



Université
de Toulouse

THESE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par l'Université Paul Sabatier
Discipline ou spécialité : Cancérologie

Présentée et soutenue par ARMAND-LABIT Virginie

Titre : Identification d'un profil de microARNs plasmatiques comme biomarqueur
potentiel dans le mélanome métastatique

Le 2 avril 2014

JURY

Pr. Bernard Guillot - Rapporteur
Pr. Philippe Saïag - Rapporteur
Pr. Jean-Michel Bidart - Rapporteur
Dr. Anne Pradines - Examineur
Pr. Gilles Favre – Directeur de thèse

Ecole doctorale : Biologie Santé Biotechnologies de Toulouse
Unité de recherche : CRCT équipe 3
Directeur(s) de Thèse : Pr FAVRE Gilles

REMERCIEMENTS

En premier lieu, je tiens à remercier mon directeur de thèse, le Pr Gilles Favre, de m'avoir confié ce travail de recherche prospective me permettant de concilier mes compétences de biologiste médical avec un travail de recherche.

Les Professeurs Bernard Guillot, Philippe Saïag et Jean-Michel Bidart m'ont fait l'honneur d'être les rapporteurs de cette thèse et de participer au jury de thèse. Je suis très reconnaissante de l'ensemble de leurs remarques constructives et leurs suggestions pour améliorer la qualité de ce mémoire. Pour tout cela, je les remercie.

Je tiens également à exprimer ma reconnaissance au Dr Anne Pradines pour l'ensemble de ses conseils, pour son expertise en biologie moléculaire, pour la relecture de ce manuscrit et sa grande disponibilité.

Je remercie Anne Casanova qui a l'origine de ce projet, pour le long travail qu'elle a réalisé de mise au point, pour son expertise en biologie moléculaire et l'ensemble de ses conseils techniques.

Un grand merci au Dr Nicolas Meyer pour son implication très importante dans ce projet. Sa motivation et son expertise clinique sont des atouts indispensables pour l'aboutissement d'un tel travail de recherche prospective.

Merci aux Dr Laurence Lamant et Magali Lacroix-Triki pour leurs expertises anatomo-pathologiques.

Je tiens à remercier les plateformes toulousaines : génotoul biopuces et génome et transcriptome (geT) pour tous les conseils et les analyses réalisées.

Merci à l'ensemble des personnes que je côtoie, au niveau du laboratoire de biologie médicale de l'Institut Claudius Regaud, de l'équipe 3 du CRCT et de la faculté de pharmacie, pour l'ensemble de leur soutien tout au long de ces années de thèse.

Je tiens à remercier mes parents qui m'ont toujours encouragé, soutenu et aidé et sans qui je n'aurais pas pu accomplir toutes ses années d'étude.

Un grand merci à mon mari, Yann, pour son soutien inconditionnel, son aide, son écoute et surtout son amour qui me sont si précieux.

Je dédie ce travail à mes deux trésors : Erwann et Corentin.

ABBREVIATIONS

ADN, ADNc : Acide DésoxyriboNucléique, Acide DésoxyriboNucléique complémentaire

Ago2: protéine Argonaute 2

AJCC: American Joint Committee on Cancer

Akt : protéine kinase B

ARN, ARNm : Acide ribonucléique, Acide ribonucléique messenger

AUC : Area Under Curve : aire sous la courbe

Bcl-2: B-cell lymphoma 2

CDK, CDK4: Cyclin-Dependent Kinase, Cyclin-Dependent Kinase 4

CDKN2A: Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 2A

c-kit: proto-oncogène, tyrosine protéine kinase kit

c-Myc: proto-oncogène, homologue au myelocytomatosis viral oncogene

CpG site : site avec une liaison phosphodiester entre cytosine et guanine

Cq, Ct: quantification Cycle value, threshold Cycle value

CREB : cAMP Responsive Element Binding protein

CTLA-4: Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4

DGCR8: DiGeorge syndrome Critical Region 8

EDTA: acide éthylène diamine tétraacétique

ERK : Extracellular signal Regulated Kinase

FC : Facteur de croissance

FOXO3 : Forkhead box O3

HAS : Haute Autorité de Santé

HDL: High Density Lipoprotein

INCA: Institut national du Cancer

IL : InterLeukine

LDH : Lactate Déshydrogénase

LLC: Leucémie Lymphoïde Chronique

LNATM: Locked Nucleic Acid

MAPK: Mitogen Activated protein Kinase

MEK: Mitogen activated ERK kinase

MITF: Microphthalmia-associated transcription factor

miARN, miR: microARN

NHEM: Normal Human Epidermal Melanocytes

nSMase 2: neutral sphingomyélinase 2

p53: protéine suppresseuse de tumeur p53

PCR, qPCR : Polymérase Chain Reaction, PCR quantitative

PD-1: Programmed cell Death-1

PDCD4: Programmed Cell Death protein 4

PIK3: Phosphatidyl Inositol 3-Kinase

PKA: Protein Kinase A

PTEN: Phosphatase and TENsin homolog

RAF: proto-oncogène sérine/thréonine-protéine kinase

RAS : Rat Sarcoma virus oncogène

Rb : protéine de susceptibilité au rétinoblastome

RGP: Radial Growth Phase

Rho: Ras homology protein

RISC: RNA-induced silencing complex

RNU6: U6 small nuclear RNA

ROC: Receiver Operating Characteristic

RT: Reverse Transcription

RTK: Récepteur à activité Tyrosine Kinase

SVF: Sérum de veau foetal

TGF: Transforming growth factor

TNF: Tumor Necrosis Factor

TNM (classification): T pour tumeur, N: nœud, M pour métastase

UI: Unité Internationale

UTR: UnTranslated Region

UV: rayon Ultra-Violet

VGP: Vertical Growth Phase

TABLE DES MATIERES

ABREVIATIONS	1
TABLE DES MATIERES.....	4
AVANT-PROPOS.....	10
INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE	11
PREMIERE PARTIE : LE MELANOME CUTANE.....	12
1) Généralités sur le mélanome cutané	12
2) Epidémiologie du mélanome cutané	13
I – Le mélanome en France	13
II – Le mélanome en Europe	14
III – Le mélanome dans le Monde	16
3) Les facteurs de risque	16
4) Physiopathologie.....	17
I – Physiopathologie cellulaire	17
II – Physiopathologie moléculaire.....	18
5) Formes anatomo-cliniques du mélanome cutané :.....	21
6) Le diagnostic de mélanome	22
I – L’examen clinique.....	23
A – La démarche analytique visuelle	23
B – La démarche cognitive visuelle	23
C – L’examen dermoscopique.....	23
II – L’examen anatomo-pathologique.....	24
7) Classification des mélanomes	25
I – La classification actuelle.....	25
II – Les indicateurs pronostiques actuels.....	26
A – Le stade clinique	26
B – L’indice de Breslow	29
C – Les autres indicateurs pronostiques	29
8) Les thérapeutiques du mélanome cutané.....	31
I – La chirurgie.....	31
II – L’immunothérapie	32

III – La chimiothérapie	32
IV – La radiothérapie	32
V – Les nouveaux traitements	32
VI – Stratégie thérapeutique	34
9) Dépistage et prévention.....	35
10) Perspectives	35
DEUXIEME PARTIE: LES MICROARNs	37
1) Généralités sur les microARNs	37
I – Définition.....	37
II – Découverte des miARNs chez le nématode	38
III – Caractérisation des miARNs dans de nombreuses espèces	39
IV – Biosynthèse des microARNs	39
A – Organisation génomique	40
B – L'étape de transcription du pri-miARN	40
C – L'étape de maturation dans le noyau en pré-miARN.....	42
1 – La voie canonique : clivage du pri-miARN par le complexe « microprocesseur »	42
2 – Voie alternative de synthèse des pré-miARNs, les mirtrons	44
D – L'étape d'export des pré-miARNs dans le cytoplasme	45
E – L'étape de maturation cytoplasmique du pré-miARN	45
F – L'appariement à l'ARNm cible	46
V – Les modes de régulation de l'expression de l'ARNm cible	47
A – Répression de la traduction par les miARNs.....	47
B – Déadénylation et dégradation de l'ARNm dans les P-bodies	49
C – Cas particulier de l'activation de la traduction	49
VI – Fonctions physiologiques des miARNs	50
2) MicroARNs et cancer.....	50
I – Mécanismes de dérégulation de l'expression des miARNs dans le cancer	51
A – Anomalies chromosomiques	51
B – Modifications épigénétiques	52
C – Mutations ou polymorphismes au niveau des gènes codants les miARNs ou leurs messagers cibles	54
D – Anomalies de la biosynthèse des miARNs	54
II – Les miARNs suppresseurs de tumeurs et les miARNs oncogènes.....	55
A – Les microARNs suppresseurs de tumeurs.....	55
1 – miR-15a et miR-16.....	55

2 – La famille let-7	57
3 – La famille des miR-34.....	57
B – miARNs oncogènes (oncomirs)	58
1 – Le polycistron miR-17-92.....	58
2 – miR-21	59
3 – miR-155	60
III – Expression des microARNs dans les cancers	61
A – Leur intérêt diagnostique	61
B – Leur intérêt pronostique.....	62
C – MiARNs et métastases	63
D – Leur intérêt dans la prédiction de la réponse aux traitements	64
3) Les microARNs dans le mélanome	65
I – Etudes sur l’expression des microARNs dans le mélanome	65
A – Premières études sur les microARN dans le mélanome (2005-2008)	65
B – Déterminations de profils de microARN dans le mélanome.....	66
II – Etudes fonctionnelles des microARNs dans le mélanome	68
A – Rôles des miRs dans les voies MAPK et PI3K	70
B – Action des miRs sur l’expression des cyclines.....	71
C – Action des miRs sur le facteur MITF	72
D – MicroARNs et hypoxie	72
E – MicroARNs et pouvoir métastatique	73
III – Synthèse	73
4) Les microARNs circulants	75
I – L’expression des miRs circulants en physiopathologie	75
A – Les mirs circulants chez les individus sains	75
B – L’expression des miRs circulants durant la grossesse	76
C – L’expression des miRs circulants en oncologie	77
1 – Les premières études	77
2 – Description des miRs circulants en oncologie	79
a – miRs circulants analysés à partir du sang	79
b – Les miRs circulants analysés à partir des autres fluides biologiques.....	84
3 – Les miRs circulants dans le mélanome	84
II – Mesure et quantification des miRs circulants.....	85
A – La grande stabilité des miRs circulants.....	86
B – Méthodes de détection : arrays, qPCR, séquençage	86

