like vesicles. *Journal of Biological Chemistry*, 286(1):787–796.
- BALAJ, L., LESSARD, R., DAI, L., CHO, Y.-J., POMEROY, S. L., BREAKEFIELD, X. O. et SKOG, J. (2011). Tumour microvesicles contain retrotransposon elements and amplified oncogene sequences. *Nature Communications*, 2:180.
- BALSS, J., MEYER, J., MUELLER, W., KORSHUNOV, A., HARTMANN, C. et von DEIMLING, A. (2008). Analysis of the IDH1 codon 132 mutation in brain tumors. *Acta neuropathologica*, 116(6):597–602. PMID : 18985363.
- BANIGAN, M. G., KAO, P. F., KOZUBEK, J. A., WINSLOW, A. R., MEDINA, J., COSTA, J., SCHMITT, A., SCHNEIDER, A., CABRAL, H., CAGSAL-GETKIN, O., VANDERBURG, C. R. et DELALLE, I. (2013). Differential expression of exosomal microRNAs in prefrontal cortices of schizophrenia and bipolar disorder patients. *PLoS ONE*, 8(1):e48814.
- BARANISKIN, A., KUHNHENN, J., SCHLEGEL, U., MAGHNOUJ, A., ZOLLNER, H., SCHMIEGEL, W., HAHN, S. et SCHROERS, R. (2011). Identification of microRNAs in the cerebrospinal fluid as biomarker for the diagnosis of glioma. *Neuro-Oncology*, 14(1):29–33.
- BARTEL, D. P. (2004). MicroRNAs : genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 116(2):281–297. PMID : 14744438.
- BASKERVILLE, S. et BARTEL, D. P. (2005). Microarray profiling of microRNAs reveals frequent coexpression with neighboring miRNAs and host genes. *RNA (New York, N.Y.)*, 11(3):241–247. PMID : 15701730.
- BEIER, D., HAU, P., PROESCHOLDT, M., LOHMEIER, A., WISCHHUSEN, J., OEFNER, P. J., AIGNER, L., BRAWANSKI, A., BOGDAHN, U. et BEIER, C. P. (2007). CD133(+) and CD133(-) glioblastoma-derived cancer stem cells show differential growth characteristics and molecular profiles. *Cancer research*, 67(9):4010–4015. PMID : 17483311.

- BELLAIL, A. C., HUNTER, S. B., BRAT, D. J., TAN, C. et VAN MEIR, E. G. (2004). Micro-regional extracellular matrix heterogeneity in brain modulates glioma cell invasion. *The international journal of biochemistry & cell biology*, 36(6):1046–1069. PMID : 15094120.
- BIANCO, F., PERROTTA, C., NOVELLINO, L., FRANCOLINI, M., RIGANTI, L., MENNA, E., SAGLIETTI, L., SCHUCHMAN, E. H., FURLAN, R., CLEMENTI, E., MATTEOLI, M. et VERDERIO, C. (2009). Acid sphingomyelinase activity triggers microparticle release from glial cells. *The EMBO Journal*, 28(8):1043–1054.
- BLAKEMORE, W. et KEIRSTEAD, H. (1999). The origin of remyelinating cells in the central nervous system. *J Neuroimmunol.*, pages 98(1) :69–76.
- BLEEKER, F. E., LAMBA, S., LEENSTRA, S., TROOST, D., HULSEBOS, T., VANDERTOP, W. P., FRATTINI, M., MOLINARI, F., KNOWLES, M., CERRATO, A., RODOLFO, M., SCARPA, A., FELICIONI, L., BUTTITTA, F., MALATESTA, S., MARCHETTI, A. et BARDELLI, A. (2009). IDH1 mutations at residue p.R132 (IDH1(R132)) occur frequently in high-grade gliomas but not in other solid tumors. *Human mutation*, 30(1):7–11. PMID : 19117336.
- BOBRIE, A., KRUMEICH, S., REYAL, F., RECCHI, C., MOITA, L. F., SEABRA, M. C., OSTROWSKI, M. et THERY, C. (2012). Rab27a supports exosome-dependent and -independent mechanisms that modify the tumor microenvironment and can promote tumor progression. *Cancer Research*, 72(19):4920–4930.
- BROWN, B. D., GENTNER, B., CANTORE, A., COLLEONI, S., AMENDOLA, M., ZINGALE, A., BACCARINI, A., LAZZARI, G., GALLI, C. et NALDINI, L. (2007). Endogenous microRNA can be broadly exploited to regulate transgene expression according to tissue, lineage and differentiation state. *Nature biotechnology*, 25(12):1457–1467. PMID : 18026085.
- BRYANT, R. J., PAWLOWSKI, T., CATTO, J. W. F., MARSDEN, G., VESSELLA, R. L., RHEES, B., KUSLICH, C., VISAKORPI, T. et HAMDY, F. C. (2012). Changes in circulating microRNA levels associated with prostate cancer. *British Journal of Cancer*, 106(4):768–774.
- CABY, M.-P., LANKAR, D., VINCENDEAU-SCHERRER, C., RAPOSO, G. et BONNEROT, C. (2005). Exosomal-like vesicles are present in human blood plasma. *International Immunology*, 17(7):879–887. PMID : 15908444.
- CAIRNCROSS, J. G., UEKI, K., ZLATESCU, M. C., LISLE, D. K., FINKELSTEIN, D. M., HAMMOND, R. R., SILVER, J. S., STARK, P. C., MACDONALD, D. R., INO, Y., RAMSAY, D. A. et LOUIS, D. N. (1998). Specific genetic predictors of chemotherapeutic response and survival in patients with anaplastic oligodendrogliomas. *Journal of the National Cancer Institute*, 90(19):1473–1479. PMID : 9776413.
- CAIRNS, R. A. et MAK, T. W. (2013). Oncogenic isocitrate dehydrogenase mutations : mechanisms, models, and clinical opportunities. *Cancer discovery*, 3(7):730–741. PMID : 23796461.
- CALIN, G. A., SEVIGNANI, C., DUMITRU, C. D., HYSLOP, T., NOCH, E., YENDAMURI, S., SHIMIZU, M., RATTAN, S., BULLRICH, F., NEGRINI, M. et CROCE, C. M. (2004). Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(9):2999–3004. PMID : 14973191.
- CALTABIANO, R., TORRISI, A., CONDORELLI, D., ALBANESE, V. et LANZAFAME, S. (2010). High levels of connexin 43 mRNA in high grade astrocytomas. study of 32 cases with in situ hybridization. *Acta Histochemica*, 112(6):529–535.
- CHAPUT, N. et THÉRY, C. (2010). Exosomes : immune properties and potential clinical implementations. *Seminars in Immunopathology*, 33(5):419–440.
- CHARLES, N. A., HOLLAND, E. C., GILBERTSON, R., GLASS, R. et KETTENMANN, H. (2011). The brain tumor microenvironment. *Glia*, 59(8):1169–1180. PMID : 21446047.

- CHEN, C., RIDZON, D. A., BROOMER, A. J., ZHOU, Z., LEE, D. H., NGUYEN, J. T., BARBISIN, M., XU, N. L., MAHUVAKAR, V. R., ANDERSEN, M. R., LAO, K. Q., LIVAK, K. J. et GUEGLER, K. J. (2005). Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic acids research*, 33(20):e179. PMID : 16314309.
- CHEN, T. S., LAI, R. C., LEE, M. M., CHOO, A. B. H., LEE, C. N. et LIM, S. K. (2009). Mesenchymal stem cell secretes microparticles enriched in pre-microRNAs. *Nucleic Acids Research*, 38(1):215–224.
- CHEN, X., LIANG, H., ZHANG, J., ZEN, K. et ZHANG, C.-Y. (2012). Secreted microRNAs : a new form of intercellular communication. *Trends in Cell Biology*, 22(3):125–132.
- CHINOT, O. L., HONORE, S., DUFOUR, H., BARRIE, M., FIGARELLA-BRANGER, D., MURACCIOLE, X., BRAGUER, D., MARTIN, P. M. et GRISOLI, F. (2001). Safety and efficacy of temozolomide in patients with recurrent anaplastic oligodendrogliomas after standard radiotherapy and chemotherapy. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 19(9):2449–2455. PMID : 11331324.
- CHIOCCA, E. A. et LAWLER, S. E. (2010). The many functions of microRNAs in glioblastoma. *World neurosurgery*, 73(6):598–601. PMID : 20934132.
- CIAFRÈ, S. A., GALARDI, S., MANGIOLA, A., FERRACIN, M., LIU, C.-G., SABATINO, G., NEGRINI, M., MAIRA, G., CROCE, C. M. et FARACE, M. G. (2005). Extensive modulation of a set of microRNAs in primary glioblastoma. *Biochemical and biophysical research communications*, 334(4):1351–1358. PMID : 16039986.
- CIMMINO, A., CALIN, G. A., FABBRI, M., IORIO, M. V., FERRACIN, M., SHIMIZU, M., WOJCICK, S. E., AQEILAN, R. I., ZUPO, S., DONO, M., RASSENTI, L., ALDER, H., VOLINIA, S., LIU, C.-G., KIPPS, T. J., NEGRINI, M. et CROCE, C. M. (2005). miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(39):13944–13949. PMID : 16166262.
- CLAYTON, A., MITCHELL, J. P., COURT, J., MASON, M. D. et TABI, Z. (2007). Human tumor-derived exosomes selectively impair lymphocyte responses to interleukin-2. *Cancer research*, 67(15):7458–7466. PMID : 17671216.
- CLAYTON, A., TURKES, A., DEWITT, S., STEADMAN, R., MASON, M. D. et HALLETT, M. B. (2004). Adhesion and signaling by b cell-derived exosomes : the role of integrins. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 18(9):977–979. PMID : 15059973.
- COOPER, L. A. D., GUTMAN, D. A., LONG, Q., JOHNSON, B. A., CHOLLETI, S. R., KURC, T., SALTZ, J. H., BRAT, D. J. et MORENO, C. S. (2010). The proneural molecular signature is enriched in oligodendrogliomas and predicts improved survival among diffuse gliomas. *PloS one*, 5(9):e12548. PMID : 20838435.
- COTRINA, M. L., LIN, J. H.-C. et NEDERGAARD, M. (2008). Adhesive properties of connexin hemichannels. *Glia*, 56(16):1791–1798. PMID : 18649405.
- COTTIN, S., GOULD, P. V., CANTIN, L. et CARUSO, M. (2011). Gap junctions in human glioblastomas : implications for suicide gene therapy. *Cancer Gene Therapy*, 18(9):674–681.
- COURT, F. A., HENDRIKS, W. T. J., MACGILLAVRY, H. D., ALVAREZ, J. et van MINNEN, J. (2008). Schwann cell to axon transfer of ribosomes : toward a novel understanding of the role of glia in the nervous system. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 28(43):11024–11029. PMID : 18945910.
- D'AGOSTINO, S., SALAMONE, M., DI LIEGRO, I. et VITTORELLI, M. L. (2006). Membrane vesicles shed by oligodendroglioma cells induce neuronal apoptosis. *International journal of oncology*, 29(5):1075–1085. PMID : 17016637.

- DANG, L., WHITE, D. W., GROSS, S., BENNETT, B. D., BITTINGER, M. A., DRIGGERS, E. M., FANTIN, V. R., JANG, H. G., JIN, S., KEENAN, M. C., MARKS, K. M., PRINS, R. M., WARD, P. S., YEN, K. E., LIAU, L. M., RABINOWITZ, J. D., CANTLEY, L. C., THOMPSON, C. B., VANDER HEIDEN, M. G. et SU, S. M. (2009). Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate. *Nature*, 462(7274):739–744.
- DAUMAS-DUPOINT, C., BEUVON, F., VARLET, P. et FALLET-BIANCO, C. (2000). Gliomas WHO and sainte-anne hospital classifications. *Annales de pathologie*, 20(5):413–428. PMID : 11084409.
- de GASSART, A., GEMINARD, C., FEVRIER, B., RAPOSO, G. et VIDAL, M. (2003). Lipid raft-associated protein sorting in exosomes. *Blood*, 102(13):4336–4344. PMID : 12881314.
- DE SMAELE, E., FERRETTI, E. et GULINO, A. (2010). MicroRNAs as biomarkers for CNS cancer and other disorders. *Brain Research*, 1338:100–111. PMID : 20380821.
- DEANGELIS, L. M. (2001). Brain tumors. *New England Journal of Medicine*, 344(2):114–123.
- DECROCK, E., DE VUYST, E., VINKEN, M., VAN MOORHEM, M., VRANCKX, K., WANG, N., VAN LAEKEN, L., DE BOCK, M., D'HERDE, K., LAI, C. P., ROGIERS, V., EVANS, W. H., NAUS, C. C. et LEYBAERT, L. (2009). Connexin 43 hemichannels contribute to the propagation of apoptotic cell death in a rat c6 glioma cell model. *Cell death and differentiation*, 16(1):151–163. PMID : 18820645.
- DECROCK, E., KRYSKO, D. V., VINKEN, M., KACZMAREK, A., CRISPINO, G., BOL, M., WANG, N., DE BOCK, M., DE VUYST, E., NAUS, C. C., ROGIERS, V., VANDENABEELE, P., ERNEUX, C., MAMMANO, F., BULTYNCK, G. et LEYBAERT, L. (2012). Transfer of IP₃ through gap junctions is critical, but not sufficient, for the spread of apoptosis. *Cell death and differentiation*, 19(6):947–957. PMID : 22117194.
- DEJEANS, N., PLUQUET, O., LHOMOND, S., GRISE, F., BOUCHECAREILH, M., JUIN, A., MEYNARD-CADARS, M., BIDAUD-MEYNARD, A., GENTIL, C., MOREAU, V., SALTEL, F. et CHEVET, E. (2012). Autocrine control of glioma cells adhesion and migration through IRE1-mediated cleavage of SPARC mRNA. *Journal of Cell Science*, 125(18):4278–4287.
- DELAGUILLAUMIE, A. (2004). Tetraspanin CD82 controls the association of cholesterol-dependent microdomains with the actin cytoskeleton in t lymphocytes : relevance to costimulation. *Journal of Cell Science*, 117(22):5269–5282.
- DEVAUX, B. C., O'FALLON, J. R. et KELLY, P. J. (1993). Resection, biopsy, and survival in malignant glial neoplasms. a retrospective study of clinical parameters, therapy, and outcome. *Journal of neurosurgery*, 78(5):767–775. PMID : 8468607.
- ELDH, M., LÖTVALL, J., MALMHÄLL, C. et EKSTRÖM, K. (2012). Importance of RNA isolation methods for analysis of exosomal RNA : evaluation of different methods. *Molecular Immunology*, 50(4):278–286.
- ERNST, A., CAMPOS, B., MEIER, J., DEVENS, F., LIESENBERG, F., WOLTER, M., REIFENBERGER, G., HEROLD-MENDE, C., LICHTER, P. et RADLWIMMER, B. (2010). De-repression of CTGF via the miR-17-92 cluster upon differentiation of human glioblastoma spheroid cultures. *Oncogene*, 29(23):3411–3422. PMID : 20305691.
- ESCUDIER, B., DORVAL, T., CHAPUT, N., ANDRÉ, F., CABY, M.-P., NOVAULT, S., FLAMENT, C., LÉBOULAIRE, C., BORG, C., AMIGORENA, S., BOCCACCIO, C., BONNEROT, C., DHELLIN, O., MOVASSAGH, M., PIPERNO, S., ROBERT, C., SERRA, V., VALENTE, N., LE PECQ, J.-B., SPATZ, A., LANTZ, O., TURSZ, T., ANGEVIN, E. et ZITVOGEL, L. (2005). Vaccination of metastatic melanoma patients with autologous dendritic cell (DC) derived-exosomes : results of the first phase I clinical trial. *Journal of translational medicine*, 3(1):10. PMID : 15740633.
- ESTELLER, M., GARCIA-FONCILLAS, J., ANDION, E., GOODMAN, S. N., HIDALGO, O. F., VANACLOCHA, V., BAYLIN, S. B. et HERMAN, J. G. (2000). Inactivation of the DNA-repair gene MGMT and the clinical response of gliomas to alkylating agents. *The New England journal of medicine*, 343(19):1350–1354. PMID : 11070098.

- FALGUIERES, T., LUYET, P.-P., BISSIG, C., SCOTT, C. C., VELLUZ, M.-C. et GRUENBERG, J. (2008). In vitro budding of intraluminal vesicles into late endosomes is regulated by alix and tsgl101. *Molecular Biology of the Cell*, 19(11):4942–4955.
- FENG, D., ZHAO, W.-L., YE, Y.-Y., BAI, X.-C., LIU, R.-Q., CHANG, L.-F., ZHOU, Q. et SUI, S.-F. (2010). Cellular internalization of exosomes occurs through phagocytosis. *Traffic*, 11(5):675–687.
- FIGARELLA-BRANGER, D. et BOUVIER, C. (2005). Histological classification of human gliomas : state of art and controversies. *Bull Cancer.*, pages 92(4) :301–9.
- FIGARELLA-BRANGER, D., COLIN, C., COULIBALY, B., QUILICHINI, B., MAUES DE PAULA, A., FERNANDEZ, C. et BOUVIER, C. (2008). Classification histologique et moléculaire des gliomes. *Revue Neurologique*, 164(6-7):505–515.
- FIRE, A., XU, S., MONTGOMERY, M. K., KOSTAS, S. A., DRIVER, S. E. et MELLO, C. C. (1998). Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in caenorhabditis elegans. *Nature*, 391(6669):806–811. PMID : 9486653.
- FLEISSNER, F., GOERZIG, Y., HAVERICH, A. et THUM, T. (2012). Microvesicles as novel biomarkers and therapeutic targets in transplantation medicine : Exosomes and organ transplantation. *American Journal of Transplantation*, 12(2):289–297.
- FOLKINS, C., SHAKED, Y., MAN, S., TANG, T., LEE, C. R., ZHU, Z., HOFFMAN, R. M. et KERBEL, R. S. (2009). Glioma tumor stem-like cells promote tumor angiogenesis and vasculogenesis via vascular endothelial growth factor and stromal-derived factor 1. *Cancer Research*, 69(18):7243–7251.
- FRÜHBEIS, C., FRÖHLICH, D. et KRÄMER-ALBERS, E.-M. (2012). Emerging roles of exosomes in Neuron–Glia communication. *Frontiers in Physiology*, 3.
- FRIEDMAN, H. S. (2000). Temozolomide in early stages of newly diagnosed malignant glioma and neoplastic meningitis. *Seminars in oncology*, 27(3 Suppl 6):35–40. PMID : 10866348.
- FRIEDMAN, H. S., PRADOS, M. D., WEN, P. Y., MIKKELSEN, T., SCHIFF, D., ABREY, L. E., YUNG, W. K. A., PALEOLOGOS, N., NICHOLAS, M. K., JENSEN, R., VREDENBURGH, J., HUANG, J., ZHENG, M. et CLOUGHESY, T. (2009). Bevacizumab alone and in combination with irinotecan in recurrent glioblastoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 27(28):4733–4740. PMID : 19720927.
- FURNARI, F. B., FENTON, T., BACHOO, R. M., MUKASA, A., STOMMEL, J. M., STEGH, A., HAHN, W. C., LIGON, K. L., LOUIS, D. N., BRENNAN, C., CHIN, L., DEPINHO, R. A. et CAVENEE, W. K. (2007). Malignant astrocytic glioma : genetics, biology, and paths to treatment. *Genes & development*, 21(21):2683–2710. PMID : 17974913.
- GALLO, A., TANDON, M., ALEVIZOS, I. et ILLEI, G. G. (2012). The majority of MicroRNAs detectable in serum and saliva is concentrated in exosomes. *PLoS ONE*, 7(3):e30679.
- GAO, Y., BERTUCCIO, C. A., BALUT, C. M., WATKINS, S. C. et DEVOR, D. C. (2012). Dynamin- and rab5-dependent endocytosis of a ca2+-activated k+ channel, KCa2.3. *PLoS ONE*, 7(8):e44150.
- GARCION, E., LAMPRECHT, A., HEURTAULT, B., PAILLARD, A., AUBERT-POUESSEL, A., DENIZOT, B., MENEI, P. et BENOÎT, J.-P. (2006). A new generation of anticancer, drug-loaded, colloidal vectors reverses multidrug resistance in glioma and reduces tumor progression in rats. *Molecular cancer therapeutics*, 5(7):1710–1722. PMID : 16891457.
- GARZON, R., CALIN, G. A. et CROCE, C. M. (2009). MicroRNAs in cancer. *Annual review of medicine*, 60:167–179. PMID : 19630570.
- GASTPAR, R., GEHRMANN, M., BAUSERO, M. A., ASEA, A., GROSS, C., SCHROEDER, J. A. et MÜLTHOFF, G. (2005). Heat shock protein 70 surface-positive tumor exosomes stimulate migratory and cytolytic activity of natural killer cells. *Cancer research*, 65(12):5238–5247. PMID : 15958569.

- GERCEL-TAYLOR, C., ATAY, S., TULLIS, R. H., KESIMER, M. et TAYLOR, D. D. (2012). Nanoparticle analysis of circulating cell-derived vesicles in ovarian cancer patients. *Analytical biochemistry*, 428(1):44–53. PMID : 22691960.
- GERMANO, I., SWISS, V. et CASACCIA, P. (2010). Primary brain tumors, neural stem cell, and brain tumor cancer cells : where is the link? *Neuropharmacology*, 58(6):903–910. PMID : 20045420.
- GIBBINGS, D. J., CIAUDO, C., ERHARDT, M. et VOINNET, O. (2009). Multivesicular bodies associate with components of miRNA effector complexes and modulate miRNA activity. *Nature Cell Biology*, 11(9):1143–1149. PMID : 19684575.
- GILAD, S., MEIRI, E., YOGEV, Y., BENJAMIN, S., LEBANONY, D., YERUSHALMI, N., BENJAMIN, H., KUSHNIR, M., CHOLAKH, H., MELAMED, N., BENTWICH, Z., HOD, M., GOREN, Y. et CHAJUT, A. (2008). Serum MicroRNAs are promising novel biomarkers. *PLoS ONE*, 3(9):e3148.
- GOLDBERG, G. S., BECHBERGER, J. F., TAJIMA, Y., MERRITT, M., OMORI, Y., GAWINOWICZ, M. A., NARAYANAN, R., TAN, Y., SANAL, Y., YAMASAKI, H., NAUS, C. C., TSUDA, H. et NICHOLSON, B. J. (2000). Connexin43 suppresses MFG-E8 while inducing contact growth inhibition of glioma cells. *Cancer research*, 60(21):6018–6026. PMID : 11085522.
- GONZALES, P. A., PISITKUN, T., HOFFERT, J. D., TCHAPYJNIKOV, D., STAR, R. A., KLETA, R., WANG, N. S. et KNEPPER, M. A. (2009). Large-scale proteomics and phosphoproteomics of urinary exosomes. *Journal of the American Society of Nephrology : JASN*, 20(2):363–379. PMID : 19056867.
- GRANGE, C., TAPPARO, M., COLLINO, F., VITILLO, L., DAMASCO, C., DEREGIBUS, M. C., TETTA, C., BUSSOLATI, B. et CAMUSSI, G. (2011). Microvesicles released from human renal cancer stem cells stimulate angiogenesis and formation of lung premetastatic niche. *Cancer Research*, 71(15):5346–5356.
- GREGORY, R. I. et SHIEKHATTAR, R. (2005). MicroRNA biogenesis and cancer. *Cancer research*, 65(9):3509–3512. PMID : 15867338.
- GRIFFITHS-JONES, S., GROCOCK, R. J., van DONGEN, S., BATEMAN, A. et ENRIGHT, A. J. (2006). miRBase : microRNA sequences, targets and gene nomenclature. *Nucleic Acids Research*, 34(Database issue):D140–144. PMID : 16381832.
- GRIFFITHS-JONES, S., SAINI, H. K., van DONGEN, S. et ENRIGHT, A. J. (2008). miRBase : tools for microRNA genomics. *Nucleic Acids Research*, 36(Database issue):D154–158. PMID : 17991681.
- GRIVEAU, A., BEJAUD, J., ANTHIYA, S., AVRIL, S., AUTRET, D. et GARCION, E. (2013). Silencing of miR-21 by locked nucleic acid–lipid nanocapsule complexes sensitize human glioblastoma cells to radiation-induced cell death. *International Journal of Pharmaceutics*, 454(2):765–774.
- GUESCINI, M., GUIDOLIN, D., VALLORANI, L., CASADEI, L., GIOACCHINI, A., TIBOLLO, P., BATTISTELLI, M., FALCIERI, E., BATTISTIN, L., AGNATI, L. et STOCCHI, V. (2010). C2C12 myoblasts release micro-vesicles containing mtDNA and proteins involved in signal transduction. *Experimental Cell Research*, 316(12):1977–1984.
- HAMERLIK, P., LATHIA, J. D., RASMUSSEN, R., WU, Q., BARTKOVA, J., LEE, M., MOUDRY, P., BARTEK, Jiri, J., FISCHER, W., LUKAS, J., RICH, J. N. et BARTEK, J. (2012). Autocrine VEGF-VEGFR2-Neuropilin-1 signaling promotes glioma stem-like cell viability and tumor growth. *The Journal of experimental medicine*, 209(3):507–520. PMID : 22393126.
- HAO, J., ZHANG, C., ZHANG, A., WANG, K., JIA, Z., WANG, G., HAN, L., KANG, C. et PU, P. (2012). miR-221/222 is the regulator of cx43 expression in human glioblastoma cells. *Oncology reports*, 27(5):1504–1510. PMID : 22294051.

- HARDING, C., HEUSER, J. et STAHL, P. (1983). Receptor-mediated endocytosis of transferrin and recycling of the transferrin receptor in rat reticulocytes. *The Journal of cell biology*, 97(2):329–339. PMID : 6309857.
- HARTMANN, C., MEYER, J., BALSS, J., CAPPER, D., MUELLER, W., CHRISTIANS, A., FELSBERG, J., WOLTER, M., MAWRIN, C., WICK, W., WELLER, M., HEROLD-MENDE, C., UNTERBERG, A., JEUKEN, J. W. M., WESSELING, P., REIFENBERGER, G. et von DEIMLING, A. (2009). Type and frequency of IDH1 and IDH2 mutations are related to astrocytic and oligodendroglial differentiation and age : a study of 1,010 diffuse gliomas. *Acta neuropathologica*, 118(4):469–474. PMID : 19554337.
- HE, L. et HANNON, G. J. (2004). MicroRNAs : small RNAs with a big role in gene regulation. *Nature Reviews. Genetics*, 5(7):522–531. PMID : 15211354.
- HE, L., THOMSON, J. M., HEMANN, M. T., HERNANDO-MONGE, E., MU, D., GOODSON, S., POWERS, S., CORDON-CARDO, C., LOWE, S. W., HANNON, G. J. et HAMMOND, S. M. (2005). A microRNA polycistron as a potential human oncogene. *Nature*, 435(7043):828–833. PMID : 15944707.
- HENDRIX, A. et HUME, A. N. (2011). Exosome signaling in mammary gland development and cancer. *The International Journal of Developmental Biology*, 55(7-8-9):879–887.
- HESSVIK, N. P., SANDVIG, K. et LLORENTE, A. (2013). Exosomal miRNAs as biomarkers for prostate cancer. *Frontiers in Genetics*, 4.
- HOANG-XUAN, K., HE, J., HUGUET, S., MOKHTARI, K., MARIE, Y., KUJAS, M., LEURAUD, P., CAPELLE, L., DELATTRE, J. Y., POIRIER, J., BROËT, P. et SANSON, M. (2001). Molecular heterogeneity of oligodendrogliomas suggests alternative pathways in tumor progression. *Neurology*, 57(7):1278–1281. PMID : 11591848.
- HOANG-XUAN, K., IDBAIH, A., MOKHTARI, K. et SANSON, M. (2005). [towards a molecular classification of gliomas]. *Bulletin du cancer*, 92(4):310–316. PMID : 15888387.
- HONG, B. S., CHO, J.-H., KIM, H., CHOI, E.-J., RHO, S., KIM, J., KIM, J. H., CHOI, D.-S., KIM, Y.-K., HWANG, D. et GHO, Y. S. (2009). Colorectal cancer cell-derived microvesicles are enriched in cell cycle-related mRNAs that promote proliferation of endothelial cells. *BMC Genomics*, 10:556. PMID : 19930720.
- HSU, C., MOROHASHI, Y., YOSHIMURA, S.-i., MANRIQUE-HOYOS, N., JUNG, S., LAUTERBACH, M. A., BAKHTI, M., GRONBORG, M., MOBIUS, W., RHEE, J., BARR, F. A. et SIMONS, M. (2010). Regulation of exosome secretion by rab35 and its GTPase-activating proteins TBC1D10A-C. *The Journal of Cell Biology*, 189(2):223–232.
- HU, G., DRESCHER, K. M. et CHEN, X.-M. (2012). Exosomal miRNAs : biological properties and therapeutic potential. *Frontiers in Genetics*, 3.
- HUNTER, M. P., ISMAIL, N., ZHANG, X., AGUDA, B. D., LEE, E. J., YU, L., XIAO, T., SCHAFER, J., LEE, M.-L. T., SCHMITTGEN, T. D., NANA-SINKAM, S. P., JARJOURA, D. et MARSH, C. B. (2008). Detection of microRNA expression in human peripheral blood microvesicles. *PLoS ONE*, 3(11):e3694.
- HURLEY, J. H. (2010). The ESCRT complexes. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology*, 45(6):463–487.
- ICHIMURA, K., PEARSON, D. M., KOCIALKOWSKI, S., BÄCKLUND, L. M., CHAN, R., JONES, D. T. W. et COLLINS, V. P. (2009). IDH1 mutations are present in the majority of common adult gliomas but rare in primary glioblastomas. *Neuro-oncology*, 11(4):341–347. PMID : 19435942.
- ILHAN-MUTLU, A., WAGNER, L., WÖHRER, A., FURTNER, J., WIDHALM, G., MAROSI, C. et PREUSSER, M. (2012). Plasma MicroRNA-21 concentration may be a useful biomarker in glioblastoma patients. *Cancer investigation*, 30(8):615–621. PMID : 22891879.

- ILHAN-MUTLU, A., WÖHRER, A., BERGHOFF, A. S., WIDHALM, G., MAROSI, C., WAGNER, L. et PREUSSER, M. (2013). Comparison of microRNA expression levels between initial and recurrent glioblastoma specimens. *Journal of neuro-oncology*, 112(3):347–354. PMID : 23420397.
- INAL, J. M., KOSGODAGE, U., AZAM, S., STRATTON, D., ANTWI-BAFFOUR, S. et LANGE, S. (2013). Blood/plasma secretome and microvesicles. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics*.
- IRIZARRY, R. A., BOLSTAD, B. M., COLLIN, F., COPE, L. M., HOBBS, B. et SPEED, T. P. (2003). Summaries of affymetrix GeneChip probe level data. *Nucleic acids research*, 31(4): e15. PMID : 12582260.
- JARJOUR, A. A., DURKO, M., LUK, T. L., MARÇAL, N., SHEKARABI, M. et KENNEDY, T. E. (2011). Autocrine netrin function inhibits glioma cell motility and promotes focal adhesion formation. *PLoS ONE*, 6(9):e25408.
- JAZDZEWSKI, K., LIYANARACHCHI, S., SWIERNIAK, M., PACHUCKI, J., RINGEL, M. D., JARZAB, B. et de la CHAPELLE, A. (2009). Polymorphic mature microRNAs from passenger strand of pre-miR-146a contribute to thyroid cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(5):1502–1505.
- JIANG, Y. et UHRBOM, L. (2012). On the origin of glioma. *Upsala journal of medical sciences*, 117(2):113–121. PMID : 22348397.
- JOHNSTONE, R. M. (2005). Revisiting the road to the discovery of exosomes. *Blood cells, molecules & diseases*, 34(3):214–219. PMID : 15885604.
- JOHNSTONE, R. M. (2006). Exosomes biological significance : A concise review. *Blood cells, molecules & diseases*, 36(2):315–321. PMID : 16487731.
- JOHNSTONE, R. M., ADAM, M., HAMMOND, J. R., ORR, L. et TURBIDE, C. (1987). Vesicle formation during reticulocyte maturation. association of plasma membrane activities with released vesicles (exosomes). *The Journal of biological chemistry*, 262(19):9412–9420. PMID : 3597417.
- JONES, C. I., ZABOLOTSKAYA, M. V., KING, A. J., STEWART, H. J. S., HORNE, G. A., CHEVASSUT, T. J. et NEWBURY, S. F. (2012). Identification of circulating microRNAs as diagnostic biomarkers for use in multiple myeloma. *British Journal of Cancer*, 107(12): 1987–1996.
- JUNG, T., CASTELLANA, D., KLINGBEIL, P., CUESTA HERNÁNDEZ, I., VITACOLONNA, M., ORLICKY, D. J., ROFFLER, S. R., BRODT, P. et ZÖLLER, M. (2009). CD44v6 dependence of premetastatic niche preparation by exosomes. *Neoplasia (New York, N.Y.)*, 11(10):1093–1105. PMID : 19794968.
- KANG, D., OH, S., AHN, S.-M., LEE, B.-H. et MOON, M. H. (2008). Proteomic analysis of exosomes from human neural stem cells by flow field-flow fractionation and nanoflow liquid Chromatography–Tandem mass spectrometry. *Journal of Proteome Research*, 7(8):3475–3480.
- KARPF, A. R., MOORE, B. C., RIRIE, T. O. et JONES, D. A. (2001). Activation of the p53 DNA damage response pathway after inhibition of DNA methyltransferase by 5-aza-2'-deoxycytidine. *Molecular pharmacology*, 59(4):751–757. PMID : 11259619.
- KATAKOWSKI, M., BULLER, B., WANG, X., ROGERS, T. et CHOPP, M. (2010). Functional MicroRNA is transferred between glioma cells. *Cancer Research*, 70(21):8259–8263.
- KATAKOWSKI, M., BULLER, B., ZHENG, X., LU, Y., ROGERS, T., OSOBAMIRO, O., SHU, W., JIANG, F. et CHOPP, M. (2013). Exosomes from marrow stromal cells expressing miR-146b inhibit glioma growth. *Cancer Letters*, 335(1):201–204.
- KATZMANN, D. J. (2003). Vps27 recruits ESCRT machinery to endosomes during MVB sorting. *The Journal of Cell Biology*, 162(3):413–423.

- KATZMANN, D. J., BABST, M. et EMR, S. D. (2001). Ubiquitin-dependent sorting into the multivesicular body pathway requires the function of a conserved endosomal protein sorting complex, ESCRT-I. *Cell*, 106(2):145–155. PMID : 11511343.
- KELLER, S., SANDERSON, M. P., STOECK, A. et ALTEVOGT, P. (2006). Exosomes : from biogenesis and secretion to biological function. *Immunology letters*, 107(2):102–108. PMID : 17067686.
- KHAN, S., JUTZY, J. M. S., ASPE, J. R., MCGREGOR, D. W., NEIDIGH, J. W. et WALL, N. R. (2010). Survivin is released from cancer cells via exosomes. *Apoptosis*, 16(1):1–12.
- KHARAZIHA, P., CEDER, S., LI, Q. et PANARETAKIS, T. (2012). Tumor cell-derived exosomes : A message in a bottle. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, 1826(1):103–111.
- KIM, V. N., HAN, J. et SIOMI, M. C. (2009). Biogenesis of small RNAs in animals. *Nature Reviews. Molecular Cell Biology*, 10(2):126–139. PMID : 19165215.
- KIM, V. N. et NAM, J.-W. (2006). Genomics of microRNA. *Trends in genetics : TIG*, 22(3):165–173. PMID : 16446010.
- KNIZETOVA, P., EHRMANN, J., HLOBILKOVA, A., VANCOVA, I., KALITA, O., KOLAR, Z. et BARTEK, J. (2008). Autocrine regulation of glioblastoma cell cycle progression, viability and radioresistance through the VEGF-VEGFR2 (KDR) interplay. *Cell cycle (Georgetown, Tex.)*, 7(16):2553–2561. PMID : 18719373.
- KOGURE, T., LIN, W.-L., YAN, I. K., BRACONI, C. et PATEL, T. (2011). Intercellular nanovesicle-mediated microRNA transfer : A mechanism of environmental modulation of hepatocellular cancer cell growth. *Hepatology*, 54(4):1237–1248.
- KOH, W., SHENG, C., TAN, B., LEE, Q., KUZNETSOV, V., KIANG, L. et TANAVDE, V. (2010). Analysis of deep sequencing microRNA expression profile from human embryonic stem cells derived mesenchymal stem cells reveals possible role of let-7 microRNA family in downstream targeting of hepatic nuclear factor 4 alpha. *BMC Genomics*, 11(Suppl 1):S6.
- KOSAKA, N., IGUCHI, H., YOSHIOKA, Y., TAKESHITA, F., MATSUKI, Y. et OCHIYA, T. (2010). Secretory mechanisms and intercellular transfer of microRNAs in living cells. *The Journal of Biological Chemistry*, 285(23):17442–17452. PMID : 20353945.
- KOSAKA, N., TAKESHITA, F., YOSHIOKA, Y., HAGIWARA, K., KATSUDA, T., ONO, M. et OCHIYA, T. (2013). Exosomal tumor-suppressive microRNAs as novel cancer therapy. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 65(3):376–382.
- KOZOMARA, A. et GRIFFITHS-JONES, S. (2010). miRBase : integrating microRNA annotation and deep-sequencing data. *Nucleic Acids Research*, 39(Suppl 1):D152–D157.
- KRÄMER-ALBERS, E.-M., BRETZ, N., TENZER, S., WINTERSTEIN, C., MÖBIUS, W., BERGER, H., NAVE, K.-A., SCHILD, H. et TROTTER, J. (2007). Oligodendrocytes secrete exosomes containing major myelin and stress-protective proteins : Trophic support for axons? *PROTEOMICS – CLINICAL APPLICATIONS*, 1(11):1446–1461.
- KRUTOVSKIKH, V. A. et HERCEG, Z. (2010). Oncogenic microRNAs (OncomiRs) as a new class of cancer biomarkers. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*, 32(10):894–904. PMID : 21105295.
- KUCHARZEWSKA, P., CHRISTIANSON, H. C., WELCH, J. E., SVENSSON, K. J., FREDLUND, E., RINGNER, M., MORGELIN, M., BOURSEAU-GUILMAIN, E., BENZON, J. et BELTING, M. (2013). Exosomes reflect the hypoxic status of glioma cells and mediate hypoxia-dependent activation of vascular cells during tumor development. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(18):7312–7317.
- KUMAR, S., KEERTHANA, R., PAZHANIMUTHU, A. et PERUMAL, P. (2013). Overexpression of circulating miRNA-21 and miRNA-146a in plasma samples of breast cancer patients. *Indian journal of biochemistry & biophysics*, 50(3):210–214. PMID : 23898484.