C – Les échantillons.....	87
D – Normalisation des dosages des miARNs par RT-qPCR.....	88
III – Formes, origine et fonctions des miRs circulants	90
A – Les formes de miRs circulants	90
1 – Les miRs circulants peuvent être contenus dans des vésicules.....	90
2 – Les miRs circulants peuvent être liés à des protéines	92
B – L’origine des miARNs circulants.....	93
C – Les rôles fonctionnels des miARNs circulants	93
1 – Dans l’état physiologique	93
2 – Etats pathologiques.....	95
a – Théorie sur un mécanisme actif.....	95
b – Théorie sur un mécanisme passif	99
IV – Place des miRs circulants en tant que biomarqueurs potentiels	100
OBJECTIFS.....	103
MATERIELS ET METHODES.....	104
1) Conception de l’étude plasmatique des miARNs	104
2) Echantillons plasmatiques.....	104
3) Culture cellulaire	105
4) Collection de Tissus	107
5) Extraction des ARNs pour détection des microARNs plasmatiques, tissulaires et cellulaires 107	
6) Amorces avec technologie LNA™ (Locked Nucleic Acid) d’Exiqon	107
7) Marquage et hybridation des miARNs sur puces LNA™	109
8) Principe de la RT-qPCR pour la détection des microARNs	109
I – Amorces LNA™ d’Exiqon	109
II – Amorces de Qiagen.....	110
9) Analyses des miARNs plasmatiques et cellulaires par RT-qPCR sur le système Biomark™ Fluidigm avec les réactifs d’Exiqon	111
10) Analyses des miARNs plasmatiques et tissulaires par RT-qPCR sur l’automate CFX96™ (Bio-Rad) avec les réactifs d’Exiqon et de Qiagen.....	112
I – Analyses avec les réactifs Exiqon	112
II – Analyses avec les réactifs Qiagen	113
11) Analyses biostatistiques	113

12) Dosage de la LDH.....	113
RESULTATS	115
PREMIERE PARTIE : ETUDE DES MICROARNs PLASMATIQUES DANS LE MELANOME METASTATIQUE.	116
1) Recherche d'un profil d'expression de microARNs plasmatiques dans le mélanome par biopuces.....	116
I – Les microARNs dérégulés chez les patients par rapport aux sujets sains	121
A – Les microARNs surexprimés chez les patients par rapport aux sujets sains.....	122
B – Les microARNs sous-exprimés chez les patients par rapport aux sujets sains	125
II – Les microARNs retrouvés exclusivement chez les patients	125
2) Recherche d'un profil d'expression de microARNs plasmatiques dans le mélanome métastatique par RT-qPCR.....	129
I – Cohorte d'apprentissage	130
A – Description de la cohorte d'apprentissage.....	130
B – Sélection des microARNs étudiés	131
C – Analyse des microARNs plasmatiques par RT qPCR sur le BioMark™ Fluidigm	133
a – Sélection des microARNs dont les résultats étaient exploitables.....	135
b – Choix de miRs servant de référence	137
c – Calcul des expressions de chaque miR par quantification relative par la méthode des delta-Cq.	137
d – Le taux de microARNs était constant chez les sujets sains.....	138
e – Etude biostatistique de la discriminance entre population malade et témoin.	139
1 – Analyse univariée	139
2 – Analyse multivariée	142
D – Conclusions des analyses par RT qPCR de notre cohorte d'apprentissage.....	143
II – Cohorte de validation	143
A – Description de la cohorte de validation.....	144
B – Analyse des microARNs plasmatiques par RT-qPCR sur BioMark™ Fluidigm	144
a – Le choix des amorces utilisés pour les miARNs cibles et les références.	145
b – Les miARNs dérégulés chez les patients par rapport aux témoins.	145
1 – L'analyse univariée	145
2 – L'analyse multivariée.....	148
III – Analyse des deux cohortes réunies	148
A – Analyse de discriminance entre population malade et témoin.....	148
1 – L'analyse univariée des cohortes 1 et 2 réunies.....	148

2 – L’analyse multivariée des cohortes 1 et 2 réunies	149
3 – Corrélation entre l’âge et les taux de miARNs.....	152
B – Analyse de survie	152
IV – Conclusions des analyses des dosages plasmatiques des miARNs par RT-qPCR.....	154
DEUXIEME PARTIE : ORIGINE DES MICROARNs D’INTERET	155
1) Etude de l’expression tissulaire des miARNs.....	155
2) Etude de l’expression des miARNs dans des lignées cellulaires de mélanome.....	157
I – Sélection des amorces de miARNs exploitables sur les lignées cellulaires	158
II – Analyse de l’expression cellulaire des miRs dérégulés	160
III – Analyse de l’expression cellulaire des miRs non dérégulés dans l’analyse plasmatique	163
<u>TROISIEME PARTIE : ARTICLE SOUMIS.....</u>	<u>165</u>
<u>DISCUSSION ET PERSPECTIVES</u>	<u>167</u>
<u>CONCLUSIONS</u>	<u>178</u>
<u>ANNEXES</u>	<u>179</u>
<u>REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES</u>	<u>187</u>

AVANT-PROPOS

En comparaison avec les autres cancers cutanés, le mélanome a une incidence faible bien qu'en constante augmentation. Il est cependant responsable de la majorité des décès liés aux cancers de la peau. Il fait partie des cancers pouvant être les plus agressifs. Le mélanome au stade métastatique est une pathologie dont le pronostic reste réservé malgré de récents progrès thérapeutiques. En effet, à ce stade, il n'existe pas de traitement curatif et la survie à 5 ans est faible. Les outils pronostiques utilisés se basent sur différents critères au diagnostic dont le meilleur est l'indice de Breslow. Cependant, ces critères sont insuffisants pour appréhender avec précision l'hétérogénéité des modes évolutifs du mélanome. Il apparaît nécessaire de trouver des biomarqueurs d'intérêt afin d'améliorer la prise en charge des patients.

Les microARNs sont des régulateurs géniques jouant un rôle important dans l'oncogénèse et la progression tumorale. De nombreuses études montrent que leur profil d'expression peut servir de signature phénotypique des cancers et certains microRNAs semblent démontrer une valeur pronostique associée au stade et à l'évolution de la maladie. Différents microARNs ont ainsi été décrits dérégulés et impliqués dans la mélanomagenèse. En 2008, plusieurs études ont montré la possibilité de doser les formes circulantes des microARNs à partir de prélèvements de sang périphérique. Ces études ont montré également que les microARNs circulants peuvent être des biomarqueurs diagnostiques et pronostiques d'intérêt dans différents cancers.

Nous avons décidé de nous intéresser aux microARNs plasmatiques dans le mélanome métastatique afin d'évaluer leur potentiel diagnostique et pronostique. Au début de notre projet, aucune étude n'avait été publiée sur le sujet. Dans l'introduction bibliographique seront décrits le mélanome cutané puis les microARNs. Concernant les microARNs, seront abordés les connaissances générales sur les microARNs, leur rôle en oncologie puis plus particulièrement dans le mélanome et enfin leurs formes circulantes. Nous développerons ensuite nos résultats. Dans un premier temps, nous avons identifié par biopuces des microARNs plasmatiques dérégulés puis nous avons validé les microARNs d'intérêt par RT-qPCR sur deux cohortes indépendantes. Dans un deuxième temps, nous avons recherché l'origine des miARNs dérégulés en les étudiant sur des tissus tumoraux et sur des lignées cellulaires.

INTRODUCTION BIBLIOGRAPHIQUE

Première partie : Le mélanome cutané

Nos travaux ont porté sur des patients atteints de mélanome cutané. Dans une première partie, nous aborderons les généralités, l'épidémiologie, les facteurs de risque, la physiopathologie cellulaire et moléculaire ainsi que les formes anatomopathologiques du mélanome cutané. Nous développerons ensuite le diagnostic, la dernière classification en vigueur et les facteurs pronostiques actuels. Enfin nous parlerons des thérapeutiques ainsi que du dépistage.

1) Généralités sur le mélanome cutané

Le mélanome est une tumeur maligne développée à partir des mélanocytes, les cellules pigmentaires de l'organisme.

La peau est constituée de trois couches tissulaires distinctes fonctionnant de manière coordonnée: l'épiderme, le derme et l'hypoderme (**Figure 1**). L'épiderme, couche la plus superficielle de la peau, est un épithélium pavimenteux stratifié constitué de quatre populations cellulaires différentes : les kératinocytes majoritaires, les mélanocytes, les cellules de Langerhans et les cellules de Merkel. L'épiderme est composé de quatre sous-couches : la couche basale (profonde), la couche spinieuse, la couche granuleuse et la couche cornée (superficielle). Les mélanocytes résident principalement dans la couche basale de l'épiderme et sont spécialisés dans la synthèse de mélanine dont le rôle principal est la protection pigmentaire de la peau contre les radiations ultraviolettes (UV). Un mélanocyte distribue la mélanine qu'il produit, à environ 36 kératinocytes avoisinants, l'ensemble constituant une unité fonctionnelle appelée unité épidermique de mélanisation (**Figure 1**).

Les mélanomes sont majoritairement cutanés mais des formes primitives plus rares de mélanomes muqueux et oculaires sont possibles. La majorité des mélanomes, environ 80%, surviennent *de novo* en peau saine. Ils peuvent aussi résulter de la transformation maligne d'un naevus bénin préexistant (Marks et al. 1990;Smolle et al. 1999). La localisation anatomique cutanée des mélanomes varie entre les femmes et les hommes avec une

prédominance au niveau du thorax pour l'homme et des membres inférieurs pour la femme (Benoit-Corven 2003;Besset 2000;Halna et al. 2000).