- LABUSSIÈRE, M., SANSON, M., IDBAIH, A. et DELATTRE, J.-Y. (2010). IDH1 gene mutations : a new paradigm in glioma prognosis and therapy ? *The oncologist*, 15(2):196–199. PMID : 20133500.
- LACHENAL, G., PERNET-GALLAY, K., CHIVET, M., HEMMING, F. J., BELLY, A., BODON, G., BLOT, B., HAASE, G., GOLDBERG, Y. et SADOUL, R. (2011). Release of exosomes from differentiated neurons and its regulation by synaptic glutamatergic activity. *Molecular and Cellular Neuroscience*, 46(2):409–418.
- LACROIX, M., ABI-SAÏD, D., FOURNEY, D. R., GOKASLAN, Z. L., SHI, W., DEMONTE, F., LANG, F. F., MCCUTCHEON, I. E., HASSENBUSCH, S. J., HOLLAND, E., HESS, K., MICHAEL, C., MILLER, D. et SAWAYA, R. (2001). A multivariate analysis of 416 patients with glioblastoma multiforme : prognosis, extent of resection, and survival. *Journal of neurosurgery*, 95(2):190–198. PMID : 11780887.
- LAEMMLI, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage t4. *Nature*, 227(5259):680–685. PMID : 5432063.
- LAGES, E., GUTTIN, A., EL ATIFI, M., RAMUS, C., IPAS, H., DUPRÉ, I., ROLLAND, D., SALON, C., GODFRAIND, C., DEFRAIPONT, F., DHOBB, M., PELLETIER, L., WION, D., GAY, E., BERGER, F. et ISSARTEL, J.-P. (2011). MicroRNA and target protein patterns reveal physiopathological features of glioma subtypes. *PLoS ONE*, 6(5):e20600.
- LAGES, E., IPAS, H., GUTTIN, A., NESR, H., BERGER, F. et ISSARTEL, J.-P. (2012). MicroRNAs : molecular features and role in cancer. *Frontiers in bioscience (Landmark edition)*, 17:2508–2540. PMID : 22652795.
- LAKHAL, S. et WOOD, M. J. (2011). Exosome nanotechnology : An emerging paradigm shift in drug delivery : Exploitation of exosome nanovesicles for systemic in vivo delivery of RNAi heralds new horizons for drug delivery across biological barriers. *BioEssays*, 33(10):737–741.
- LAKKARAJU, A. et RODRIGUEZ-BOULAN, E. (2008). Itinerant exosomes : emerging roles in cell and tissue polarity. *Trends in Cell Biology*, 18(5):199–209.
- LAMPARSKI, H. G., METHA-DAMANI, A., YAO, J.-Y., PATEL, S., HSU, D.-H., RUEGG, C. et LE PECQ, J.-B. (2002). Production and characterization of clinical grade exosomes derived from dendritic cells. *Journal of immunological methods*, 270(2):211–226. PMID : 12379326.
- LARSEN, C. (2010). [genetic and molecular abnormalities of glioblastomas (GBM)]. *Bulletin du cancer*, 97(11):1389–1407. PMID : 21084244.
- LAULAGNIER, K., MOTTA, C., HAMDI, S., ROY, S., FAUVELLE, F., PAGEAUX, J.-F., KOBAYASHI, T., SALLES, J.-P., PERRET, B., BONNEROT, C. et RECORD, M. (2004). Mast cell- and dendritic cell-derived exosomes display a specific lipid composition and an unusual membrane organization. *The Biochemical journal*, 380(Pt 1):161–171. PMID : 14965343.
- LAULAGNIER, K., VINCENT-SCHNEIDER, H., HAMDI, S., SUBRA, C., LANKAR, D. et RECORD, M. (2005). Characterization of exosome subpopulations from RBL-2H3 cells using fluorescent lipids. *Blood cells, molecules & diseases*, 35(2):116–121. PMID : 16023874.
- LAVON, I., ZRIHAN, D., GRANIT, A., EINSTEIN, O., FAINSTEIN, N., COHEN, M. A., COHEN, M. A., ZELIKOVITCH, B., SHOSHAN, Y., SPEKTOR, S., REUBINOFF, B. E., FELIG, Y., GERLITZ, O., BEN-HUR, T., SMITH, Y. et SIEGAL, T. (2010). Gliomas display a microRNA expression profile reminiscent of neural precursor cells. *Neuro-oncology*, 12(5):422–433. PMID : 20406893.
- LAWRIE, C. H., GAL, S., DUNLOP, H. M., PUSHKARAN, B., LIGGINS, A. P., PULFORD, K., BANHAM, A. H., PEZZELLA, F., BOULTWOOD, J., WAINSCOT, J. S., HATTON, C. S. R. et HARRIS, A. L. (2008). Detection of elevated levels of tumour-associated microRNAs in serum of patients with diffuse large b-cell lymphoma. *British journal of haematology*, 141(5):672–675. PMID : 18318758.

- LEE, Y., KIM, M., HAN, J., YEOM, K.-H., LEE, S., BAEK, S. H. et KIM, V. N. (2004). MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *The EMBO Journal*, 23(20):4051–4060. PMID : 15372072.
- LEHMANN, B. D., PAINE, M. S., BROOKS, A. M., McCUBREY, J. A., RENEGAR, R. H., WANG, R. et TERRIAN, D. M. (2008). Senescence-associated exosome release from human prostate cancer cells. *Cancer Research*, 68(19):7864–7871.
- LESPAGNOL, A., DUFLAUT, D., BEEKMAN, C., BLANC, L., FIUCCI, G., MARINE, J.-C., VIDAL, M., AMSON, R. et TELERMAN, A. (2008). Exosome secretion, including the DNA damage-induced p53-dependent secretory pathway, is severely compromised in TSAP6/Steap3-null mice. *Cell Death and Differentiation*, 15(11):1723–1733.
- LI, A., WALLING, J., AHN, S., KOTLIAROV, Y., SU, Q., QUEZADO, M., OBERHOLTZER, J. C., PARK, J., ZENKLUSEN, J. C. et FINE, H. A. (2009a). Unsupervised analysis of transcriptomic profiles reveals six glioma subtypes. *Cancer research*, 69(5):2091–2099. PMID : 19244127.
- LI, C. C. Y., EATON, S. A., YOUNG, P. E., LEE, M., SHUTTLEWORTH, R., HUMPHREYS, D. T., GRAU, G. E., COMBES, V., BEBAWY, M., GONG, J., BRAMMAH, S., BUCKLAND, M. E. et SUTER, C. M. (2013a). Glioma microvesicles carry selectively packaged coding and noncoding RNAs which alter gene expression in recipient cells. *RNA biology*, 10(8). PMID : 23807490.
- LI, F., PINCET, F., PEREZ, E., ENG, W. S., MELIA, T. J., ROTHMAN, J. E. et TARESTE, D. (2007). Energetics and dynamics of SNAREpin folding across lipid bilayers. *Nature structural & molecular biology*, 14(10):890–896. PMID : 17906638.
- LI, G., CHEN, Z., HU, Y.-D., WEI, H., LI, D., JI, H. et WANG, D.-L. (2009b). Autocrine factors sustain glioblastoma stem cell self-renewal. *Oncology reports*, 21(2):419–424. PMID : 19148517.
- LI, J., SHERMAN-BAUST, C. A., TSAI-TURTON, M., BRISTOW, R. E., RODEN, R. B. et MORIN, P. J. (2009c). Claudin-containing exosomes in the peripheral circulation of women with ovarian cancer. *BMC Cancer*, 9(1):244.
- LI, K. K.-W., YANG, L., PANG, J. C.-S., CHAN, A. K.-Y., ZHOU, L., MAO, Y., WANG, Y., LAU, K.-M., POON, W. S., SHI, Z. et NG, H.-K. (2013b). MIR-137 suppresses growth and invasion, is downregulated in oligodendroglial tumors and targets CSE1L : miR-137 in oligodendroglial tumors. *Brain Pathology*, 23(4):426–439.
- LIM, L. P., GLASNER, M. E., YEKTA, S., BURGE, C. B. et BARTEL, D. P. (2003). Vertebrate microRNA genes. *Science (New York, N.Y.)*, 299(5612):1540. PMID : 12624257.
- LIU, C., YU, S., ZINN, K., WANG, J., ZHANG, L., JIA, Y., KAPPES, J. C., BARNES, S., KIMBERLY, R. P., GRIZZLE, W. E. et ZHANG, H.-G. (2006). Murine mammary carcinoma exosomes promote tumor growth by suppression of NK cell function. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 176(3):1375–1385. PMID : 16424164.
- LIU, Y., YE, F., YAMADA, K., TSO, J. L., ZHANG, Y., NGUYEN, D. H., DONG, Q., SOTO, H., CHOE, J., DEMBO, A., WHEELER, H., ESKIN, A., SCHMID, I., YONG, W. H., MISHEL, P. S., CLOUGHESY, T. F., KORNBLUM, H. I., NELSON, S. F., LIAU, L. M. et TSO, C.-L. (2011). Autocrine endothelin-3/Endothelin receptor b signaling maintains cellular and molecular properties of glioblastoma stem cells. *Molecular Cancer Research*, 9(12):1668–1685.
- LIVAK, K. J. et SCHMITTGEN, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-delta delta c(t)) method. *Methods (San Diego, Calif.)*, 25(4):402–408. PMID : 11846609.
- LLORENTE, A., van DEURS, B. et SANDVIG, K. (2007). Cholesterol regulates prostatesome release from secretory lysosomes in PC-3 human prostate cancer cells. *European journal of cell biology*, 86(7):405–415. PMID : 17601634.

- LO CICERO, A., SCHIERA, G., PROIA, P., SALADINO, P., SAVETTIERI, G., DI LIEGRO, C. M. et DI LIEGRO, I. (2011). Oligodendroglioma cells shed microvesicles which contain TRAIL as well as molecular chaperones and induce cell death in astrocytes. *International journal of oncology*, 39(6):1353–1357. PMID : 21842121.
- LOUIS, D. N., OHGAKI, H., WIESTLER, O. D., CAVENEE, W. K., BURGER, P. C., JOUVET, A., SCHEITHAUER, B. W. et KLEIHUES, P. (2007). The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta neuropathologica*, 114(2):97–109. PMID : 17618441.
- LU, J., GETZ, G., MISKA, E. A., ALVAREZ-SAAVEDRA, E., LAMB, J., PECK, D., SWEET-CORDERO, A., EBERT, B. L., MAK, R. H., FERRANDO, A. A., DOWNING, J. R., JACKS, T., HORVITZ, H. R. et GOLUB, T. R. (2005). MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature*, 435(7043):834–838. PMID : 15944708.
- LUO, S.-S., ISHIBASHI, O., ISHIKAWA, G., ISHIKAWA, T., KATAYAMA, A., MISHIMA, T., TAKIZAWA, T., SHIGIHARA, T., GOTO, T., IZUMI, A., OHKUCHI, A., MATSUBARA, S., TAKESHITA, T. et TAKIZAWA, T. (2009). Human villous trophoblasts express and secrete placenta-specific MicroRNAs into maternal circulation via exosomes. *Biology of Reproduction*, 81(4):717–729.
- LYNCH, S., SANTOS, S. G., CAMPBELL, E. C., NIMMO, A. M. S., BOTTING, C., PRESCOTT, A., ANTONIOU, A. N. et POWIS, S. J. (2009). Novel MHC class I structures on exosomes. *Journal of Immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 183(3):1884–1891. PMID : 19596992.
- MALLEGOL, J., VAN NIEL, G., LEBRETON, C., LEPELLETIER, Y., CANDALH, C., DUGAVE, C., HEATH, J. K., RAPOSO, G., CERF-BENSUSSAN, N. et HEYMAN, M. (2007). T84-intestinal epithelial exosomes bear MHC class II/peptide complexes potentiating antigen presentation by dendritic cells. *Gastroenterology*, 132(5):1866–1876. PMID : 17484880.
- MAO, H., LEBRUN, D. G., YANG, J., ZHU, V. F. et LI, M. (2012). Deregulated signaling pathways in glioblastoma multiforme : Molecular mechanisms and therapeutic targets. *Cancer Investigation*, 30(1):48–56.
- MARLEAU, A. M., CHEN, C.-S., JOYCE, J. A. et TULLIS, R. H. (2012). Exosome removal as a therapeutic adjuvant in cancer. *Journal of Translational Medicine*, 10(1):134.
- MARSH, M. et van MEER, G. (2008). Cell biology. no ESCRTs for exosomes. *Science (New York, N.Y.)*, 319(5867):1191–1192. PMID : 18309064.
- MARTIN-DUVERNEUIL, N., GUILLEVIN, R. et CHIRAS, J. (2008). Imagerie des gliomes. *Cancer/Radiothérapie*, 12(6-7):669–675.
- MATHIVANAN, S., FAHNER, C. J., REID, G. E. et SIMPSON, R. J. (2011). ExoCarta 2012 : database of exosomal proteins, RNA and lipids. *Nucleic Acids Research*, 40(D1):D1241–D1244.
- MCCULLOUGH, J., FISHER, R. D., WHITBY, F. G., SUNDQUIST, W. I. et HILL, C. P. (2008). ALIX-CHMP4 interactions in the human ESCRT pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105(22):7687–7691.
- MELLO, C. C. et CONTE, Darryl, J. (2004). Revealing the world of RNA interference. *Nature*, 431(7006):338–342. PMID : 15372040.
- MENÉNDEZ, P., PADILLA, D., VILLAREJO, P., PALOMINO, T., NIETO, P., MENÉNDEZ, J. M. et RODRÍGUEZ-MONTES, J. A. (2013). Prognostic implications of serum microRNA-21 in colorectal cancer : microRNA-21 and colorectal cancer. *Journal of Surgical Oncology*, pages n/a–n/a.
- MICHAEL, A., BAJRACHARYA, S. D., YUEN, P. S. T., ZHOU, H., STAR, R. A., ILLEI, G. G. et ALEVIZOS, I. (2010). Exosomes from human saliva as a source of microRNA biomarkers. *Oral Diseases*, 16(1):34–38. PMID : 19627513.
- MINCHEVA-NILSSON, L. et BARANOV, V. (2010). The role of placental exosomes in reproduction : PLACENTAL EXOSOMES IN REPRODUCTION. *American Journal of Reproductive Immunology*, 63(6):520–533.

- MITTLER, M., WALTERS, B. et STOPA, E. (1996). Observer reliability in histological grading of astrocytoma stereotactic biopsies. *J Neurosurg.*, pages 85(6) :1091–4.
- MOLTZAHN, F., OLSHEN, A. B., BAEHNER, L., PEEK, A., FONG, L., STÖPPLER, H., SIMKO, J., HILTON, J. F., CARROLL, P. et BLELLOCH, R. (2011). Microfluidic-based multiplex qRT-PCR identifies diagnostic and prognostic microRNA signatures in the sera of prostate cancer patients. *Cancer research*, 71(2):550–560. PMID : 21098088.
- MONTECALVO, A., LARREGINA, A. T., SHUFESKY, W. J., BEER STOLZ, D., SULLIVAN, M. L. G., KARLSSON, J. M., BATY, C. J., GIBSON, G. A., ERDOS, G., WANG, Z., MILOSEVIC, J., TKACHEVA, O. A., DIVITO, S. J., JORDAN, R., LYONS-WEILER, J., WATKINS, S. C. et MORELLI, A. E. (2011). Mechanism of transfer of functional microRNAs between mouse dendritic cells via exosomes. *Blood*, 119(3):756–766.
- MONTECALVO, A., SHUFESKY, W. J., STOLZ, D. B., SULLIVAN, M. G., WANG, Z., DIVITO, S. J., PAPWORTH, G. D., WATKINS, S. C., ROBBINS, P. D., LARREGINA, A. T. et MORELLI, A. E. (2008). Exosomes as a short-range mechanism to spread alloantigen between dendritic cells during t cell allorecognition. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 180(5): 3081–3090. PMID : 18292531.
- MORELLI, A. E., LARREGINA, A. T., SHUFESKY, W. J., SULLIVAN, M. L. G., STOLZ, D. B., PAPWORTH, G. D., ZAHORCHAK, A. F., LOGAR, A. J., WANG, Z., WATKINS, S. C., FALO, Louis D, J. et THOMSON, A. W. (2004). Endocytosis, intracellular sorting, and processing of exosomes by dendritic cells. *Blood*, 104(10):3257–3266. PMID : 15284116.
- MUELLER, M. M., HEROLD-MENDE, C. C., RIEDE, D., LANGE, M., STEINER, H. H. et FUSENIG, N. E. (1999). Autocrine growth regulation by granulocyte colony-stimulating factor and granulocyte macrophage colony-stimulating factor in human gliomas with tumor progression. *The American journal of pathology*, 155(5):1557–1567. PMID : 10550313.
- NAKAMURA, M., WATANABE, T., KLANGBY, U., ASKER, C., WIMAN, K., YONEKAWA, Y., KLEIHUES, P. et OHGAKI, H. (2001a). p14ARF deletion and methylation in genetic pathways to glioblastomas. *Brain pathology (Zurich, Switzerland)*, 11(2):159–168. PMID : 11303791.
- NAKAMURA, M., WATANABE, T., YONEKAWA, Y., KLEIHUES, P. et OHGAKI, H. (2001b). Promoter methylation of the DNA repair gene MGMT in astrocytomas is frequently associated with G :C → A :T mutations of the TP53 tumor suppressor gene. *Carcinogenesis*, 22(10):1715–1719. PMID : 11577014.
- NIEUWLAND, R. et STURK, A. (2010). Why do cells release vesicles? *Thrombosis Research*, 125:S49–S51.
- NILSSON, J., SKOG, J., NORDSTRAND, A., BARANOV, V., MINCHEVA-NILSSON, L., BREAKEFIELD, X. O. et WIDMARK, A. (2009). Prostate cancer-derived urine exosomes : a novel approach to biomarkers for prostate cancer. *British Journal of Cancer*, 100(10):1603–1607. PMID : 19401683.
- NISSOU, M.-F., ATIFI, M., GUTTIN, A., GODFRAIND, C., SALON, C., GARCION, E., SANDEN, B., ISSARTEL, J.-P., BERGER, F. et WION, D. (2013). Hypoxia-induced expression of VE-cadherin and filamin b in glioma cell cultures and pseudopalisade structures. *Journal of Neuro-Oncology*, 113(2):239–249.
- Nolte-'t HOEN, E. N. M., BUERMANS, H. P. J., WAASDORP, M., STOOORVOGEL, W., WAUBEN, M. H. M. et 't HOEN, P. A. C. (2012). Deep sequencing of RNA from immune cell-derived vesicles uncovers the selective incorporation of small non-coding RNA biotypes with potential regulatory functions. *Nucleic Acids Research*, 40(18):9272–9285.
- OBERHEIM, N. A., GOLDMAN, S. A. et NEDERGAARD, M. (2012). Heterogeneity of astrocytic form and function. In MILNER, R., éditeur : *Astrocytes*, volume 814, pages 23–45. Humana Press, Totowa, NJ.

- OGAWA, Y., KANAI-AZUMA, M., AKIMOTO, Y., KAWAKAMI, H. et YANOSHITA, R. (2008). Exosome-like vesicles with dipeptidyl peptidase IV in human saliva. *Biological & pharmaceutical bulletin*, 31(6):1059–1062. PMID : 18520029.
- OHGAKI, H., DESSEN, P., JOURDE, B., HORSTMANN, S., NISHIKAWA, T., DI PATRE, P.-L., BURKHARD, C., SCHÜLER, D., PROBST-HENSCH, N. M., MAIORKA, P. C., BAEZA, N., PISANI, P., YONEKAWA, Y., YASARGIL, M. G., LÜTOLF, U. M. et KLEIHUES, P. (2004). Genetic pathways to glioblastoma : a population-based study. *Cancer research*, 64(19): 6892–6899. PMID : 15466178.
- OHGAKI, H., EIBL, R. H., WIESTLER, O. D., YASARGIL, M. G., NEWCOMB, E. W. et KLEIHUES, P. (1991). p53 mutations in nonastrocytic human brain tumors. *Cancer research*, 51(22):6202–6205. PMID : 1933879.
- OHGAKI, H. et KLEIHUES, P. (2005). Population-based studies on incidence, survival rates, and genetic alterations in astrocytic and oligodendroglial gliomas. *J Neuropathol Exp Neurol.*, pages 64(6) :479–89.
- OHGAKI, H. et KLEIHUES, P. (2007). Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. *The American journal of pathology*, 170(5):1445–1453. PMID : 17456751.
- OHGAKI, H. et KLEIHUES, P. (2009). Genetic alterations and signaling pathways in the evolution of gliomas. *Cancer Science*, 100(12):2235–2241.
- OHSHIMA, K., INOUE, K., FUJIWARA, A., HATAKEYAMA, K., KANTO, K., WATANABE, Y., MURAMATSU, K., FUKUDA, Y., OGURA, S.-i., YAMAGUCHI, K. et MOCHIZUKI, T. (2010). Let-7 MicroRNA family is selectively secreted into the extracellular environment via exosomes in a metastatic gastric cancer cell line. *PLoS ONE*, 5(10):e13247.
- OSTROWSKI, M., CARMO, N. B., KRUMEICH, S., FANGET, I., RAPOSO, G., SAVINA, A., MOITA, C. F., SCHAUER, K., HUME, A. N., FREITAS, R. P., GOUD, B., BENAROCHE, P., HACOEN, N., FUKUDA, M., DESNOS, C., SEABRA, M. C., DARCHEN, F., AMIGORENA, S., MOITA, L. F. et THERY, C. (2009). Rab27a and rab27b control different steps of the exosome secretion pathway. *Nature Cell Biology*, 12(1):19–30.
- PALANISAMY, V., SHARMA, S., DESHPANDE, A., ZHOU, H., GIMZEWSKI, J. et WONG, D. T. (2010). Nanostructural and transcriptomic analyses of human saliva derived exosomes. *PloS One*, 5(1):e8577. PMID : 20052414.
- PALMA, J., YADDANAPUDI, S. C., PIGATI, L., HAVENS, M. A., JEONG, S., WEINER, G. A., WEIMER, K. M. E., STERN, B., HASTINGS, M. L. et DUELLI, D. M. (2012). MicroRNAs are exported from malignant cells in customized particles. *Nucleic Acids Research*, 40(18):9125–9138.
- PAN, B. T., TENG, K., WU, C., ADAM, M. et JOHNSTONE, R. M. (1985). Electron microscopic evidence for externalization of the transferrin receptor in vesicular form in sheep reticulocytes. *The Journal of cell biology*, 101(3):942–948. PMID : 2993317.
- PAP, E., PÁLLINGER, E., PÁSZTÓI, M. et FALUS, A. (2009). Highlights of a new type of intercellular communication : microvesicle-based information transfer. *Inflammation research : official journal of the European Histamine Research Society ... [et al.]*, 58(1):1–8. PMID : 19132498.
- PARK, J. E., TAN, H. S., DATTA, A., LAI, R. C., ZHANG, H., MENG, W., LIM, S. K. et SZE, S. K. (2010). Hypoxic tumor cell modulates its microenvironment to enhance angiogenic and metastatic potential by secretion of proteins and exosomes. *Molecular & Cellular Proteomics*, 9(6):1085–1099.
- PAROLINI, I., FEDERICI, C., RAGGI, C., LUGINI, L., PALLESCHI, S., DE MILITO, A., COSCIA, C., IESSI, E., LOGOZZI, M., MOLINARI, A., COLONE, M., TATTI, M., SARGIACOMO, M. et FAIS, S. (2009). Microenvironmental pH is a key factor for exosome traffic in tumor cells. *Journal of Biological Chemistry*, 284(49):34211–34222.

- PÊCHE, H., HESLAN, M., USAL, C., AMIGORENA, S. et CUTURI, M. C. (2003). Presentation of donor major histocompatibility complex antigens by bone marrow dendritic cell-derived exosomes modulates allograft rejection. *Transplantation*, 76(10):1503–1510. PMID : 14657694.
- PEGTEL, D. M., COSMOPOULOS, K., THORLEY-LAWSON, D. A., van EIJNDHOVEN, M. A. J., HOPMANS, E. S., LINDENBERG, J. L., de GRUIJL, T. D., WURDINGER, T. et MIDDELDORP, J. M. (2010). Functional delivery of viral miRNAs via exosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(14):6328–6333.
- PEI, Y. et WECHSLER-REYA, R. J. (2010). A malignant oligarchy : progenitors govern the behavior of oligodendrogliomas. *Cancer cell*, 18(6):546–547. PMID : 21156279.
- PEINADO, H., ALEČKOVIĆ, M., LAVOTSHKIN, S., MATEI, I., COSTA-SILVA, B., MORENO-BUENO, G., HERGUETA-REDONDO, M., WILLIAMS, C., GARCÍA-SANTOS, G., GHAJAR, C. M., NITADORI-HOSHINO, A., HOFFMAN, C., BADAL, K., GARCIA, B. A., CALLAHAN, M. K., YUAN, J., MARTINS, V. R., SKOG, J., KAPLAN, R. N., BRADY, M. S., WOLCHOK, J. D., CHAPMAN, P. B., KANG, Y., BROMBERG, J. et LYDEN, D. (2012). Melanoma exosomes educate bone marrow progenitor cells toward a pro-metastatic phenotype through MET. *Nature Medicine*, 18(6):883–891.
- PERMUTH-WEY, J., THOMPSON, R. C., BURTON NABORS, L., OLSON, J. J., BROWNING, J. E., MADDEN, M. H., ANN CHEN, Y. et EGAN, K. M. (2011). A functional polymorphism in the pre-miR-146a gene is associated with risk and prognosis in adult glioma. *Journal of Neuro-Oncology*, 105(3):639–646.
- PERSSON, A. I., PETRITSCH, C., SWARTLING, F. J., ITSARA, M., SIM, F. J., AUVERGNE, R., GOLDENBERG, D. D., VANDENBERG, S. R., NGUYEN, K. N., YAKOVENKO, S., AYERS-RINGLER, J., NISHIYAMA, A., STALLCUP, W. B., BERGER, M. S., BERGERS, G., MCK-NIGHT, T. R., GOLDMAN, S. A. et WEISS, W. A. (2010). Non-stem cell origin for oligodendroglioma. *Cancer cell*, 18(6):669–682. PMID : 21156288.
- PHILLIPS, H., KHARBANDA, S., CHEN, R., FORREST, W., SORIANO, R. et WU, T. (2006). Molecular subclasses of high-grade glioma predict prognosis, delineate a pattern of disease progression, and resemble stages in neurogenesis. *Cancer Cell*, 9:157–173.
- PIGATI, L., YADDANAPUDI, S. C. S., IYENGAR, R., KIM, D.-J., HEARN, S. A., DANFORTH, D., HASTINGS, M. L. et DUELLI, D. M. (2010). Selective release of MicroRNA species from normal and malignant mammary epithelial cells. *PLoS ONE*, 5(10):e13515.
- PISITKUN, T., SHEN, R.-F. et KNEPPER, M. A. (2004). Identification and proteomic profiling of exosomes in human urine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(36):13368–13373. PMID : 15326289.
- PLAISIER, C. L., PAN, M. et BALIGA, N. S. (2012). A miRNA-regulatory network explains how dysregulated miRNAs perturb oncogenic processes across diverse cancers. *Genome research*, 22(11):2302–2314. PMID : 22745231.
- POLTRONIERI, P., D'URSO, P. I., MEZZOLLA, V. et D'URSO, O. F. (2013). Potential of anti-cancer therapy based on anti-miR-155 oligonucleotides in glioma and brain tumours : **Potential of Anti-Cancer Therapy**. *Chemical Biology & Drug Design*, 81(1):79–84.
- PRINCIPE, S., HUI, A. B.-Y., BRUCE, J., SINHA, A., LIU, F.-F. et KISLINGER, T. (2013). Tumor-derived exosomes and microvesicles in head and neck cancer : Implications for tumor biology and biomarker discovery. *PROTEOMICS*, 13(10-11):1608–1623.
- PU, P. (2012). miR-221/222 is the regulator of cx43 expression in human glioblastoma cells. *Oncology Reports*.
- PUROW, B. (2011). The elephant in the room : do microRNA-based therapies have a realistic chance of succeeding for brain tumors such as glioblastoma? *Journal of neuro-oncology*, 103(3):429–436. PMID : 21082214.

- QU, J.-L., QU, X.-J., ZHAO, M.-F., TENG, Y.-E., ZHANG, Y., HOU, K.-Z., JIANG, Y.-H., YANG, X.-H. et LIU, Y.-P. (2009). Gastric cancer exosomes promote tumour cell proliferation through PI3K/Akt and MAPK/ERK activation. *Digestive and Liver Disease*, 41(12):875–880.
- RABINOWITS, G., GERÇEL-TAYLOR, C., DAY, J. M., TAYLOR, D. D. et KLOECKER, G. H. (2009). Exosomal microRNA : a diagnostic marker for lung cancer. *Clinical Lung Cancer*, 10(1):42–46. PMID : 19289371.
- RAMNARAIN, D. B., PARK, S., LEE, D. Y., HATANPAA, K. J., SCOGGIN, S. O., OTU, H., LIBERMANN, T. A., RAISANEN, J. M., ASHFAQ, R., WONG, E. T., WU, J., ELLIOTT, R. et HABIB, A. A. (2006). Differential gene expression analysis reveals generation of an autocrine loop by a mutant epidermal growth factor receptor in glioma cells. *Cancer research*, 66(2):867–874. PMID : 16424019.
- RAPOSO, G., NIJMAN, H. W., STOORVOGEL, W., LIEJENDEKKER, R., HARDING, C. V., MELIEF, C. J. et GEUZE, H. J. (1996). B lymphocytes secrete antigen-presenting vesicles. *The Journal of experimental medicine*, 183(3):1161–1172. PMID : 8642258.
- RAYMOND, E., BRANDES, A. A., DITTRICH, C., FUMOLEAU, P., COUDERT, B., CLEMENT, P. M., FRENAY, M., RAMPLING, R., STUPP, R., KROS, J. M., HEINRICH, M. C., GORLIA, T., LACOMBE, D. et van den BENT, M. J. (2008). Phase II study of imatinib in patients with recurrent gliomas of various histologies : A european organisation for research and treatment of cancer brain tumor group study. *Journal of Clinical Oncology*, 26(28):4659–4665.
- RECORD, M., SUBRA, C., SILVENTE-POIROT, S. et POIROT, M. (2011). Exosomes as intercellular signalosomes and pharmacological effectors. *Biochemical Pharmacology*, 81(10):1171–1182.
- REIFENBERGER, G., LIU, L., ICHIMURA, K., SCHMIDT, E. E. et COLLINS, V. P. (1993). Amplification and overexpression of the MDM2 gene in a subset of human malignant gliomas without p53 mutations. *Cancer research*, 53(12):2736–2739. PMID : 8504413.
- REIFENBERGER, J., REIFENBERGER, G., ICHIMURA, K., SCHMIDT, E. E., WECHSLER, W. et COLLINS, V. P. (1996). Epidermal growth factor receptor expression in oligodendroglial tumors. *The American journal of pathology*, 149(1):29–35. PMID : 8686753.
- REIFENBERGER, J., REIFENBERGER, G., LIU, L., JAMES, C. D., WECHSLER, W. et COLLINS, V. P. (1994). Molecular genetic analysis of oligodendroglial tumors shows preferential allelic deletions on 19q and 1p. *The American journal of pathology*, 145(5):1175–1190. PMID : 7977648.
- RICH, J. N., REARDON, D. A., PEERY, T., DOWELL, J. M., QUINN, J. A., PENNE, K. L., WIKSTRAND, C. J., VAN DUYN, L. B., DANCEY, J. E., MCLENDON, R. E., KAO, J. C., STENZEL, T. T., AHMED RASHEED, B. K., TOURT-UHLIG, S. E., HERNDON, James E, n., VREDENBURGH, J. J., SAMPSON, J. H., FRIEDMAN, A. H., BIGNER, D. D. et FRIEDMAN, H. S. (2004). Phase II trial of gefitinib in recurrent glioblastoma. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 22(1):133–142. PMID : 14638850.
- SAKSENA, S., WAHLMAN, J., TEIS, D., JOHNSON, A. E. et EMR, S. D. (2009). Functional reconstitution of ESCRT-III assembly and disassembly. *Cell*, 136(1):97–109.
- SANAI, N., ALVAREZ-BUYLLA, A. et BERGER, M. S. (2005). Neural stem cells and the origin of gliomas. *The New England journal of medicine*, 353(8):811–822. PMID : 16120861.
- SATO, K., SCHÄUBLE, B., KLEIHUES, P. et OHGAKI, H. (1996). Infrequent alterations of the p15, p16, CDK4 and cyclin d1 genes in non-astrocytic human brain tumors. *International journal of cancer. Journal international du cancer*, 66(3):305–308. PMID : 8621248.

- SAUNDERS, N. A., SIMPSON, F., THOMPSON, E. W., HILL, M. M., ENDO-MUNOZ, L., LEGGATT, G., MINCHIN, R. F. et GUMINSKI, A. (2012). Role of intratumoural heterogeneity in cancer drug resistance : molecular and clinical perspectives. *EMBO molecular medicine*, 4(8):675–684. PMID : 22733553.
- SAVINA, A., FURLÁN, M., VIDAL, M. et COLOMBO, M. I. (2003). Exosome release is regulated by a calcium-dependent mechanism in k562 cells. *The Journal of biological chemistry*, 278(22):20083–20090. PMID : 12639953.
- SEGURA, E., GUÉRIN, C., HOGG, N., AMIGORENA, S. et THÉRY, C. (2007). CD8+ dendritic cells use LFA-1 to capture MHC-peptide complexes from exosomes in vivo. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 179(3):1489–1496. PMID : 17641014.
- SHEN, J., AMBROSONE, C. B., DICIOCCIO, R. A., ODUNSI, K., LELE, S. B. et ZHAO, H. (2008). A functional polymorphism in the miR-146a gene and age of familial breast/ovarian cancer diagnosis. *Carcinogenesis*, 29(10):1963–1966.
- SHERR, C. J. et ROBERTS, J. M. (1999). CDK inhibitors : positive and negative regulators of g1-phase progression. *Genes & development*, 13(12):1501–1512. PMID : 10385618.
- SHU, H. K., KIM, M. M., CHEN, P., FURMAN, F., JULIN, C. M. et ISRAEL, M. A. (1998). The intrinsic radioresistance of glioblastoma-derived cell lines is associated with a failure of p53 to induce p21(BAX) expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 95(24):14453–14458. PMID : 9826721.
- SILBER, J., LIM, D. A., PETRITSCH, C., PERSSON, A. I., MAUNAKEA, A. K., YU, M., VANDENBERG, S. R., GINZINGER, D. G., JAMES, C. D., COSTELLO, J. F., BERGERS, G., WEISS, W. A., ALVAREZ-BUYLLA, A. et HODGSON, J. G. (2008). miR-124 and miR-137 inhibit proliferation of glioblastoma multiforme cells and induce differentiation of brain tumor stem cells. *BMC medicine*, 6:14. PMID : 18577219.
- SIMONS, M. et RAPOSO, G. (2009). Exosomes – vesicular carriers for intercellular communication. *Current Opinion in Cell Biology*, 21(4):575–581.
- SIMPSON, R. J., KALRA, H. et MATHIVANAN, S. (2012). ExoCarta as a resource for exosomal research. *Journal of Extracellular Vesicles*, 1(0).
- SIN, W.-C., CRESPIN, S. et MESNIL, M. (2012). Opposing roles of connexin43 in glioma progression. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1818(8):2058–2067.
- SINGH, S. K., CLARKE, I. D., HIDE, T. et DIRKS, P. B. (2004). Cancer stem cells in nervous system tumors. *Oncogene*, 23(43):7267–7273. PMID : 15378086.
- SIOMI, H. et SIOMI, M. C. (2009). RISC hitches onto endosome trafficking. *Nature Cell Biology*, 11(9):1049–1051.
- SKALSKY, R. L. et CULLEN, B. R. (2011). Reduced expression of brain-enriched microRNAs in glioblastomas permits targeted regulation of a cell death gene. *PLoS ONE*, 6(9):e24248.
- SKOG, J., WÜRDINGER, T., van RIJN, S., MEIJER, D. H., GAINCHE, L., CURRY, W. T., CARTER, B. S., KRICHEVSKY, A. M. et BREAKEFIELD, X. O. (2008). Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nature Cell Biology*, 10(12):1470–1476.
- SKOKOS, D., BOTROS, H. G., DEMEURE, C., MORIN, J., PERONET, R., BIRKENMEIER, G., BOUDALY, S. et MÉCHERI, S. (2003). Mast cell-derived exosomes induce phenotypic and functional maturation of dendritic cells and elicit specific immune responses in vivo. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 170(6):3037–3045. PMID : 12626558.
- SMITH, J. S., ALDERETE, B., MINN, Y., BORELL, T. J., PERRY, A., MOHAPATRA, G., HOSEK, S. M., KIMMEL, D., O'FALLON, J., YATES, A., FEUERSTEIN, B. G., BURGER, P. C., SCHEITHAUER, B. W. et JENKINS, R. B. (1999). Localization of common deletion regions on 1p and 19q in human gliomas and their association with histological subtype. *Oncogene*, 18(28):4144–4152. PMID : 10435596.