La peau et le mélanocyte

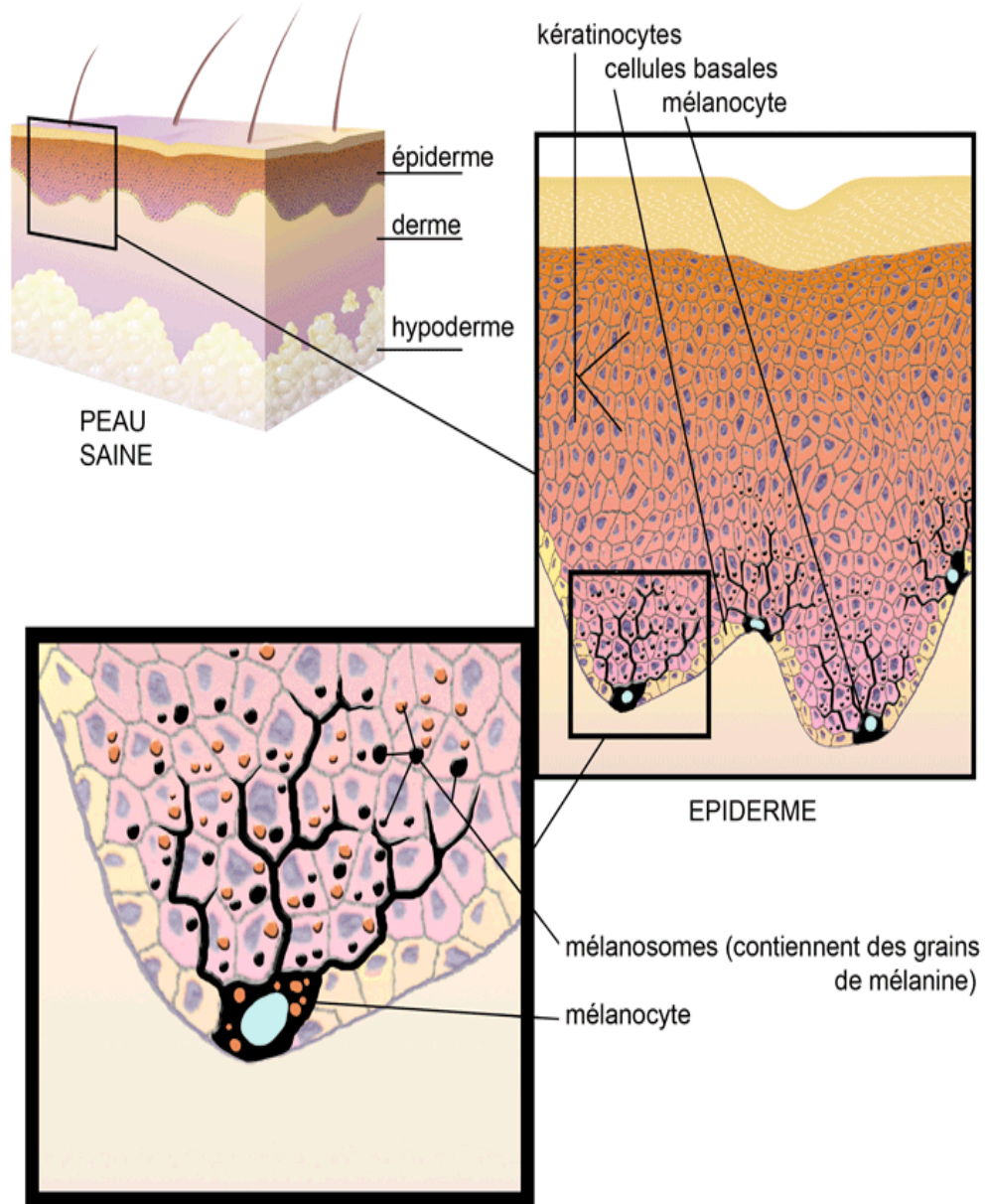


Figure 1. Constitution des différentes couches de la peau et localisation des mélanocytes. La peau est constituée de trois couches : l'épiderme, le derme et l'hypoderme. Les mélanocytes se trouvent dans la couche basale (couche la plus profonde de l'épiderme). Ils produisent la mélanine qui protège des rayons UV. Illustration prise sur le site [www.melanome-patients.fr/comprendre le melanome/illustration1](http://www.melanome-patients.fr/comprendre-le-melanome/illustration1).

2) Epidémiologie du mélanome cutané

I – Le mélanome en France

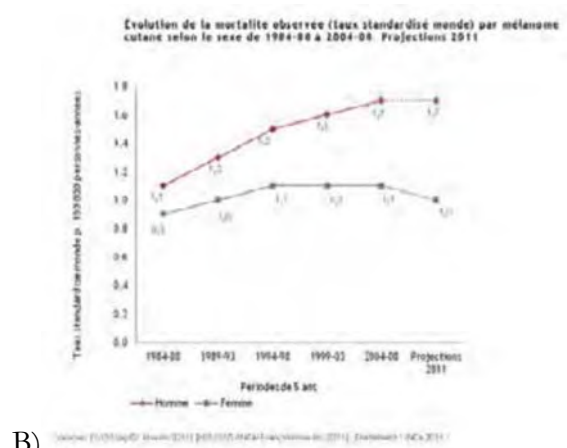
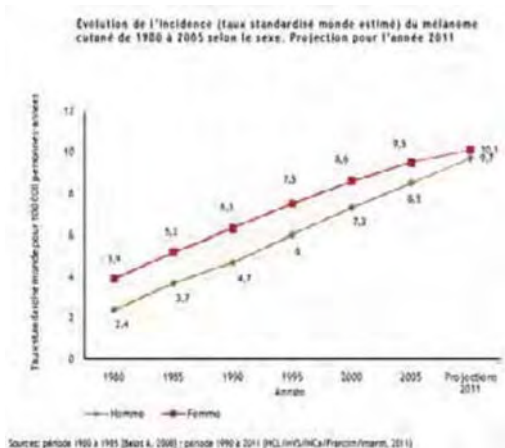
Le mélanome cutané se situait en 2011 au 9^{ème} rang des cancers tous sexes confondus avec 9780 nouveaux cas estimés (dont 4680 cas chez l'homme et 5100 chez la femme) et représentait 2,7% des cancers incidents (Institut National du Cancer 2013). Il était au 16^{ème} rang et représentait 1% de l'ensemble des décès par cancer. Les projections 2011 estimaient à 1620 le nombre de décès par mélanome dont 55% survenant chez l'homme. Les taux d'incidence standardisé à la population mondiale étaient estimés à 9,7 pour 100 000 hommes et 10,1 pour 100 000 femmes et les taux de mortalité à 1,7 pour 100 000 pour les hommes et 1,0 pour 100 000 pour les femmes (**Figures 2 A et B**).

Les mélanomes peuvent survenir à tous les âges, ils sont rares avant 15 ans. L'âge médian des patients lors du diagnostic était de 60 ans chez l'homme et de 58 ans chez la femme. Près de 70% des nouveaux cas sont diagnostiqués au-delà de 49 ans (Belot et al. 2008). L'incidence est en forte augmentation depuis 1980 avec toutefois un ralentissement de cette évolution depuis l'an 2000. Entre 1980 et 2005, le taux d'incidence standardisé à la population mondiale a augmenté en moyenne chez l'homme de 4.7% par an et de 3.4% chez la femme (Belot et al. 2008). La mortalité a connu une croissance plus modérée de 1980 à 2005 avec une tendance depuis l'an 2000 à la diminution pour les femmes et la stabilité pour les hommes. Cette diminution de la progression de l'incidence semble au moins en partie attribuable aux campagnes d'information, de sensibilisation et de dépistage de la population générale.

Le mélanome est une tumeur de bon pronostic s'il est diagnostiqué précocement. La survie dépend du stade de la maladie au moment du diagnostic avec l'épaisseur tumorale (selon Breslow) pour critère pronostic principal. Les survies relatives à 5 ans toutes épaisseurs confondues sont estimées à 88% pour les données françaises : étude PETRI (Prévention et Epidémiologie des Tumeurs en Région Ile-de-France) et à 98% pour les données américaines : étude SEER pour les stades localisés; alors qu'elle est inférieure à 20% en cas de diagnostic à un stade métastatique (Etude PETRI (Prévention et Epidémiologie des tumeurs en région Ile-de-France) 2004; Horner et al. 2009).

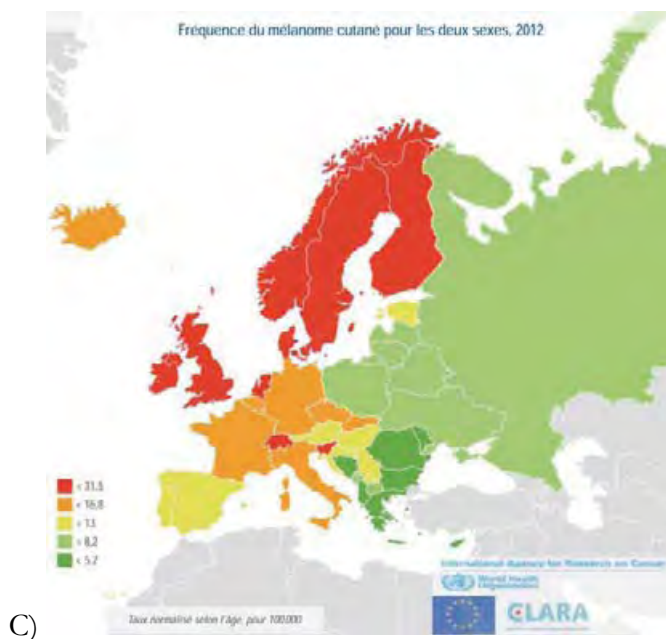
II – Le mélanome en Europe

En Europe, l'incidence du mélanome diminue selon un gradient Nord-Sud. D'après les estimations réalisées en 2008, l'incidence était la plus élevée dans l'Europe du Nord (Suisse, Pays-Bas, Danemark, Suède) et la plus basse en Europe du Sud et de l'Est (Albanie, Bosnie, Grèce). L'incidence en France se situe dans une zone intermédiaire en comparaison avec les autres pays européens (Ferlay et al. 2010) (**Figure 2C**).

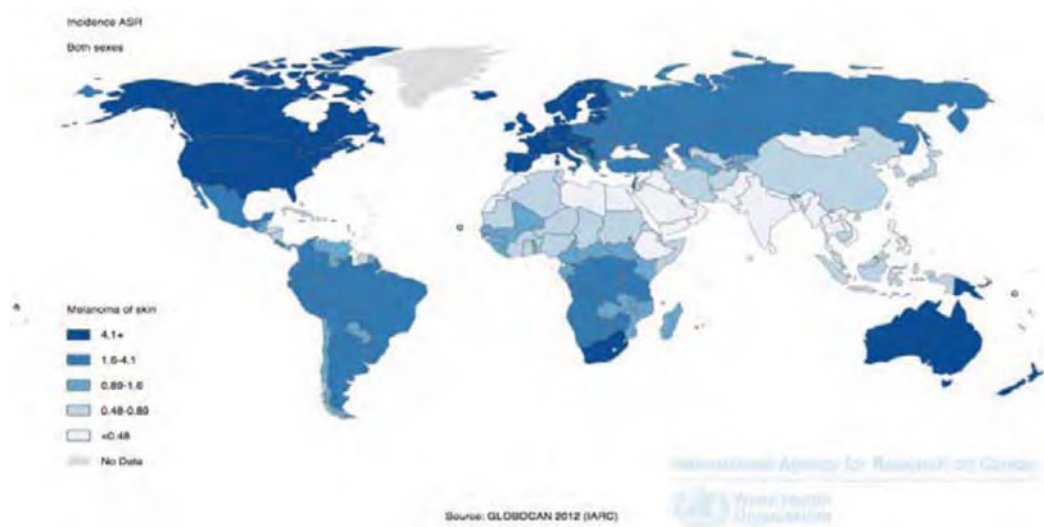


A)

B)



C)



D)

Figure 2. Incidence (A) et mortalité (B) du mélanome en France selon l'Institut National du Cancer en 2012 (Institut National du Cancer 2013). Incidence du mélanome en Europe (C) et dans le Monde (D) selon Globocan 2012.

III – Le mélanome dans le Monde

Selon l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS), 132 000 cas de mélanomes cutanés sont enregistrés chaque année dans le monde, soit 15 à 20 fois moins que pour les autres cancers cutanés (2 à 3 millions de cas enregistrés par an). Cependant, le mélanome est le cancer qui est marqué par la plus forte augmentation d'incidence de l'ensemble des cancers évalués.

Dans le reste du monde, de grandes différences épidémiologiques s'observent en fonction de la latitude et des caractéristiques ethniques des populations. Du fait de la conjonction des facteurs géographiques (distance à l'équateur et degré d'ensoleillement) et des facteurs individuels (phototype cutané), les taux d'incidence les plus élevés sont observés en Australie (37 cas/100 000 habitants). Des taux d'incidence élevés sont également observés en Amérique du Nord (Canada, Etats-Unis) (Ferlay et al. 2010) (**Figure 2D**).

3) Les facteurs de risque

Le mélanome cutané est une maladie multifactorielle résultant de l'interaction de facteurs environnementaux et de facteurs constitutifs. Les facteurs environnementaux et/ou comportementaux sont liés à l'exposition solaire surtout pendant l'enfance et à l'exposition aux UV artificiels (Gandini et al. 2005b). Le rayonnement UV est le seul facteur de risque exogène de mélanome identifié. Les principaux facteurs constitutifs de risque sont : un nombre de naevus communs supérieur à 40, un nombre de naevus atypiques supérieur ou égal à 2 (l'association de ces deux derniers définissant le syndrome des naevus atypiques) (Gandini et al. 2005a), la présence d'un naevus congénital géant, les antécédents personnels ou familiaux de mélanome (Gandini et al. 2005c) et/ou une immunodépression constitutionnelle ou acquise. Le mélanome est essentiellement une maladie des populations à peau claire. Les individus de phototype I et II sont plus exposés au mélanome que les individus de phototype III et IV.

Les études épidémiologiques attribuent un rôle majeur aux expositions solaires intermittentes et intenses ainsi qu'aux brûlures solaires reçues dans l'enfance. L'association épidémiologique entre le risque d'avoir un mélanome et l'exposition solaire est très étroite en ce qui concerne la dose cumulée totale d'ultraviolets reçue au cours de la vie, l'exposition solaire intermittente et les antécédents de coups de soleil dans l'enfance

(Gandini et al. 2005a ;Gandini et al. 2005b ;Gandini et al. 2005c). L'exposition aux UV artificiels des cabines de bronzage est également fortement associée épidémiologiquement à la survenue d'un mélanome (Boniol et al. 2012).

Environ 10% des mélanomes sont des formes familiales. Le **mélanome familial** est défini par l'existence, dans une famille, d'au moins deux membres atteints de mélanome de la parenté du premier degré ou trois membres de la famille quel que soit le degré de parenté. Des mutations de trois gènes de prédisposition conférant un risque élevé de développer un mélanome ont été mises en évidence. Il s'agit du gène suppresseur de tumeur CDKN2A (Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A) situé en 9p21 et de l'oncogène CDK4 (Cyclin-dependent kinase 4) situé en 12q13 (Fargnoli et al. 2006). En 2011, un nouveau gène de prédisposition a été identifié : BAP1 (BRCA1 (Breast Cancer 1) associated protein 1) dans le mélanome cutané et oculaire (Wiesner et al. 2011). Les mutations du gène CDKN2A sont les plus fréquemment rencontrées en France. Ce gène code pour les deux protéines suppressives de tumeurs : p16 et p14. La protéine p16 entraîne un arrêt du cycle cellulaire en G1. La protéine p14 intervient en inhibant la dégradation de la protéine p53. Des mutations du facteur MITF conférant un risque modéré de développer un mélanome ont été également décrits (Bertolotto et al. 2011;Yokoyama et al. 2011). De plus, de nombreux polymorphismes génétiques fréquents, augmentant modérément le risque de développer un mélanome, ont été également identifiés, appartenant principalement à des gènes de pigmentation notamment sur le gène MC1R (récepteur de type 1 à la mélanocortine) (Fargnoli et al. 2010).

4) Physiopathologie

I – Physiopathologie cellulaire

La mélanomagénèse est conditionnée par l'instabilité génétique cellulaire. Les cellules tumorales acquièrent des propriétés prolifératives et invasives suite à des mutations génétiques successives. Plusieurs modèles de progression du mélanome ont été proposés. Selon le modèle de progression linéaire initialement décrit, un mélanome se développe à partir de mélanocytes sains (Clark, Jr. et al. 1984;Gaggioli and Sahai 2007) (**Figure 3**). La première étape correspond à la prolifération de mélanocytes normaux conduisant au développement d'un naevus. Dans la majorité des cas, ce naevus reste tel quel. Certains naevus, au travers de l'acquisition d'un phénotype dysplasique, se transforment en mélanome à croissance superficielle et prolifère de manière radiale dans l'épiderme (RGP : Radial

Growth Phase). Cette phase est suivie par une phase de croissance verticale (VGP : Vertical Growth Phase) où les cellules tumorales infiltrant le derme. Enfin, les cellules tumorales acquièrent un potentiel métastatique. Cependant dans la majorité des cas, le mélanome apparaît *de novo* et ce modèle n'est donc pas applicable. D'autres modèles ont été proposés. Certaines anomalies moléculaires qui sont à l'origine de la transformation maligne du mélanocyte ont été identifiées. C'est l'acquisition progressive de différentes anomalies génétiques qui va conduire à une perte de contrôle de la prolifération. Par exemple, les mutations activatrices de BRAF apparaissent très précocement dans la majorité des mélanomes et dans les naevus. Ces mutations induisent une prolifération conduisant à des tumeurs mélanocytaires. Les naevus vont arrêter leur croissance cellulaire par acquisition d'un phénotype sénescent. Dans le mélanome, se produit un échappement à la sénescence suivi d'autres anomalies génétiques conduisant à la mélanomagenèse.

II – Physiopathologie moléculaire

Un grand nombre d'altérations moléculaires ont été décrites dans le mélanome. Ces altérations permettent une classification moléculaire du mélanome en sous-groupes. La survenue d'un mélanome est un processus complexe qui associe des mutations induisant une augmentation de la prolifération cellulaire et une inhibition de la sénescence cellulaire. Les principales voies dérégulées dans le mélanome sont les voies impliquées dans la prolifération, la sénescence et l'apoptose. Ces voies sont principalement : la voie des MAP Kinases avec la cascade des protéines RAS/RAF/MEK/ERK via les récepteurs à tyrosine kinase, la voie PI3K/AKT, la voie p16 et p14 avec la cascade CDKN2A/p53, la voie MITF et la voie Wnt/Béta-caténine (**Figure 4**) (Palmieri et al. 2009). Plusieurs cibles potentielles ont été identifiées dans ces voies, dont certaines sont des cibles thérapeutiques actuellement visées par les thérapies ciblées de nouvelle génération (BRAV, MEK).

La voie MAPK joue un rôle particulièrement important dans le cas du mélanome avec une activation constante et irréversible retrouvée dans près de 80% des cas (Fecher et al. 2008; Platz et al. 2008). Plusieurs mécanismes peuvent conduire à cette activation. Une forte association entre des mutations V600 du gène BRAF et le mélanome a été rapportée par Davies en 2002 (Davies et al. 2002). Le gène BRAF code pour une protéine kinase intervenant dans la voie de signalisation des MAPK. La protéine BRAF est une protéine kinase de la famille RAF qui régule les protéines MEK et ERK et joue un rôle dans la prolifération cellulaire et la survie. Elle est située en aval des voies de signalisation de

nombreux récepteurs aux cytokines et aux facteurs de croissance (dont l'EGF) et des protéines Ras. Les gènes BRAF et N-RAS, impliqués dans cette voie de signalisation, sont fréquemment mutés dans le mélanome. La présence de BRAF muté est également détectée dans les naevus bénins et dysplasiques montrant qu'il s'agit d'un évènement précoce dans la progression du mélanome (Pollock et al. 2003). Les mutations de N-RAS sont retrouvées avec une fréquence proche de 20% dans les mélanomes (Goel et al. 2006;Hocker and Tsao 2007). Des mutations du gène BRAF sont observées avec une fréquence comprise entre 40 et 50% des formes métastatiques de mélanome (Davies et al. 2002 ;Hocker and Tsao 2007). Les mutations du codon 600 de BRAF représentent à elles-seules 90% des mutations observées. La mutation la plus fréquemment retrouvée est la mutation V600E (substitution d'un acide glutamique par une valine en position 600). Ces mutations induisent une activation constitutionnelle et irréversible de la protéine kinase BRAF conduisant au découplage de la voie des MAPK et des signaux du micro-environnement cellulaire avec pour principale conséquence la transmission constante d'un signal de prolifération qui concourt au développement du cancer. La découverte des mutations activatrices de l'oncogène BRAF a conduit au développement d'une stratégie de thérapie ciblée inhibant BRAF dont les résultats cliniques ont révolutionné le traitement du mélanome métastatique en améliorant significativement la survie des patients atteints de formes métastatiques.