- SÁNCHEZ-ALVAREZ, R., TABERNERO, A., SÁNCHEZ-ABARCA, L. I., ORFAO, A., GIAUME, C. et MEDINA, J. M. (2001). Proliferation of c6 glioma cells is blunted by the increase in gap junction communication caused by tolbutamide. *FEBS letters*, 509(2):202–206. PMID : 11741589.
- SOFRONIEW, M. V. et VINTERS, H. V. (2009). Astrocytes : biology and pathology. *Acta Neuropathologica*, 119(1):7–35.
- SPANG, A. (2009). On the fate of early endosomes. *Biological Chemistry*, 390(8).
- SRIDHAR, K., VENKATPRASANNA, G. et SRIDHAR, R. (2011). Management of posterior fossa gliomas in children. *Journal of Pediatric Neurosciences*, 6(3):72.
- STARK, M. S., TYAGI, S., NANCARROW, D. J., BOYLE, G. M., COOK, A. L., WHITEMAN, D. C., PARSONS, P. G., SCHMIDT, C., STURM, R. A. et HAYWARD, N. K. (2010). Characterization of the melanoma miRNAome by deep sequencing. *PloS one*, 5(3):e9685. PMID : 20300190.
- STENMARK, H. (2009). Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 10(8):513–525.
- STOECK, A., KELLER, S., RIEDLE, S., SANDERSON, M. P., RUNZ, S., LE NAOUR, F., GUTWEIN, P., LUDWIG, A., RUBINSTEIN, E. et ALTEVOGT, P. (2006). A role for exosomes in the constitutive and stimulus-induced ectodomain cleavage of I1 and CD44. *The Biochemical journal*, 393(Pt 3):609–618. PMID : 16229685.
- STOORVOGEL, W. (2012). Functional transfer of microRNA by exosomes. *Blood*, 119(3):646–648.
- STOORVOGEL, W., KLEIJMEER, M. J., GEUZE, H. J. et RAPOSO, G. (2002). The biogenesis and functions of exosomes. *Traffic (Copenhagen, Denmark)*, 3(5):321–330. PMID : 11967126.
- STOUT, C. E., COSTANTIN, J. L., NAUS, C. C. G. et CHARLES, A. C. (2002). Intercellular calcium signaling in astrocytes via ATP release through connexin hemichannels. *The Journal of biological chemistry*, 277(12):10482–10488. PMID : 11790776.
- STRALE, P.-O., CLARHAUT, J., LAMICHE, C., CRONIER, L., MESNIL, M. et DEFAMIE, N. (2012). Down-regulation of connexin43 expression reveals the involvement of caveolin-1 containing lipid rafts in human u251 glioblastoma cell invasion. *Molecular carcinogenesis*, 51(11):845–860. PMID : 21882259.
- STREET, J. M., BARRAN, P. E., MACKAY, C. L., WEIDT, S., BALMFORTH, C., WALSH, T. S., CHALMERS, R. T., WEBB, D. J. et DEAR, J. W. (2012). Identification and proteomic profiling of exosomes in human cerebrospinal fluid. *Journal of Translational Medicine*, 10(1):5.
- STUFFERS, S., SEM WEGNER, C., STENMARK, H. et BRECH, A. (2009). Multivesicular endosome biogenesis in the absence of ESCRTs. *Traffic*, 10(7):925–937.
- STUPP, R., MASON, W. P., van den BENT, M. J., WELLER, M., FISHER, B., TAPHOORN, M. J. B., BELANGER, K., BRANDES, A. A., MAROSI, C., BOGDAHN, U., CURSCHMANN, J., JANZER, R. C., LUDWIN, S. K., GORLIA, T., ALLGEIER, A., LACOMBE, D., CAIRNCROSS, J. G., EISENHAEUER, E., MIRIMANOFF, R. O., EUROPEAN ORGANISATION FOR RESEARCH AND TREATMENT OF CANCER BRAIN TUMOR AND RADIOTHERAPY GROUPS et NATIONAL CANCER INSTITUTE OF CANADA CLINICAL TRIALS GROUP (2005). Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *The New England journal of medicine*, 352(10):987–996. PMID : 15758009.
- SUADICANI, S. O., FLORES, C. E., URBAN-MALDONADO, M., BEELITZ, M. et SCEMES, E. (2004). Gap junction channels coordinate the propagation of intercellular ca²⁺ signals generated by P2Y receptor activation. *Glia*, 48(3):217–229. PMID : 15390120.

- SUBRA, C., LAULAGNIER, K., PERRET, B. et RECORD, M. (2007). Exosome lipidomics unravels lipid sorting at the level of multivesicular bodies. *Biochimie*, 89(2):205–212. PMID : 17157973.
- TANAKA, Y., KAMOHARA, H., KINOSHITA, K., KURASHIGE, J., ISHIMOTO, T., IWATSUKI, M., WATANABE, M. et BABA, H. (2013). Clinical impact of serum exosomal microRNA-21 as a clinical biomarker in human esophageal squamous cell carcinoma. *Cancer*, 119(6):1159–1167.
- TAYLOR, A. R., ROBINSON, M. B., GIFONDORWA, D. J., TYTELL, M. et MILLIGAN, C. E. (2007). Regulation of heat shock protein 70 release in astrocytes : role of signaling kinases. *Developmental neurobiology*, 67(13):1815–1829. PMID : 17701989.
- TAYLOR, D. D., AKYOL, S. et GERCEL-TAYLOR, C. (2006). Pregnancy-associated exosomes and their modulation of t cell signaling. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 176(3):1534–1542. PMID : 16424182.
- TAYLOR, D. D. et GERCEL-TAYLOR, C. (2008). MicroRNA signatures of tumor-derived exosomes as diagnostic biomarkers of ovarian cancer. *Gynecologic Oncology*, 110(1):13–21. PMID : 18589210.
- TEPLYUK, N. M., MOLLENHAUER, B., GABRIELY, G., GIESE, A., KIM, E., SMOLSKY, M., KIM, R. Y., SARIA, M. G., PASTORINO, S., KESARI, S. et KRICHEVSKY, A. M. (2012). MicroRNAs in cerebrospinal fluid identify glioblastoma and metastatic brain cancers and reflect disease activity. *Neuro-Oncology*, 14(6):689–700.
- THÉRY, C. (2011). Exosomes : secreted vesicles and intercellular communications. *F1000 Biology Reports*, 3.
- THÉRY, C., AMIGORENA, S., RAPOSO, G. et CLAYTON, A. (2006). Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids. *Current protocols in cell biology / editorial board, Juan S. Bonifacino ... [et al.]*, Chapter 3:Unit 3.22. PMID : 18228490.
- THÉRY, C., DUBAN, L., SEGURA, E., VÉRON, P., LANTZ, O. et AMIGORENA, S. (2002). Indirect activation of naïve CD4+ t cells by dendritic cell-derived exosomes. *Nature immunology*, 3(12):1156–1162. PMID : 12426563.
- THÉRY, C., OSTROWSKI, M. et SEGURA, E. (2009). Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nature Reviews Immunology*, 9(8):581–593.
- TIAN, T., ZHU, Y.-L., HU, F.-H., WANG, Y.-Y., HUANG, N.-P. et XIAO, Z.-D. (2013). Dynamics of exosome internalization and trafficking. *Journal of Cellular Physiology*, 228(7):1487–1495.
- TRAJKOVIC, K., HSU, C., CHIANTIA, S., RAJENDRAN, L., WENZEL, D., WIELAND, F., SCHWILLE, P., BRUGGER, B. et SIMONS, M. (2008). Ceramide triggers budding of exosome vesicles into multivesicular endosomes. *Science*, 319(5867):1244–1247.
- TRAMS, E. G., LAUTER, C. J., SALEM, N. J. et HEINE, U. (1981). Exfoliation of membrane ecto-enzymes in the form of micro-vesicles. *Biochimica et biophysica acta*, 645(1):63–70. PMID : 6266476.
- TURCHINOVICH, A., WEIZ, L., LANGHEINZ, A. et BURWINKEL, B. (2011). Characterization of extracellular circulating microRNA. *Nucleic Acids Research*, 39(16):7223–7233.
- UMEZU, T., OHYASHIKI, K., KURODA, M. et OHYASHIKI, J. H. (2012). Leukemia cell to endothelial cell communication via exosomal miRNAs. *Oncogene*, 32(22):2747–2755.
- VAKSMAN, O., STAVNES, H. T., KAERN, J., TROPE, C. G., DAVIDSON, B. et REICH, R. (2011). miRNA profiling along tumour progression in ovarian carcinoma. *Journal of cellular and molecular medicine*, 15(7):1593–1602. PMID : 20716115.

- VALADI, H., EKSTRÖM, K., BOSSIOS, A., SJÖSTRAND, M., LEE, J. J. et LÖTVALL, J. O. (2007). Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nature Cell Biology*, 9(6):654–659. PMID : 17486113.
- VALLHOV, H., GUTZEIT, C., JOHANSSON, S. M., NAGY, N., PAUL, M., LI, Q., FRIEND, S., GEORGE, T. C., KLEIN, E., SCHEYNIUS, A. et GABRIELSSON, S. (2010). Exosomes containing glycoprotein 350 released by EBV-Transformed b cells selectively target b cells through CD21 and block EBV infection in vitro. *The Journal of Immunology*, 186(1):73–82.
- van den BENT, M. J., AFRA, D., de WITTE, O., BEN HASSEL, M., SCHRAUB, S., HOANG-XUAN, K., MALMSTRÖM, P.-O., COLLETTE, L., PIÉRART, M., MIRIMANOFF, R., KARIM, A. B. M. F. et EORTC RADIOTHERAPY AND BRAIN TUMOR GROUPS AND THE UK MEDICAL RESEARCH COUNCIL (2005). Long-term efficacy of early versus delayed radiotherapy for low-grade astrocytoma and oligodendroglioma in adults : the EORTC 22845 randomised trial. *Lancet*, 366(9490):985–990. PMID : 16168780.
- van den BENT, M. J., BRANDES, A. A., RAMPLING, R., KOUWENHOVEN, M. C., KROS, J. M., CARPENTIER, A. F., CLEMENT, P. M., FRENAY, M., CAMPONE, M., BAURAIN, J.-F., ARMAND, J.-P., TAPHOORN, M. J., TOSONI, A., KLETZL, H., KLUGHAMMER, B., LACOMBE, D. et GORLIA, T. (2009). Randomized phase II trial of erlotinib versus temozolomide or carmustine in recurrent glioblastoma : EORTC brain tumor group study 26034. *Journal of Clinical Oncology*, 27(8):1268–1274.
- VAN NIEL, G., CHARRIN, S., SIMOES, S., ROMAO, M., ROCHIN, L., SAFTIG, P., MARKS, M., RUBINSTEIN, E. et RAPOSO, G. (2011). The tetraspanin CD63 regulates ESCRT-Independent and -dependent endosomal sorting during melanogenesis. *Developmental Cell*, 21(4):708–721.
- VENTURA, A., YOUNG, A. G., WINSLOW, M. M., LINTAULT, L., MEISSNER, A., ERKELAND, S. J., NEWMAN, J., BRONSON, R. T., CROWLEY, D., STONE, J. R., JAENISCH, R., SHARP, P. A. et JACKS, T. (2008). Targeted deletion reveals essential and overlapping functions of the miR-17~92 family of miRNA clusters. *Cell*, 132(5):875–886.
- VERHAAK, R. G., HOADLEY, K. A., PURDOM, E., WANG, V., QI, Y., WILKERSON, M. D., MILLER, C. R., DING, L., GOLUB, T. et MESIROV, J. P. (2010). Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell*, 17(1):98–110.
- VIAUD, S., PLOIX, S., LAPIERRE, V., THÉRY, C., COMMERE, P.-H., TRAMALLONI, D., GORRICHON, K., VIRAULT-ROCROY, P., TURSZ, T., LANTZ, O., ZITVOGEL, L. et CHAPUT, N. (2011). Updated technology to produce highly immunogenic dendritic cell-derived exosomes of clinical grade : A critical role of interferon- γ . *Journal of Immunotherapy*, 34(1):65–75.
- VIDAL, M., MANGEAT, P. et HOEKSTRA, D. (1997). Aggregation reroutes molecules from a recycling to a vesicle-mediated secretion pathway during reticulocyte maturation. *Journal of cell science*, 110 (Pt 16):1867–1877. PMID : 9296387.
- VIVES, K. P. et PIEPMEIER, J. M. (1999). Complications and expected outcome of glioma surgery. *Journal of neuro-oncology*, 42(3):289–302. PMID : 10433111.
- VOS, K. E., BALAJ, L., SKOG, J. et BREAKEFIELD, X. O. (2011). Brain tumor microvesicles : Insights into intercellular communication in the nervous system. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 31(6):949–959.
- VOUSDEN, K. H. et LU, X. (2002). Live or let die : the cell's response to p53. *Nature reviews. Cancer*, 2(8):594–604. PMID : 12154352.
- WALKER, M. D., ALEXANDER, E. J., HUNT, W. E., MACCARTY, C. S., MAHALEY, M S, J., MEALEY, J. J., NORRELL, H. A., OWENS, G., RANSOHOFF, J., WILSON, C. B., GEHAN, E. A. et STRIKE, T. A. (1978). Evaluation of BCNU and/or radiotherapy in the treatment of anaplastic gliomas. a cooperative clinical trial. *Journal of neurosurgery*, 49(3):333–343. PMID : 355604.

- WALLACE, P. K., TARIO, Joseph D, J., FISHER, J. L., WALLACE, S. S., ERNSTOFF, M. S. et MUIRHEAD, K. A. (2008). Tracking antigen-driven responses by flow cytometry : monitoring proliferation by dye dilution. *Cytometry. Part A : the journal of the International Society for Analytical Cytology*, 73(11):1019–1034. PMID : 18785636.
- WANG, K., ZHANG, S., WEBER, J., BAXTER, D. et GALAS, D. J. (2010). Export of microRNAs and microRNA-protective protein by mammalian cells. *Nucleic Acids Research*. PMID : 20615901.
- WANG, Q., LI, P., LI, A., JIANG, W., WANG, H., WANG, J. et XIE, K. (2012). Plasma specific miRNAs as predictive biomarkers for diagnosis and prognosis of glioma. *Journal of Experimental & Clinical Cancer Research*, 31(1):97.
- WANG, Y. et LEE, C. G. L. (2009). MicroRNA and cancer—focus on apoptosis. *Journal of cellular and molecular medicine*, 13(1):12–23. PMID : 19175697.
- WANG, Z., ZHANG, H., HE, L., DONG, W., LI, J., SHAN, Z. et TENG, W. (2013). Association between the expression of four upregulated miRNAs and extrathyroidal invasion in papillary thyroid carcinoma. *Oncotargets and therapy*, 6:281–287. PMID : 23569392.
- WATANABE, T., NOBUSAWA, S., KLEIHUES, P. et OHGAKI, H. (2009). IDH1 mutations are early events in the development of astrocytomas and oligodendrogliomas. *The American Journal of Pathology*, 174(4):1149–1153.
- WINTER, J., JUNG, S., KELLER, S., GREGORY, R. I. et DIEDERICH, S. (2009). Many roads to maturity : microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nature cell biology*, 11(3):228–234. PMID : 19255566.
- WOLFERS, J., LOZIER, A., RAPOSO, G., REGNAULT, A., THÉRY, C., MASURIER, C., FLAMENT, C., POUZIEUX, S., FAURE, F., TURSZ, T., ANGEVIN, E., AMIGORENA, S. et ZITVOGEL, L. (2001). Tumor-derived exosomes are a source of shared tumor rejection antigens for CTL cross-priming. *Nature medicine*, 7(3):297–303. PMID : 11231627.
- WOLLERT, T. et HURLEY, J. H. (2010). Molecular mechanism of multivesicular body biogenesis by ESCRT complexes. *Nature*, 464(7290):864–869.
- WUBBOLTS, R., LECKIE, R. S., VEENHUIZEN, P. T. M., SCHWARZMANN, G., MÖBIUS, W., HOERNSCHEMEYER, J., SLOT, J.-W., GEUZE, H. J. et STOOORVOGEL, W. (2003). Proteomic and biochemical analyses of human b cell-derived exosomes. potential implications for their function and multivesicular body formation. *The Journal of biological chemistry*, 278(13):10963–10972. PMID : 12519789.
- XIAO, W.-H., SANREN, G.-W., ZHU, J.-H., LI, Q.-W., KANG, H.-R., WANG, R.-L., SONG, L.-P. et YE, M. (2010). Effect of 5-aza-2'-deoxycytidine on immune-associated proteins in exosomes from hepatoma. *World Journal of Gastroenterology : WJG*, 16(19):2371–2377. PMID : 20480522.
- XU, B., FENG, N.-H., LI, P.-C., TAO, J., WU, D., ZHANG, Z.-D., TONG, N., WANG, J.-F., SONG, N.-H., ZHANG, W., HUA, L.-X. et WU, H.-F. (2009). A functional polymorphism in *Pre-miR-146a* gene is associated with prostate cancer risk and mature miR-146a expression in vivo. *The Prostate*, pages n/a–n/a.
- XU, B., WANG, N., WANG, X., TONG, N., SHAO, N., TAO, J., LI, P., NIU, X., FENG, N., ZHANG, L., HUA, L., WANG, Z. et CHEN, M. (2012). MiR-146a suppresses tumor growth and progression by targeting EGFR pathway and in a p-ERK-dependent manner in castration-resistant prostate cancer. *The Prostate*, 72(11):1171–1178.
- XU, T., ZHU, Y., WEI, Q.-K., YUAN, Y., ZHOU, F., GE, Y.-Y., YANG, J.-R., SU, H. et ZHUANG, S.-M. (2008). A functional polymorphism in the miR-146a gene is associated with the risk for hepatocellular carcinoma. *Carcinogenesis*, 29(11):2126–2131.
- YAMAKUCHI, M., FERLITO, M. et LOWENSTEIN, C. J. (2008). miR-34a repression of SIRT1 regulates apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(36):13421–13426. PMID : 18755897.

- YAN, H., PARSONS, D. W., JIN, G., MCLENDON, R., RASHEED, B. A., YUAN, W., KOS, I., BATINIC-HABERLE, I., JONES, S., RIGGINS, G. J., FRIEDMAN, H., FRIEDMAN, A., REARDON, D., HERNDON, J., KINZLER, K. W., VELCULESCU, V. E., VOGELSTEIN, B. et BIGNER, D. D. (2009). IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. *The New England journal of medicine*, 360(8):765–773. PMID : 19228619.
- YANG, C., WANG, C., CHEN, X., CHEN, S., ZHANG, Y., ZHI, F., WANG, J., LI, L., ZHOU, X., LI, N., PAN, H., ZHANG, J., ZEN, K., ZHANG, C.-Y. et ZHANG, C. (2013). Identification of seven serum microRNAs from a genome-wide serum microRNA expression profile as potential noninvasive biomarkers for malignant astrocytomas. *International Journal of Cancer*, 132(1):116–127.
- YAO, Y., CHAN, A. K.-Y., QIN, Z. Y., CHEN, L. C., ZHANG, X., PANG, J. C.-S., LI, H. M., WANG, Y., MAO, Y., NG, H.-K. et ZHOU, L. F. (2013). Mutation analysis of IDH1 in paired gliomas revealed IDH1 mutation was not associated with malignant progression but predicted longer survival. *PloS one*, 8(6):e67421. PMID : 23840696.
- YE, X.-z., XU, S.-l., XIN, Y.-h., YU, S.-c., PING, Y.-f., CHEN, L., XIAO, H.-l., WANG, B., YI, L., WANG, Q.-l., JIANG, X.-f., YANG, L., ZHANG, P., QIAN, C., CUI, Y.-h., ZHANG, X. et BIAN, X.-w. (2012). Tumor-associated microglia/macrophages enhance the invasion of glioma stem-like cells via TGF- β 1 signaling pathway. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 189(1):444–453. PMID : 22664874.
- YU, S.-C., XIAO, H.-L., JIANG, X.-F., WANG, Q.-L., LI, Y., YANG, X.-J., PING, Y.-F., DUAN, J. J., JIANG, J.-Y., YE, X.-Z., XU, S.-L., XIN, Y.-H., YAO, X.-H., CHEN, J.-H., CHU, W.-H., SUN, W., WANG, B., WANG, J. M., ZHANG, X. et BIAN, X.-W. (2012). Connexin 43 reverses malignant phenotypes of glioma stem cells by modulating e-cadherin. *STEM CELLS*, 30(2):108–120.
- YU, X., HARRIS, S. L. et LEVINE, A. J. (2006). The regulation of exosome secretion : a novel function of the p53 protein. *Cancer research*, 66(9):4795–4801. PMID : 16651434.
- ZHAI, H., HEPPNER, F. L. et TSIRKA, S. E. (2011). Microglia/macrophages promote glioma progression. *Glia*, 59(3):472–485. PMID : 21264953.
- ZHANG, C.-Z., ZHANG, J.-X., ZHANG, A.-L., SHI, Z.-D., HAN, L., JIA, Z.-F., YANG, W.-D., WANG, G.-X., JIANG, T., YOU, Y.-P., PU, P.-Y., CHENG, J.-Q. et KANG, C.-S. (2010). MiR-221 and miR-222 target PUMA to induce cell survival in glioblastoma. *Molecular cancer*, 9:229. PMID : 20813046.
- ZHANG, G., ZHOU, H., XIAO, H., LIU, Z., TIAN, H. et ZHOU, T. (2013). MicroRNA-92a functions as an oncogene in colorectal cancer by targeting PTEN. *Digestive diseases and sciences*. PMID : 24026406.
- ZHANG, J., SARKAR, S., CUA, R., ZHOU, Y., HADER, W. et YONG, V. W. (2011). A dialog between glioma and microglia that promotes tumor invasiveness through the CCL2/CCR2/interleukin-6 axis. *Carcinogenesis*, 33(2):312–319.
- ZHANG, W., COULDWELL, W. T., SIMARD, M. F., SONG, H., LIN, J. H. et NEDERGAARD, M. (1999). Direct gap junction communication between malignant glioma cells and astrocytes. *Cancer research*, 59(8):1994–2003. PMID : 10213512.
- ZHOU, X., REN, Y., MOORE, L., MEI, M., YOU, Y., XU, P., WANG, B., WANG, G., JIA, Z., PU, P., ZHANG, W. et KANG, C. (2010). Downregulation of miR-21 inhibits EGFR pathway and suppresses the growth of human glioblastoma cells independent of PTEN status. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 90(2):144–155. PMID : 20048743.
- ZITVOGEL, L., REGNAULT, A., LOZIER, A., WOLFERS, J., FLAMENT, C., TENZA, D., RICCIARDI-CASTAGNOLI, P., RAPOSO, G. et AMIGORENA, S. (1998). Eradication of established murine tumors using a novel cell-free vaccine : dendritic cell-derived exosomes. *Nature medicine*, 4(5):594–600. PMID : 9585234.

- ZOMER, A., VENDRIG, T., HOPMANS, E. S., van EIJNDHOVEN, M., MIDDELDORP, J. M. et PEGTEL, D. M. (2010). Exosomes : Fit to deliver small RNA. *Communicative & Integrative Biology*, 3(5):447–450.
- ZONG, H., VERHAAK, R. G. W. et CANOLL, P. (2012). The cellular origin for malignant glioma and prospects for clinical advancements. *Expert review of molecular diagnostics*, 12(4):383–394. PMID : 22616703.
- ZYLBERSZTEJN, K. et GALLI, T. (2011). Vesicular traffic in cell navigation : Vesicular trafficking in cell navigation. *FEBS Journal*, 278(23):4497–4505.

A Annexe1 : Méthodes d'analyse des ARN

A.1 Analyse des ARN par électrophorèse capillaire

Le bioanalyseur Agilent 2100 permet, via les puces « RNA Lab Chip », une migration électrophorétique miniaturisée de chaque échantillon d'ARN pour en vérifier l'intégrité. Un marquage fluorescent est incorporé aux échantillons qui sont ensuite détectés en fonction de leur taille, permettant l'obtention de profils d'électrophorèse. À l'aide des temps de rétention et des intensités de fluorescence de chaque échantillon, des données qualitatives et quantitatives sont extraites et permettent de valider la qualité des préparations.

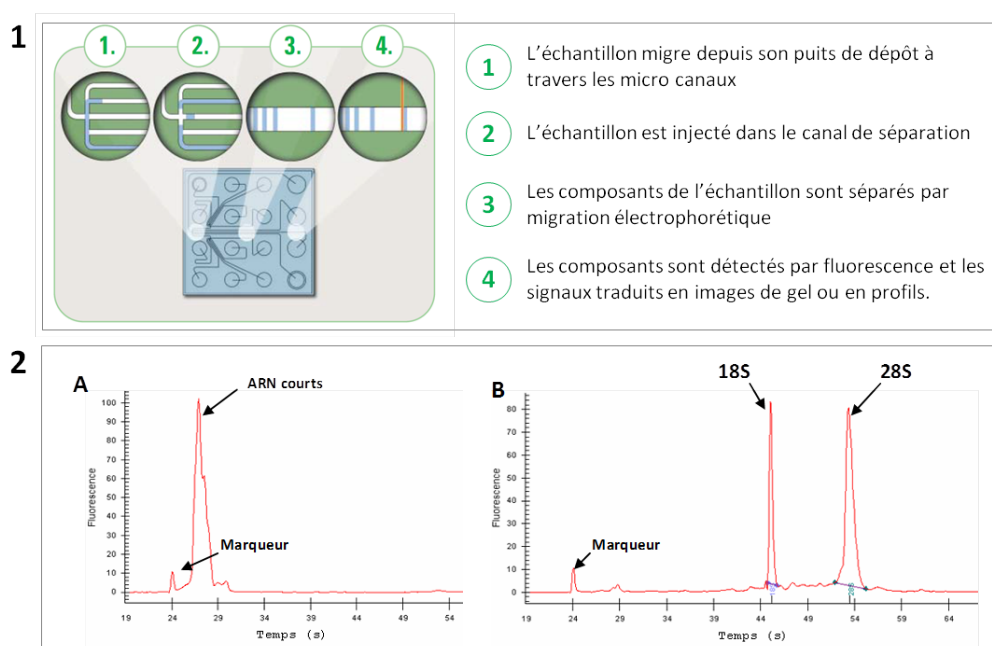


FIGURE 53 – Principe de fonctionnement Bioanalyseur Agilent 2100 et profils obtenus.

1. Principe de fonctionnement

2. Profils d'électrophorèse miniature obtenus après migration des ARN courts sur une puce Agilent RNA Small (A) et longs sur une puce Agilent RNA Nano ou Pico 6000 (B).

Les pics annotés 18S et 28S sont les pics d'ARN ribosomiaux 18S et 28S. L'allure de l'électrophorégramme permet de calculer le RIN (RNA Integrity Number). Ce nombre est compris entre 0 et 10 et reflète l'intégrité des ARN analysés ; au dessus de 7 ces ARN sont considérés comme parfaitement intègres.

A.2 Quantification des microARN par RT-qPCR Taqman

La particularité de la RT-qPCR Taqman (Figure 54) repose sur l'utilisation de primers de RT en forme de boucle, ce qui les rend entièrement spécifiques à un microARN mature donné et rend impossible l'hybridation de ces mêmes primers sur les premiR correspondants. La réaction nécessite alors des amorces spécifiques à chaque microARN dosé.

Pour la qPCR, les sondes TaqMan[®] (TaqMan probe), ici utilisées, permettent le suivi de fluorescence grâce à l'utilisation du phénomène FRET (Fluorescent Resonance Energy Transfert). Ces sondes possèdent deux fluorophores, « un donneur » (« F ») et « un accepteur » (« Q » pour quencher). S'ils sont proches dans l'espace, le donneur peut transférer son énergie à l'« accepteur » et ainsi atténuer le signal de fluorescence. Lors du déroulement de la PCR, la sonde Taqman est dépolymérisée par l'action de l'ADN Polymérase, conduisant à « l'éloignement » des fluorophores et donc à une augmentation de la fluorescence. Ainsi la fluorescence mesurée est proportionnelle à la quantité d'amplicon formée.

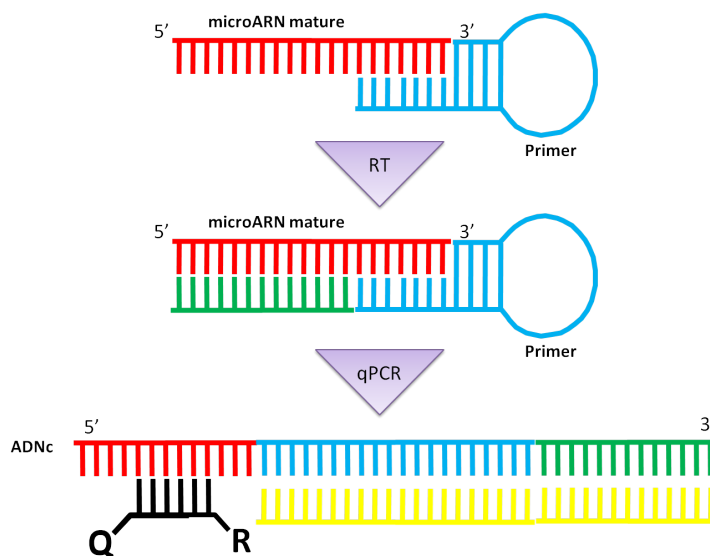


FIGURE 54 – Principe de la RT-qPCR Taqman

A.3 Dosage des microARN par hybridation (technique QuantiGene)

La technique QuantiGene permet de doser les ARNs d'un échantillon directement suite à une lyse, évitant l'étape d'extraction ou de purification des ARNs.

Les ARN souhaités sont ensuite dosés par détection d'un signal lumineux attestant de la présence dans l'échantillon des ARN donnés puisqu'ils se sont alors hybridés sur les sondes

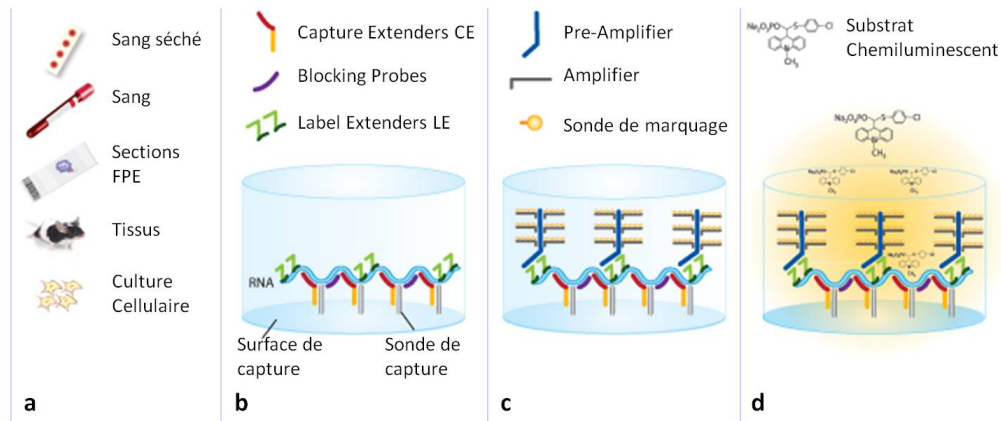


FIGURE 55 – Principe de la méthode QuantiGene

a. Types d'échantillons pris en charge par cette technique

b. Construction des sondes de captures - spécifiques d'une partie de la séquence de l'ARN à doser - à l'aide des « Capture Extenders » (rouge et jaune) et des « Bloquant Probes » (violet); puis hybridation de l'ARN (bleu) sur ces sondes de captures et hybridation des « Labels Extenders » (vert) sur une autre partie de la séquence de l'ARN à quantifier.

c. Construction d'un « arbre de détection » à partir de chaque « Label Extender ».

d. Détection de la luminescence induite par les arbres de détection en présence d'un substrat luminescent.

spécifiques à la séquence de ces ARN donnés.

A.4 Analyse des profils d'expression sur puces Affymetrix

La technologie des puces Affymetrix est basée sur une méthode d'hybridation d'ARN marqués sur des puces contenant les séquences complémentaires de ces ARN. Ces séquences d'oligonucléotides de 25 nucléotides sont synthétisées *in situ* par photolithographie (Figure 56).

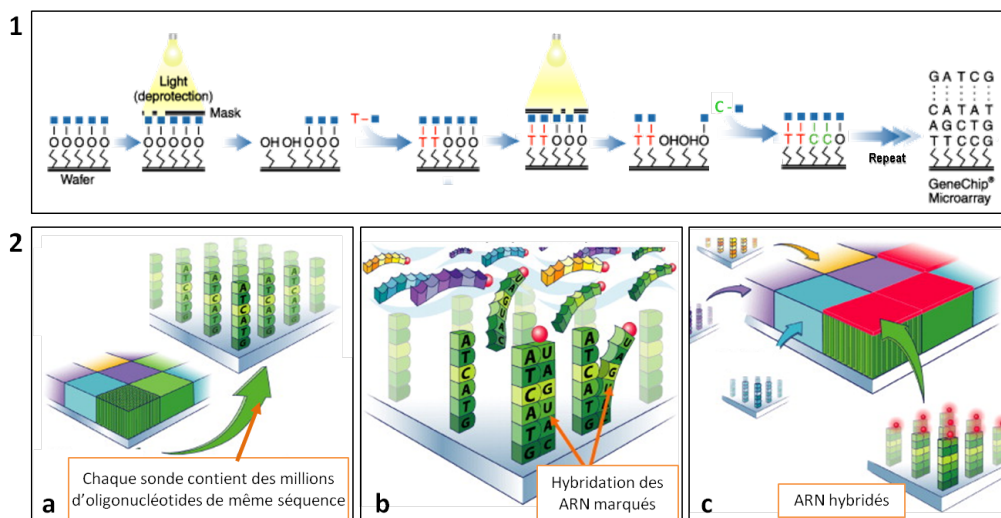


FIGURE 56 – Principe des puces Affymetrix

1. Principe de synthèse d'oligonucléotide par photolithographie

2. Puces Affymetrix : a) Composition, b) Hybridation, c) Détection des sondes hybridées

A.4.1 microARN

Les ARN courts sont marqués au préalable grâce au FlashTag® Biotin HSR labeling kit (Genisphere).

Ce marquage consiste en une première étape de polyadénylation des ARN en 3'. Une deuxième étape permet ensuite de fixer sur la queue polyA, tout juste synthétisée, un oligonucléotide possédant un dendrimère 3DNA en son extrémité. Ce dendrimère est marqué avec 15 biotines de manière à obtenir un signal amplifié. Les ARN marqués sont ensuite hybridés sur puces Affymetrix de type miRNA Genechip. (Figure 57).

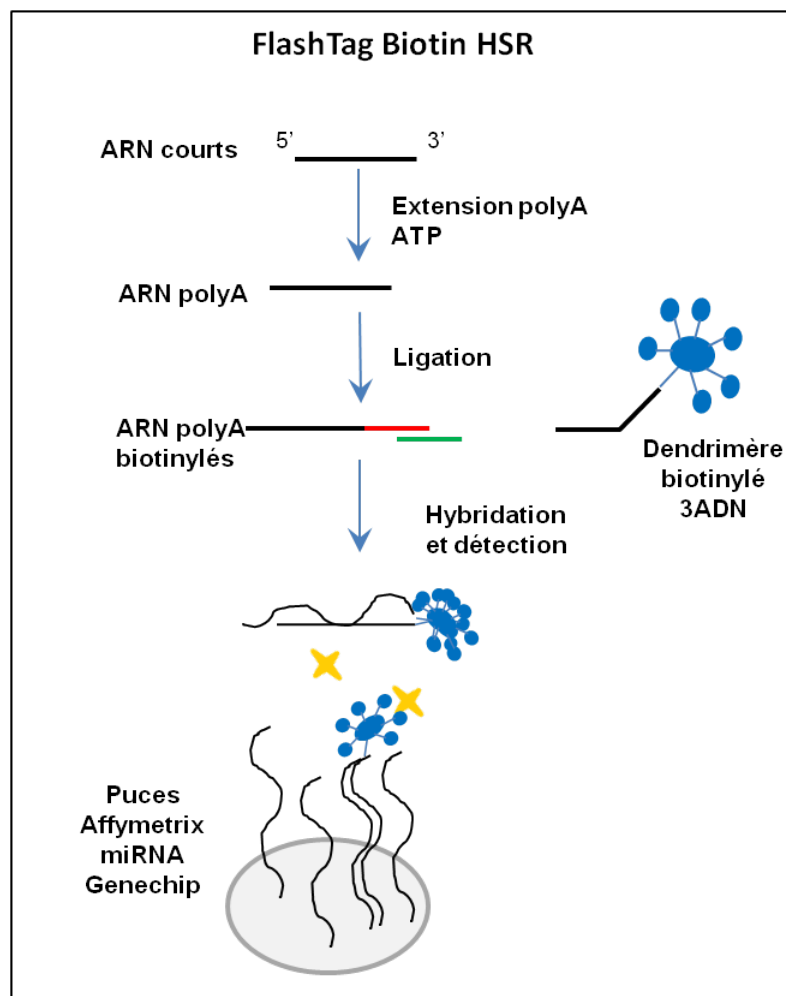


FIGURE 57 – Principe de marquage Genisphere

Ces puces sont multi espèces et les « probesets » sont ici composés de 4 sondes identiques pour le dosage des miARN. Des séquences contrôles sont également incluses comme les contrôles d'hybridation identiques aux puces U133 Plus 2.0 mais également des contrôles permettant de s'assurer de l'absence de RNAses.

Trois versions de puces ont été commercialisées successivement, permettant de suivre l'évolution de la miRbase. La version 1 (v1) est basée sur la version 11 de miRbase et permet de doser 847 microARN humains. Les deux versions suivantes permettent aussi de doser les premiRs : la version 2 (v2) basée sur la version 15 permet de doser 1105 microARN humains et 1105 premiR humains, et enfin la version 3 (v3) basée sur la version 17 permet de doser 1733 microARN humains et 1658 premiR humains (Figure 58).

Array contents	miRNA	miRNA 2.0	miRNA 3.0
miRBase Version	11	15	17
Organisms	74	131	153
Total Probe Sets	7,815	15,644	19,724
Probes/Probe Set for mature miRNA	4	9	9
Human mature miRNA	847	1,105	1,733
Mouse mature miRNA	609	722	1,111
Rat mature miRNA	351	389	680
Human snoRNA and scaRNA	922	2,334	2,216
Human pre-miRNA	-	1,105	1,658
Mouse pre-miRNA	-	690	855
Rat pre-miRNA	-	389	486

FIGURE 58 – Trois versions de puces Affymetrix miRNA Genechip

A.4.2 ARN messagers

Les ARN messagers sont au préalable marqués avec le kit Genechip® 3' IVT Express kit (Affymetrix), qui permet de créer et d'amplifier des fragments d'ARN complémentaires des ARNm tout en incorporant de la biotine dans ces fragments (Figure 59).