La kinase c-Kit peut également être sur-activée dans certains mélanomes, une mutation est retrouvée dans 2 à 17% des cas de mélanome. Cette mutation est plus fréquente dans les formes muqueuses ou acro-lentigineuses (Antonescu et al. 2007;Davies and Samuels 2010;Handolias et al. 2010).

La présence de la mutation BRAF V600E n'est ni nécessaire ni suffisante pour induire la formation de mélanomes. D'autres altérations génétiques sont nécessaires pour induire la transformation complète des mélanocytes telle que l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeurs tels que PTEN, CDKN2A ou p53 (Haluska et al. 2006) ou l'activation de la voie PI3K/AKT, de la voie MITF. L'acquisition d'un phénotype invasif lors de la dissémination des cellules tumorales passe par des modifications de l'expression de diverses protéines d'adhésions (cadhérines, intégrines) s'intégrant au processus plus complexe dit de « transition épithélio-mésenchymateuse » qui conduit une cellule épithéliale à acquérir l'ensemble des capacités lui permettant de survivre, proliférer et migrer dans un environnement mésenchymateux (Miller and Mihm, Jr. 2006;Zaidi et al. 2008). Plusieurs gènes de susceptibilité au mélanome ont été identifiés dans des formes familiales (CDKN2A, CDK4). Des mutations spontanées ont été observées dans plusieurs gènes et

ont été proposés pour participer à différents stades de progression du mélanome. Il a été mis en évidence la présence de plusieurs gènes dont l'expression est altérée dans le mélanome par des modulations épigénétiques (Zaini et al. 2008) (**Figure 3**).

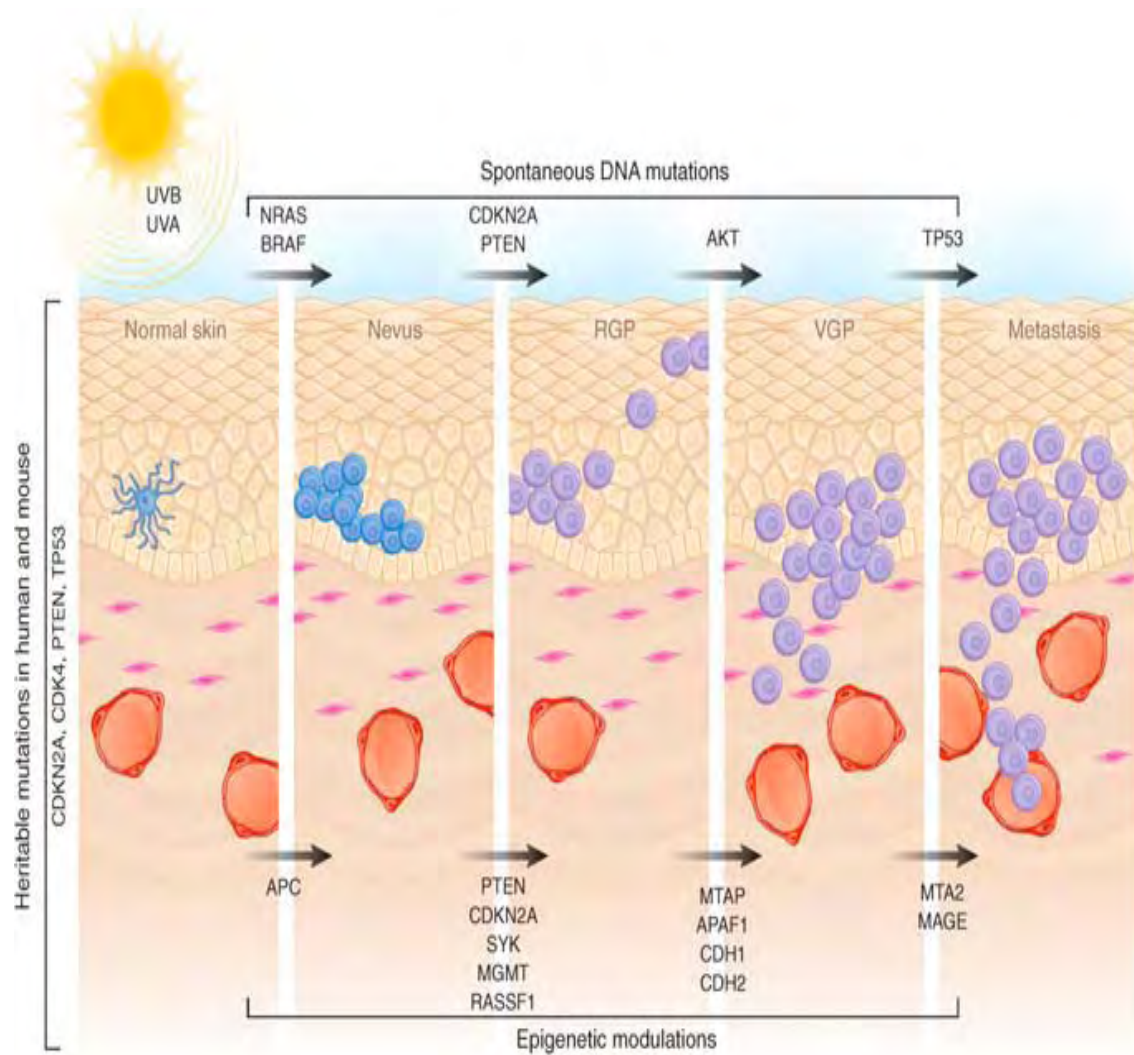


Figure 3. Modèle proposé concernant la physiopathologie cellulaire et moléculaire du mélanome d'après Zaidi, 2008 (Zaini et al. 2008). Le modèle, discuté, de progression linéaire propose le développement d'un mélanome à partir d'un naevus. Ainsi, la prolifération aberrante des mélanocytes normaux, en réponse aux rayonnements UV, aboutit à la formation de naevus bénins et de naevus dysmorphiques. La phase de croissance radiale (RGP) du mélanome correspond à une prolifération cellulaire intra-épidermique suivie de l'invasion du derme dans la phase de croissance verticale (VGP) et aboutissant à la phase métastatique. Plusieurs gènes de susceptibilité ont été identifiés dans les formes familiales (mutations CDKN2A, CDK4). Des mutations spontanées de l'ADN ont été observées dans plusieurs gènes (BRAF, NRAS, PTEN, AKT, P53) et pourraient participer à différents stades de progression du mélanome. Des études récentes ont également mis en évidence la présence de plusieurs gènes dont l'expression est altérée par des modulations épigénétiques. Ce modèle est actuellement débattu et laisse progressivement place à un modèle micro-environnemental dans lequel la cellule tumorale et son environnement interagissent de manière étroite dans chacune des phases de la progression tumorale.

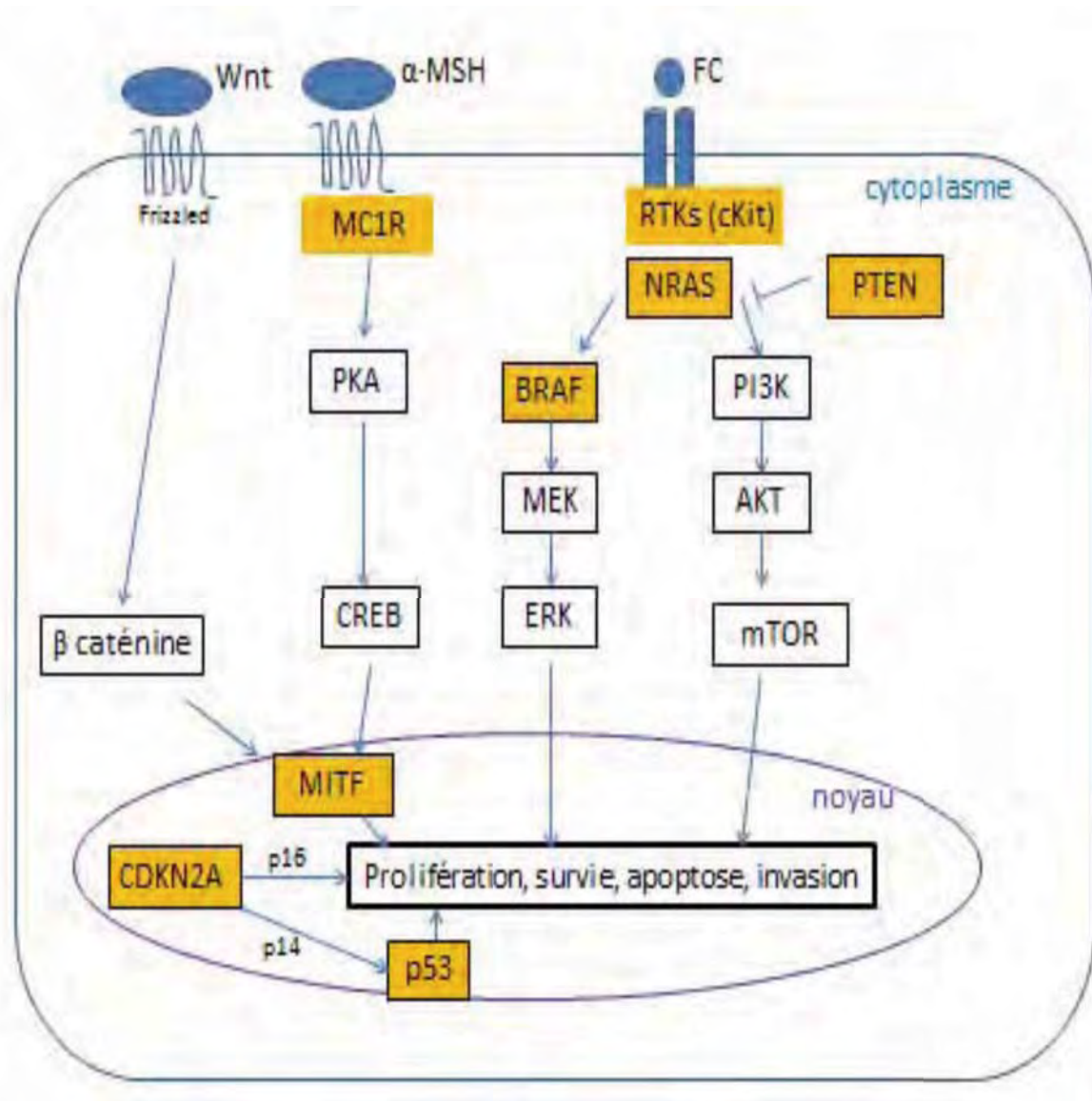


Figure 4. Représentation simplifiée des principales cascades de signalisation impliquées dans le développement des mélanomes. Les voies MAPK (NRAS/BRAF/MEK/ERK), voie PI3K/AKT et voie MITF sont impliquées dans la prolifération, l'apoptose et la survie cellulaire dans le mélanome. Les protéines en orange sont codées par des gènes fréquemment mutés ou amplifiés dans le mélanome. Figure adaptée et simplifiée de Palmieri (Palmieri et al. 2009).

5) Formes anatomo-cliniques du mélanome cutané :

Quatre formes anatomo-cliniques principales de mélanome cutané ont été décrites :

- Le mélanome à extension superficielle (SSM : Superficial Spreading Melanoma) qui représente la majorité des cas de mélanome
- Le mélanome nodulaire (NM)
- Le mélanome de Dubreuilh (LMM : Lentigo Maligna Melanoma)
- Le mélanome acral-lentigineux (ALM).

Le mélanome à extension superficielle est d'évolution biphasique comportant une phase de croissance horizontale intra-épidermique (mélanome *in situ*) qui précède de plusieurs mois à plusieurs années, une phase de croissance verticale. Pendant sa phase de croissance horizontale, le mélanome se présente sous la forme d'une lésion pigmentée hétérogène à contours irréguliers polycycliques, de couleur inhomogène ou polychrome sans relief à la palpation. Pendant sa phase de croissance verticale, il peut devenir accessible à la palpation.

Le mélanome nodulaire a une définition anatomo-pathologique (absence de composante latérale intra-épidermique ou intéressant moins de trois crêtes épidermiques) et clinique (nodule de couleur noire, parfois achromique, ferme, arrondi, pouvant s'ulcérer, se recouvrir d'une croûte, suinter ou saigner). C'est une forme d'emblée invasive (sans phase d'extension horizontale), il a une croissance rapide et acquiert un potentiel métastatique en quelques semaines à quelques mois.

Le mélanome de Dubreuilh est observé sur les zones photoexposées du visage. Il se présente sous la forme de taches pigmentées, inhomogènes observées sur les zones photoexposées chez le sujet âgé (visage principalement). La phase de croissance horizontale intra-épidermique dure plusieurs années puis vient la phase d'envahissement vertical.

Le mélanome acral-lentigineux est observé sur les paumes des mains ou plantes de pieds, les ongles, sur des zones cutanées non exposées au soleil. Leur phase radiale est longue et leur phase verticale est agressive.

En France, les mélanomes les plus fréquemment observés sont le mélanome à extension superficielle qui représente entre 60 et 70% des mélanomes identifiés puis les mélanomes nodulaires (4-18%), le mélanome de Dubreuilh (6-8%) et enfin le mélanome acral-lentigineux (2-6%) (Benoit-Corven 2003;Besset 2000).

Un mélanome cutané peut donc se développer soit en deux temps (phase horizontale puis verticale) pour les formes SSM, LMM et ALM soit en un temps (phases horizontales et verticales synchrones) pour la forme nodulaire. Plus la phase horizontale est longue, plus le diagnostic peut se faire avant l'invasion verticale. Cependant à invasion tumorale identique, toutes ces formes ont le même pronostic.

6) Le diagnostic de mélanome

Le mélanome est suspecté à l'examen clinique. Son diagnostic repose sur l'examen anatomopathologique de la lésion enlevée en totalité.

I – L'examen clinique

L'examen clinique fait appel à trois méthodes : deux méthodes analytiques visuelles, qui sont la règle ABCDE et la liste révisée des sept points du groupe de Glasgow; et une méthode cognitive visuelle.

A – La démarche analytique visuelle

L'orientation du diagnostic clinique repose sur l'analyse sémiologique de la lésion pigmentée à l'aide de la règle ABCDE. Cette règle a été créée comme un cadre servant à l'éducation des patients à l'auto-dépistage. Selon la **règle ABCDE** décrite par Friedman en 1985 (Friedman et al. 1985) et modifiée par Thomas en 1998 (Thomas et al. 1998), une lésion susceptible d'être un mélanome est :

- **Asymétrique** (critère A)
- avec des **Bords** irréguliers, encochés, polycycliques, bien délimités (critère B).
- de **Couleur** inhomogène, du brun clair au noir foncé (critère C)
- de **Diamètre** généralement supérieur à 6 millimètres (critère D).
- **Evolutive** dans sa taille, sa couleur, son épaisseur (critère E).

La règle ABCDE basée sur ces cinq critères est la méthode la plus enseignée en France. Une lésion mélanocytaire est considérée comme suspecte si deux de ces critères sont validés. Le critère E est le critère le plus sensible.

La liste révisée des sept points du groupe de Glasgow, dérivée de la règle ABCDE, dite « règle des sept points du groupe de Glasgow » a été publiée en 1989 par Mackie (Mackie RM. 1989). Cette règle prend en compte trois critères majeurs (couleur, croissance, forme), quatre critères mineurs (inflammation, ulcération/saignement, sensibilité, taille) et donne une place prépondérante au concept de l'évolution.

B – La démarche cognitive visuelle

Chez un sujet donné, les naevus ont un aspect clinique homogène, chaque naevus ressemblant grossièrement aux autres. Une lésion mélanocytaire est considérée comme suspecte si elle est cliniquement différente des autres naevus du patient dans sa forme, sa couleur ou son épaisseur. C'est la règle dite « du vilain petit canard – Ugly duckling sign ».

C – L'examen dermoscopique

Le dermatologue peut compléter l'examen d'un naevus suspect par un dermoscope qui permet une visualisation *in vivo* non invasive des structures cutanées épidermiques,

dermo-épidermiques et dermiques accessibles ou non accessibles à l'œil nu. Certains sont couplés avec un système de capture d'images, appelé la vidéomicroscopie, qui permet un enregistrement et une comparaison dans le temps, facilitant ainsi la mise en évidence de l'évolutivité d'une lésion. Elle permet une documentation de toutes les lésions pigmentées d'un patient et l'acquisition d'images numériques grâce à une caméra vidéo pour une comparaison dans le temps de ces images.

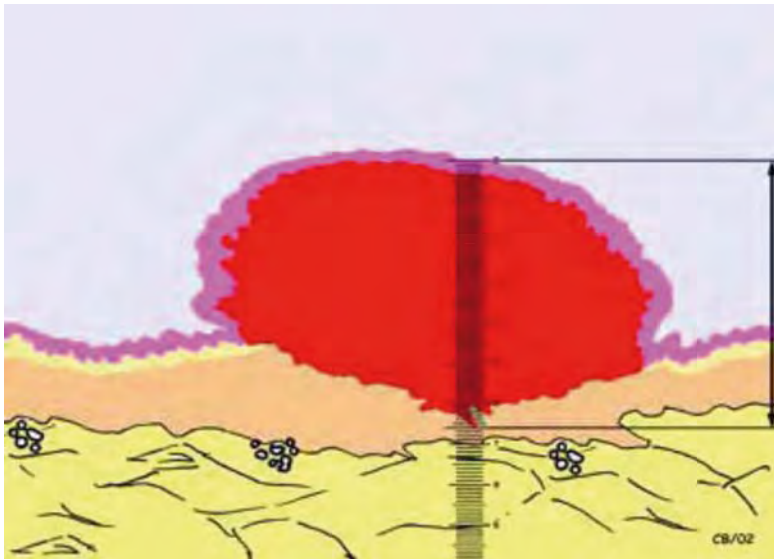
II – L'examen anatomo-pathologique

Le diagnostic est établi sur l'examen anatomo-pathologique. Il se fait sur une exérèse complète de la lésion. L'analyse histologique va confirmer le diagnostic clinique en authentifiant la nature mélanocytaire de la lésion et sa malignité. Une immunohistochimie peut être réalisée pour confirmer la nature mélanique. Les anticorps qui peuvent être utilisés sont la protéine S100, Melan A/ MART-1, HMB-45 (Human Melanoma Black-45). La malignité repose sur des critères histologiques et architecturaux dont l'interprétation nécessite de la part de l'anatomopathologiste un niveau minimal d'expertise dans la lecture des lésions cutanées. Lorsque le mélanome est avéré, l'analyse permet de déterminer le type histologique (mélanome SSM, nodulaire, de Dubreuilh ou acral-lentigineux). L'analyse va également déterminer des critères pronostiques :

- **L'indice de Breslow (Figure 5A)** qui est l'épaisseur maximale de la tumeur en millimètre. La mesure s'effectue au microscope à l'aide d'un micromètre.
- le **niveau d'invasion de Clark (Figure 5B)** défini par l'indice de Clark allant de I à V (niveau I : mélanome *in situ* intra-épidermique, niveau II : quelques mélanocytes atypiques infiltrant le derme papillaire, niveau III : infiltration du derme papillaire, niveau IV : infiltration du derme réticulaire, niveau V : atteinte de l'hypoderme).
- l'existence ou non d'une zone de régression
- l'existence ou non d'une **ulcération**.
- **L'activité mitotique** ou index mitotique (comptage du nombre de mitose par mm²)
- La présence de lymphocytes infiltrant la tumeur.