Pour doser les ARN messagers, ce sont les puces de type U133 Plus 2.0 qui sont utilisées. Elles permettent de doser l'expression d'environ 39000 gènes humains. Pour ce faire chaque séquence d'ARNm est ciblée par un ou plusieurs « probesets », soient environ 54000 « probesets » par puce. Chacun de ces probesets est composé de 11 sondes différentes.

Des séquences contrôles sont présentes telles que les contrôles de marquage qui s'hybrident sur des ARN bactériens ayant une extrémité polyA : dap, lys, phe, thr. Il y a aussi les contrôles d'hybridation permettant de s'assurer d'une hybridation correcte : les ARN BioB, BioC, BioD, Cre et enfin les contrôles de normalisation permettant de normaliser les données par la suite, qui détectent les transcrits des gènes de ménage GAPDH et beta-Actine.

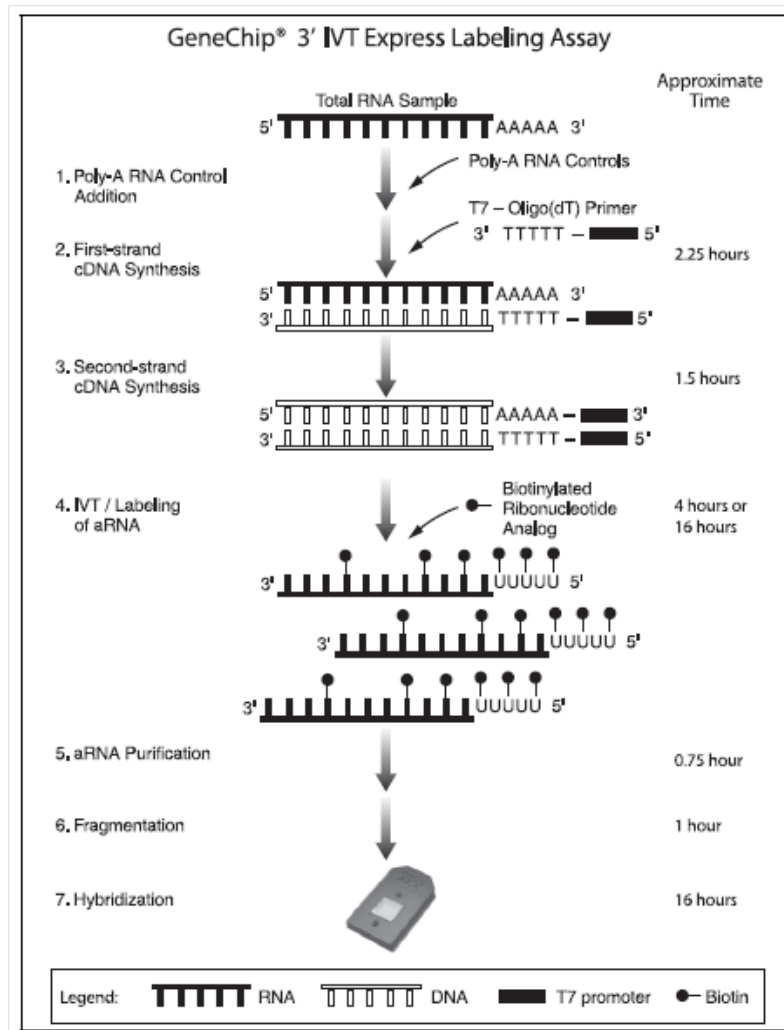


FIGURE 59 – Principe de marquage IVT express

A.5 Analyse des profils d'expression à l'aide des puces 3D-Gene

La technologie 3D-Gene de TORAY est basée sur un support innovant qui permettrait d'augmenter la sensibilité et donc la détection des miRNA même faiblement exprimés en diminuant fortement le bruit de fond. Pour ce faire, les sondes sont disposées sur des plots, et l'hybridation optimisée par la circulation de micro-billes de céramique entre les plots.

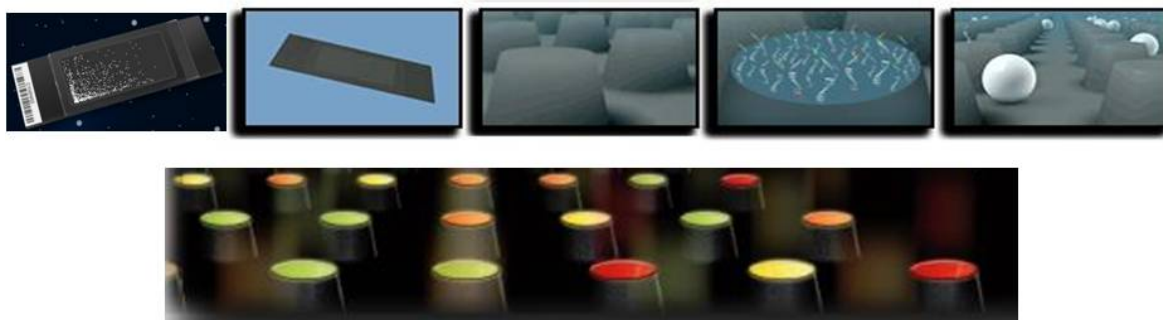


FIGURE 60 – Principe de la méthode 3D-Gene

La puce miRNA Human TORAY 3D-gene (4-plex) cible 1719 miRNA correspondant à la version 17 de miRBase et requiert 250ng d'ARN totaux.

Pour plus d'informations : www.3d-gene.com/en/

B Annexe2 : revue « MicroRNAs : molecular features and role in cancer »

Cette revue présente en détail la biosynthèse et la maturation des microARN ainsi que leur mécanisme d'action dans la régulation de l'expression des gènes.

Le rôle joué par les microARN dans les cancers et leur développement est aussi discuté.

MicroRNAs: molecular features and role in cancer

Elodie Lages^{1,2}, Helene Ipas^{1,2}, Audrey Guttin^{1,2,3}, Houssam Nesr^{1,2}, Francois Berger^{1,2}, Jean-Paul Issartel^{1,2,3,4}

¹INSERM, U836, Team7 Nanomedicine and Brain, BP 170, Grenoble Cedex 9, F-38042, France, ²Universite Joseph Fourier, Institut des Neurosciences, BP 170, Grenoble Cedex 9, F-38042, France, ³Clinical Transcriptomics and Proteomics Facilities, Institut de Biologie et Pathologie, Centre Hospitalier Universitaire and Grenoble Institut des Neurosciences, Grenoble, France, ⁴CNRS, 25 rue des Martyrs, Grenoble Cedex 9, F-38042, France

TABLE OF CONTENTS

1. Abstract
2. Introduction
3. miRNA: nomenclature, biogenesis and functions
 - 3.1. miRNA nomenclature
 - 3.2. Interfering RNAs: similarities and differences
 - 3.3. miRNA biogenesis
 - 3.3.1. Localization and structure of miRNA coding genes
 - 3.3.2. Transcription of primary miRNA transcript
 - 3.3.3. Maturation of pri-miRNAs into miRNAs
 - 3.3.3.1. Formation of the pre-miRNA in the nucleus
 - 3.3.3.2. Pre-miRNAs export from the nucleus to the cytoplasm
 - 3.3.3.3. Mature miRNA production in the cytoplasm
 - 3.4. Gene expression regulation by miRNAs
 - 3.4.1. miRISC (miRNA-induced silencing complex) formation
 - 3.4.2. Interaction between miRNAs and mRNA targets
 - 3.4.2.1. Mechanisms of interaction
 - 3.4.2.2. Categories of target sites
 - 3.4.2.3. Biocomputational tools for the prediction of target sites
 - 3.4.3. Molecular mechanisms of translation regulation of mRNA targets by miRNAs
 - 3.4.3.1. mRNA maturation, stability, and translation: basic features
 - 3.4.3.2. Translation initiation repression by miRNAs
 - 3.4.3.3. Repression of the postinitiation step of translation by miRNAs
 - 3.4.3.4. Regulation by degradation of the mRNA targets
 - 3.4.4. Translation activation by miRNAs
4. miRNAs in tumorigenesis and tumor development processes
 - 4.1. Modifications of miRNA expression levels in cancer
 - 4.1.1. miRNA expression profiles in tumors
 - 4.1.2. Deregulation of miRNA expression by defects in the biogenesis mechanism
 - 4.1.3. Deregulation of miRNA expression by chromosomal rearrangements
 - 4.1.4. Deregulation of miRNA expression due to point mutations in coding genes
 - 4.1.5. Modifications of miRNA expression due to transcriptional regulation
 - 4.2. Modifications of the interactions between miRNAs and their mRNA targets
 - 4.2.1. Deregulation by chromosomal modification
 - 4.2.2. Deregulation by point mutations
 - 4.3. Oncogene and tumor suppressor miRNAs involved in molecular pathways of tumor development
 - 4.3.1. Apoptosis and cellular proliferation processes
 - 4.3.2. Angiogenesis process
 - 4.4. Exosomal miRNAs: new potential tumor biomarkers
 - 4.5. miRNAs in cancer therapy
5. Conclusion
6. Acknowledgements
7. References

1. ABSTRACT

microRNAs (miRNAs) are small noncoding endogenously produced RNAs that play key roles in controlling the expression of many cellular proteins. Once they are recruited and incorporated into a ribonucleoprotein complex miRISC, they can target specific mRNAs in a miRNA sequence-dependent process

and interfere in the translation into proteins of the targeted mRNAs via several mechanisms. Consequently, miRNAs can regulate many cellular pathways and processes. Dysregulation of their physiological roles may largely contribute to disease. In particular, in cancer, miRNAs can be involved in the deregulation of the expression of important genes that play key roles in tumorigenesis, tumor development, and angiogenesis and have oncogenic or

MicroRNAs: molecular features and role in cancer

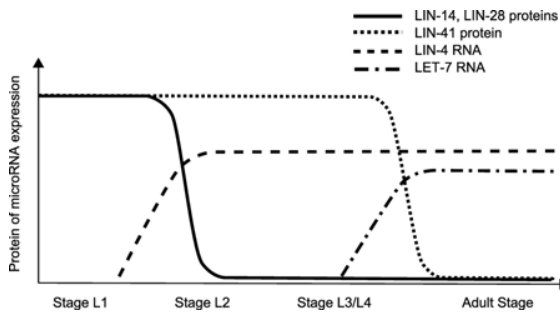


Figure 1. Time-dependent expression of *lin-4* and *let-7* microRNAs during *C. elegans* larval development and their impact on the expression of key proteins involved in larvae stage transitions.

tumor suppressor roles. This review focuses on the biogenesis and maturation of miRNAs, their mechanisms of gene regulation, and the way their expression is deregulated in cancer. The involvement of miRNAs in several oncogenic pathways such as angiogenesis and apoptosis, and in the inter-cellular dialog mediated by miRNA-loaded exosomes as well as the development of new therapeutical strategies based on miRNAs will be discussed.

2. INTRODUCTION

miRNAs were described in *Caenorhabditis elegans* at the beginning of the 1990s (1) as small noncoding endogenously produced RNAs that inhibit mRNA translation. Nevertheless, the existence in eukaryotic cells of RNA molecules called tRNAs (translational control RNAs), that were able to inhibit the translation of mRNAs, had been previously suggested by Heywood et al. (2). The first miRNA described in *C. elegans*, *lin-4*, is a small RNA containing complementary sequences for repeated elements of the 3'UTR region of the *lin-14* and *lin-28* mRNAs. Lee et al. proposed a *lin-4*-dependent regulation of the translation of the *lin-14* and *lin-28* mRNAs due to a sense-antisense RNA interaction. This regulation model was validated by Wightman et al. who used reporter genes and demonstrated that the 3' untranslated region (UTR) of *lin-14* mRNA was essential for the regulation of its translation by *lin-4* (3). A second small RNA, *let-7*, which, similar to *lin-4*, comes from the family of heterochronic switch genes, and controls the larval development of *C. elegans* was then discovered by Reinhart et al. (4). *let-7* plays a role in the transition of the larval L3/L4 stage to the adult stage, repressing the expression of *LIN-41* by interacting with the 3'UTR region of the mRNA.

lin-4 and *let-7* were first called small temporal RNAs (stRNAs) (5) due to their role in the control of development and were renamed miRNAs in 2001 (6) (Figure 1). Afterwards, several miRNAs were described in other organisms such as *Drosophila melanogaster*, mice, and plants as well as in human cell lines (7-13).

3. miRNA: NOMENCLATURE, BIOGENESIS AND FUNCTIONS

3.1. miRNA nomenclature

miRNAs are identified either by cloning and sequencing studies or informatics approaches using prediction programs based on conservation of miRNA within species and on the detection of the stem-loop structures typical of miRNA precursors. All miRNAs named in scientific publications and generally found using cloning and sequencing techniques are listed in the database called miRBase (<http://microrna.sanger.ac.uk/> (14)). miRBase version 18 (November 2011) now classifies 1527 miRNAs for humans.

miRNA-encoding genes are first transcribed in stem-loop structured primary transcripts called pri-miRNAs, which are then excised by RNase III Drosha and its cofactor DGCR8, freeing a precursor called pre-miRNA. These precursor molecules are then exported from the nucleus to the cytoplasm with exportin-5. They are then matured by the RNase III Dicer to free a duplex miRNA-miRNA*. One strand, called mature, is then incorporated into the RISC complex, a complex containing essentially Argonaute-type proteins. (Figure 2).

While genes or pre-miRNAs are noted “mir-X”, mature miRNAs are noted “miR-X” where X is a numeric value. A three-letter code is added as a prefix to refer to the organism they originate from. One letter stands for the organism genus and the two others for the species, e.g., *hsa* for *Homo sapiens* or *mmu* for *Mus musculus*.

When mature miRNAs differ by a few bases, a letter is added as a suffix, reflecting the difference: e.g., miR-181a and miR-181b:

- miR-181a: aacauucaacgcugucggugagu
- miR-181b: aacauucauugcugucggugggu

When both strands of a pre-miRNA are processed as mature miRNAs, an indication is given to specify which arm of the hairpin structure of the pre-miRNA generates one or the other of the two miRNAs. Several nomenclatures can be used:

- miR-X and miR-X*: miR-X* is the less abundant of the two mature miRNAs in the cells.
- miR-X-5p and miR-X-3p: 5p and 3p stand for the 5' and 3' arms of the stem-loop structure of the pre-miRNA, respectively. This nomenclature is mainly used when the respective abundance of the two miRNAs is still unknown (15).
- miR-X-s (5' arm) and miR-X-as (3' arm).

Moreover, a mature miRNA can result from the transcription and maturation of transcripts from separate genomic loci. A numeral suffix is added to the names of all the multiloci miRNAs, e.g., miR-181a-1 and miR-181a-2 (miR-181a-1 originates from a locus on chromosome 1 and miR-181a-2 from a locus on chromosome 9). Nevertheless,

MicroRNAs: molecular features and role in cancer

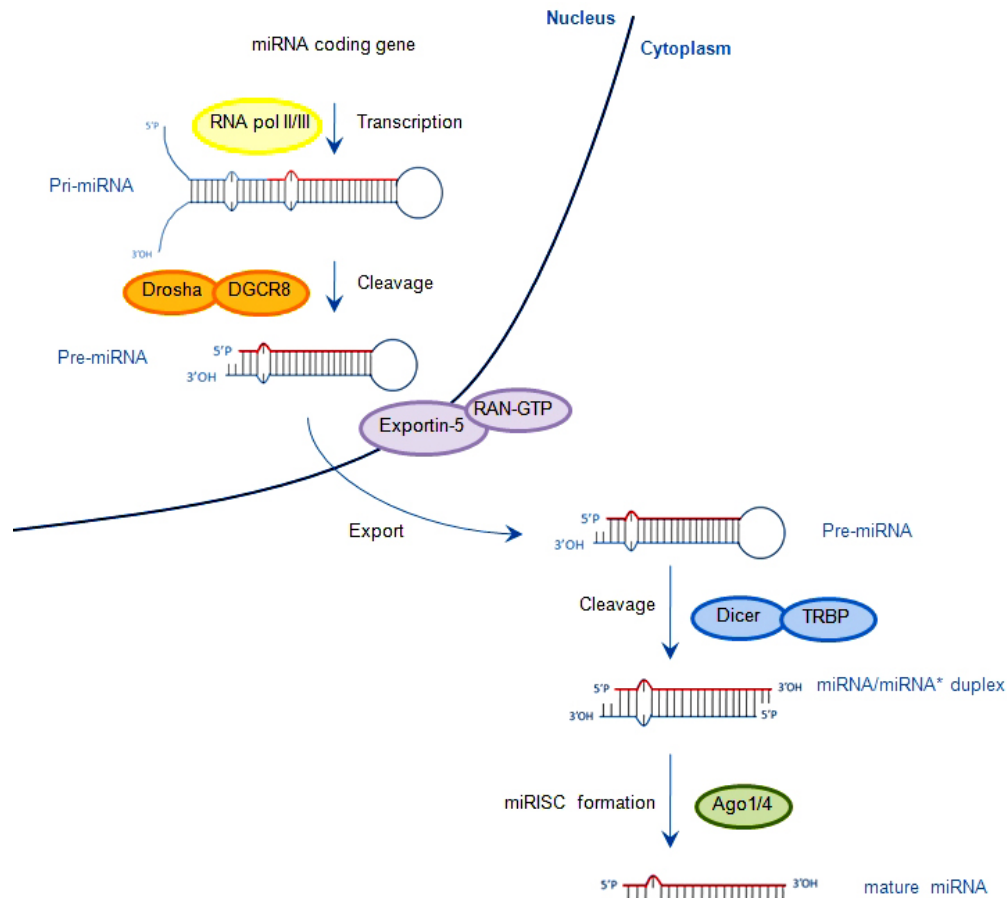


Figure 2. The biogenesis mechanism of microRNAs. The transcription of a miRNA coding gene by a polymerase (yellow symbol) or the splicing of an intron generates a primary transcript called pri-miRNA. The cleavage of this transcript by the RNase Drosha associated with DGCR8 (orange) generates an RNA precursor called pre-miRNA. This precursor is then exported to the cytoplasm *via* the exportin-5 (purple) where it will be excised by the Drosha enzyme associated with the TRBP protein (blue). Only one of the two duplex strands of the miRNA, called the mature strand, is incorporated into the RISC complex, mainly composed of Argonaute proteins (green).

some miRNAs, such as hsa-let-7 and cel-lin-4, do not follow the above-described nomenclature.

3.2. Interfering RNAs: similarities and differences

RNA interference (RNAi) is mainly responsible for the post-transcriptional regulation of gene expression (mRNA cleavage or decay, translation repression or activation) but is also involved in transcriptional regulation as described by various studies (16-19).

Mainly two classes of small RNAs interfere in the RNA interference process: miRNAs and siRNAs (short interfering RNA). These RNAs share similarities such as their short size (about 22 nucleotides), their maturation by the ribonuclease III Dicer, and their implication in the RISC complex for post-transcriptional repression.

Nevertheless, there are a number of important differences, such as the following:

- miRNAs are exclusively endogenously produced. They come from intrinsic genes of the organism they interfere in, whereas siRNAs may originate from viruses, transposable elements, perfectly paired endogenous double-stranded RNA resulting from an antisense transcription of various loci (20), or transfected exogenous and double-stranded RNAs.

- miRNAs play a role in the regulation of genes that do not generate them, whereas siRNAs mainly regulate the genes that produce them. This point is critical in order to secure host cell defense against parasite RNAs such as viruses or transposons.

- In mammals, miRNAs have a varying degree of complementarity with their target, whereas siRNA always have a perfect complementarity with their targets. When the complementarity is perfect, the target mRNA is degraded in the presence of the Ago2 protein, which is the sole protein of the four Argonaute family proteins responsible for endonucleolytic cleavage. In plants, the difference between

MicroRNAs: molecular features and role in cancer

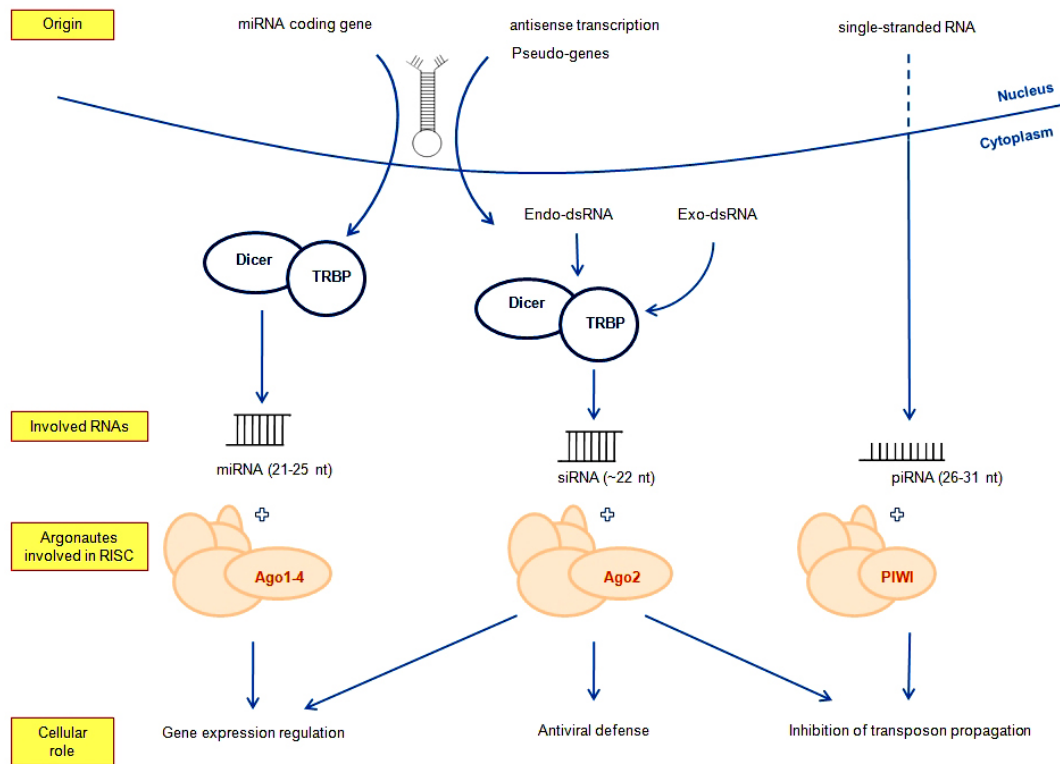


Figure 3. Comparison of miRNAs, siRNAs, and piRNAs. miRNAs are processed according to the pathway described in Figure 2. siRNAs come from exogenous double-stranded RNA (Exo-dsRNA; viral infection) or endogenous double-stranded RNA (Endo-dsRNA; reverse transcription or transposons). Like miRNAs, siRNAs are matured by Dicer associated with TRBP and then incorporated into the RISC complex mainly composed of Ago2. siRNAs play a role in cell defense after a viral infection, in the inhibition of transposon propagation, or in the simple regulation of gene expression. piRNAs are different from miRNAs and siRNAs mainly because of their origin and their maturation; they are derived from single-stranded RNAs and are not processed by Dicer. They are also a few nucleotides longer than miRNAs and siRNAs, are mainly present in germinal cell lines, and contribute to maintaining the genome integrity targeting transposable elements.

miRNAs and siRNAs is very small because the pairing between miRNA and mRNA is often perfect (21).

In addition to miRNAs and siRNAs, there are other small RNAs that contribute to maintaining the genome integrity: the piRNAs (piwi-interacting RNAs). They are longer (26–31 nucleotides), abundant in germinal cells but can also be found in somatic tissues (22–24) (Figure 3). These RNAs, formerly called repeat-associated siRNA (rasiRNA), were discovered in *D. melanogaster* (25). In 2006, several studies showed the presence of piRNAs in mammals (25–28). Contrary to siRNA and miRNA, it seems that they come from long single-stranded RNA precursors and their biogenesis does not include the RNase III Dicer. Once matured, piRNAs associate themselves with PIWI proteins, a subfamily of Argonaute proteins, principally to target transposons and preserve genome integrity (22).

3.3. miRNA biogenesis

3.3.1. Localization and structure of miRNA coding genes

These genes are widespread on all chromosomes except for chromosome Y and approximately 50% of the

described miRNAs are located in clusters. When these clustered miRNAs are under the control of a single promoter, they are dubbed polycistronic miRNAs.

miRNA coding genes can be independent gene units and miRNAs are then called intergenic; they can also be gene units coding for pre-mRNA that either code for proteins or do not code for them. In this case, miRNAs can be intronic or exonic (Figure 4) (29–31).

3.3.2. Transcription of primary miRNA transcript

Most of the miRNA coding genes are transcribed by the RNA polymerase II, producing long primary transcripts (pri-miRNAs). These pri-miRNAs have a typical structure composed of a stem (about 33 nucleotides), a loop connecting the two strands of the stem, and single-stranded flanking sequences (Figure 5). Like mRNAs, these sequences contain a 7-methyl-guanosine (m7G) cap at their 5' end and a 3' polyA tail (32, 33). With the transcription performed by the RNA polymerase II, the regulation of this mechanism could be similar to the regulation of the transcription of protein-coding genes. The localization of promoter regions of miRNA coding genes

MicroRNAs: molecular features and role in cancer

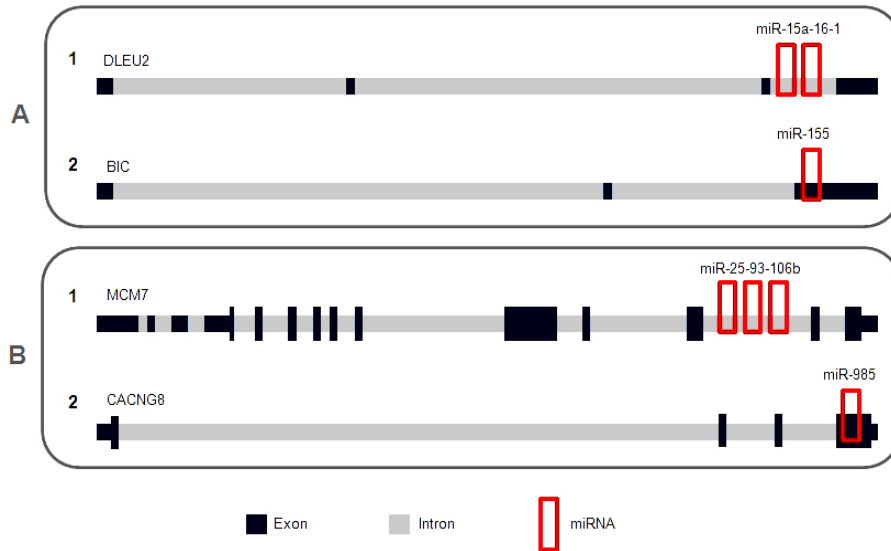


Figure 4. Localization of miRNA coding genes located in gene units coding for pre-miRNAs (31). miRNAs can be located in transcription units not coding for proteins (A) or coding for proteins (B). miRNAs can also be located in either the intron (1) or exon (2).

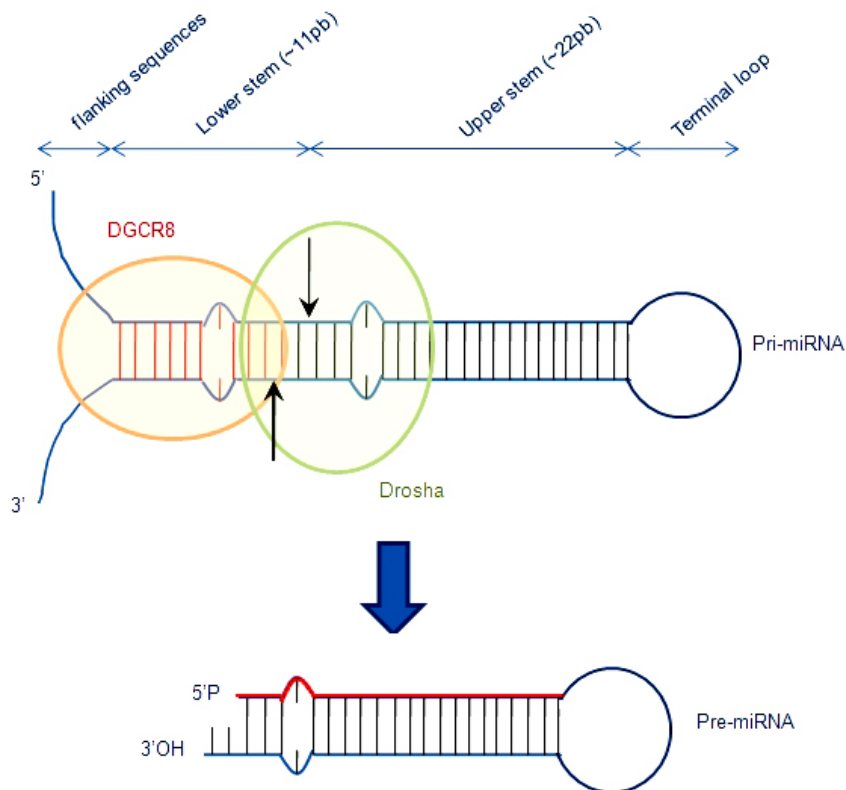


Figure 5. Maturation of pri-miRNA into pre-miRNA by the Drosha/DGCR8 complex (43). DGCR8 binds to double-stranded RNA, recognizes the pri-miRNA flanking sequences, and allows the stem-loop cleavage by the ribonuclease Drosha, approximately 11 bp from the junction between the flanking sequences and the stem-loop. This asymmetric cleavage leaves two unpaired nucleotides at the 3'OH end.

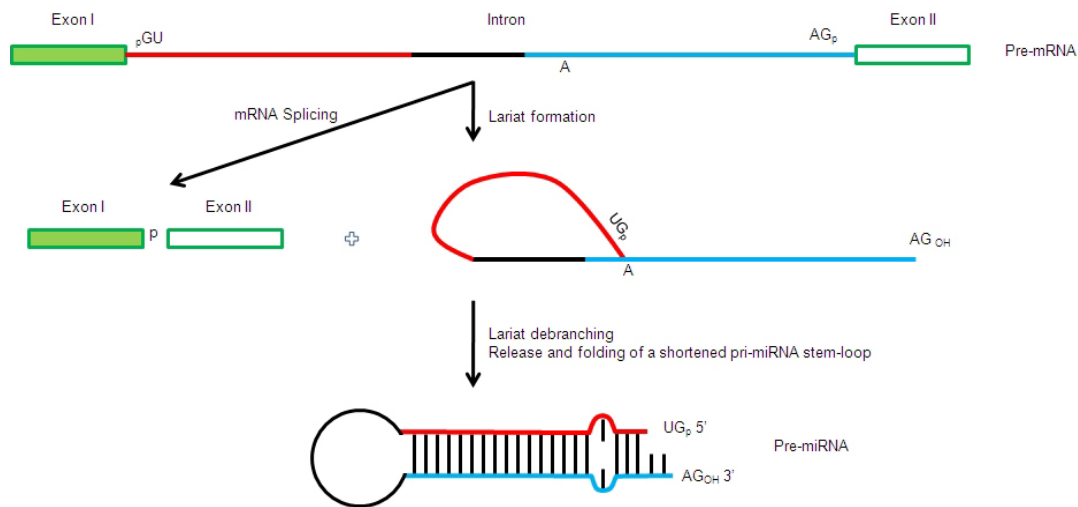


Figure 6. mirtron pathway (44,45). In the nucleus, short introns with hairpin potential, termed mirtrons, can be spliced and debranched into pre-miRNA hairpins. Hairpin potential is due to the complementarity of the sequences of the 5' and 3' domains of the introns (red and blue domains of the intron in the figure, respectively). The intron donor splicing site (GU) and the acceptor splicing site (AG) constitute the 5' end and the 3' end of the pre-mirtron, respectively.

was predicted *in silico* by genomic mapping of the transcription start sites (TSS) and by mapping of transcription factor binding motifs. This was reported in *Arabidopsis thaliana*, *C. elegans*, and *H. sapiens* (34-36). Furthermore, two studies highlighted the localization and characteristics of TSS sequences of miRNAs in human using high-throughput genomic analyses such as chromatin immunoprecipitation (37, 38).

3.3.3. Maturation of pri-miRNAs into miRNAs

3.3.3.1. Formation of the pre-miRNA in the nucleus

In human, primary transcripts are processed in the nucleus by a protein complex called microprocessor that is composed of the ribonuclease Drosha associated with its cofactor DGCR8 (DiGeorge syndrome Critical Region gene 8) (39). The Drosha complex also contains several other factors such as EWSR1, FUS, numerous heterogeneous nuclear ribonucleoproteins (hnRNPs), p68 (DDX5) and p72 (DDX17) DEAD-box helicases. The roles of these accessory components in miRNA maturation is largely unknown, some hnRNPs and p68/p72 may promote the fidelity and activity of the Drosha processing (40, 41). DGCR8, which interacts with double-stranded RNA, is required to allow the binding of the Drosha/DGCR8 complex to the pri-miRNA at the junction between the flanking sequences and the stem-loop. Once the complex is bound to the pri-miRNA, DGCR8 specifies the Drosha cleavage distance (~11 bp) away from the junction between the flanking sequences and the stem-loop. The Drosha enzyme is a class 2 ribonuclease III, *i.e.*, it contains two RNase III domains and one binding domain for double-stranded RNA. This structure allows an asymmetric cleavage of the double-stranded RNA and the release of a shortened pri-miRNA stem-loop (42). This shortened stem-loop is called pre-miRNA and contains two unpaired nucleotides at the 3' end and a phosphate group at the 5' end (43) (Figure 5).

Another pre-miRNA biogenesis pathway is the mirtron pathway, which is connected to the mRNA splicing mechanism. After splicing and lariat release, the intron structures itself in a stem-loop to generate a pre-miRNA. In this case, the mechanism of mirtron maturation bypasses cleavage by the pre-miRNA generating enzyme Drosha. The pre-miRNA 5' and 3' ends correspond to the donor splicing site (GU) and the acceptor splicing site (AG), respectively. This mirtron pathway, first described in the invertebrates *D. melanogaster* et *C. elegans* (44, 45), was then evidenced in mammals (such as miR-877 and miR-1224) (46). The main difference between the invertebrate and mammal mirtron pathways seems to rely on the fact that the mature miRNA is usually located on the 3' strand of the stem-loop in invertebrates while it is located on the 5' strand in mammals (Figure 6).

3.3.3.2. Pre-miRNAs export from the nucleus to the cytoplasm

The export of RNAs (messenger, ribosomal, and transfer RNAs) is made possible by the action of receptors of the karyopherin family, such as CRM1 and exportin-t (Exp-t). Nevertheless, nuclear-export of pre-miRNAs mostly relies on another receptor called exportin-5 (Exp-5) (47, 48). This receptor, discovered in 2002, belongs to the karyopherin beta family. Like all the other receptors of this family, it binds directly and specifically to the RAN-GTP protein (RAS-related nuclear protein with bound GTP) in the nucleus and then binds to nucleoporins to allow the pre-miRNA transfer from the nucleus to the cytoplasm (49). Exp-5 specifically interacts with double-stranded RNAs longer than 14 bp that contain a protruding 3' end (50), hence its binding specificity for pre-miRNAs (51). Once the pre-miRNA/Exp-5/RAN-GTP complex is assembled and is bound to nucleoporins, it goes through the nuclear pores. Then the RAN-GAP enzyme (RAN-GTPase activating protein), located on the cytoplasmic side

MicroRNAs: molecular features and role in cancer

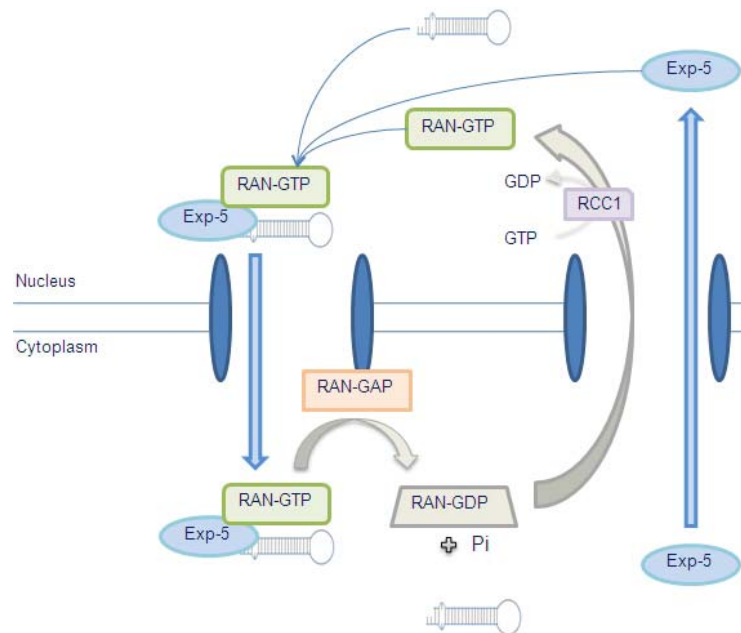


Figure 7. Mechanism of pre-miRNA export from the nucleus to the cytoplasm (48). The Exp-5/RAN-GTP/pre-miRNA complex binds to nucleoporins in the nucleus and goes through the nuclear pores. The release of pre-miRNAs into the cytoplasm is linked to the hydrolysis of RAN-bound GTP by the RAN-GTPase-activating protein. Exp-5 is then transported back into the nucleus and RAN-GTP is regenerated with RCC1 (Ran guanine nucleotide exchange factor).

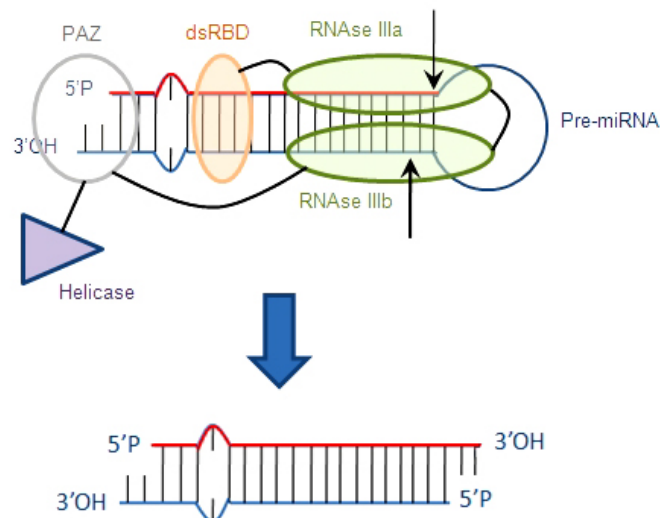


Figure 8. Dicer-dependent cleavage of pre-miRNA (59). The Dicer PAZ domain recognizes the single-stranded 2 nucleotide-long 3' overhang of the pre-miRNA. The dsRNA binding domain (dsRBD) allows the positioning of the RNase III domains and the cleavage of the pre-miRNA.

of the pores, activates the hydrolysis of the RAN-bound GTP into RAN-bound GDP (52), leading to the release of the pre-miRNA in the cytoplasm (Figure 7).

3.3.3.3. Mature miRNA production in the cytoplasm

In the cytoplasm, pre-miRNAs become the substrates of the ribonuclease III Dicer, which completes their processing. Previously described for siRNA processing (53), Dicer was found to be involved in the final cleavage of pre-

miRNAs into 21-nucleotide miRNAs in *C. elegans* (54, 55). Dicer is a class 3 type III ribonuclease composed of two RNase III domains, one double-stranded RNA (dsRNA) binding domain, one PAZ signature (Piwi/Argonaute/Zwille), and a helicase domain. The PAZ domain allows Dicer to recognize the single-stranded 3' overhangs of the pre-miRNA (56, 57). In addition, the dsRNA binding domain allows the recognition of the stem by Dicer (58, 59) and the cleavage by the RNase III domains of the dsRNA about 21 nt away from

MicroRNAs: molecular features and role in cancer

the PAZ-bound end. This cleavage generates another single-stranded 3' overhang (Figure 8).

3.4. Gene expression regulation by miRNAs

3.4.1. miRISC (miRNA-induced silencing complex) formation

During the maturation step catalyzed by Dicer, two other proteins, TRBP (TAR (HIV-1) RNA binding protein or TARBP2) and Ago2 (Argonaute 2), were found to be involved in the formation of the RISC loading complex (RLC) with Dicer (60-63). Most of the studies carried out *in vitro* with recombinant proteins revealed that the association of only three proteins – Dicer, TRBP, and Ago2 – makes an equistoichiometric complex that is able to process the pre-miRNA and to select one of the two strands to form the miRISC. The dimeric TRBP (64) first dissociates into monomers to form the RLC. In *Drosophila*, the assembly of the Dicer/TRBP/Ago complex requires ATP (65), whereas in human, assembly of the complex can be either ATP-independent (61-63) or ATP-dependent (66).

The RNA duplex obtained after maturation contains 2-nt 3' overhang ends, resulting from the action of the two type III RNases, Droscha and Dicer. In some rare cases, the two duplex strands can accumulate in the cell (6, 67) with both strands acting as mature strands to guide the miRISCs to the mRNA targets (68). Nevertheless, most of the time only one of the two strands is selected according to asymmetric rules (69, 70). The unselected strand is called the passenger strand and noted miR-X* (see nomenclature Part 3.1). The selected strand is called the guide strand or mature strand and noted miR-X. This strand has the less thermodynamically stable 5' end, *i.e.*, with the weakest 4-bp-long duplex binding energy (70). Indeed, this thermodynamic instability can facilitate the unwinding of the duplex by helicases, such as Gemin3 (67) or RCK/p54 (71). Unwinding of the duplex may also be promoted by Dicer's helicase domain, since it was shown that it can be performed by the *in vitro* associated RLC (only containing Dicer/TRBP/Ago2) (63). ATP does not seem to be necessary for the dissociation of the two strands by a helicase. Indeed, the energy released after the cleavage of the two phosphodiester bonds by Dicer could provide energy to achieve this dissociation step (63). Another recent study suggests that Ago1 and Ago2 may participate in the separation of the duplex's two strands (72). For siRNA duplexes, after the dissociation of the two strands, the passenger strand is degraded by cleavage by Argonaute proteins (73, 74). As for the miRNAs duplexes, the fate of the passenger strand seems less clearly identified. According to Matranga *et al.*, degradation by cleavage does not occur because of the imperfect complementarity between the two strands (75). According to Shin *et al.*, the passenger strand of a miRNA duplex may be degraded if strong complementarity is observed in the middle part of the duplex (76). Another pathway has also been proposed by Diederichs and Haber, who claim that the passenger strand is cleaved by Ago2 before Dicer's action (77).

RLC allows *in fine* the loading of the mature miRNA into the miRISC after the dissociation of the two

strands. Among the three proteins that take part in the RLC (Dicer, TRBP, and Ago), only the Ago component is required for RISC activity in the miRISC (Figure 9). Argonaute proteins are composed of two main regions: one containing the N-terminal and the PAZ domains, the other one containing the Mid and PIWI domains (78). Although the functions of these domains are poorly defined, it seems that the three domains – PAZ, Mid, and PIWI – play an important role in the RNA interference phenomenon as they are required for the interaction with the miRNA. Indeed, the PAZ domain, which is similar to the Dicer domain, binds to RNA duplexes containing two unpaired nucleotides on the 3' end and therefore recognizes the 3' end of mature miRNAs (56, 57, 79). The Mid domain recognizes the phosphate 5' end of mature miRNAs and also mRNA m7G capping (80, 81). Finally, the PIWI domain contains a tertiary structure specific of the RNase H family providing an endonucleolytic activity to RISC (82). In *Drosophila*, only Ago1 is specialized in the loading of miRNAs (Ago2 is specialized in loading siRNAs) (83). In human, there are four Argonaute proteins (Ago1–4). All four forms can load miRNAs, but only Ago2 has an endonucleolytic activity (84, 85).

3.4.2. Interaction between miRNAs and mRNA targets

3.4.2.1. Mechanisms of interaction

The main interaction between miRNAs and target messenger RNAs occurs at the level of the mRNA 3'UTR and generates duplexes. In plants, most miRNAs show a perfect complementarity with their mRNA targets and perfect duplex formation is associated with the degradation of the targets by endonucleolytic cleavage (86, 87). On the contrary, in metazoans, a perfect complementarity between miRNAs and their mRNA targets is not always the rule.

Several specific features of duplex formation have been described which were used to define algorithms to predict miRNA targets. In 2003, Lewis *et al.* reported that the hybridization between miRNA and its mRNA target has to be perfectly complementary between nucleotides 2 and 7 from the 5' end of the miRNA; this region was called the seed region (88). Any mismatch in this region and in particular any G:U type mismatch would more or less severely reduce the miRNA efficiency to interact with a given mRNA target, depending on the size of the seed region (89, 90). For example, with a 6-nt seed region, a G:U type mismatch leads to a complete loss of the miRNA activity. In addition, the presence of an A residue in position 1 and/or an A/U residue in position 9 from the 5' end of the miRNA (*i.e.*, on both sides of the seed region) may improve the interaction between miRNA and the targeted mRNA (91).

Another feature is the presence of a mismatched bulge in the middle region of the miRNA–mRNA duplex, which prohibits the endonucleolytic cleavage catalyzed by Ago2 (92). In addition, a sequence complementarity on the 3' end of the miRNA stabilizes the miRNA–mRNA duplex, especially when it occurs between nucleotides 13 and 16 from the 5' end of the miRNA (93).

Finally, other factors can improve the miRNA efficiency such as AU-repeat mRNA sequences close to

MicroRNAs: molecular features and role in cancer

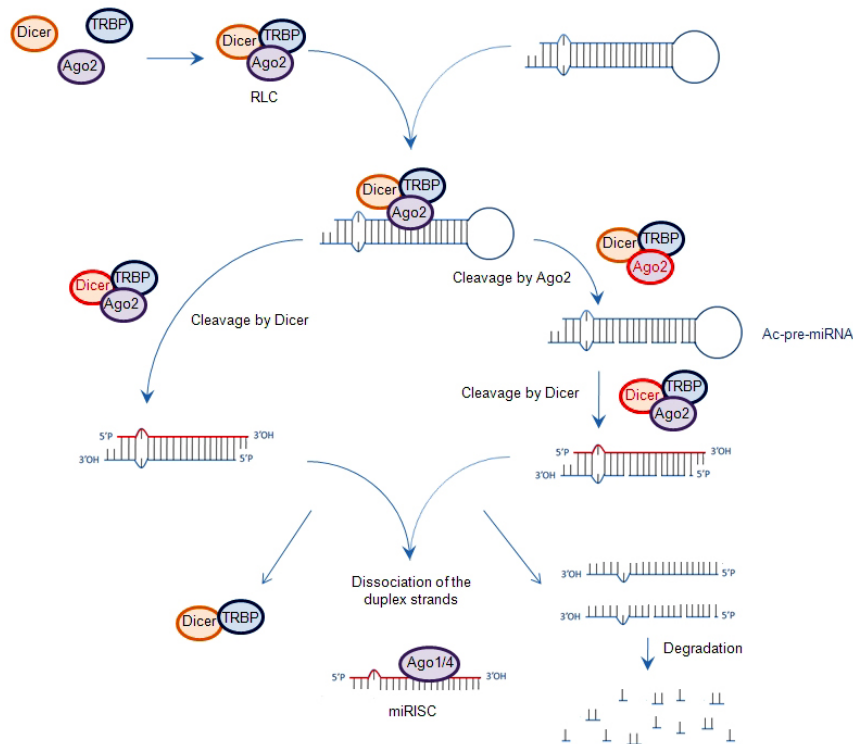


Figure 9. miRISC formation (77). The RLC is composed of Dicer, TRBP, and Ago2. Two pathways may lead to the formation of miRISC. One (left) includes dissociation of the two strands of the duplex after cleavage of the pre-miRNA by Dicer. The second (right) first relies on the cleavage of the complementary strand by Ago2, allowing the formation of a transitory miRNA called Ac-pre-miRNA (Ago2-clived pre-miRNA) before cleavage by Dicer. In this model, the passenger strand is then degraded.

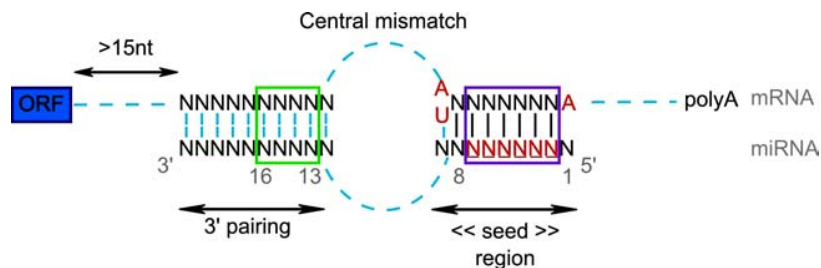


Figure 10. Schematic model of the interaction between miRNAs and target mRNAs in metazoans (94). The major structural features are the following. miRNAs target mRNAs in the 3'UTR at a distance from the stop codon greater than 15 nt. A perfect complementarity is found in the seed region between nucleotides 2 and 7 from the 5' end of the miRNA (pink rectangle). A central bulge prevents endonucleolytic cleavage mediated by Ago2 (a major difference with the miRNA–target mRNA interaction in plants). A few nucleotide matches in the miRNA 3' end (especially between nucleotides 13 and 16) is necessary for the best stabilization of the miRNA/mRNA target duplex (green rectangle). The presence in the mRNA sequence of an A residue in position 1 and/or an A or U residue in position 9 could increase miRNA efficiency.

the miRNA binding site, or the proximity of the miRNA site to the stop codon or to the polyA tail of the target, especially for mRNA with long 3'UTR (>1300 nt). However, for a distance between the miRNA site and the stop codon shorter than 15 nucleotides a severe drop in miRNA efficiency is expected. Proximity to the stop codon and to the polyA tail of the miRNA site increases the accessibility of the miRISC. Moreover, the binding of several different miRNAs to the 3'UTR promotes the cooperative repressing phenomenon (94). All these structural features are summarized in Figure 10.

Besides the above-mentioned canonical mechanisms of miRNA gene regulation through 3'UTR interactions, other “non-canonical” miRNA-mediated mechanisms of mRNA expression modulation have been reported. Some miRNAs have been shown to bind to the open reading frame (95) or to the 5'UTR of the target genes (96).

3.4.2.2. Categories of target sites

Several categories of target sites have been described according to their structural features (91, 97).

MicroRNAs: molecular features and role in cancer

Table 1. Biocomputational tools for prediction of mRNA target sites in metazoans

Biocomputational tools	Criteria	Websites	References
Targetscan	A ¹ ; D ⁴ ; E ⁵ ; F ⁶ ; G ⁷	http://www.targetscan.org	(88, 98)
TargetscanS	A ¹ ; B ² (6-nt pairing necessary); D ⁴ ; F ⁶ ; G ⁷	http://www.targetscan.org	(91)
PicTar	A ¹ ; C ³ ; D ⁴ ; E ⁵	http://www.pictar.mdc-berlin.de	(99)
MiRanda	A ¹ ; B ² ; D ⁴ ; E ⁵	http://www.microrna.org	(100, 101)
Microcosm targets	Based on MiRanda software	http://www.ebi.ac.uk/enright-srv/microcosm/htdocs/targets/v5/	(14)
PITA Top	A ¹ ; B ² ; D ⁴ ; E ⁵ ; G ⁷ ; H ⁸	http://genie.weizmann.ac.il/pubs/mir07/mir07_prediction.html	(102)
EIMMo	A ¹ ; D ⁴ ; E ⁵	http://www.mirz.unibas.ch/EIMMo2	(103)
Diana-microT	A ¹ ; B ² ; C ³ ; D ⁴ ; F ⁶	http://diana.cslab.ece.ntua.gr/microT	(104, 105)

¹Strong pairing in the seed region, ²Moderate pairing in the seed region, ³Thermodynamic stability, ⁴Interspecies preservation of target sites, ⁵Number of target sites on the 3'UTR of a given mRNA, ⁶Sequence context (location of the miRNA sites with regard to the stop codon and to the polyA tail or presence of AU-rich clusters), ⁷Accessibility of the target site to the RISC complex, ⁸Possibility of tuning the search parameters

There are two main categories, which can be called canonical or marginal sites, and more rarely, atypical sites (Figure 11). Canonical sites are characterized by strong pairing in the seed region and contain three types of sites (8mer, 7mer-m8, and 7mer-A1). The 8mer sites have an interaction on 8 nucleotides including the 6 seed region nucleotides (nucleotides 2–7), and nucleotides in positions 1 and 8. The 7mer-m8 and 7mer-A1 sites include the 6 seed region nucleotides and, respectively, any nucleotide in position 8 (m8) or the A residue in position 1. Marginal sites are characterized by a weaker pairing in the 5' end of the miRNA, with pairing of only 6 nucleotides located inside the seed region (6mer) or located between nucleotides 3 and 8 (6mer offset). Finally, atypical sites are characterized by an increased number of complementary nucleotides at the 3' end.

3.4.2.3. Biocomputational tools for the prediction of target sites

Several tools and databases have been set up to assist in the identification of the mRNAs that are putatively targeted by miRNAs in mammals. Target identification is based on different criteria such as the binding duplex stringency characterized by the length of the pairing region and the thermodynamic stability of this binding, the conservation of the target sites between species, or the number of miRNAs targeting a specific 3'UTR part. The main biocomputational tools are referenced in Table 1.

TargetScanS is considered the simplified and improved version of TargetScan. Indeed, in this version, the necessary pairing is only 6 nucleotides in the seed region and the target site number on a single mRNA is not required in this version. The three biocomputational tools, TargetScanS, PicTar, and EIMMo have many common putative target sites because the engines look for sites with strong base-pairing in the seed region. However, there is no perfect overlapping between the results obtained with these three engines that use different UTR databases and/or miRNA sequence files (105). Moreover, these algorithms have some intrinsic differences in the criteria for mRNA target prediction. For example, TargetScanS requires that the mRNA target site ends by an A residue located in complementarity to the first miRNA 5' nucleotide, whereas the two other algorithms allow any Watson-Crick base pairing in this position (97).

The reliability of these algorithms is sometimes questionable (see for example (106)). In order to reduce

false-positive or false-negative targets of miRNAs, a useful tool, TargetCombo (<http://www.diana.pcbi.upenn.edu/cgi-bin/TargetCombo.cgi>), has been developed to combine many data sets. In particular it is possible to query files that combine all the targets predicted by at least one of the databases, Diana-microT, TargetScanS, miRanda and PicTar, or the targets all predicted by TargetScanS, miRanda and PicTar, or finally the results obtained with TarBase (105). The biocomputational tool TarBase (<http://diana.cslab.ece.ntua.gr/tarbase>) compiles all the experimentally validated targets (107, 108).

3.4.3. Molecular mechanisms of translation regulation of mRNA targets by miRNAs

3.4.3.1. mRNA maturation, stability, and translation: basic features

After transcription, mRNAs are processed by addition of a cap m7G at the 5' end, a polyA extension at the 3' end, and by appropriate exon splicing. Cap and polyA tail strengthen mRNA stability since they interact with specific protein complexes that prevent exonuclease activity due to steric hindrance. mRNA stability is also regulated by the AU-rich elements binding proteins (ARE-BP), which bind to AU-rich domains located in the 3'UTR of mRNAs.

In the cytoplasm, mRNA translation requires three major steps: initiation, elongation, and termination (109, 110). The initiation occurs at the level of the cap, with first association of the 40S ribosomal subunit, methionine initiator tRNA, protein factors to aggregate in a 43S preinitiation complex, and involvement of the eIF4F complex. The 43S complex then shifts to the initiation codon AUG and partially dissociates, while a 80S is assembled by binding the 60S ribosomal subunit prior to translation.

Alternatively, translation initiation may rely on the recruitment of ribosomes by an internal ribosome entry site (IRES) and does not need the loading of the initiation protein complex at the mRNA cap structure (111). The IRES sequences are characterized by stem-loop secondary structures in the mRNA 5'UTR that contain an initiation codon at their 3' ends. The 40S ribosomal subunit binds directly to the initiation codon and initiates translation. After translation initiation, the ribosome moves codon by codon and recruits amino acid-loaded tRNAs. At the level of a stop codon, the action of termination factors promotes

MicroRNAs: molecular features and role in cancer

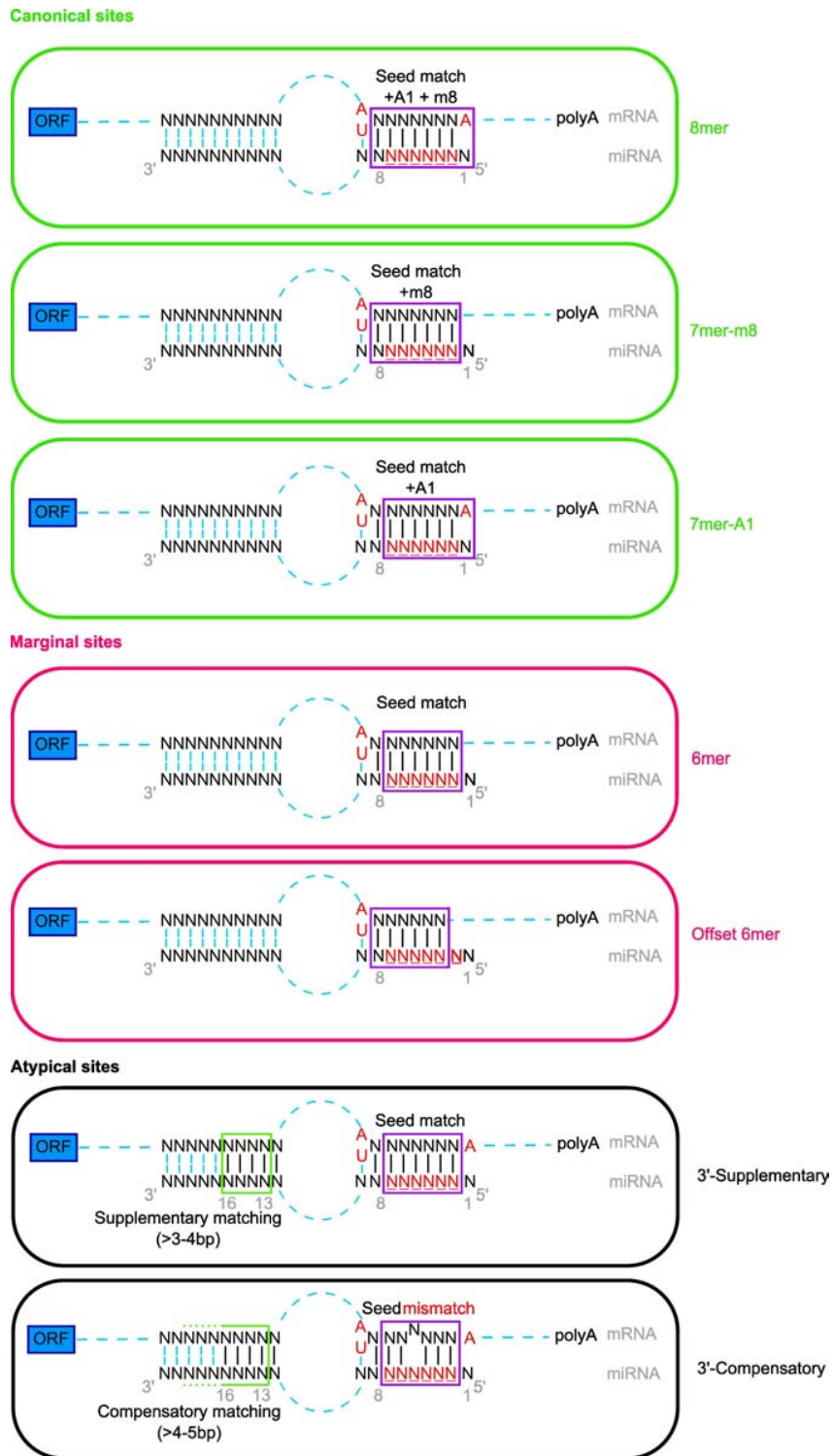


Figure 11. The three different categories of target sites. Canonical, marginal, and atypical sites (97). Canonical sites are composed of complementary sites of 7 or 8 nucleotides at the miRNA 5' end (6 seed region nucleotides + position 1 and/or 8). Marginal sites encompass complementarity sites for only 6 nucleotides in the seed region or 6 nucleotides between positions 3 and 8). Atypical sites show strand complementarity at the 3' end of miRNA to compensate for weak base-pairing in the 5' region. m8. nucleotide in position 8 A1. nucleotide A in position 1.

MicroRNAs: molecular features and role in cancer

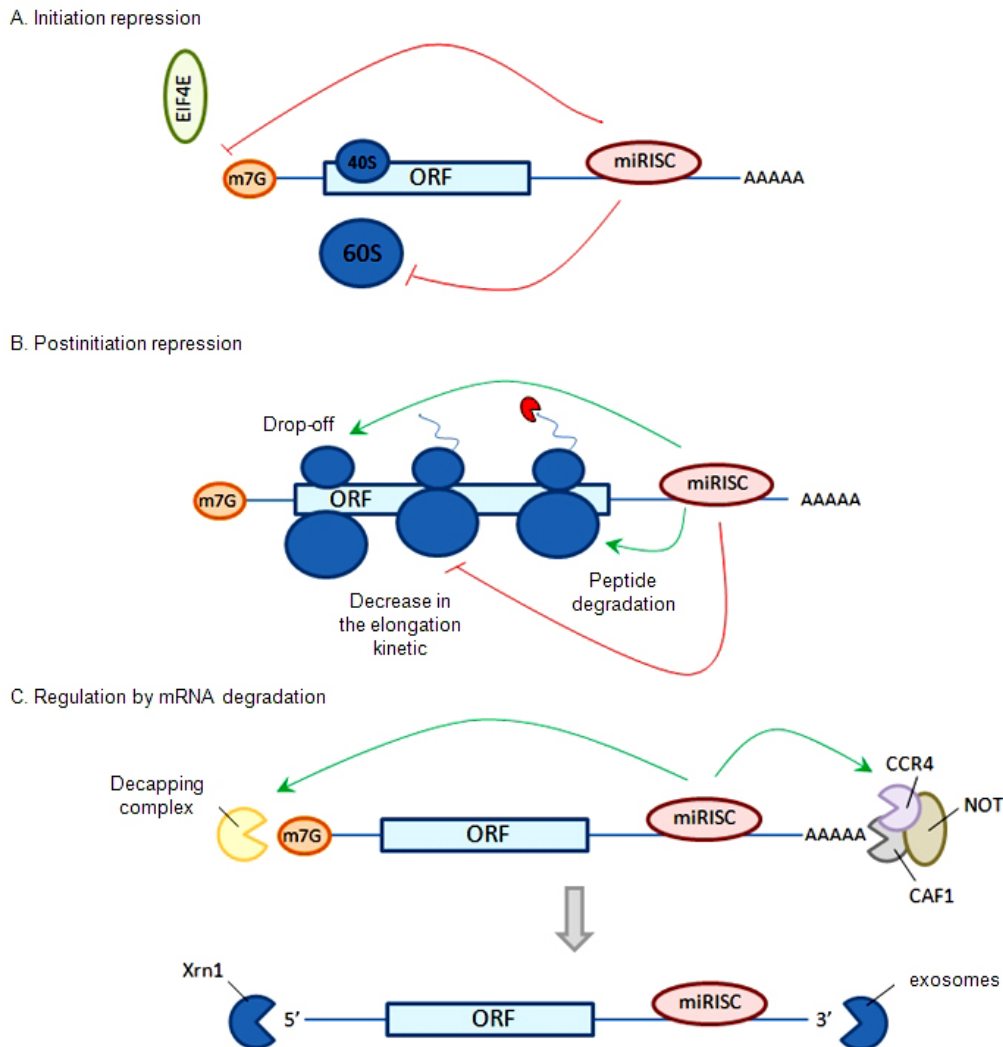


Figure 12. Mechanisms of regulation of mRNA target translation by miRNA. (A) Regulation by translation initiation repression. This regulation can occur either by inhibition of eIF4E fixation at the cap because of a competition with Ago proteins or by inhibition of the recruitment of the 60S ribosomal subunit. (B) Regulation by repression at the translation postinitiation step. Three mechanisms have been described. Regulation by premature release of ribosomes (drop-off), by decrease in the elongation kinetics, or by degradation of the newly synthesized peptide. (C) Regulation by mRNA degradation. A complex containing two deadenylases (CCR4 and CAF1) and NOT protein degrades the polyA tail. A decapping complex removes the cap at the 5' end and mRNA degradation can take place from 5' to 3' with the endonuclease Xrn1 or from 3' to 5' with exosomes.

ribosome dissociation and translation stops. Translation initiation is a key step for translation regulation (110), and it is frequently repressed by miRNAs.

3.4.3.2. Translation initiation repression by miRNAs

Several studies carried out on cultured cells demonstrated that the functional m7G cap is required for translation inhibition by miRNAs to take place. Indeed, miRNA inhibition of translation is impeded when mRNAs have a nonfunctional cap structure or when they are translated from IRES (112, 113). Some mRNAs have a bicistronic feature, with one cistron translated in a cap-dependent way and another one translated from IRES. In this case, only the translation of the first cistron is repressed by miRNA (113). The importance of the m7G cap structure in the regulation of

translation initiation is also illustrated by the fact that the central domain sequences of Ago proteins share some similarities with the central domain of the eIF4E factor, the cap-associated factor essential for translation initiation. In the Ago2 central domain, there are two phenylalanine residues that have proved to be necessary for binding Ago2 at the cap. Consequently, these proteins may inhibit initiation translation by competition with cap-associated factors such as eIF4E for binding to the cap (112-114). In addition, translation initiation repression mediated by miRNA may rely on interaction between the miRISC complex and the eIF6 factor. This factor prevents the association between the 60S ribosomal subunit and the 40S ribosomal subunit and blocks translation initiation (115). The different mechanisms of the regulation of mRNA target expression by miRNAs are shown in Figure 12.

MicroRNAs: molecular features and role in cancer

3.4.3.3. Repression of the postinitiation step of translation by miRNAs

Studies conducted on *C. elegans* highlighted that lin-14 and lin-28 mRNAs, the targets of the lin-4 miRNA, are associated with polysomes, while they are poorly translated into proteins (116, 117). mRNA association with polysomes is usually a sign of strong translation activity. A low level of lin-14 and lin-28 mRNA translation could then be taken as an indication that miRNAs can play a role in translation inhibition at a postinitiation step. Similar situations were also observed in mammals. Indeed, Petersen et al. (118) reported that IRES-dependent translation of mRNA (a process that does not rely on a cap-dependent initiation step) can also be repressed by miRNAs. They found that miRNAs and their mRNA targets are present in translation-active polysomes and, in the presence of puromycin, which aborts the translation elongation step, miRNAs and mRNAs are finally found in the translation-inactive polysomes. It was then concluded that the postinitiation repression mechanism is due to a premature release of ribosomes (called drop off) during the elongation step (118). Postinitiation repression was also observed in HeLa cells in Kras mRNA, a let-7 target (119). Let-7 leads to inhibition of Kras expression and both the miRNA and its mRNA target were found associated with translation-active polysomes. However, the authors suggested that in this case, the miRNA-mediated postinitiation repression mechanism stems from a decrease in the speed of translational elongation. Finally, Nottrot et al. (120) also found miRNAs and mRNAs associated in polysomes, and concluded that translation repression by miRNA could be the result of a degradation of the newly synthesized polypeptide.

3.4.3.4. Regulation by degradation of the mRNA targets

Several studies reported that miRNAs repress protein expression with limited effects on the levels of the target mRNAs. Nevertheless, other studies reported a miRNA-mediated decrease in stability of the mRNAs. For example, in *C. elegans* let-7 decreases lin-41 mRNA stability and lin-4 reduces the stability of both lin-14 and lin-28 mRNAs (121). In human, lin-28 mRNA stability is lowered by miR-125a and miR-125b (122). Moreover, in mammals miRNAs were reported to reduce protein output mainly by destabilization of target mRNAs (123). Accelerated deadenylation of the polyA-tailed target mRNA was reported to be a key step in miRNA-mediated mRNA decay (124).

In eucaryotes, deadenylation is first initiated by the PARN2/PARN3 complex and then requires a protein complex composed of NOT and two deadenylases, CAF1 and CCR4 (125). Once deadenylated, mRNAs can be degraded by exonucleases from their two ends. The 5'-to-3' end degradation is performed by the Xrn1 exonuclease after cap removal. In human, this step involves a complex made of DCP2 and several cofactors such as DCP1, EDC3, Ge-1, and RCK/p54 (126). All these proteins involved in the 5'-to-3' end degradation are located in cytoplasmic granules called p-bodies (processing bodies) (125, 127, 128), while the 3'-to-5' end mRNA degradation is carried out by protein complexes called exosomes (129).

These p-body cytoplasmic granules, also important in RNA interference phenomena, contain the GW182 protein, a 182-kDa protein containing glycine-tryptophane (GW) repeated elements (130). This protein is able to bind to Argonaute proteins, present in p-bodies associated with miRNAs and mRNA targets (131). Stress granules are another kind of cytoplasmic granule produced by eucaryote cells subjected to stress, such as oxidative stress, thermic shock, or UV irradiation (132). Using immunofluorescent techniques, stress granules and p-bodies were proved to be two independent and distinct structures (133, 134). These cytoplasmic granules are a storage place for nontranslated mRNAs.

3.4.4. Translation activation by miRNAs

In most of cases, miRNAs play a role in negative regulation of gene expression by mRNA target translation repression or by mRNA degradation. Nevertheless, in a few cases positive regulation by translation activation has been observed and especially in conditions of cellular stress. ARE sequences (AU-rich elements) located in the mRNA 3'UTR are critical elements for translation activation. It was shown that Ago2 and FXR1 bind to ARE sequences in order to activate the translation of the TNF-alpha factor in cultured cells under serum privation and to stop the cell cycle (135). miR-369 which has a seed region complementary to two target sites of the ARE sequence of the TNF-alpha coding mRNA was shown to recruit Ago2 and FXR1 and to activate TNF-alpha translation under serum privation conditions. It has been concluded that miRNAs may play a role of translation repressors in proliferating cells and a role of translation activators in cells blocked at the G0/G1 stage. Consequently, Ago2 may be involved in either activation or repression of mRNA translation (135).

Interestingly, mRNA translation activation by miRNA was also reported to proceed through an indirect action of miRNA by Eiring *et al.* (136). In the specific case of the chronic myelogenous leukemia, miR-328 was found acting as a decoy by binding to heterogeneous ribonucleoprotein hnRNP E2 in a miRNA's seed sequence independent way and this relieves the hnRNP E2 dependent translational repression of the CEBPA mRNA involved in myeloid cell differentiation.

miRNAs play an important role in translation regulation since it is assumed that up to 60% of the protein coding genes can be under the control of miRNAs (98). They are strongly involved in many cell processes such as development, differentiation, proliferation, and apoptosis (21, 137-140), all processes that are often deregulated in tumors. miRNA are believed to provide major contributions in tumorigenesis and description of these pathological roles at a molecular level are now increasingly documented.

4. miRNAs IN TUMORIGENESIS AND TUMOR DEVELOPMENT PROCESSES

4.1. Modifications of miRNA expression levels in cancer

4.1.1. miRNA expression profiles in tumors

Different techniques can be used to assess the miRNA expression level in tumor samples such as

MicroRNAs: molecular features and role in cancer

Northern blot analysis, quantitative PCR, oligonucleotide microarrays, SAGE and RAKE techniques, and quantitative flow cytometry or Next Generation Sequencing. Most of these techniques are useful for large-scale studies, involving large numbers of samples to be analyzed, or large numbers of different miRNAs to assay, or both.

Two of the early large-scale studies assayed many miRNAs in several types of tumors, using a quantitative flow cytometry technique based on the use of beads (141) or a microarray technique and Northern blots (142). Approximately 25% of the miRNAs studied were found to be significantly deregulated in at least one tumor type. The first study mainly revealed that miRNAs are underexpressed in tumor tissues in comparison to normal tissues, whereas the second one uncovered that miRNAs are overexpressed in tumor tissues. The different conclusions reported by these two studies conducted on similar types of tumor tissue (breast, colon, lung, pancreas, prostate, and stomach) probably resulted from the use of two different technical platforms or the sample size (142).

miRNA expression deregulation in several types of cancer were reassessed by taking into account the two above-mentioned original studies and the analysis of only one type of tumor (143). This highlighted that a number of miRNAs such as miR-21, miR-155, miR-221, and miR-222 appeared to be consistently overexpressed in many tumor tissues (brain, thyroid, gastrointestinal tract, liver, lung, and breast), whereas others such as miR-143, miR-145, and the let-7/miR-98 cluster were found to be underexpressed in tumor tissues. However, the expression of several miRNAs is not always modified identically in all types of cancer. For example, the miR-17/92 cluster has been reported to be overexpressed in seven tumor types and underexpressed in three others.

miRNAs are also interesting diagnostic biomarkers distinguishing different subtypes of tumors from the same tissue, such as in gliomas (144), thyroid cancer (145) or renal cell carcinoma (146).

4.1.2. Deregulation of miRNA expression by defects in the biogenesis mechanism

Altered expression of the proteins involved in the miRNA biogenesis and maturation machinery has been observed in several cancers. For example, deregulation of Drosha expression is associated with ovarian cancer (147), skin epithelium cancer (148), and esophagus tumors (149). A high Drosha expression level is associated with a poor survival prognosis. Interestingly, when esophagus tumor cell lines were transfected by siRNAs designed to target the Drosha coding mRNA, a significant decrease in the cell proliferation was noted (149).

Inactivating mutations in XPO5, coding for Exportin 5, have been discovered in several cancer cell lines with microsatellite instability (150). These mutations lead to trapping pre-miRNAs in the nucleus, thus preventing miRNA processing.

Dicer was also found to be overexpressed in lung carcinoma and prostate adenocarcinoma (151, 152) and underexpressed in high-grade ovarian carcinoma, small-cell lung tumors with poor prognosis, and invasive lung adenocarcinoma (147, 152, 153). In addition, frameshift mutations in the TRBP2 genes were found to diminish the TRBP protein expression. This causes destabilization of the DICER complex and a defect in the processing of miRNAs (154).

Expression and activity of some major components of the miRNA processing pathway such as Drosha/DGCR8, Dicer/TRBP2 or Argonautes may be regulated by the transcription factors p53, p63, and p73 (155). The promoters of the genes coding for Drosha, DGCR8, Dicer and TRBP contain p53-RE sequences indicating that they could be direct transcriptional targets of p53 and preferentially of p63/p73. Moreover, direct interactions between WW domains in p63 and p73 and PY domains in DGCR8 protein may influence miRNA processing. In addition, the pro-apoptotic TA-p63 isoform may indirectly decrease the expression of Dicer, for example, by increasing the expression of let-7, a miRNA that has been reported to reduce the expression of Dicer. Drosha, DGCR8, Dicer, and TRBP are also controlled by several miRNAs whose expression is regulated by p53. This suggests that p53/p63/p73 could regulate the expression of the miRNA processing components, at both the transcriptional and post-transcriptional levels.

4.1.3. Deregulation of miRNA expression by chromosomal rearrangements

Two studies highlighted that miRNA genes are located in chromosomal regions that are frequently altered in cancers (156, 157). Alterations of the copy number for 37%, 73%, and 86% of 283 miRNA coding genes were pinpointed in ovarian cancer, breast cancer, and melanoma, respectively. Nearly 40 miRNA coding genes are altered in common in these three types of tumor (157). Modifications of the expression of miRNA coding genes may result from chromosomal translocation, leading, for example, to overexpression of the gene coding for miR-125b, due to translocation t(2;11) in some types of leukemia (158). They may also be linked to amplification or deletion of genomic regions. This is exemplified in the 17q23 region, which was found to be amplified in neuroblastoma (159). This region hosts the gene coding for miR-21, which is usually upregulated in tumors. Another example is the presence of a deletion in the 13q14 region in several cases of B-cell chronic lymphoid leukemia. Genes coding for miR-15a and miR-16-1, underexpressed in 68% of these types of tumor, are located in this region (160).