L'examen va également vérifier l'état des marges d'exérèse en tissu sain ou non pour s'assurer de l'absence de résidu tumoral.

A)



Indice
de

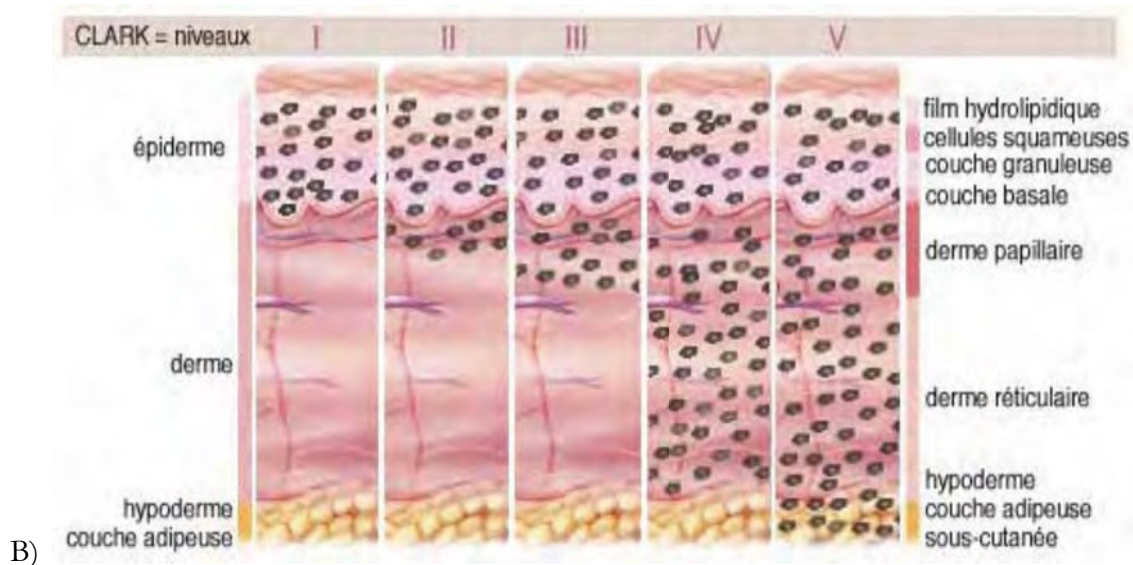


Figure 5. Indice de Breslow (A) et indice de Clark (B). L'indice de Breslow traduit l'épaisseur en millimètre de la lésion (HAS 2012) (HAS 2012 mélanome 12 A.D.). L'indice de Clark traduit le niveau d'infiltration en profondeur de la lésion. (InfoCancer 14 A.D.) (<http://www.arcagy.org/infocancer/localisations/autres-cancers/melanome/formes-de-la-maladie/la-stadification.html>).

7) Classification des mélanomes

I – La classification actuelle

La classification du mélanome utilisée est celle établie par l'AJCC (American Joint Committee on Cancer). Actuellement la dernière édition utilisée est la 7^{ème} édition (AJCC Melanoma Staging and Classification) (Balch et al. 2009). C'est une classification pronostique. Cette révision récente de la classification prend en compte l'index mitotique pour les mélanomes de faible épaisseur. La 6^{ème} édition avait pris en compte l'ulcération de

la tumeur primitive et le statut du ganglion sentinelle s'il est pratiqué. Le ganglion sentinelle correspond au premier ganglion lymphatique assurant le drainage de la tumeur. L'envahissement métastatique du ganglion sentinelle est le principal facteur de mauvais pronostic des mélanomes d'épaisseur intermédiaire (épaisseur selon Breslow comprise entre 1 et 4 mm).

Après l'exérèse chirurgicale, la classification utilisée est la classification pTNM (p « pathologic » provenant des analyses histologiques, T pour « Tumor », N pour « Node » ganglion, M pour « métastase ») (**Tableau 1A**) et la classification en stades de I à IV (critères diagnostiques et histologiques) (**Tableau 1B**). Cette classification permet d'avoir une évaluation pronostique et guide la prise en charge des patients. Des recommandations nationales et internationales sont régulièrement émises pour guider les cliniciens dans l'organisation de la prise en charge thérapeutique et de la surveillance des patients atteints de mélanome.

II – Les indicateurs pronostiques actuels

A – Le stade clinique

Le pronostic du mélanome est lié à son stade clinique au moment du diagnostic. Il existe quatre stades : les stades I et II sont des mélanomes localisés, le stade III correspond à des mélanomes avec métastases loco-régionales ganglionnaires ou cutanées et le stade IV correspond à des mélanomes avec des métastases à distance. Le stade va être déterminé par l'examen clinique et histologique associé au bilan d'extension. Dans 84% des cas, le mélanome est diagnostiqué à un stade localisé (National Cancer Institute 2009, <http://seer.cancer.gov/statfacts/html/melan.html>).

Dans la majorité des cas, le mélanome est une tumeur de bon pronostic lorsqu'il est diagnostiqué avec une épaisseur faible (inférieure à 1mm selon Breslow). La survie dépend du stade de la maladie au moment du diagnostic : les survies relatives à 5 ans sont estimées à 98% pour les stades localisés (**Figure 6A**), 62% pour les stades III (**Figure 6B**) alors qu'elle est inférieure à 20% en cas de métastase (SEER 2003-2009) (Horner et al. 2009). La médiane de survie au stade métastatique est de 6,5 mois en cas de traitement « conventionnel » et proche de 13 mois pour les patients présentant une réponse aux inhibiteurs de BRAF V600. Actuellement, il n'existe pas de traitement curatif pour les stades métastatiques.

T	Epaisseur de la tumeur (mm)	Ulcération/Mitoses
Tis	NA	NA
T1	≤ 1,0	a : sans ulcération et mitose < 1/mm ² b : ulcération et/ou mitoses ≥ 1/mm ²
T2	1,01 – 2,0	a : sans ulcération b : avec ulcération
T3	2.01 – 4.0	a : sans ulcération b : avec ulcération
T4	> 4.0	a : sans ulcération b : avec ulcération
N	Nombre de ganglions envahis	Micro/Macrométastases
N0	aucun	NA
N1	1	a : micrométastase* b : macrométastase**
N2	2-3	a : micrométastase* b : macrométastase** c : métastase(s) en transit et/ou nodule(s) satellite(s) sans ganglion métastatique
N3	≥ 4 ganglions métastatiques ou ganglions fixés ou métastase(s) en transit ou nodule(s) satellite(s) avec ganglion(s) métastatique(s)	
M	Site	LDH sérique
M0	Pas de métastase à distance	NA
M1a	Cutané, sous-cutané ou ganglionnaire à distance	Normale
M1b	Poumon	Normale
M1c	Tout autre site métastatique viscéral Tout site métastatique	Normale Elevée

Tableau 1A : Classification TNM du mélanome cutané – AJCC 2009 (Balch et al. 2009)

* : les micrométastases sont diagnostiquées après analyse du ganglion sentinelle.

** : les macrométastases sont détectées par l'examen clinique et confirmées par l'examen anatomopathologique.

NA : non applicable, LDH : lactate déshydrogénase

	Classification clinique*			Classification histologique**			
	T	N	M		T	N	M
0	Tis	N0	M0	0	Tis	N0	M0
IA	T1a	N0	M0	IA	T1a	N0	M0
IB	T1b	N0	M0	IB	T1b	N0	M0
	T2a	N0	M0		T2a	N0	M0
IIA	T2b	N0	M0	IIA	T2b	N0	M0
	T3a	N0	M0		T3a	N0	M0
IIB	T3b	N0	M0	IIB	T3b	N0	M0
	T4a	N0	M0		T4a	N0	M0
IIC	T4b	N0	M0	IIC	T4b	N0	M0
III	Tout T	N > N0	M0	IIIA	T1-4a	N1a N2a	M0
				IIIB	T1-4b T1-4a	N1a N2a N1b N2b N2c	
				IIIC	T1-4b Tout T	N1b N2b N2c N3	
IV	Tout T	Tout N	M1	IV	Tout T	Tout N	M1

Tableau 1B : Classification anatomopathologique du mélanome cutané – AJCC 2009 (Balch et al. 2009)

* La classification clinique inclut l'analyse histologique de la tumeur primitive et l'évaluation clinique et/ou radiologique des métastases ; par convention, elle doit être utilisée après exérèse complète du mélanome primitif avec évaluation clinique des métastases régionales et à distance.

** La classification histologique inclut l'analyse histologique de la tumeur primitive et l'examen anatomopathologique des ganglions régionaux après exérèse partielle analyse du ganglion sentinelle ou curage ganglionnaire ; les patients de stades histologiques 0 et IA sont l'exception : ils ne nécessitent pas l'évaluation histologique des ganglions régionaux.