4.1.4. Deregulation of miRNA expression due to point mutations in coding genes

The number of point mutations or SNPs (single nucleotide polymorphisms) in human pri-miRNA or pre-miRNA sequences has been reported to be usually very low (161). Nevertheless, several studies have indicated that SNPs may explain changes in miRNA expression between tumor and normal tissues. One SNP (G:C) in the pre-miR-146a sequence (60 nucleotides from the first nucleotide)

MicroRNAs: molecular features and role in cancer

has been revealed and associated with a decrease in the expression of mature miR-146a in thyroid papillary carcinoma (162) and in prostate cancer (163). Moreover, a G/C heterozygous status in tissues is associated with a higher risk of thyroid papillary carcinoma in comparison to G/G or C/C homozygous status (162). In prostate cancer, a C/C homozygous status was reported to correlate to halving the risk of cancer in comparison to G/G or G/C genotypes (163). Another SNP (G:U), identified in the seed region of miR-125a located 8 nt from the 5' end, could have an impact on the interaction between miRNA-125a and its mRNA target (164). A G/U heterozygous status was observed in some cases of breast cancer (165). In non-small-cell lung cancer, an SNP (U:C) in the pre-miR-196a-2 (78 nucleotides from the first nucleotide) has been identified and patients with a C/C homozygous status had a shorter survival rate compared to patients with a U/U or U/C genotype (166). Calin *et al.* highlighted mutations in five out of 42 miRNAs in 15% of chronic lymphocytic leukemia (CLL) samples (167). In another type of lymphocytic leukemia, MLL-AF4 acute lymphocytic leukemia, miR-128b has been found to be underexpressed in tumor samples, due to a mutation in the primary transcript located 13 bp from the 3' end of mature miR-128b (168). This mutation also contributes to glucocorticoid resistance of tumor cells.

4.1.5. Modifications of miRNA expression due to transcriptional regulation

Transcription of miRNA encoding genes by RNA polymerase II can be regulated by several transcriptional factors. In the flanking regions of miRNA-coding genes in *C. elegans* and in humans the presence of patterns involved in transcriptional regulation has been studied (169). A number of transcriptional factors such as p53, E2F, and Myc have been reported to play a role in this regulation.

p53, known to be a tumor suppressor, has been highlighted as a transcriptional regulator of several miRNAs (170). It acts as a transcription activator of the miR-34a gene, as it can bind to the promoter region of this gene (171-173). It may also impair the expression of several miRNAs by inhibition of the transcription factor E2F1 (174). Activation by transcription factors belonging to the E2F family has been reported to increase the expression of some miRNAs (175). Another transcription factor, Myc, which has oncogenic properties, has been described as an expression modulator for a number of miRNAs. Indeed, by binding to promoter regions, Myc has been shown to be an expression activator of the miR-17/92 cluster, for example (176), but also an expression repressor for many miRNAs involved in proliferation processes (177).

Transcription regulation, which can account for a modulation of miRNA expression levels, can also result from epigenetic modifications at the promoter regions of specific miRNA coding genes. One important epigenetic modification is DNA methylation, which is a reversible phenomenon and involves only cytosines belonging to CpG dinucleotide motifs. CpG-rich genomic domains,

called CpG islands, can be located in several promoter regions. DNA methylation of CpG islands in promoters is a phenomenon that controls the expression level of downstream genes, as this modifies the chromatin structure and consequently the binding of transcription factors; in addition it favors MBD (methyl-DNA binding) protein fixation (178).

The role of DNA methylation in repression of miRNA expression was confirmed by using DNA demethylation drugs on cultured tumor cells that promote miRNA overexpression (179-181). Several miRNAs have been studied more specifically, such as miR-124 (181) and miR-34a (182), for which the lower expression in cell lines or in tumor tissues is due to a hypermethylation of CpG islands, and miR-128 (183) and let-7a-3 (184), which are overexpressed due to a hypomethylation of CpG islands.

4.2. Modifications of the interactions between miRNAs and their mRNA targets

4.2.1. Deregulation by chromosomal modification

As mentioned above, several genomic alterations, such as chromosomal rearrangements or point mutations, may rationalize the differences observed in miRNA expression between tumor and normal tissues. These alterations are important events in the tumor genesis process, as they prevent proper regulation of normal cellular processes by miRNAs. In addition, and similarly, genomic alterations can also affect the 3'UTR sequences of mRNA targets and lead to gene regulation modifications by impairment of the miRNA/mRNA target hybridizations.

One study demonstrated that a 4-nt TTCA insertion in the 3'UTR of the IL-1 alpha mRNA significantly disrupts a binding site for miR-122 and miR-378 and has a substantial influence on IL-1 alpha expression regulation (185). Studies conducted on mantle cell lymphoma have shown high expression of CCND1 in these tumors due to deletions and mutations in the CCND1 mRNA 3'UTR (186). These sequence modifications impair the interaction between CCND1 mRNA and miR-16, increasing the expression of the CCND1 protein (187). Genomic translocation can delete the normal 3'UTR part of the mRNA coding for HMGA2, making let-7 unable to bind to this region and to restrain HMGA2 expression (188). This protein has been shown to be involved in the tumorigenesis of many malignant tumors such as lung cancer (189-191) and pancreas cancer (192).

In the case of ABCG2 (a ubiquitous ATP-binding cassette (ABC) transporter, playing a role in absorption, distribution, and elimination of drugs), a shortening of the 3'UTR mRNA has been detected in drug-resistant colon cancer cell lines, leading to a loss of a miR-519c binding site. This relieves the repression of ABCG2 translation, contributes to the overexpression of the transporter, and confers drug resistance to the tumor cells (193).

4.2.2. Deregulation by point mutations

Yu *et al.* (194) investigated SNPs in the mRNA 3'UTR sequence complementary to several miRNAs. They noted fewer SNPs in the regions that are complementary to

MicroRNAs: molecular features and role in cancer

the miRNA seed region than in the other part of the 3'UTRs (194). This was taken as evidence of a selection pressure and the importance of the regulatory mechanism by miRNAs.

SNPs located in miRNA complementary regions have been studied in a tumor context in an increasing number of reports. Two SNPs in the 3'UTR of the KIT mRNA (tyrosine kinase receptor) in thyroid papillary carcinoma have been described. These SNPs (G:A and G:C) affect the binding of miR-221/222 and miR-146a/146b miRNAs to the KIT mRNA, favor expression of the protein, and consequently increase the risk of cancer (195). In CD86 mRNA 3'UTR, a (G:C) SNP was found associated with a higher risk of sporadic colorectal cancer. This site is the target of five miRNAs; three experience a decrease in their binding affinity with the mRNA, contrary to the other two (196). Another study was conducted on the mRNA 3'UTR region coding for KRAS in non-small-cell lung cancer in moderate smokers. This mRNA contains ten target sites in the 3'UTR for the miRNA let-7 family. The authors described only one SNP per target site and most of these SNPs are infrequently found in tumors (197). Only one SNP (U:G) was found in about 20% of tumors and therefore can be associated with a higher risk of developing these tumors, and this type of mutation leads to an increase in KRAS mRNA expression *in vitro* (198). Another study was conducted on breast cancer and most particularly on integrins, proteins involved in the control of cellular attachment to the extracellular matrix. SNPs were found in the 3'UTR of integrin coding mRNAs, in particular ITGB4. A strong correlation was found between the presence of the polymorphic allele and the negative status of hormonal receptors in breast cancer (199).

4.3. Oncogene and tumor suppressor miRNAs involved in molecular pathways of tumor development

miRNAs can be considered as oncogenes when an increase in their expression contributes to a malignant transformation of normal cells, or on the contrary, as tumor suppressors in the reciprocal. The status of oncogenes or tumor suppressors is generally given to miRNAs that have been found to be deregulated in many tumor types. Several miRNAs have been described as oncogenes (frequently called oncomiRs). A few specific examples are given hereafter.

miR-372/373 are two miRNAs that have been described as playing a role in the development of testicular germ cell tumors in presence of active wild-type p53 and oncogenic RAS (200). The polycistronic cluster miR17-92 also seems to have an oncogenic role such as in lung cancer and B-cell lymphoma (201, 202). Indeed, overexpression of this cluster seems to accelerate tumor development of B-cell lymphoma in mice expressing c-myc. miR-155 is also described as an oncogenic miRNA, as it is overexpressed in B-cell lymphoma (142, 203-206). Some miRNAs, such as miR-21, are also considered as oncogenes when they can repress the expression of tumor suppressor proteins. miR-21 is overexpressed in many tumor types and targets the mRNAs of tumor suppressors PDCD4 and TPM1 (143, 207-210). On the contrary, other

miRNAs have been described as tumor suppressors: let-7 (156, 189, 211-216) as well as miR-15a and miR-16-1 (160, 217-220). miR-34a is also considered a tumor suppressor repressing several oncogenic genes, such as c-Met in brain tumors (221) and uveal melanoma (222) or Bcl-2 in neuroblastoma (223).

For a more comprehensive list of oncogenic or tumor suppressor miRNAs, the reader is referred to the miR 2 Disease database (www.mir2disease.org) (224).

miRNAs involved in tumor development can control many key signalization pathways such as apoptosis, cellular proliferation, and angiogenesis.

4.3.1. Apoptosis and cellular proliferation processes

The apoptosis process can be activated *via* two pathways, the intrinsic and the extrinsic pathways (Figure 13). In the intrinsic one, several pro-apoptotic and anti-apoptotic members of the Bcl-2 family are involved and their actions are antagonized to regulate mitochondrial membrane permeability. The anti-apoptotic proteins Bcl-2 and Bcl-xL are often overexpressed in tumors (225-227) and prevent mitochondrial permeabilization by inhibition of the cytosolic pro-apoptotic Bax and Bak (228). After a cellular stress, expression of pro-apoptotic members of the Bcl-2 family such as Puma and Noxa is enhanced by p53-dependent transcriptional activation. Subsequent activation of Bax and Bak proteins then allow their migration to the mitochondrial membrane where they concur to increase the permeability of the mitochondrial membrane. This permeabilization is associated with a release of cytochrome *c* into the cytoplasm (229), which binds to the APAF-1 protein (apoptotic protease-activating factor-1) and to two procaspases-9 to form the apoptosome. Then this protein complex promotes the activation of caspase-9, an apoptosis-initiating caspase (230). Activated caspase-9 cleaves procaspase-3, -6, or -7. In normal conditions, activation of these caspases is inhibited by proteins called IAPs (inhibitor of apoptosis protein). IAPs are inhibited by Smac/DIABLO proteins that are released into the cytoplasm after membrane permeabilization of mitochondria (231, 232).

As for the extrinsic apoptotic pathway, it starts outside of the cell with an activation of the pro-apoptotic receptors at the surface of the cell by ligands such as CD95L (FAS-L). Ligand binding to the extracellular domain receptors promotes intracellular domain binding to the FADD protein (Fas-associated death domain) (233). Then this complex recruits procaspase-8 or -10 and activates it. Activated caspases-8 and -10 then participate in the downstream steps of the intrinsic apoptotic pathway as they activate activator caspase-3, -6, or -7 and can also cleave and activate the Bid protein. The truncated protein tBid allows the relocalization of Bax and Bak (234).

A number of miRNAs have been shown to be able to regulate the apoptotic pathways at different stages (235). Several proteins of the Bcl-2 family are regulated by miRNAs. The Bcl-2 mRNA is the target of miR-15a/16 and it was demonstrated that both miRNAs negatively

MicroRNAs: molecular features and role in cancer

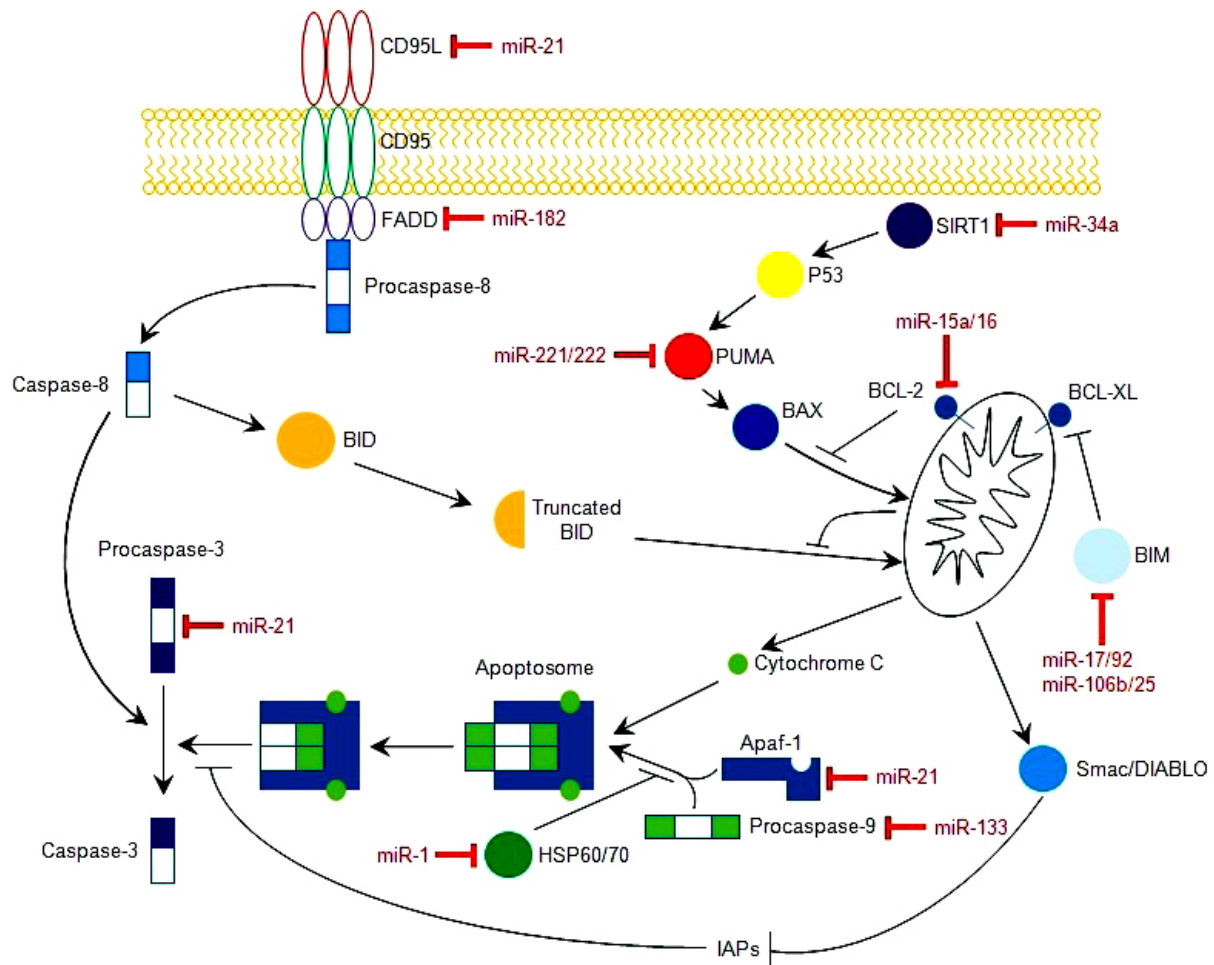


Figure 13. Implication of miRNAs in the apoptosis process (235). In the intrinsic pathway, the pro-apoptotic protein Puma is the target of miR-221/222 and is regulated by p53, target of the protein SIRT1, itself regulated by miR-34a. Anti-apoptotic protein Bcl-2 is the direct target of miR-15a/16, and Bcl-xL is the indirect target of some members of the miR-17/92 and miR-106b/25 clusters that regulate the pro-apoptotic protein Bim. Several miRNAs repress the apoptosome proteins, such as miR-21 targeting APAF-1 and miR-133 targeting caspase-9. miR-1 is a pro-apoptotic miRNA targeting HSP60 and HSP70, proteins that inhibit apoptosome formation. In the extrinsic pathway, concerning the CD95 receptor and its ligand CD95L (or FAS-L), miR-21 acts as a repressor of this ligand, whereas miR-182 lowers FADD expression. miR-21 also plays a role in caspase-3 regulation.

regulate Bcl-2 at a post-transcriptional level and induce apoptosis (236). The Bcl-xL protein is inhibited by the pro-apoptotic protein Bim whose expression level is downregulated by certain miRNAs of the miR-17/92 and miR-106b/25 clusters. Indeed, the miR-17/92 cluster is essential for B cell development, and absence of miR-17/92 leads to increased levels of the pro-apoptotic protein Bim and inhibits B cell development (237). miR-17/92 was found to be overexpressed in many cancers such as B-cell lymphoma. The miR-106b/25 cluster was found to be overexpressed in many gastric and prostate cancers. Some miRNAs, most particularly miR-106b, are assumed to target Bim but also p21, which is involved in cell cycle control, and E2F1 (238, 239). miR-34a is also an important regulator of the initiation of the apoptosis pathway, as this

miRNA lowers the expression of the deacetylase SIRT1. This leads to the acetylation of p53, the increase in its transcriptional activity, and the induction of the pro-apoptotic protein Puma (240). A recent study showed that Puma is the target of two miRNAs, miR-221/222, in glioblastoma cells (241). These two miRNAs also play an important role in cellular proliferation by regulation of p27^{Kip1} expression (242).

The second part of the intrinsic pathway, with apoptosome formation and activation of caspases, is also regulated by miRNAs. For example, miR-1 and miR-133 are co-transcribed from the same polycistron, but they have antagonistic roles in apoptosis, as miR-1 has a pro-apoptotic effect, whereas miR-133 is an anti-apoptotic

MicroRNAs: molecular features and role in cancer

factor. In fact, miR-1 targets the anti-apoptotic proteins HSP60 and HSP70, two proteins that prevent apoptosome formation, while miR-133 represses caspase-9 expression (243). miR-21 also plays an anti-apoptotic role initially observed in glioblastoma cells (244), since this miRNA regulates the expression of APAF-1, caspase-3, and PDCD4 (245). In addition, PDCD4 also regulates caspase-3 activity (246).

The extrinsic pathway can be the target of miR-21 and miR-182, which control the expression of FAS-L (247) and protein FADD (248), respectively.

4.3.2. Angiogenesis process

Growth of new blood vessels from preexisting vessels, a process called angiogenesis, is a key step in tumor progression (249, 250). The control of this process by miRNAs has been evidenced to occur after the experimental knockdown of Dicer, by the transfection of specific siRNAs in endothelial cells. Indeed, the reduction of the expression of Dicer led to a decrease in angiogenesis, by a reduction of capillary sprouting of endothelial cells and tube-forming activity (251). After Dicer knockdown, Suarez *et al.* have shown an alteration in the expression of key genes in angiogenesis such as IL-8, angiopoietin receptor Tie-2, and VEGFR2 (252). Several studies analyzed the expression levels of miRNAs in endothelial cells and highlighted their pro-angiogenic properties *in vivo* (miR-126, miR-378, miR-296, and the miR-17/92 cluster), or *in vitro* (miR-210, let-7f, miR-27b, and miR-130a), or their anti-angiogenic properties (miR-221/222, miR-15b, and miR-16) (253). miR-126, the only endothelial cell-specific miRNA, was studied *in vivo* in a mouse model in which a drop in the expression of this miRNA was correlated with a decrease in angiogenesis and vascular integrity (254). The same conclusion was drawn in zebrafish in which knockdown of miR-126 leads to the loss of vascular integrity. This miRNA plays a role in the repression of negative regulators of the VEGF pathway, such as SPRED1 and PIK3R2, and it also seems that miR-126 regulates the expression of EGFL7 (255). This protein is also involved in many processes and particularly in angiogenic sprouting (256).

Other miRNAs, nonspecific of endothelial cells, such as miR-378, miR-296, and the miR-17/92 cluster, also have pro-angiogenic properties. The overexpression of miR-378 in glioblastoma U87 cells leads to angiogenesis of tumors after injection of the cells in nude mice by repression of the expression of tumor suppressors Fus-1 and SuFu (257). An inhibition of miR-296 in the glioblastoma U87 cells injected in nude mice reduces angiogenesis (258). Concerning the miR-17/92 cluster, overexpression in cells promotes the development of better-perfused tumors (259).

miR-210, a hypoxia-inducible miRNA, stimulates the cellular migration and the formation of vessel-like structures by downregulating Ephrin-A3 expression (260). miR-130a shows pro-angiogenic properties by targeting mRNAs coding for the anti-angiogenic proteins Gax and Hoxa5 (261). On the contrary, some miRNAs are more likely anti-angiogenic factors such

as miR-221/222, whose overexpression *in vitro* in endothelial cells leads to a decrease in cellular migration and the formation of vessel-like structures by repression of c-Kit (262). The miRNAs miR-15b and miR-16 target the VEGF-coding mRNA and thus have anti-angiogenic properties (263).

4.4. Exosomal miRNAs: new potential tumor biomarkers

Quantitative analyses of miRNA expression in tumor tissues revealed that miRNAs can be regarded as appropriate biomarkers that can help discriminate tumor types. miRNA profiling for tumor typing appears to be an attractive approach for diagnosis as a complement to pathology methods (144). This can be performed directly on tumor tissue specimens, but other less invasive approaches are currently under investigation. These approaches are based on the fact that miRNAs can be found in detectable amounts in small membrane vesicles (about 100 nm in diameter) called exosomes (264). Exosomes offer miRNAs a protection against RNases (265) and are secreted by a wide range of cell types such as hematopoietic cells, dendritic cells, mast cells, neurons, and tumor cells (266-268). Exosome purification and analysis of miRNA content may give new opportunities for diagnosis. In addition, exosomes and their RNase-protected miRNA are present in several biological fluids. Indeed, their presence has been evidenced in blood (268-272), urine (273, 274), saliva (275, 276) and amniotic fluid (277).

Assaying exosomal miRNAs in body fluids could be useful for cancer diagnosis. In fact, tumor-derived exosomes were proved to contain numerous tumor-specific miRNAs. For instance, exosomes can be enriched either in the let-7 miRNA family if derived from metastatic gastric cancer (278) or in various pre-miRNAs if derived from mesenchymal stem cells (279). miRNAs derived from glioma exosomes can therefore be envisioned for use as diagnosis biomarkers or surrogate markers for therapy follow-up (268, 269). For example, the exosomal miRNAs miR-21 and miR-155 extracted from blood have been reported to be valuable biomarkers for diagnosis of patients with lung adenocarcinomas (271). In ovarian cancer, exosomal circulating miRNAs can also be informative to distinguish various tumor stages (280). In prostate cancer cells, irradiation-induced premature senescence is associated with an increased release of exosomes. Thus, a quantitative assessment of the tumor exosomes released in body fluids should constitute an easy means for therapy follow-up (281).

It should be noted that exosomes may also have considerable implications in cancer development, given that these vesicles have been reported to be involved in an intercellular transfer of the mRNAs and miRNAs they contain between glioma cells (282), or from tumor cells into normal cells in the tissues (264, 283). Also, exosomes derived from cancer stem cells, which seem to be responsible for the increase in tumor growth, invasion, or vascularization, could establish a premetastatic niche away from the tumor tissue (284).

MicroRNAs: molecular features and role in cancer

4.5. miRNAs in cancer therapy

With the discovery of the role of miRNAs in controlling the expression of many proteins, and moreover that they behave as oncogenic or tumor suppressor components, it soon became clear that miRNAs can be involved or may be used in new therapeutic approaches. It goes without saying that taking advantage of miRNAs in new antitumor developments requires that a number of hurdles be overcome (285).

Briefly, miRNAs intrinsically have a number of attractive features for therapy. Their mechanism of action guides the therapeutic process. In comparison to small inhibitory molecules that reduce the activity of targeted enzymes but leave the amount of cellular enzyme intact, miRNAs can be used to reduce the cellular concentration of targeted proteins. miRNAs are natural cellular components and they include an intrinsic signature that may ensure specificity to target. These may have important consequences in the control of side effects. Nevertheless, accurate miRNA-target recognition is not perfectly managed (see above) and off-target effects are still dreaded. On the other hand, one single miRNA can target several oncogenic proteins and the opportunity to simultaneously repress several oncogenes with only a single miRNA appears very attractive in the search to improve anticancer therapy, while limiting possible side effects. An example of this multitarget therapy can be found with miR-34a, which represses c-Met, CDK4 (cyclin-dependent kinase 4), and Bcl-2 (B-cell lymphoma 2), all involved in separate oncogenic pathways (286).

miRNA-based therapies can be tentatively classified according to two different criteria: the antitumoral effects that are strategically expected and the mode of action triggered. First and most specifically, several antitumoral effects can be putatively promoted using miRNA-based strategies (287). Indeed, given the numerous roles played by miRNAs in the tumor physiopathology mentioned above, modulation of miRNA expression in tumor tissues may have direct effects on several biochemical pathways and proliferation, survival, differentiation, and migration of tumor cells. Hence therapeutic strategies can include direct tumor suppressive effects, antiangiogenic effects, antimetastatic effects, suppression of immune evasion of tumors, or sensitization of tumor cells to traditional anticancer treatments such as radiotherapy or chemotherapy.

Second, miRNA-based therapies can be based on the development of miRNA mimicking compounds to increase the cellular concentration of any given miRNA or on the contrary of miRNA antagonists to reduce their level. Upregulation of miRNA cellular concentration can be obtained by transfection of the cells with exogenous miRNA, *i.e.*, pre-miRNA or mature miRNA, whereas antisense-mediated inhibition is based on the use of complementary antisense oligonucleotides of mature miRNAs to downregulate miRNAs (287). A third attractive therapeutic approach called indirect miRNA-based therapy takes advantage of the fact that some miRNAs are expressed in reduced amounts in cancer cells but are

present in high concentration in normal cells. The introduction of specific vectors or constructs containing a miRNA-regulated suicide gene in cancer cells may result in the expression of the given suicide gene only in the cancer cells that are devoid of the suicide gene-regulating miRNA. This strategy may be very safe and leave all normal cells unaffected.

miRNA replacement is the approach based on the administration of synthetic miRNAs so as to increase the cellular concentration of tumor suppressor miRNAs whose levels are frequently lowered in tumors. For example, in the case of let-7, which is a tumor suppressor downregulated in several cancer types, an intratumoral introduction of the let-7 oligonucleotide into a mouse model of non-small-cell lung cancer led to a reduction of the tumor size (288). Exogenous delivery of a miR-34 mimic by transfection or use of lentivirus constructs resulted in a reduction of the tumor in gastric cancer (289). miR-based strategies are under investigation at a preclinical stage for development of miRNA replacement therapies against cancers. For example, several are based on the delivery of mimics of miR-34 miR-16 or let-7, which are said to be tumor suppressors in tumors (Mirna Therapeutics, Austin, TX, USA) (286).

Antagonists of miRNAs are required to reduce the cellular levels of oncogenic miRNAs that are overexpressed in tumors. This can be achieved using antisense oligonucleotides (ASO) that can hybridize to miRNAs and then prevent miRNA interactions with the mRNA targets. Chemical modifications are needed to protect ASOs from nuclease degradation and to improve their affinity for miRNAs (290). The main modifications are the use of 2'-O-methyl-RNA nucleotides or locked nucleic acid (LNATM) nucleotides. In the locked nucleic acid nucleotides, the ribose ring is modified by a methylene bridge connecting the 2'-O atom and the 4'-C atom. A recent study has successfully used 2'-O-methyl- and DNA/LNA-mixed oligonucleotides to specifically knock down miR-21 and to investigate the potential contribution of this miRNA in the regulation of apoptosis-associated genes in glioblastoma cell lines (244). In these cell lines, Papagiannakopoulos *et al.* compared these two miR-21 downregulating types of ASOs and observed greater knockdown using LNA-complementary antisense miR-21 than the 2'-O-methyl-complementary antisense miR-21, increasing the levels of major components of the apoptotic pathway (245).

miR-122 is a miRNA expressed in liver that is essential for replication of the hepatitis C virus (HCV) RNA genome, causing liver disease and increased risk of hepatocellular carcinoma. Therapeutic silencing of miR-122 using a locked nucleic acid (LNA)-modified oligonucleotide (SPC3649) complementary antisense to miR-122 was proved to suppress viremia in primates (291). The antgomiR-122 (SPC3649 or Miravirsen - Santaris Pharma A/S, Hørsholm, Denmark) is currently being evaluated in Phase 2a clinical trials. Regulus Therapeutics (San Diego, CA, USA) is developing proprietary chemically modified anti-miR oligonucleotides delivered

MicroRNAs: molecular features and role in cancer

systemically to target miR-21, which is overexpressed in many cancer types (142) and can promote tumor progression and metastasis (292). Regulus's anti-miR-21 downregulates miR-21 in the liver and reduces hepatocellular carcinoma (HCC).

Sensitization of tumors to chemotherapy or radiotherapy by miRNA-based therapy also seems to be a valuable approach according to a number of published results. For example, the oncogenic cluster miR-17/92 has been shown to be involved in the radioresistance of tumor cells. Indeed, overexpression of these clustered miRNAs in mantle cell lymphoma cells decreases the radiosensitivity of these cells by targeting PTEN and activating the PI3K/Akt signal pathway (293). In a similar way, miR-221/222 are also described as being involved in the radioresistance of tumor cells in gastric cancer. A knockdown of these miRNAs in cancer cell lines using complementary antisense oligonucleotides (2'-O-methyl-oligonucleotides) increases PTEN expression and increases the radiosensitivity of the tumoral cells (294).

The role played by miRNAs in the chemoresistance process ((295) for review) and as biomarkers of chemoresistance has been demonstrated. Ranade *et al.* found that miR-92*, miR-147, and miR-574-5p are overexpressed in small-cell lung cancer and are potential biomarkers of chemoresistance (296). In other types of cancer such as colon cancer or ovarian cancer, several other miRNAs have been described as being involved in chemoresistance. It has been shown that miR-140 and miR-215 are overexpressed in drug-resistant colorectal cancer cell lines and the targeted proteins involved in this resistance may be HDAC4 and DHFR, respectively (297, 298). In ovarian cancer, several miRNAs are involved in drug resistance, such as miR-30c, miR-130a, and miR-335, which are downregulated in drug-resistant cell lines and promote upregulation of M-CSF (macrophage colony-stimulating factor), a previously described resistance factor for ovarian cancers (299).

Collectively, all these studies show that appropriate control of specific miRNA concentrations in tumors may have beneficial impacts on tumor initiation and promotion. One main obstacle to these therapeutic strategies, as pointed by Purow (285), probably relates to the correct delivery of the miRNA mimics or antagonists to tumor cells.

5. CONCLUSION

miRNA appears to be an original class of noncoding RNAs. Approximately 1000 different miRNAs are expressed in human. This rather limited number may facilitate the understanding of their global physiological or pathological roles in cells. However, the large number of mRNAs that they can individually target makes the analysis extremely complicated. Moreover, additional factors or events probably remain to be identified to achieve a complete appraisal of the way mRNA expression is finely tuned in cells under the control of miRNAs.

Study of miRNAs in cancer obviously provides new opportunities for diagnosis. On the other hand, given their critical role in the control of gene expression and in their possible involvement in molecular dialogs between cells driven by exosomes, research programs in which miRNAs are regarded as targets for new therapeutic drugs or approaches seem perfectly warranted and look promising.

6. ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by grants from the Ligue contre le Cancer (comites departementaux Isere, Drome and Ardeche and Ligue Nationale) (<http://www.ligue-cancer.net/>); the Region Rhone-Alpes (<http://www.rhonealpes.fr/>); the Lyon, Auvergne, Rhone-Alpes Canceropole (<http://www.canceropole-clara.com/>). We thank Ms. L. Northrup (PhD, ELS; English Solutions) for manuscript editing.

7. REFERENCES

1. Lee, R. C., R. L. Feinbaum & V. Ambros: The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, 75, 843-854 (1993)
2. Heywood, S. M., D. S. Kennedy & A. J. Bester: Separation of specific initiation factors involved in the translation of myosin and myoglobin messenger RNAs and the isolation of a new RNA involved in translation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 71, 2428-31 (1974)
3. Wightman, B., I. Ha & G. Ruvkun: Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene *lin-14* by *lin-4* mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell*, 75, 855-862 (1993)
4. Reinhart, B. J., F. J. Slack, M. Basson, A. E. Pasquinelli, J. C. Bettinger, A. E. Rougvie, H. R. Horvitz & G. Ruvkun: The 21-nucleotide *let-7* RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 403, 901-906 (2000)
5. Pasquinelli, A. E., B. J. Reinhart, F. Slack, M. Q. Martindale, M. I. Kuroda, B. Maller, D. C. Hayward, E. E. Ball, B. Degnan, P. Müller, J. Spring, A. Srinivasan, M. Fishman, J. Finnerty, J. Corbo, M. Levine, P. Leahy, E. Davidson & G. Ruvkun: Conservation of the sequence and temporal expression of *let-7* heterochronic regulatory RNA. *Nature*, 408, 86-89 (2000)
6. Lagos-Quintana, M., R. Rauhut, W. Lendeckel & T. Tuschl: Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science*, 294, 853-858 (2001)
7. Lagos-Quintana, M., R. Rauhut, A. Yalcin, J. Meyer, W. Lendeckel & T. Tuschl: Identification of tissue-specific microRNAs from mouse. *Curr Biol*, 12, 735-739 (2002)
8. Reinhart, B. J., E. G. Weinstein, M. W. Rhoades, B. Bartel & D. P. Bartel: MicroRNAs in plants. *Genes Dev*, 16, 1616-1626 (2002)

MicroRNAs: molecular features and role in cancer

9. Aravin, A. A., M. Lagos-Quintana, A. Yalcin, M. Zavolan, D. Marks, B. Snyder, T. Gaasterland, J. Meyer & T. Tuschl: The small RNA profile during *Drosophila melanogaster* development. *Dev Cell*, 5, 337-350 (2003)
10. Dostie, J., Z. Mourelatos, M. Yang, A. Sharma & G. Dreyfuss: Numerous microRNPs in neuronal cells containing novel microRNAs. *RNA*, 9, 180-186 (2003)
11. Houbaviy, H. B., M. F. Murray & P. A. Sharp: Embryonic stem cell-specific MicroRNAs. *Dev Cell*, 5, 351-358 (2003)
12. Lagos-Quintana, M., R. Rauhut, J. Meyer, A. Borkhardt & T. Tuschl: New microRNAs from mouse and human. *RNA*, 9, 175-179 (2003)
13. Lim, L. P., M. E. Glasner, S. Yekta, C. B. Burge & D. P. Bartel: Vertebrate microRNA genes. *Science*, 299, 1540-1540 (2003)
14. Griffiths-Jones, S., H. K. Saini, S. van Dongen & A. J. Enright: miRBase: tools for microRNA genomics. *Nucleic Acids Res*, 36, D154-158-D154-158 (2008)
15. Griffiths-Jones, S.: The microRNA Registry. *Nucleic Acids Res*, 32, D109-111-D109-111 (2004)
16. Place, R. F., L. C. Li, D. Pookot, E. J. Noonan & R. Dahiya: MicroRNA-373 induces expression of genes with complementary promoter sequences. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 1608-13 (2008)
17. Gonzalez, S., D. G. Pisano & M. Serrano: Mechanistic principles of chromatin remodeling guided by siRNAs and miRNAs. *Cell Cycle*, 7, 2601-8 (2008)
18. Kim, D. H., P. Saetrom, O. Snove, Jr. & J. J. Rossi: MicroRNA-directed transcriptional gene silencing in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 16230-5 (2008)
19. Khraiweh, B., M. A. Arif, G. I. Seumel, S. Ossowski, D. Weigel, R. Reski & W. Frank: Transcriptional control of gene expression by microRNAs. *Cell*, 140, 111-22 (2010)
20. Watanabe, T., Y. Totoki, A. Toyoda, M. Kaneda, S. Kuramochi-Miyagawa, Y. Obata, H. Chiba, Y. Kohara, T. Kono, T. Nakano, M. A. Surani, Y. Sakaki & H. Sasaki: Endogenous siRNAs from naturally formed dsRNAs regulate transcripts in mouse oocytes. *Nature*, 453, 539-543 (2008)
21. Bartel, D. P.: MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 116, 281-297 (2004)
22. Malone, C. D., J. Brennecke, M. Dus, A. Stark, W. R. McCombie, R. Sachidanandam & G. J. Hannon: Specialized piRNA pathways act in germline and somatic tissues of the *Drosophila* ovary. *Cell*, 137, 522-535 (2009)
23. Li, C., V. V. Vagin, S. Lee, J. Xu, S. Ma, H. Xi, H. Seitz, M. D. Horwich, M. Syrzycka, B. M. Honda, E. L. Kittler, M. L. Zapp, C. Klattenhoff, N. Schulz, W. E. Theurkauf, Z. Weng & P. D. Zamore: Collapse of germline piRNAs in the absence of Argonaute3 reveals somatic piRNAs in flies. *Cell*, 137, 509-21 (2009)
24. Yan, Z., H. Y. Hu, X. Jiang, V. Maierhofer, E. Neb, L. He, Y. Hu, H. Hu, N. Li, W. Chen & P. Khaitovich: Widespread expression of piRNA-like molecules in somatic tissues. *Nucleic Acids Res*, 39, 6596-607 (2011)
25. Aravin, A., D. Gaidatzis, S. Pfeffer, M. Lagos-Quintana, P. Landgraf, N. Iovino, P. Morris, M. J. Brownstein, S. Kuramochi-Miyagawa, T. Nakano, M. Chien, J. J. Russo, J. Ju, R. Sheridan, C. Sander, M. Zavolan & T. Tuschl: A novel class of small RNAs bind to MILI protein in mouse testes. *Nature*, 442, 203-207 (2006)
26. Girard, A., R. Sachidanandam, G. J. Hannon & M. A. Carmell: A germline-specific class of small RNAs binds mammalian Piwi proteins. *Nature*, 442, 199-202 (2006)
27. Grivna, S. T., E. Beyret, Z. Wang & H. Lin: A novel class of small RNAs in mouse spermatogenic cells. *Genes Dev*, 20, 1709-1714 (2006)
28. Watanabe, T., A. Takeda, T. Tsukiyama, K. Mise, T. Okuno, H. Sasaki, N. Minami & H. Imai: Identification and characterization of two novel classes of small RNAs in the mouse germline: retrotransposon-derived siRNAs in oocytes and germline small RNAs in testes. *Genes Dev*, 20, 1732-1743 (2006)
29. Rodriguez, A., S. Griffiths-Jones, J. L. Ashurst & A. Bradley: Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome Res*, 14, 1902-1910 (2004)
30. Saini, H. K., A. J. Enright & S. Griffiths-Jones: Annotation of mammalian primary microRNAs. *BMC Genomics*, 9, 564-564 (2008)
31. Kim, V. N., J. Han & M. C. Siomi: Biogenesis of small RNAs in animals. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 10, 126-139 (2009)
32. Cai, X., C. H. Hagedorn & B. R. Cullen: Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA*, 10, 1957-1966 (2004)
33. Lee, Y., M. Kim, J. Han, K.-H. Yeom, S. Lee, S. H. Baek & V. N. Kim: MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J*, 23, 4051-4060 (2004)
34. Megraw, M., V. Baev, V. Rusinov, S. T. Jensen, K. Kalantidis & A. G. Hatzigeorgiou: MicroRNA promoter element discovery in Arabidopsis. *RNA*, 12, 1612-1619 (2006)
35. Saini, H. K., S. Griffiths-Jones & A. J. Enright: Genomic analysis of human microRNA transcripts. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104, 17719-17724 (2007)

MicroRNAs: molecular features and role in cancer

36. Zhou, X., J. Ruan, G. Wang & W. Zhang: Characterization and identification of microRNA core promoters in four model species. *PLoS Comput Biol*, 3, e37-e37 (2007)
37. Marson, A., S. S. Levine, M. F. Cole, G. M. Frampton, T. Brambrink, S. Johnstone, M. G. Guenther, W. K. Johnston, M. Wernig, J. Newman, J. M. Calabrese, L. M. Dennis, T. L. Volkert, S. Gupta, J. Love, N. Hannett, P. A. Sharp, D. P. Bartel, R. Jaenisch & R. A. Young: Connecting microRNA genes to the core transcriptional regulatory circuitry of embryonic stem cells. *Cell*, 134, 521-533 (2008)
38. Ozsolak, F., L. L. Poling, Z. Wang, H. Liu, X. S. Liu, R. G. Roeder, X. Zhang, J. S. Song & D. E. Fisher: Chromatin structure analyses identify miRNA promoters. *Genes Dev*, 22, 3172-3183 (2008)
39. Gregory, R. I., K.-P. Yan, G. Amuthan, T. Chendrimada, B. Doratotaj, N. Cooch & R. Shiekhattar: The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature*, 432, 235-240 (2004)
40. Guil, S. & J. F. Caceres: The multifunctional RNA-binding protein hnRNP A1 is required for processing of miR-18a. *Nat Struct Mol Biol*, 14, 591-6 (2007)
41. Fukuda, T., K. Yamagata, S. Fujiyama, T. Matsumoto, I. Koshida, K. Yoshimura, M. Mihara, M. Naitou, H. Endoh, T. Nakamura, C. Akimoto, Y. Yamamoto, T. Katagiri, C. Foulds, S. Takezawa, H. Kitagawa, K. Takeyama, B. W. O'Malley & S. Kato: DEAD-box RNA helicase subunits of the Drosha complex are required for processing of rRNA and a subset of microRNAs. *Nat Cell Biol*, 9, 604-11 (2007)
42. Lee, Y., C. Ahn, J. Han, H. Choi, J. Kim, J. Yim, J. Lee, P. Provost, O. Rådmark, S. Kim & V. N. Kim: The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature*, 425, 415-419 (2003)
43. Han, J., Y. Lee, K.-H. Yeom, J.-W. Nam, I. Heo, J.-K. Rhee, S. Y. Sohn, Y. Cho, B.-T. Zhang & V. N. Kim: Molecular basis for the recognition of primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 complex. *Cell*, 125, 887-901 (2006)
44. Okamura, K., J. W. Hagen, H. Duan, D. M. Tyler & E. C. Lai: The mirtron pathway generates microRNA-class regulatory RNAs in *Drosophila*. *Cell*, 130, 89-100 (2007)
45. Ruby, J. G., C. H. Jan & D. P. Bartel: Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing. *Nature*, 448, 83-86 (2007)
46. Berezikov, E., W.-J. Chung, J. Willis, E. Cuppen & E. C. Lai: Mammalian mirtron genes. *Mol Cell*, 28, 328-336 (2007)
47. Lund, E., S. Güttinger, A. Calado, J. E. Dahlberg & U. Kutay: Nuclear export of microRNA precursors. *Science*, 303, 95-98 (2004)
48. Yi, R., B. P. Doehle, Y. Qin, I. G. Macara & B. R. Cullen: Overexpression of exportin 5 enhances RNA interference mediated by short hairpin RNAs and microRNAs. *RNA*, 11, 220-226 (2005)
49. Brownawell, A. M. & I. G. Macara: Exportin-5, a novel karyopherin, mediates nuclear export of double-stranded RNA binding proteins. *J Cell Biol*, 156, 53-64 (2002)
50. Gwizdek, C., B. Ossareh-Nazari, A. M. Brownawell, A. Doglio, E. Bertrand, I. G. Macara & C. Dargemont: Exportin-5 mediates nuclear export of minihelix-containing RNAs. *J Biol Chem*, 278, 5505-5508 (2003)
51. Zeng, Y. & B. R. Cullen: Structural requirements for pre-microRNA binding and nuclear export by Exportin 5. *Nucleic Acids Res*, 32, 4776-4785 (2004)
52. Kehlenbach, R. H., A. Dickmanns, A. Kehlenbach, T. Guan & L. Gerace: A role for RanBP1 in the release of CRM1 from the nuclear pore complex in a terminal step of nuclear export. *J Cell Biol*, 145, 645-657 (1999)
53. Bernstein, E., A. A. Caudy, S. M. Hammond & G. J. Hannon: Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature*, 409, 363-366 (2001)
54. Hutvágner, G., J. McLachlan, A. E. Pasquinelli, E. Bálint, T. Tuschl & P. D. Zamore: A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. *Science*, 293, 834-838 (2001)
55. Ketting, R. F., S. E. Fischer, E. Bernstein, T. Sijen, G. J. Hannon & R. H. Plasterk: Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in *C. elegans*. *Genes Dev*, 15, 2654-2659 (2001)
56. Song, J.-J., J. Liu, N. H. Tolia, J. Schneiderman, S. K. Smith, R. A. Martienssen, G. J. Hannon & L. Joshua-Tor: The crystal structure of the Argonaute2 PAZ domain reveals an RNA binding motif in RNAi effector complexes. *Nat Struct Biol*, 10, 1026-1032 (2003)
57. Ma, J.-B., K. Ye & D. J. Patel: Structural basis for overhang-specific small interfering RNA recognition by the PAZ domain. *Nature*, 429, 318-322 (2004)
58. Zhang, H., F. A. Kolb, V. Brondani, E. Billy & W. Filipowicz: Human Dicer preferentially cleaves dsRNAs at their termini without a requirement for ATP. *EMBO J*, 21, 5875-5885 (2002)
59. Zhang, H., F. A. Kolb, L. Jaskiewicz, E. Westhof & W. Filipowicz: Single processing center models for human Dicer and bacterial RNase III. *Cell*, 118, 57-68 (2004)
60. Chendrimada, T. P., R. I. Gregory, E. Kumaraswamy, J. Norman, N. Cooch, K. Nishikura & R. Shiekhattar: TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature*, 436, 740-744 (2005)

MicroRNAs: molecular features and role in cancer

61. Gregory, R. I., T. P. Chendrimada, N. Cooch & R. Shiekhattar: Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing. *Cell*, 123, 631-640 (2005)
62. Maniataki, E. & Z. Mourelatos: A human, ATP-independent, RISC assembly machine fueled by pre-miRNA. *Genes Dev*, 19, 2979-2990 (2005)
63. MacRae, I. J., E. Ma, M. Zhou, C. V. Robinson & J. A. Doudna: In vitro reconstitution of the human RISC-loading complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 512-517 (2008)
64. Cosentino, G. P., S. Venkatesan, F. C. Serluca, S. R. Green, M. B. Mathews & N. Sonenberg: Double-stranded-RNA-dependent protein kinase and TAR RNA-binding protein form homo- and heterodimers in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92, 9445-9449 (1995)
65. Kawamata, T., H. Seitz & Y. Tomari: Structural determinants of miRNAs for RISC loading and slicer-independent unwinding. *Nat Struct Mol Biol*, 16, 953-960 (2009)
66. Yoda, M., T. Kawamata, Z. Paroo, X. Ye, S. Iwasaki, Q. Liu & Y. Tomari: ATP-dependent human RISC assembly pathways. *Nat Struct Mol Biol*, 17, 17-23 (2010)
67. Mourelatos, Z., J. Dostie, S. Paushkin, A. Sharma, B. Charroux, L. Abel, J. Rappsilber, M. Mann & G. Dreyfuss: miRNPs: a novel class of ribonucleoproteins containing numerous microRNAs. *Genes Dev*, 16, 720-728 (2002)
68. Okamura, K., M. D. Phillips, D. M. Tyler, H. Duan, Y.-t. Chou & E. C. Lai: The regulatory activity of microRNA* species has substantial influence on microRNA and 3' UTR evolution. *Nat Struct Mol Biol*, 15, 354-363 (2008)
69. Schwarz, D. S., G. Hutvagner, T. Du, Z. Xu, N. Aronin & P. D. Zamore: Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell*, 115, 199-208 (2003)
70. Khvorova, A., A. Reynolds & S. D. Jayasena: Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell*, 115, 209-216 (2003)
71. Chu, C.-y. & T. M. Rana: Translation repression in human cells by microRNA-induced gene silencing requires RCK/p54. *PLoS Biol*, 4, e210-e210 (2006)
72. Wang, B., S. Li, H. H. Qi, D. Chowdhury, Y. Shi & C. D. Novina: Distinct passenger strand and mRNA cleavage activities of human Argonaute proteins. *Nat Struct Mol Biol*, 16, 1259-1266 (2009)
73. Rand, T. A., S. Petersen, F. Du & X. Wang: Argonaute2 cleaves the anti-guide strand of siRNA during RISC activation. *Cell*, 123, 621-629 (2005)
74. Leuschner, P. J. F., S. L. Ameres, S. Kueng & J. Martinez: Cleavage of the siRNA passenger strand during RISC assembly in human cells. *EMBO Rep*, 7, 314-320 (2006)
75. Matranga, C., Y. Tomari, C. Shin, D. P. Bartel & P. D. Zamore: Passenger-strand cleavage facilitates assembly of siRNA into Ago2-containing RNAi enzyme complexes. *Cell*, 123, 607-620 (2005)
76. Shin, C.: Cleavage of the star strand facilitates assembly of some microRNAs into Ago2-containing silencing complexes in mammals. *Mol Cells*, 26, 308-313 (2008)
77. Diederichs, S. & D. A. Haber: Dual role for argonautes in microRNA processing and posttranscriptional regulation of microRNA expression. *Cell*, 131, 1097-1108 (2007)
78. Yuan, Y.-R., Y. Pei, J.-B. Ma, V. Kuryavyi, M. Zhadina, G. Meister, H.-Y. Chen, Z. Dauter, T. Tuschl & D. J. Patel: Crystal structure of *A. aeolicus* argonaute, a site-specific DNA-guided endoribonuclease, provides insights into RISC-mediated mRNA cleavage. *Mol Cell*, 19, 405-419 (2005)
79. Lingel, A., B. Simon, E. Izaurralde & M. Sattler: Nucleic acid 3'-end recognition by the Argonaute2 PAZ domain. *Nat Struct Mol Biol*, 11, 576-577 (2004)
80. Boland, A., F. Tritschler, S. Heimstädt, E. Izaurralde & O. Weichenrieder: Crystal structure and ligand binding of the MID domain of a eukaryotic Argonaute protein. *EMBO Rep*, 11, 522-527 (2010)
81. Djuranovic, S., M. K. Zinchenko, J. K. Hur, A. Nahvi, J. L. Brunelle, E. J. Rogers & R. Green: Allosteric regulation of Argonaute proteins by miRNAs. *Nat Struct Mol Biol*, 17, 144-150 (2010)
82. Song, J.-J., S. K. Smith, G. J. Hannon & L. Joshua-Tor: Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity. *Science*, 305, 1434-1437 (2004)
83. Okamura, K., A. Ishizuka, H. Siomi & M. C. Siomi: Distinct roles for Argonaute proteins in small RNA-directed RNA cleavage pathways. *Genes Dev*, 18, 1655-1666 (2004)
84. Liu, J., M. A. Carmell, F. V. Rivas, C. G. Marsden, J. M. Thomson, J.-J. Song, S. M. Hammond, L. Joshua-Tor & G. J. Hannon: Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science*, 305, 1437-1441 (2004)
85. Meister, G., M. Landthaler, A. Patkaniowska, Y. Dorsett, G. Teng & T. Tuschl: Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs. *Mol Cell*, 15, 185-197 (2004)
86. Rhoades, M. W., B. J. Reinhart, L. P. Lim, C. B. Burge, B. Bartel & D. P. Bartel: Prediction of plant microRNA targets. *Cell*, 110, 513-520 (2002)
87. Jones-Rhoades, M. W., D. P. Bartel & B. Bartel: MicroRNAs and their regulatory roles in plants. *Annu Rev Plant Biol*, 57, 19-53 (2006)

MicroRNAs: molecular features and role in cancer

88. Lewis, B. P., I. h. Shih, M. W. Jones-Rhoades, D. P. Bartel & C. B. Burge: Prediction of mammalian microRNA targets. *Cell*, 115, 787-798 (2003)
89. Doench, J. G. & P. A. Sharp: Specificity of microRNA target selection in translational repression. *Genes Dev*, 18, 504-511 (2004)
90. Brennecke, J., A. Stark, R. B. Russell & S. M. Cohen: Principles of microRNA-target recognition. *PLoS Biol*, 3, e85-e85 (2005)
91. Lewis, B. P., C. B. Burge & D. P. Bartel: Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell*, 120, 15-20 (2005)
92. Elbashir, S. M., J. Martinez, A. Patkaniowska, W. Lendeckel & T. Tuschl: Functional anatomy of siRNAs for mediating efficient RNAi in *Drosophila melanogaster* embryo lysate. *EMBO J*, 20, 6877-88 (2001)
93. Grimson, A., K. K.-H. Farh, W. K. Johnston, P. Garrett-Engele, L. P. Lim & D. P. Bartel: MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing. *Mol Cell*, 27, 91-105 (2007)
94. Filipowicz, W., S. N. Bhattacharyya & N. Sonenberg: Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat Rev Genet*, 9, 102-114 (2008)
95. Forman, J. J. & H. A. Collier: The code within the code: microRNAs target coding regions. *Cell Cycle*, 9, 1533-41 (2010)
96. Lytle, J. R., T. A. Yario & J. A. Steitz: Target mRNAs are repressed as efficiently by microRNA-binding sites in the 5' UTR as in the 3' UTR. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104, 9667-72 (2007)
97. Bartel, D. P.: MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*, 136, 215-233 (2009)
98. Friedman, R. C., K. K.-H. Farh, C. B. Burge & D. P. Bartel: Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res*, 19, 92-105 (2009)
99. Krek, A., D. Grün, M. N. Poy, R. Wolf, L. Rosenberg, E. J. Epstein, P. MacMenamin, I. da Piedade, K. C. Gunsalus, M. Stoffel & N. Rajewsky: Combinatorial microRNA target predictions. *Nat Genet*, 37, 495-500 (2005)
100. John, B., A. J. Enright, A. Aravin, T. Tuschl, C. Sander & D. S. Marks: Human MicroRNA targets. *PLoS Biol*, 2, e363-e363 (2004)
101. Betel, D., M. Wilson, A. Gabow, D. S. Marks & C. Sander: The microRNA.org resource: targets and expression. *Nucleic Acids Res*, 36, D149-153-D149-153 (2008)
102. Kertesz, M., N. Iovino, U. Unnerstall, U. Gaul & E. Segal: The role of site accessibility in microRNA target recognition. *Nat Genet*, 39, 1278-1284 (2007)
103. Gaidatzis, D., E. van Nimwegen, J. Hausser & M. Zavolan: Inference of miRNA targets using evolutionary conservation and pathway analysis. *BMC Bioinformatics*, 8, 69-69 (2007)
104. Kiriakidou, M., P. T. Nelson, A. Kouranov, P. Fitziev, C. Bouyioukos, Z. Mourelatos & A. Hatzigeorgiou: A combined computational-experimental approach predicts human microRNA targets. *Genes Dev*, 18, 1165-1178 (2004)
105. Sethupathy, P., M. Megraw & A. G. Hatzigeorgiou: A guide through present computational approaches for the identification of mammalian microRNA targets. *Nat Meth*, 3, 881-886 (2006)
106. Lam, L. T., X. Lu, H. Zhang, R. Lesniewski, S. Rosenberg & D. Semizarov: A microRNA screen to identify modulators of sensitivity to BCL2 inhibitor ABT-263 (navitoclax). *Mol Cancer Ther*, 9, 2943-50 (2010)
107. Sethupathy, P., B. Corda & A. G. Hatzigeorgiou: TarBase: A comprehensive database of experimentally supported animal microRNA targets. *RNA*, 12, 192-197 (2006)
108. Papadopoulos, G. L., M. Reczko, V. A. Simossis, P. Sethupathy & A. G. Hatzigeorgiou: The database of experimentally supported targets: a functional update of TarBase. *Nucleic Acids Res*, 37, D155-158-D155-158 (2009)
109. Pestova, T. V., V. G. Kolupaeva, I. B. Lomakin, E. V. Pilipenko, I. N. Shatsky, V. I. Agol & C. U. Hellen: Molecular mechanisms of translation initiation in eukaryotes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 7029-7036 (2001)
110. Gebauer, F. & M. W. Hentze: Molecular mechanisms of translational control. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 5, 827-835 (2004)
111. Kean, K. M.: The role of mRNA 5'-noncoding and 3'-end sequences on 40S ribosomal subunit recruitment, and how RNA viruses successfully compete with cellular mRNAs to ensure their own protein synthesis. *Biol Cell*, 95, 129-139 (2003)
112. Humphreys, D. T., B. J. Westman, D. I. K. Martin & T. Preiss: 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 (2005)
113. Pillai, R. S., S. N. Bhattacharyya, C. G. Artus, T. Zoller, N. Cougot, E. Basyuk, E. Bertrand & W. Filipowicz: Inhibition of translational initiation by Let-7 MicroRNA in human cells. *Science*, 309, 1573-1576 (2005)

MicroRNAs: molecular features and role in cancer

114. Kiriakidou, M., G. S. Tan, S. Lamprinak, M. De Planell-Saguer, P. T. Nelson & Z. Mourelatos: An mRNA m7G cap binding-like motif within human Ago2 represses translation. *Cell*, 129, 1141-1151 (2007)
115. Chendrimada, T. P., K. J. Finn, X. Ji, D. Baillat, R. I. Gregory, S. A. Liebhaber, A. E. Pasquinelli & R. Shiekhattar: MicroRNA silencing through RISC recruitment of eIF6. *Nature*, 447, 823-828 (2007)
116. Olsen, P. H. & V. Ambros: The lin-4 regulatory RNA controls developmental timing in *Caenorhabditis elegans* by blocking LIN-14 protein synthesis after the initiation of translation. *Dev Biol*, 216, 671-680 (1999)
117. Seggerson, K., L. Tang & E. G. Moss: Two genetic circuits repress the *Caenorhabditis elegans* heterochronic gene lin-28 after translation initiation. *Dev Biol*, 243, 215-225 (2002)
118. Petersen, C. P., M.-E. Bordeleau, J. Pelletier & P. A. Sharp: Short RNAs repress translation after initiation in mammalian cells. *Mol Cell*, 21, 533-542 (2006)
119. Maroney, P. A., Y. Yu, J. Fisher & T. W. Nilsen: Evidence that microRNAs are associated with translating messenger RNAs in human cells. *Nat Struct Mol Biol*, 13, 1102-1107 (2006)
120. Nottrott, S., M. J. Simard & J. D. Richter: Human let-7a miRNA blocks protein production on actively translating polyribosomes. *Nat Struct Mol Biol*, 13, 1108-1114 (2006)
121. Bagga, S., J. Bracht, S. Hunter, K. Massirer, J. Holtz, R. Eachus & A. E. Pasquinelli: Regulation by let-7 and lin-4 miRNAs results in target mRNA degradation. *Cell*, 122, 553-563 (2005)
122. Wu, L. & J. G. Belasco: Micro-RNA regulation of the mammalian lin-28 gene during neuronal differentiation of embryonal carcinoma cells. *Mol Cell Biol*, 25, 9198-9208 (2005)
123. Guo, H., N. T. Ingolia, J. S. Weissman & D. P. Bartel: Mammalian microRNAs predominantly act to decrease target mRNA levels. *Nature*, 466, 835-40 (2010)
124. Wu, L., J. Fan & J. G. Belasco: MicroRNAs direct rapid deadenylation of mRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103, 4034-4039 (2006)
125. Parker, R. & H. Song: The enzymes and control of eukaryotic mRNA turnover. *Nat Struct Mol Biol*, 11, 121-127 (2004)
126. Eulalio, A., I. Behm-Ansmant & E. Izaurralde: P bodies: at the crossroads of post-transcriptional pathways. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8, 9-22 (2007)
127. Ingelfinger, D., D. J. Arndt-Jovin, R. Lührmann & T. Achsel: The human LSM1-7 proteins colocalize with the mRNA-degrading enzymes Dcp1/2 and Xrnl in distinct cytoplasmic foci. *RNA*, 8, 1489-1501 (2002)
128. Sheth, U. & R. Parker: Decapping and decay of messenger RNA occur in cytoplasmic processing bodies. *Science*, 300, 805-808 (2003)
129. Brengues, M., D. Teixeira & R. Parker: Movement of eukaryotic mRNAs between polysomes and cytoplasmic processing bodies. *Science*, 310, 486-489 (2005)
130. Eystathiou, T., E. K. L. Chan, S. A. Tenenbaum, J. D. Keene, K. Griffith & M. J. Fritzler: A phosphorylated cytoplasmic autoantigen, GW182, associates with a unique population of human mRNAs within novel cytoplasmic speckles. *Mol Biol Cell*, 13, 1338-1351 (2002)
131. Liu, J., F. V. Rivas, J. Wohlschlegel, J. R. Yates, R. Parker & G. J. Hannon: A role for the P-body component GW182 in microRNA function. *Nat Cell Biol*, 7, 1261-1266 (2005)
132. Kedersha, N. & P. Anderson: Stress granules: sites of mRNA triage that regulate mRNA stability and translatability. *Biochem Soc Trans*, 30, 963-969 (2002)
133. Cougot, N., S. Babajko & B. Séraphin: Cytoplasmic foci are sites of mRNA decay in human cells. *J Cell Biol*, 165, 31-40 (2004)
134. Kedersha, N., G. Stoecklin, M. Ayodele, P. Yacono, J. Lykke-Andersen, M. J. Fritzler, D. Scheuner, R. J. Kaufman, D. E. Golan & P. Anderson: Stress granules and processing bodies are dynamically linked sites of mRNP remodeling. *J Cell Biol*, 169, 871-884 (2005)
135. Vasudevan, S. & J. A. Steitz: AU-rich-element-mediated upregulation of translation by FXR1 and Argonaute 2. *Cell*, 128, 1105-1118 (2007)
136. Eiring, A. M., J. G. Harb, P. Neviani, C. Garton, J. J. Oaks, R. Spizzo, S. Liu, S. Schwind, R. Santhanam, C. J. Hickey, H. Becker, J. C. Chandler, R. Andino, J. Cortes, P. Hokland, C. S. Huettner, R. Bhatia, D. C. Roy, S. A. Liebhaber, M. A. Caligiuri, G. Marcucci, R. Garzon, C. M. Croce, G. A. Calin & D. Perrotti: miR-328 functions as an RNA decoy to modulate hnRNP E2 regulation of mRNA translation in leukemic blasts. *Cell*, 140, 652-65 (2010)
137. Brennecke, J., D. R. Hipfner, A. Stark, R. B. Russell & S. M. Cohen: bantam encodes a developmentally regulated microRNA that controls cell proliferation and regulates the proapoptotic gene hid in *Drosophila*. *Cell*, 113, 25-36 (2003)
138. Chen, C.-Z., L. Li, H. F. Lodish & D. P. Bartel: MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation. *Science*, 303, 83-86 (2004)

MicroRNAs: molecular features and role in cancer

139. Harfe, B. D.: MicroRNAs in vertebrate development. *Curr Opin Genet Dev*, 15, 410-415 (2005)
140. Pasquinelli, A. E., S. Hunter & J. Bracht: MicroRNAs: a developing story. *Curr Opin Genet Dev*, 15, 200-205 (2005)
141. Lu, J., G. Getz, E. A. Miska, E. Alvarez-Saavedra, J. Lamb, D. Peck, A. Sweet-Cordero, B. L. Ebert, R. H. Mak, A. A. Ferrando, J. R. Downing, T. Jacks, H. R. Horvitz & T. R. Golub: MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature*, 435, 834-838 (2005)
142. Volinia, S., G. A. Calin, C. G. Liu, S. Ambs, A. Cimmino, F. Petrocca, R. Visone, M. Iorio, C. Roldo, M. Ferracin, R. L. Prueitt, N. Yanaihara, G. Lanza, A. Scarpa, A. Vecchione, M. Negrini, C. C. Harris & C. M. Croce: A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103, 2257-61 (2006)
143. Wang, Y. & C. G. L. Lee: MicroRNA and cancer--focus on apoptosis. *J Cell Mol Med*, 13, 12-23 (2009)
144. Lages, E., A. Guttin, M. El Atifi, C. Ramus, H. Ipas, I. Dupre, D. Rolland, C. Salon, C. Godfraind, F. deFraipont, M. Dhobb, L. Pelletier, D. Wion, E. Gay, F. Berger & J. P. Issartel: MicroRNA and target protein patterns reveal physiopathological features of glioma subtypes. *PLoS One*, 6, e20600 (2011)
145. Kitano, M., R. Rahbari, E. E. Patterson, Y. Xiong, N. B. Prasad, Y. Wang, M. A. Zeiger & E. Kebebew: Expression Profiling of Difficult-to-diagnose Thyroid Histologic Subtypes Shows Distinct Expression Profiles and Identify Candidate Diagnostic microRNAs. *Ann Surg Oncol*, 18, 3443-52 (2011)
146. Youssef, Y. M., N. M. White, J. Grigull, A. Krizova, C. Samy, S. Mejia-Guerrero, A. Evans & G. M. Yousef: Accurate molecular classification of kidney cancer subtypes using microRNA signature. *Eur Urol*, 59, 721-30 (2011)
147. Merritt, W. M., Y. G. Lin, L. Y. Han, A. A. Kamat, W. A. Spannuth, R. Schmandt, D. Urbauer, L. A. Pennacchio, J.-F. Cheng, A. M. Nick, M. T. Deavers, A. Mourad-Zeidan, H. Wang, P. Mueller, M. E. Lenburg, J. W. Gray, S. Mok, M. J. Birrer, G. Lopez-Berestein, R. L. Coleman, M. Bar-Eli & A. K. Sood: Dicer, Drosha, and outcomes in patients with ovarian cancer. *N Engl J Med*, 359, 2641-2650 (2008)
148. Sand, M., T. Gambichler, M. Skrygan, D. Sand, N. Scola, P. Altmeyer & F. G. Bechara: Expression levels of the microRNA processing enzymes Drosha and dicer in epithelial skin cancer. *Cancer Invest*, 28, 649-653 (2010)
149. Sugito, N., H. Ishiguro, Y. Kuwabara, M. Kimura, A. Mitsui, H. Kurehara, T. Ando, R. Mori, N. Takashima, R. Ogawa & Y. Fujii: RNASEN regulates cell proliferation and affects survival in esophageal cancer patients. *Clin Cancer Res*, 12, 7322-7328 (2006)
150. Melo, S. A., C. Moutinho, S. Ropero, G. A. Calin, S. Rossi, R. Spizzo, A. F. Fernandez, V. Davalos, A. Villanueva, G. Montoya, H. Yamamoto, S. Schwartz, Jr. & M. Esteller: A genetic defect in exportin-5 traps precursor microRNAs in the nucleus of cancer cells. *Cancer Cell*, 18, 303-15 (2010)
151. Chiosea, S., E. Jelezcova, U. Chandran, M. Acquafondata, T. McHale, R. W. Sobol & R. Dhir: Up-regulation of dicer, a component of the MicroRNA machinery, in prostate adenocarcinoma. *Am J Pathol*, 169, 1812-1820 (2006)
152. Chiosea, S., E. Jelezcova, U. Chandran, J. Luo, G. Mantha, R. W. Sobol & S. Dacic: Overexpression of Dicer in precursor lesions of lung adenocarcinoma. *Cancer Res*, 67, 2345-2350 (2007)
153. Karube, Y., H. Tanaka, H. Osada, S. Tomida, Y. Tatematsu, K. Yanagisawa, Y. Yatabe, J. Takamizawa, S. Miyoshi, T. Mitsudomi & T. Takahashi: Reduced expression of Dicer associated with poor prognosis in lung cancer patients. *Cancer Sci*, 96, 111-115 (2005)
154. Melo, S. A., S. Ropero, C. Moutinho, L. A. Aaltonen, H. Yamamoto, G. A. Calin, S. Rossi, A. F. Fernandez, F. Carneiro, C. Oliveira, B. Ferreira, C. G. Liu, A. Villanueva, G. Capella, S. Schwartz, Jr., R. Shiekhhattar & M. Esteller: A TARBP2 mutation in human cancer impairs microRNA processing and DICER1 function. *Nat Genet*, 41, 365-70 (2009)
155. Boominathan, L.: The tumor suppressors p53, p63, and p73 are regulators of microRNA processing complex. *PLoS One*, 5, e10615-e10615 (2010)
156. Calin, G. A., C. Sevignani, C. D. Dumitru, T. Hyslop, E. Noch, S. Yendamuri, M. Shimizu, S. Rattan, F. Bullrich, M. Negrini & C. M. Croce: Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 2999-3004 (2004)
157. Zhang, L. & G. Coukos: MicroRNAs: a new insight into cancer genome. *Cell Cycle*, 5, 2216-2219 (2006)
158. Bousquet, M., C. Quelen, R. Rosati, V. Mansat-De Mas, R. La Starza, C. Bastard, E. Lippert, P. Talmant, M. Lafage-Pochitaloff, D. Leroux, C. Gervais, F. Vigié, J.-L. Lai, C. Terre, B. Beverlo, C. Sambani, A. Hagemeyer, P. Marynen, G. Delsol, N. Dastugue, C. Mecucci & P. Brousset: Myeloid cell differentiation arrest by miR-125b-1 in myelodysplastic syndrome and acute myeloid leukemia with the t(2;11)(p21;q23) translocation. *J Exp Med*, 205, 2499-2506 (2008)
159. Saito-Ohara, F., I. Imoto, J. Inoue, H. Hosoi, A. Nakagawara, T. Sugimoto & J. Inazawa: PPM1D is a

MicroRNAs: molecular features and role in cancer

potential target for 17q gain in neuroblastoma. *Cancer Res*, 63, 1876-1883 (2003)

160. Calin, G. A., C. D. Dumitru, M. Shimizu, R. Bichi, S. Zupo, E. Noch, H. Aldler, S. Rattan, M. Keating, K. Rai, L. Rassenti, T. Kipps, M. Negrini, F. Bullrich & C. M. Croce: 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 (2002)

161. Saunders, M. A., H. Liang & W.-H. Li: Human polymorphism at microRNAs and microRNA target sites. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104, 3300-3305 (2007)

162. Jazdzewski, K., E. L. Murray, K. Franssila, B. Jarzab, D. R. Schoenberg & A. de la Chapelle: Common SNP in pre-miR-146a decreases mature miR expression and predisposes to papillary thyroid carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 7269-7274 (2008)

163. Xu, B., N.-H. Feng, P.-C. Li, J. Tao, D. Wu, Z.-D. Zhang, N. Tong, J.-F. Wang, N.-H. Song, W. Zhang, L.-X. Hua & H.-F. Wu: A functional polymorphism in Pre-miR-146a gene is associated with prostate cancer risk and mature miR-146a expression in vivo. *Prostate*, 70, 467-472 (2010)

164. Duan, R., C. Pak & P. Jin: Single nucleotide polymorphism associated with mature miR-125a alters the processing of pri-miRNA. *Hum Mol Genet*, 16, 1124-1131 (2007)

165. Li, W., R. Duan, F. Kooy, S. L. Sherman, W. Zhou & P. Jin: Germline mutation of microRNA-125a is associated with breast cancer. *J Med Genet*, 46, 358-360 (2009)

166. Hu, Z., J. Chen, T. Tian, X. Zhou, H. Gu, L. Xu, Y. Zeng, R. Miao, G. Jin, H. Ma, Y. Chen & H. Shen: Genetic variants of miRNA sequences and non-small cell lung cancer survival. *J Clin Invest*, 118, 2600-2608 (2008)

167. Calin, G. A., M. Ferracin, A. Cimmino, G. Di Leva, M. Shimizu, S. E. Wojcik, M. V. Iorio, R. Visone, N. I. Sever, M. Fabbri, R. Iuliano, T. Palumbo, F. Pichiorri, C. Roldo, R. Garzon, C. Sevignani, L. Rassenti, H. Alder, S. Volinia, C. G. Liu, T. J. Kipps, M. Negrini & C. M. Croce: A MicroRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*, 353, 1793-801 (2005)

168. Kotani, A., D. Ha, D. Schotte, M. L. den Boer, S. A. Armstrong & H. F. Lodish: A novel mutation in the miR-128b gene reduces miRNA processing and leads to glucocorticoid resistance of MLL-AF4 acute lymphocytic leukemia cells. *Cell Cycle*, 9, 1037-42 (2010)

169. Ohler, U., S. Yekta, L. P. Lim, D. P. Bartel & C. B. Burge: Patterns of flanking sequence conservation and a characteristic upstream motif for microRNA gene identification. *RNA*, 10, 1309-1322 (2004)

170. Xi, Y., R. Shalgi, O. Fodstad, Y. Pilpel & J. Ju: Differentially regulated micro-RNAs and actively

translated messenger RNA transcripts by tumor suppressor p53 in colon cancer. *Clin Cancer Res*, 12, 2014-2024 (2006)

171. Chang, T.-C., E. A. Wentzel, O. A. Kent, K. Ramachandran, M. Mullendore, K. H. Lee, G. Feldmann, M. Yamakuchi, M. Ferlito, C. J. Lowenstein, D. E. Arking, M. A. Beer, A. Maitra & J. T. Mendell: Transactivation of miR-34a by p53 broadly influences gene expression and promotes apoptosis. *Mol Cell*, 26, 745-752 (2007)

172. Raver-Shapira, N., E. Marciano, E. Meiri, Y. Spector, N. Rosenfeld, N. Moskovits, Z. Bentwich & M. Oren: Transcriptional activation of miR-34a contributes to p53-mediated apoptosis. *Mol Cell*, 26, 731-743 (2007)

173. Tarasov, V., P. Jung, B. Verdoodt, D. Lodygin, A. Epanchintsev, A. Menssen, G. Meister & H. Hermeking: Differential regulation of microRNAs by p53 revealed by massively parallel sequencing: miR-34a is a p53 target that induces apoptosis and G1-arrest. *Cell Cycle*, 6, 1586-1593 (2007)

174. Brosh, R., R. Shalgi, A. Liran, G. Landan, K. Korotayev, G. H. Nguyen, E. Enerly, H. Johnsen, Y. Buganim, H. Solomon, I. Goldstein, S. Madar, N. Goldfinger, A.-L. Børresen-Dale, D. Ginsberg, C. C. Harris, Y. Pilpel, M. Oren & V. Rotter: p53-Repressed miRNAs are involved with E2F in a feed-forward loop promoting proliferation. *Mol Syst Biol*, 4, 229-229 (2008)

175. Bueno, M. J., M. Gómez de Cedrón, U. Laresgoiti, J. Fernández-Piqueras, A. M. Zubiaga & M. Malumbres: Multiple E2F-induced microRNAs prevent replicative stress in response to mitogenic signaling. *Mol Cell Biol*, 30, 2983-2995 (2010)

176. O'Donnell, K. A., E. A. Wentzel, K. I. Zeller, C. V. Dang & J. T. Mendell: c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression. *Nature*, 435, 839-843 (2005)

177. Chang, T.-C., D. Yu, Y.-S. Lee, E. A. Wentzel, D. E. Arking, K. M. West, C. V. Dang, A. Thomas-Tikhonenko & J. T. Mendell: Widespread microRNA repression by Myc contributes to tumorigenesis. *Nat Genet*, 40, 43-50 (2008)

178. Tate, P. H. & A. P. Bird: Effects of DNA methylation on DNA-binding proteins and gene expression. *Curr Opin Genet Dev*, 3, 226-231 (1993)

179. Saito, Y. & P. A. Jones: Epigenetic activation of tumor suppressor microRNAs in human cancer cells. *Cell Cycle*, 5, 2220-2222 (2006)

180. Saito, Y., G. Liang, G. Egger, J. M. Friedman, J. C. Chuang, G. A. Coetzee & P. A. Jones: Specific activation of microRNA-127 with downregulation of the proto-oncogene BCL6 by chromatin-modifying drugs in human cancer cells. *Cancer Cell*, 9, 435-443 (2006)

181. Lujambio, A., S. Ropero, E. Ballestar, M. F. Fraga, C. Cerrato, F. Setién, S. Casado, A. Suarez-Gauthier, M.

MicroRNAs: molecular features and role in cancer

- Sanchez-Cespedes, A. Git, A. Gitt, I. Spiteri, P. P. Das, C. Caldas, E. Miska & M. Esteller: Genetic unmasking of an epigenetically silenced microRNA in human cancer cells. *Cancer Res*, 67, 1424-1429 (2007)
182. Lodygin, D., V. Tarasov, A. Epanchintsev, C. Berking, T. Knyazeva, H. Körner, P. Knyazev, J. Diebold & H. Hermeking: Inactivation of miR-34a by aberrant CpG methylation in multiple types of cancer. *Cell Cycle*, 7, 2591-2600 (2008)
183. Mi, S., J. Lu, M. Sun, Z. Li, H. Zhang, M. B. Neilly, Y. Wang, Z. Qian, J. Jin, Y. Zhang, S. K. Bohlander, M. M. Le Beau, R. A. Larson, T. R. Golub, J. D. Rowley & J. Chen: MicroRNA expression signatures accurately discriminate acute lymphoblastic leukemia from acute myeloid leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104, 19971-19976 (2007)
184. Brueckner, B., C. Stresemann, R. Kuner, C. Mund, T. Musch, M. Meister, H. Sültmann & F. Lyko: The human let-7a-3 locus contains an epigenetically regulated microRNA gene with oncogenic function. *Cancer Res*, 67, 1419-1423 (2007)
185. Gao, Y., Y. He, J. Ding, K. Wu, B. Hu, Y. Liu, Y. Wu, B. Guo, Y. Shen, D. Landi, S. Landi, Y. Zhou & H. Liu: An insertion/deletion polymorphism at miRNA-122-binding site in the interleukin-1alpha 3' untranslated region confers risk for hepatocellular carcinoma. *Carcinogenesis*, 30, 2064-2069 (2009)
186. Wiestner, A., M. Tehrani, M. Chiorazzi, G. Wright, F. Gibellini, K. Nakayama, H. Liu, A. Rosenwald, H. K. Muller-Hermelink, G. Ott, W. C. Chan, T. C. Greiner, D. D. Weisenburger, J. Vose, J. O. Armitage, R. D. Gascoyne, J. M. Connors, E. Campo, E. Montserrat, F. Bosch, E. B. Smeland, S. Kvaloy, H. Holte, J. Delabie, R. I. Fisher, T. M. Grogan, T. P. Miller, W. H. Wilson, E. S. Jaffe & L. M. Staudt: Point mutations and genomic deletions in CCND1 create stable truncated cyclin D1 mRNAs that are associated with increased proliferation rate and shorter survival. *Blood*, 109, 4599-4606 (2007)
187. Chen, R. W., L. T. Bemis, C. M. Amato, H. Myint, H. Tran, D. K. Birks, S. G. Eckhardt & W. A. Robinson: Truncation in CCND1 mRNA alters miR-16-1 regulation in mantle cell lymphoma. *Blood*, 112, 822-829 (2008)
188. Mayr, C., M. T. Hemann & D. P. Bartel: Disrupting the pairing between let-7 and Hmga2 enhances oncogenic transformation. *Science*, 315, 1576-1579 (2007)
189. Sarhadi, V. K., H. Wikman, K. Salmenkivi, E. Kuosma, T. Sioris, J. Salo, A. Karjalainen, S. Knuutila & S. Anttila: Increased expression of high mobility group A proteins in lung cancer. *J Pathol*, 209, 206-212 (2006)
190. Meyer, B., S. Loeschke, A. Schultze, T. Weigel, M. Sandkamp, T. Goldmann, E. Vollmer & J. Bullerdiek: HMGA2 overexpression in non-small cell lung cancer. *Mol Carcinog*, 46, 503-511 (2007)
191. Di Cello, F., J. Hillion, A. Hristov, L. J. Wood, M. Mukherjee, A. Schuldenfrei, J. Kowalski, R. Bhattacharya, R. Ashfaq & L. M. S. Resar: HMGA2 participates in transformation in human lung cancer. *Mol Cancer Res*, 6, 743-750 (2008)
192. Abe, N., T. Watanabe, Y. Suzuki, N. Matsumoto, T. Masaki, T. Mori, M. Sugiyama, G. Chiappetta, A. Fusco & Y. Atomi: An increased high-mobility group A2 expression level is associated with malignant phenotype in pancreatic exocrine tissue. *Br J Cancer*, 89, 2104-2109 (2003)
193. To, K. K., Z. Zhan, T. Litman & S. E. Bates: Regulation of ABCG2 expression at the 3' untranslated region of its mRNA through modulation of transcript stability and protein translation by a putative microRNA in the S1 colon cancer cell line. *Mol Cell Biol*, 28, 5147-61 (2008)
194. Yu, Z., Z. Li, N. Jolicoeur, L. Zhang, Y. Fortin, E. Wang, M. Wu & S.-H. Shen: Aberrant allele frequencies of the SNPs located in microRNA target sites are potentially associated with human cancers. *Nucleic Acids Res*, 35, 4535-4541 (2007)
195. He, H., K. Jazdzewski, W. Li, S. Liyanarachchi, R. Nagy, S. Volinia, G. A. Calin, C.-G. Liu, K. Franssila, S. Suster, R. T. Kloos, C. M. Croce & A. de la Chapelle: The role of microRNA genes in papillary thyroid carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 19075-19080 (2005)
196. Landi, D., F. Gemignani, A. Naccarati, B. Pardini, P. Vodicka, L. Vodickova, J. Novotny, A. Försti, K. Hemminki, F. Canzian & S. Landi: Polymorphisms within micro-RNA-binding sites and risk of sporadic colorectal cancer. *Carcinogenesis*, 29, 579-584 (2008)
197. Chin, L. J., E. Ratner, S. Leng, R. Zhai, S. Nallur, I. Babar, R.-U. Muller, E. Straka, L. Su, E. A. Burki, R. E. Crowell, R. Patel, T. Kulkarni, R. Homer, D. Zelterman, K. K. Kidd, Y. Zhu, D. C. Christiani, S. A. Belinsky, F. J. Slack & J. B. Weidhaas: A SNP in a let-7 microRNA complementary site in the KRAS 3' untranslated region increases non-small cell lung cancer risk. *Cancer Res*, 68, 8535-8540 (2008)
198. Paranjape, T., H. Heneghan, R. Lindner, F. K. Keane, A. Hoffman, A. Hollestelle, J. Dorairaj, K. Geyda, C. Pelletier, S. Nallur, J. W. Martens, M. J. Hooning, M. Kerin, D. Zelterman, Y. Zhu, D. Tuck, L. Harris, N. Miller, F. Slack & J. Weidhaas: A 3'-untranslated region KRAS variant and triple-negative breast cancer: a case-control and genetic analysis. *Lancet Oncol*, 12, 377-86 (2011)
199. Brendle, A., H. Lei, A. Brandt, R. Johansson, K. Enquist, R. Henriksson, K. Hemminki, P. Lenner & A. Försti: Polymorphisms in predicted microRNA-binding sites in integrin genes and breast cancer: ITGB4 as prognostic marker. *Carcinogenesis*, 29, 1394-1399 (2008)
200. Voorhoeve, P. M., C. le Sage, M. Schrier, A. J. M. Gillis, H. Stoop, R. Nagel, Y.-P. Liu, J. van Duijse, J.

MicroRNAs: molecular features and role in cancer

- Drost, A. Griekspoor, E. Zlotorynski, N. Yabuta, G. De Vita, H. Nojima, L. H. J. Looijenga & R. Agami: A genetic screen implicates miRNA-372 and miRNA-373 as oncogenes in testicular germ cell tumors. *Cell*, 124, 1169-1181 (2006)
201. Hayashita, Y., H. Osada, Y. Tatematsu, H. Yamada, K. Yanagisawa, S. Tomida, Y. Yatabe, K. Kawahara, Y. Sekido & T. Takahashi: A polycistronic microRNA cluster, miR-17-92, is overexpressed in human lung cancers and enhances cell proliferation. *Cancer Res*, 65, 9628-9632 (2005)
202. He, L., J. M. Thomson, M. T. Hemann, E. Hernandez-Monge, D. Mu, S. Goodson, S. Powers, C. Cordon-Cardo, S. W. Lowe, G. J. Hannon & S. M. Hammond: A microRNA polycistron as a potential human oncogene. *Nature*, 435, 828-833 (2005)
203. Tam, W., S. H. Hughes, W. S. Hayward & P. Besmer: Avian bic, a gene isolated from a common retroviral site in avian leukosis virus-induced lymphomas that encodes a noncoding RNA, cooperates with c-myc in lymphomagenesis and erythroleukemogenesis. *J Virol*, 76, 4275-4286 (2002)
204. Eis, P. S., W. Tam, L. Sun, A. Chadburn, Z. Li, M. F. Gomez, E. Lund & J. E. Dahlberg: Accumulation of miR-155 and BIC RNA in human B cell lymphomas. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 3627-3632 (2005)
205. Kluiver, J., S. Poppema, D. de Jong, T. Blokzijl, G. Harms, S. Jacobs, B.-J. Kroesen & A. van den Berg: BIC and miR-155 are highly expressed in Hodgkin, primary mediastinal and diffuse large B cell lymphomas. *J Pathol*, 207, 243-249 (2005)
206. Costinean, S., N. Zanesi, Y. Pekarsky, E. Tili, S. Volinia, N. Heerema & C. M. Croce: Pre-B cell proliferation and lymphoblastic leukemia/high-grade lymphoma in E(mu)-miR155 transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103, 7024-7029 (2006)
207. Chen, Y., T. Knösel, G. Kristiansen, A. Pietas, M. E. Garber, S. Matsushita, I. Ozaki & I. Petersen: Loss of PDCD4 expression in human lung cancer correlates with tumour progression and prognosis. *J Pathol*, 200, 640-646 (2003)
208. Mudduluru, G., F. Medved, R. Grobholz, C. Jost, A. Gruber, J. H. Leupold, S. Post, A. Jansen, N. H. Colburn & H. Allgayer: Loss of programmed cell death 4 expression marks adenoma-carcinoma transition, correlates inversely with phosphorylated protein kinase B, and is an independent prognostic factor in resected colorectal cancer. *Cancer*, 110, 1697-1707 (2007)
209. Zhu, S., M.-L. Si, H. Wu & Y.-Y. Mo: MicroRNA-21 targets the tumor suppressor gene tropomyosin 1 (TPM1). *J Biol Chem*, 282, 14328-14336 (2007)
210. Asangani, I. A., S. A. K. Rasheed, D. A. Nikolova, J. H. Leupold, N. H. Colburn, S. Post & H. Allgayer: MicroRNA-21 (miR-21) post-transcriptionally downregulates tumor suppressor Pcd4 and stimulates invasion, intravasation and metastasis in colorectal cancer. *Oncogene*, 27, 2128-2136 (2008)
211. Iorio, M. V., M. Ferracin, C.-G. Liu, A. Veronese, R. Spizzo, S. Sabbioni, E. Magri, M. Pedriali, M. Fabbri, M. Campiglio, S. Ménard, J. P. Palazzo, A. Rosenberg, P. Musiani, S. Volinia, I. Nenci, G. A. Calin, P. Querzoli, M. Negrini & C. M. Croce: MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. *Cancer Res*, 65, 7065-7070 (2005)
212. Johnson, S. M., H. Grosshans, J. Shingara, M. Byrom, R. Jarvis, A. Cheng, E. Labourier, K. L. Reinert, D. Brown & F. J. Slack: RAS is regulated by the let-7 microRNA family. *Cell*, 120, 635-647 (2005)
213. Akao, Y., Y. Nakagawa & T. Naoe: let-7 microRNA functions as a potential growth suppressor in human colon cancer cells. *Biol Pharm Bull*, 29, 903-906 (2006)
214. Yanaihara, N., N. Caplen, E. Bowman, M. Seike, K. Kumamoto, M. Yi, R. M. Stephens, A. Okamoto, J. Yokota, T. Tanaka, G. A. Calin, C.-G. Liu, C. M. Croce & C. C. Harris: Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Cell*, 9, 189-198 (2006)
215. Lee, Y. S. & A. Dutta: The tumor suppressor microRNA let-7 represses the HMGA2 oncogene. *Genes Dev*, 21, 1025-1030 (2007)
216. Sampson, V. B., N. H. Rong, J. Han, Q. Yang, V. Aris, P. Soteropoulos, N. J. Petrelli, S. P. Dunn & L. J. Krueger: MicroRNA let-7a down-regulates MYC and reverts MYC-induced growth in Burkitt lymphoma cells. *Cancer Res*, 67, 9762-9770 (2007)
217. Dong, J. T.: Chromosomal deletions and tumor suppressor genes in prostate cancer. *Cancer Metastasis Rev*, 20, 173-193 (2001)
218. Calin, G. A., A. Cimmino, M. Fabbri, M. Ferracin, S. E. Wojcik, M. Shimizu, C. Taccioli, N. Zanesi, R. Garzon, R. I. Aqeilan, H. Alder, S. Volinia, L. Rassenti, X. Liu, C.-G. Liu, T. J. Kipps, M. Negrini & C. M. Croce: MiR-15a and miR-16-1 cluster functions in human leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 5166-5171 (2008)
219. Nasser, M. W., J. Datta, G. Nuovo, H. Kutay, T. Motiwala, S. Majumder, B. Wang, S. Suster, S. T. Jacob & K. Ghoshal: Down-regulation of micro-RNA-1 (miR-1) in lung cancer. Suppression of tumorigenic property of lung cancer cells and their sensitization to doxorubicin-induced apoptosis by miR-1. *J Biol Chem*, 283, 33394-33405 (2008)
220. Reddy, S. D. N., K. Ohshiro, S. K. Rayala & R. Kumar: MicroRNA-7, a homeobox D10 target, inhibits p21-activated kinase 1 and regulates its functions. *Cancer Res*, 68, 8195-8200 (2008)
221. Guessous, F., Y. Zhang, A. Kofman, A. Catania, Y. Li, D. Schiff, B. Purow & R. Abounader: microRNA-34a is

MicroRNAs: molecular features and role in cancer

tumor suppressive in brain tumors and glioma stem cells. *Cell Cycle*, 9, 1031-6 (2010)

222. Yan, R. T., L. He & S. Z. Wang: Pro-photoreceptor activity of chick neurogenin1. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 50, 5567-76 (2009)

223. Cole, K. A., E. F. Attiyeh, Y. P. Mosse, M. J. Laquaglia, S. J. Diskin, G. M. Brodeur & J. M. Maris: A functional screen identifies miR-34a as a candidate neuroblastoma tumor suppressor gene. *Mol Cancer Res*, 6, 735-42 (2008)

224. Jiang, Q., Y. Wang, Y. Hao, L. Juan, M. Teng, X. Zhang, M. Li, G. Wang & Y. Liu: miR2Disease: a manually curated database for microRNA deregulation in human disease. *Nucleic Acids Res*, 37, D98-104 (2009)

225. Igney, F. H. & P. H. Krammer: Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nat Rev Cancer*, 2, 277-288 (2002)

226. Bush, J. A. & G. Li: The role of Bcl-2 family members in the progression of cutaneous melanoma. *Clin Exp Metastasis*, 20, 531-539 (2003)

227. Coultas, L. & A. Strasser: The role of the Bcl-2 protein family in cancer. *Semin Cancer Biol*, 13, 115-123 (2003)

228. Reed, J. C., J. M. Jurgensmeier & S. Matsuyama: Bcl-2 family proteins and mitochondria. *Biochim Biophys Acta*, 1366, 127-137 (1998)

229. Henry-Mowatt, J., C. Dive, J.-C. Martinou & D. James: Role of mitochondrial membrane permeabilization in apoptosis and cancer. *Oncogene*, 23, 2850-2860 (2004)

230. Li, P., D. Nijhawan, I. Budihardjo, S. M. Srinivasula, M. Ahmad, E. S. Alnemri & X. Wang: Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade. *Cell*, 91, 479-489 (1997)

231. Du, C., M. Fang, Y. Li, L. Li & X. Wang: Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. *Cell*, 102, 33-42 (2000)

232. Verhagen, A. M., P. G. Ekert, M. Pakusch, J. Silke, L. M. Connolly, G. E. Reid, R. L. Moritz, R. J. Simpson & D. L. Vaux: Identification of DIABLO, a mammalian protein that promotes apoptosis by binding to and antagonizing IAP proteins. *Cell*, 102, 43-53 (2000)

233. Chinnaiyan, A. M., K. O'Rourke, M. Tewari & V. M. Dixit: FADD, a novel death domain-containing protein, interacts with the death domain of Fas and initiates apoptosis. *Cell*, 81, 505-512 (1995)

234. Eskes, R., S. Desagher, B. Antonsson & J. C. Martinou: Bid induces the oligomerization and insertion of

Bax into the outer mitochondrial membrane. *Mol Cell Biol*, 20, 929-935 (2000)

235. Vecchione, A. & C. M. Croce: Apoptomirs: small molecules have gained the license to kill. *Endocr-Relat Cancer*, 17, F37-50-F37-50 (2010)

236. Cimmino, A., G. A. Calin, M. Fabbri, M. V. Iorio, M. Ferracin, M. Shimizu, S. E. Wojcik, R. I. Aqeilan, S. Zupo, M. Dono, L. Rassenti, H. Alder, S. Volinia, C.-G. Liu, T. J. Kipps, M. Negrini & C. M. Croce: miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 13944-13949 (2005)

237. Ventura, A., A. G. Young, M. M. Winslow, L. Lintault, A. Meissner, S. J. Erkeland, J. Newman, R. T. Bronson, D. Crowley, J. R. Stone, R. Jaenisch, P. A. Sharp & T. Jacks: Targeted deletion reveals essential and overlapping functions of the miR-17 through 92 family of miRNA clusters. *Cell*, 132, 875-886 (2008)

238. Ambs, S., R. L. Prueitt, M. Yi, R. S. Hudson, T. M. Howe, F. Petrocca, T. A. Wallace, C.-G. Liu, S. Volinia, G. A. Calin, H. G. Yfantis, R. M. Stephens & C. M. Croce: Genomic profiling of microRNA and messenger RNA reveals deregulated microRNA expression in prostate cancer. *Cancer Res*, 68, 6162-6170 (2008)

239. Petrocca, F., R. Visone, M. R. Onelli, M. H. Shah, M. S. Nicoloso, I. de Martino, D. Iliopoulos, E. Pilozzi, C.-G. Liu, M. Negrini, L. Cavazzini, S. Volinia, H. Alder, L. P. Ruco, G. Baldassarre, C. M. Croce & A. Vecchione: E2F1-regulated microRNAs impair TGFbeta-dependent cell-cycle arrest and apoptosis in gastric cancer. *Cancer Cell*, 13, 272-286 (2008)

240. Yamakuchi, M., M. Ferlito & C. J. Lowenstein: miR-34a repression of SIRT1 regulates apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 13421-13426 (2008)

241. Zhang, C.-Z., J.-X. Zhang, A.-L. Zhang, Z.-D. Shi, L. Han, Z.-F. Jia, W.-D. Yang, G.-X. Wang, T. Jiang, Y.-P. You, P.-Y. Pu, J.-Q. Cheng & C.-S. Kang: MiR-221 and miR-222 target PUMA to induce cell survival in glioblastoma. *Mol Cancer*, 9, 229-229 (2010)

242. le Sage, C., R. Nagel, D. A. Egan, M. Schrier, E. Mesman, A. Mangiola, C. Anile, G. Maira, N. Mercatelli, S. A. Ciafrè, M. G. Farace & R. Agami: Regulation of the p27(Kip1) tumor suppressor by miR-221 and miR-222 promotes cancer cell proliferation. *EMBO J*, 26, 3699-3708 (2007)

243. Xu, C., Y. Lu, Z. Pan, W. Chu, X. Luo, H. Lin, J. Xiao, H. Shan, Z. Wang & B. Yang: The muscle-specific microRNAs miR-1 and miR-133 produce opposing effects on apoptosis by targeting HSP60, HSP70 and caspase-9 in cardiomyocytes. *J Cell Sci*, 120, 3045-3052 (2007)

244. Chan, J. A., A. M. Krichevsky & K. S. Kosik: MicroRNA-21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells. *Cancer Res*, 65, 6029-6033 (2005)

MicroRNAs: molecular features and role in cancer

245. Papagiannakopoulos, T., A. Shapiro & K. S. Kosik: MicroRNA-21 targets a network of key tumor-suppressive pathways in glioblastoma cells. *Cancer Res*, 68, 8164-8172 (2008)
246. Bitomsky, N., N. Wethkamp, R. Marikkannu & K. H. Klempner: siRNA-mediated knockdown of Pcd4 expression causes upregulation of p21(Waf1/Cip1) expression. *Oncogene*, 27, 4820-4829 (2008)
247. Sayed, D., M. He, C. Hong, S. Gao, S. Rane, Z. Yang & M. Abdellatif: MicroRNA-21 is a downstream effector of AKT that mediates its antiapoptotic effects via suppression of Fas ligand. *J Biol Chem*, 285, 20281-20290 (2010)
248. Ovcharenko, D., K. Kelnar, C. Johnson, N. Leng & D. Brown: Genome-scale microRNA and small interfering RNA screens identify small RNA modulators of TRAIL-induced apoptosis pathway. *Cancer Res*, 67, 10782-10788 (2007)
249. Fischer, C., M. Schneider & P. Carmeliet: Principles and therapeutic implications of angiogenesis, vasculogenesis and arteriogenesis. *Handb Exp Pharmacol* 157-212 (2006)
250. Sullivan, D. C. & R. Bicknell: New molecular pathways in angiogenesis. *Br J Cancer*, 89, 228-31 (2003)
251. Kuehnbacher, A., C. Urbich, A. M. Zeiher & S. Dimmeler: Role of Dicer and Drosha for endothelial microRNA expression and angiogenesis. *Circ Res*, 101, 59-68 (2007)
252. Suárez, Y., C. Fernández-Hernando, J. S. Pober & W. C. Sessa: Dicer dependent microRNAs regulate gene expression and functions in human endothelial cells. *Circ Res*, 100, 1164-1173 (2007)
253. Wang, S. & E. N. Olson: Angiomirs--key regulators of angiogenesis. *Curr Opin Genet Dev*, 19, 205-211 (2009)
254. Wang, S., A. B. Aurora, B. A. Johnson, X. Qi, J. McAnally, J. A. Hill, J. A. Richardson, R. Bassel-Duby & E. N. Olson: The endothelial-specific microRNA miR-126 governs vascular integrity and angiogenesis. *Dev Cell*, 15, 261-271 (2008)
255. Fish, J. E., M. M. Santoro, S. U. Morton, S. Yu, R. F. Yeh, J. D. Wythe, K. N. Ivey, B. G. Bruneau, D. Y. Stainier & D. Srivastava: miR-126 regulates angiogenic signaling and vascular integrity. *Dev Cell*, 15, 272-84 (2008)
256. Nikolic, I., K. H. Plate & M. H. Schmidt: EGFL7 meets miRNA-126: an angiogenesis alliance. *J Angiogenes Res*, 2, 9 (2010)
257. Lee, D. Y., Z. Deng, C.-H. Wang & B. B. Yang: MicroRNA-378 promotes cell survival, tumor growth, and angiogenesis by targeting SuFu and Fus-1 expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104, 20350-20355 (2007)
258. Würdinger, T., B. A. Tannous, O. Saydam, J. Skog, S. Grau, J. Soutschek, R. Weissleder, X. O. Breakefield & A. M. Krichevsky: miR-296 regulates growth factor receptor overexpression in angiogenic endothelial cells. *Cancer Cell*, 14, 382-393 (2008)
259. Dews, M., A. Homayouni, D. Yu, D. Murphy, C. Sevignani, E. Wentzel, E. E. Furth, W. M. Lee, G. H. Enders, J. T. Mendell & A. Thomas-Tikhonenko: Augmentation of tumor angiogenesis by a Myc-activated microRNA cluster. *Nat Genet*, 38, 1060-1065 (2006)
260. Fasanaro, P., Y. D'Alessandra, V. Di Stefano, R. Melchionna, S. Romani, G. Pompilio, M. C. Capogrossi & F. Martelli: MicroRNA-210 modulates endothelial cell response to hypoxia and inhibits the receptor tyrosine kinase ligand Ephrin-A3. *J Biol Chem*, 283, 15878-15883 (2008)
261. Chen, Y. & D. H. Gorski: Regulation of angiogenesis through a microRNA (miR-130a) that down-regulates antiangiogenic homeobox genes GAX and HOXA5. *Blood*, 111, 1217-1226 (2008)
262. Polisenio, L., A. Tuccoli, L. Mariani, M. Evangelista, L. Citti, K. Woods, A. Mercatanti, S. Hammond & G. Rainaldi: MicroRNAs modulate the angiogenic properties of HUVECs. *Blood*, 108, 3068-3071 (2006)
263. Hua, Z., Q. Lv, W. Ye, C.-K. A. Wong, G. Cai, D. Gu, Y. Ji, C. Zhao, J. Wang, B. B. Yang & Y. Zhang: MiRNA-directed regulation of VEGF and other angiogenic factors under hypoxia. *PLoS One*, 1, e116-e116 (2006)
264. Valadi, H., K. Ekstrom, A. Bossios, M. Sjostrand, J. J. Lee & J. O. Lotvall: Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol*, 9, 654-9 (2007)
265. Kosaka, N., H. Iguchi & T. Ochiya: Circulating microRNA in body fluid: a new potential biomarker for cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Sci*, 101, 2087-2092 (2010)
266. Thery, C., L. Duban, E. Segura, P. Veron, O. Lantz & S. Amigorena: Indirect activation of naive CD4+ T cells by dendritic cell-derived exosomes. *Nat Immunol*, 3, 1156-62 (2002)
267. Keller, S., M. P. Sanderson, A. Stoeck & P. Altevogt: Exosomes: from biogenesis and secretion to biological function. *Immunol Lett*, 107, 102-108 (2006)
268. Skog, J., T. Würdinger, S. van Rijn, D. H. Meijer, L. Gainche, M. Sena-Estevés, W. T. Curry, Jr., B. S. Carter, A. M. Krichevsky & X. O. Breakefield: Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nat Cell Biol*, 10, 1470-6 (2008)
269. Hunter, M. P., N. Ismail, X. Zhang, B. D. Aguda, E. J. Lee, L. Yu, T. Xiao, J. Schafer, M. L. Lee, T. D.

MicroRNAs: molecular features and role in cancer

- Schmittgen, S. P., Nana-Sinkam, D., Jarjoura & C. B. Marsh: Detection of microRNA expression in human peripheral blood microvesicles. *PLoS One*, 3, e3694 (2008)
270. Caby, M.-P., D. Lankar, C. Vincendeau-Scherrer, G. Raposo & C. Bonnerot: Exosomal-like vesicles are present in human blood plasma. *Int Immunol*, 17, 879-887 (2005)
271. Rabinowits, G., C. Gercel-Taylor, J. M. Day, D. D. Taylor & G. H. Kloecker: Exosomal microRNA: a diagnostic marker for lung cancer. *Clin Lung Cancer*, 10, 42-6 (2009)
272. Taylor, D. D., C. Gercel-Taylor & L. P. Parker: Patient-derived tumor-reactive antibodies as diagnostic markers for ovarian cancer. *Gynecol Oncol*, 115, 112-20 (2009)
273. Pisitkun, T., R. F. Shen & M. A. Knepper: Identification and proteomic profiling of exosomes in human urine. *Proc Natl Acad Sci USA*, 101, 13368-73 (2004)
274. Gonzales, P. A., T. Pisitkun, J. D. Hoffert, D. Tchapyjnikov, R. A. Star, R. Kleta, N. S. Wang & M. A. Knepper: Large-scale proteomics and phosphoproteomics of urinary exosomes. *J Am Soc Nephrol*, 20, 363-379 (2009)
275. Michael, A., S. D. Bajracharya, P. S. Yuen, H. Zhou, R. A. Star, G. G. Illei & I. Alevizos: Exosomes from human saliva as a source of microRNA biomarkers. *Oral Dis*, 16, 34-8 (2010)
276. Palanisamy, V., S. Sharma, A. Deshpande, H. Zhou, J. Gimzewski & D. T. Wong: Nanostructural and transcriptomic analyses of human saliva derived exosomes. *PLoS One*, 5, e8577-e8577 (2010)
277. Keller, S., C. Rupp, A. Stoeck, S. Runz, M. Fogel, S. Lugert, H. D. Hager, M. S. Abdel-Bakky, P. Gutwein & P. Altevogt: CD24 is a marker of exosomes secreted into urine and amniotic fluid. *Kidney Int*, 72, 1095-102 (2007)
278. Ohshima, K., K. Inoue, A. Fujiwara, K. Hatakeyama, K. Kanto, Y. Watanabe, K. Muramatsu, Y. Fukuda, S. Ogura, K. Yamaguchi & T. Mochizuki: Let-7 microRNA family is selectively secreted into the extracellular environment via exosomes in a metastatic gastric cancer cell line. *PLoS One*, 5, e13247 (2010)
279. Chen, T. S., R. C. Lai, M. M. Lee, A. B. Choo, C. N. Lee & S. K. Lim: Mesenchymal stem cell secretes microparticles enriched in pre-microRNAs. *Nucleic Acids Res*, 38, 215-24 (2010)
280. Taylor, D. D. & C. Gercel-Taylor: MicroRNA signatures of tumor-derived exosomes as diagnostic biomarkers of ovarian cancer. *Gynecol Oncol*, 110, 13-21 (2008)
281. Lehmann, B. D., M. S. Paine, A. M. Brooks, J. A. McCubrey, R. H. Renegar, R. Wang & D. M. Terrian: Senescence-associated exosome release from human prostate cancer cells. *Cancer Res*, 68, 7864-71 (2008)
282. Katakowski, M., B. Buller, X. Wang, T. Rogers & M. Chopp: Functional microRNA is transferred between glioma cells. *Cancer Res*, 70, 8259-63 (2010)
283. Collino, F., M. C. Deregibus, S. Bruno, L. Sterpone, G. Aghemo, L. Viltono, C. Tetta & G. Camussi: Microvesicles derived from adult human bone marrow and tissue specific mesenchymal stem cells shuttle selected pattern of miRNAs. *PLoS One*, 5, e11803 (2010)
284. Grange, C., M. Tapparo, F. Collino, L. Vitillo, C. Damasco, M. C. Deregibus, C. Tetta, B. Bussolati & G. Camussi: Microvesicles released from human renal cancer stem cells stimulate angiogenesis and formation of lung premetastatic niche. *Cancer Res*, 71, 5346-56 (2011)
285. Purow, B.: The elephant in the room: do microRNA-based therapies have a realistic chance of succeeding for brain tumors such as glioblastoma? *J Neurooncol*, 103, 429-36 (2011)
286. Lammers, P. & A. G. Bader: The Therapeutic Potential of microRNAs. *Innovations in Pharmaceutical Technology*, 52-55 (2011)
287. Bader, A. G., D. Brown, J. Stoudemire & P. Lammers: Developing therapeutic microRNAs for cancer. *Gene Ther* (2011)
288. Trang, P., P. P. Medina, J. F. Wiggins, L. Ruffino, K. Kelnar, M. Omotola, R. Homer, D. Brown, A. G. Bader, J. B. Weidhaas & F. J. Slack: Regression of murine lung tumors by the let-7 microRNA. *Oncogene*, 29, 1580-1587 (2010)
289. Ji, Q., X. Hao, Y. Meng, M. Zhang, J. Desano, D. Fan & L. Xu: Restoration of tumor suppressor miR-34 inhibits human p53-mutant gastric cancer tumorspheres. *BMC Cancer*, 8, 266-266 (2008)
290. Esau, C. C.: Inhibition of microRNA with antisense oligonucleotides. *Methods (San Diego, Calif.)*, 44, 55-60 (2008)
291. Lanford, R. E., E. S. Hildebrandt-Eriksen, A. Petri, R. Persson, M. Lindow, M. E. Munk, S. Kauppinen & H. Orum: Therapeutic silencing of microRNA-122 in primates with chronic hepatitis C virus infection. *Science*, 327, 198-201 (2010)
292. Medina, P. P., M. Nolde & F. J. Slack: OncomiR addiction in an in vivo model of microRNA-21-induced pre-B-cell lymphoma. *Nature*, 467, 86-90 (2010)
293. Jiang, P., E. Y. Rao, N. Meng, Y. Zhao & J. J. Wang: MicroRNA-17-92 significantly enhances radioresistance in human mantle cell lymphoma cells. *Radiat Oncol*, 5, 100 (2010)
294. Chun-Zhi, Z., H. Lei, Z. An-Ling, F. Yan-Chao, Y. Xiao, W. Guang-Xiu, J. Zhi-Fan, P. Pei-Yu, Z. Qing-Yu & K. Chun-Sheng: MicroRNA-221 and microRNA-222

MicroRNAs: molecular features and role in cancer

regulate gastric carcinoma cell proliferation and radioresistance by targeting PTEN. *BMC Cancer*, 10, 367 (2010)

295. Allen, K. E. & G. J. Weiss: Resistance may not be futile: microRNA biomarkers for chemoresistance and potential therapeutics. *Mol Cancer Ther*, 9, 3126-36 (2010)

296. Ranade, A. R., D. Cherba, S. Sridhar, P. Richardson, C. Webb, A. Paripati, B. Bowles & G. J. Weiss: MicroRNA 92a-2*: a biomarker predictive for chemoresistance and prognostic for survival in patients with small cell lung cancer. *J Thorac Oncol*, 5, 1273-8 (2010)

297. Song, B., Y. Wang, Y. Xi, K. Kudo, S. Bruheim, G. I. Botchkina, E. Gavin, Y. Wan, A. Formentini, M. Kornmann, O. Fodstad & J. Ju: Mechanism of chemoresistance mediated by miR-140 in human osteosarcoma and colon cancer cells. *Oncogene*, 28, 4065-74 (2009)

298. Song, B., Y. Wang, M. A. Titmus, G. Botchkina, A. Formentini, M. Kornmann & J. Ju: Molecular mechanism of chemoresistance by miR-215 in osteosarcoma and colon cancer cells. *Mol Cancer*, 9, 96 (2010)

299. Sorrentino, A., C. G. Liu, A. Addario, C. Peschle, G. Scambia & C. Ferlini: Role of microRNAs in drug-resistant ovarian cancer cells. *Gynecol Oncol*, 111, 478-86 (2008)

Abbreviations: miRNA: microRNA; siRNAs: short interfering RNA; MiRISC: miRNA-induced silencing complex

Key words: Oncogenes, Tumor Suppressors, Exosome, miRNA, OncomiR, Cancer Therapy, Review

Send correspondence to: Jean-Paul Issartel, INSERM U836, Grenoble Institut des Neurosciences, Equipe 7, Batiment EJ Safra, Chemin Fortune Ferrini, 38700 La Tronche, France, Tel: 33456520640, Fax: 33456520513, E-mail: jean-paul.issartel@ujf-grenoble.fr

C Production Scientifique

- Publications scientifiques

- Lages, E., Guttin, A., El Atifi, M., Ramus, C., Ipas, H., Dupré, I., Rolland, D., Salon, C., Godfraind, C., deFraipont, F., Dhobb, M., Pelletier, L., Wion, D., Gay, E., Berger, F. et Issartel, J.-P. (2011).
MicroRNA and target protein patterns reveal physiopathological features of glioma subtypes.
Plosone 6(5) :e20600.
- Lages, E., Ipas, H., Guttin, A., Nesr, H., Berger, F. et Issartel, J.-P. (2012).
MicroRNAs : molecular features and role in cancer.
Front Biosci (Landmark Ed), 17 :2508–2540.
PMID : 22652795.
- En preparation, Exosomal microRNAs and their role in gliomas
Ipas, H. *et al.*

- Brevets

- Méthode de diagnostic *in vitro* intra-tissulaire pour diagnostiquer les tumeurs du cerveau.
Guttin A, Ipas H, Lages E, EL Atifi M, Berger F, Issartel JP
FR 10/60278 déposée le 8 décembre 2010 ; PCT/FR2011/052910 - WO/2012/076823
- Méthode de diagnostic *in vitro* inter-tissulaire pour diagnostiquer les tumeurs du cerveau.
Guttin A, Ipas H, Lages E, EL Atifi M, Berger F, Issartel JP
FR 10/60279 déposée le 8 décembre 2010 ; PCT/FR2011/052904 - WO/2012/076821

- Communication orale en congrès international (sur invitation)

- Biomarkers and RNAs : Glioma exosomal microRNAs
ISEV meeting à Göteborg, Suède (Avril 2012)

Résumé

Les tumeurs gliales du cerveau et en particulier les glioblastomes sont des tumeurs de très mauvais pronostic. Les paramètres qui contrôlent des phénotypes comme l'agressivité, la migration, ou la chimio-résistance de ces tumeurs sont mal connus. Dans ce contexte tumoral, il est envisagé que les microARN (ARN non-codants d'une vingtaine de bases) soient des acteurs essentiels des phénomènes de modification phénotypique parce qu'ils sont capables d'orchestrer l'expression de nombreux gènes. Nous avons montré que les microARN sont des marqueurs tissulaires précieux pour le diagnostic permettant de différencier les deux types principaux de gliomes à partir de prélèvements tumoraux. Nous avons aussi observé que plusieurs microARN sont, en outre, sécrétés par les cellules gliales saines ou cancéreuses au sein de microvésicules appelées exosomes. Le contenu en ARN de ces exosomes a été caractérisé par analyse moléculaire transcriptomique (ARN messagers et microARN) par techniques d'hybridation sur puces à ADN Affymetrix. Les profils ARN exosomaux sains et cancéreux sont distincts, mais ils ne reflètent pas intégralement le profil ARN des cellules dont ils sont issus. Des conditions de stress hypoxique ou l'utilisation de composés pharmacologiques (GW4869 et 5-aza-2'-désoxycytidine) n'affectent pas la quantité d'exosomes produite par la lignée de glioblastome (U87) en culture. Les profils ARN sont cependant modifiés, et le contenu des exosomes produits semble donc être un mécanisme actif et régulé. Enfin, des exosomes cancéreux incubés avec des cellules saines ont très peu d'effet sur le phénotype de celles-ci. Les microARN tissulaires et exosomaux seraient donc des acteurs importants de la physiopathologie du gliome et de sa progression, dont les rôles restent encore à préciser.

Mots-Clés : ARN, glioblastome, oligodendrogliome, inhibiteur, hypoxie, microarray, étude transcriptomique, biomarqueur

Abstract

Brain glial tumors, and particularly glioblastomas, are tumors with a very bad prognosis. Nowadays, parameters that control aggressiveness, migration or chemo-resistance are poorly known. In this tumor context microRNAs (20 base-long non-coding RNAs) are thought to be essential actors of phenotypic-modification phenomena as they are able to control the expression of numerous genes. We showed that microRNAs are precious diagnosis tissular markers helping in differentiating two principal tumor types from tissular samples. We also observed that several microRNAs are secreted by glial cells in microvesicles called exosomes. The exosomes RNA content was characterized by molecular transcriptomic analysis (messenger RNAs and microRNAs) using Affymetrix hybridization techniques. The healthy and cancerous exosomal RNA profiles are distinct but do not reflect the RNA profile of the cells they are derived from. Oxygen stress conditions, or use of chemical drugs (GW4869 or 5-Aza-2'-deoxycytidine), do not affect the quantity of exosomes produced by the culture cell line of glioblastoma U87. Nevertheless, the RNA profiles are modified and contents of exosomes produced seem to be controlled by an active and regulated mechanism. Finally, cancerous exosomes incubated with healthy cells have a very restrain effect on their phenotypes. Thus tissular and exosomal microRNAs might be important actors of the glioma physiopathology and progression, which roles remain to be defined in detail.

Key Words : RNA, glioblastoma, oligodendroglioma, inhibitor, hypoxia, microarray, transcriptomic study, biomarker