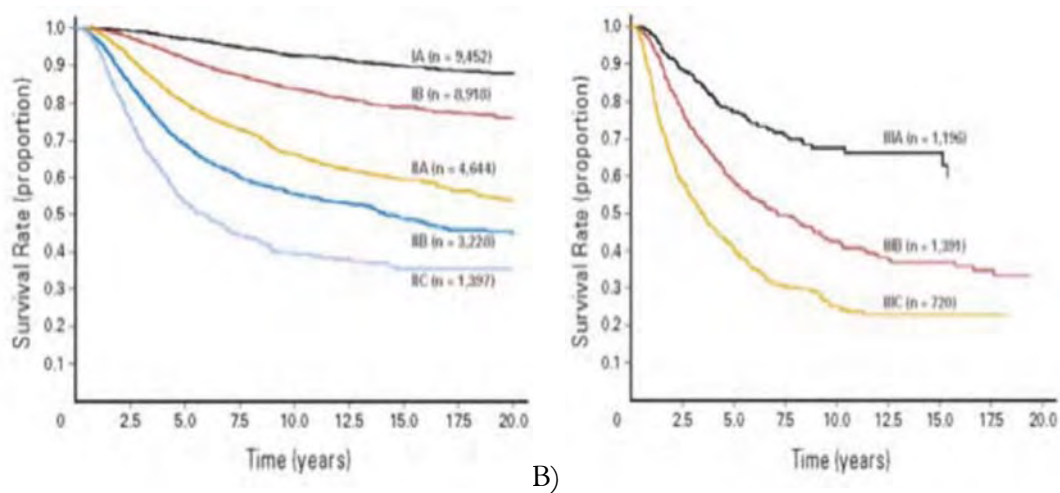


Figure 6. Courbes de survie pour les stades I-II (A) et III (B) de mélanome- AJCC 2009 (Balch et al. 2009)

B – L'indice de Breslow

L'indice de Breslow est le facteur pronostique le plus important pour les stades I, II et III. Il est prédictif des taux de survie à 10 ans. La survie à 10 ans est de 92%, 80%, 63% et 50% pour des indices de Breslow respectivement inférieur ou égal à 1 mm, entre 1,01 et 2 mm, entre 2,01 et 4 mm et supérieur à 4 mm (Balch et al. 2009).

C – Les autres indicateurs pronostiques

La classification AJCC est une classification pronostique se basant sur le stade clinique et l'indice de Breslow et elle est complétée par d'autres facteurs pronostiques en fonction du stade.

Pour les stades localisés, stades I et II, la classification tient compte de la présence ou non d'une ulcération et de l'index mitotique. Les facteurs pronostiques défavorables sont la présence d'une ulcération et un index mitotique élevé, ce dernier ayant remplacé le niveau de Clark dans la classification actuelle. Pour les mélanomes d'épaisseurs inférieures ou égales à 1 mm, le nombre de mitose dermique par mm² (appelé index mitotique) doit être précisé. L'ulcération a une valeur pronostique majeure qui persiste au stade ganglionnaire. L'index mitotique a une valeur pronostique valable pour toutes les épaisseurs de mélanome primaire.

Pour les stades d'envahissement cutané ou ganglionnaire loco-régional (III), le statut du ganglion sentinelle est pris en compte. La recherche du ganglion sentinelle est effectuée dans le but de préciser le stade du mélanome et la prise en charge qui en résulte. La

positivité du ganglion sentinelle classe le patient en stade III. Cet examen peut mettre en évidence des métastases ganglionnaires infra-cliniques et infra-radiologiques (dites « micro-métastases », ganglion sentinelle positif). Le ganglion sentinelle est prélevé et soumis à un examen anatomopathologique. Le statut du ganglion sentinelle est un facteur pronostic identifié et participe à la détermination du stade. C'est une procédure qui est encore débattue, en effet, l'exérèse du ganglion sentinelle, même suivie d'un curage ganglionnaire, n'a pas démontré d'efficacité en termes d'amélioration de la survie globale (Morton et al. 2006). Cependant, malgré l'absence de mise en évidence de gain thérapeutique de la procédure de ganglion sentinelle, cette procédure, est le moyen le plus sensible de mettre en évidence les métastases ganglionnaires infra-cliniques qui définissent le stade IIIa de la classification AJCC 2009 ; et les méta-analyses de la survie réalisées pour cette nouvelle version de la classification montrent une survie significativement meilleure pour les patients présentant une maladie stade IIIa.

Au stade de dissémination métastatique (IV), la localisation des métastases (**Figure 7A**) influence le pronostic ainsi que le taux de LDH sérique (**Figure 7B**). Les métastases cutanées sont de meilleur pronostic que les métastases pulmonaires, les métastases viscérales extra-pulmonaires celles de moins bon pronostic, les localisations cérébrales étant les localisations secondaires les plus sévères en termes de survie.

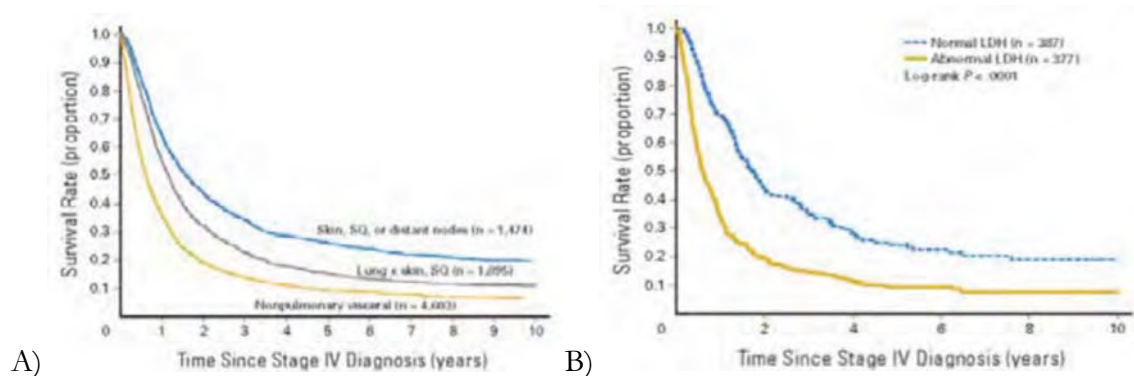


Figure 7. Courbe de survie des stades IV de mélanome en fonction de la localisation des métastases (A) et du taux de LDH (B) - AJCC 2009 (Balch et al. 2009)

Seuls deux biomarqueurs sérologiques sont actuellement connus : la protéine S100 β et la lactate déshydrogénase (LDH). Le seul marqueur pronostique validé pour la pratique courante dans le mélanome métastatique est la LDH. C'est un marqueur aspécifique ancien, qui relate approximativement de la masse tumorale de nombreuses tumeurs dont le mélanome. Sa concentration plasmatique semble être un facteur pronostique indépendant pour les stades IV (Agarwala et al. 2009). Des études comparant LDH et protéine S100 β montrent que la concentration de LDH est le facteur pronostique indépendant le plus

puissant dans les stades IV de mélanome (Deichmann et al. 1999). Ainsi, en raison de son statut pronostique, de sa méthode de détection facile, la concentration sérique de LDH est le seul marqueur moléculaire à avoir été inclus dans la classification actuelle du mélanome de l'AJCC (septième édition) pour les stades IV de mélanome (Balch et al. 2009).

La classification pronostique actuelle guide la prise en charge thérapeutique des patients. Cependant, l'ensemble des indicateurs pronostiques actuels ne permet pas de définir avec certitude le pronostic pour un patient donné. Ces indicateurs restent insuffisants pour appréhender l'hétérogénéité du mélanome. En terme de pronostic, une valeur péjorative a été attribuée à la présence de la mutation BRAF (Safaei et al. 2012) ou NRAS (Jakob et al. 2012) par certaines équipes. Cependant, cela ne permet pas d'améliorer la classification actuelle.

Il apparaît important de trouver de nouveaux outils permettant de distinguer les mélanomes dont le potentiel évolutif est réellement inquiétant, de ceux dont la prise en charge initiale permettra une guérison sans récurrence.

8) Les thérapeutiques du mélanome cutané

Le choix du traitement dépend du stade de la maladie, de la localisation, de l'histologie et de l'état général du patient (HAS 2012 mélanome 12 A.D.; Institut National du Cancer 14 A.D.). Alors que les stades précoces sont traités le plus souvent efficacement par chirurgie exclusive, il n'existe pas de traitement curatif pour les stades métastatiques. Le traitement médical du mélanome peut faire appel à l'immunothérapie, la chimiothérapie, la radiothérapie ou aux nouvelles thérapies ciblées ou d'immunothérapie (inhibiteurs de BRAF V600, de MEK, du CTLA-4 ou du PD-1) après discussion en réunion de concertation pluridisciplinaire (RCP).

I – La chirurgie

La chirurgie est le traitement de référence du mélanome cutané non métastatique. L'exérèse chirurgicale de la tumeur primitive est le seul traitement curatif. Une reprise élargie de l'exérèse, adaptée à l'indice de Breslow, est systématiquement réalisée après diagnostic histopathologique. Après l'exérèse chirurgicale, la classification pTNM est utilisée. En cas d'atteinte ganglionnaire, le curage ganglionnaire est le traitement standard. Certaines équipes recommandent, en plus, une radiothérapie complémentaire sur le lit du curage ganglionnaire en cas d'atteinte massive, mais celle-ci reste débattue et le niveau de preuve scientifique de cette procédure est restreint. En cas de maladie métastatique de

faible volume, l'exérèse chirurgicale des métastases doit être systématiquement discutée, mais celle-ci reste anecdotique du fait de la rareté des situations cliniques l'autorisant.

II – L'immunothérapie

Le système immunitaire est très impliqué dans le développement des mélanomes. Les traitements reposant sur l'immunothérapie ont pour objectif de rompre la tolérance de l'organisme vis-à-vis du mélanome et de favoriser la destruction de la tumeur par les cellules du système immunitaire. L'immunothérapie par interféron alpha peut être proposée en traitement adjuvant à partir des stades II. Elle débute rapidement après la chirurgie et dure entre 1 an et 18 mois. C'est un traitement dont le rapport bénéfice/risque est réduit et qui reste controversé selon les équipes médicales.

III – La chimiothérapie

Une chimiothérapie peut être proposée pour le traitement des mélanomes avec atteinte cutanée ou ganglionnaire non résécable ou métastatique viscérale. Les médicaments utilisés en première ligne thérapeutique sont principalement la dacarbazine (DETICENE®), la fotemustine (MUPHORAN®) en particulier en cas de métastases cérébrales et le témozolomide (TEMODAL®). Ce sont des agents alkylants. Ces molécules sont actuellement de moins en moins utilisées du fait d'une efficacité très modeste, et progressivement remplacées par les nouvelles thérapies spécifiques.

IV – La radiothérapie

La radiothérapie peut être utilisée en traitement adjuvant. Elle constitue le traitement standard pour les métastases osseuses ou cérébrales symptomatiques.

V – Les nouveaux traitements

Ces dernières années, de nouvelles molécules sont apparues pour la prise en charge des formes métastatiques avec un bénéfice significatif sur la survie des patients. Ces molécules sont soit des thérapies ciblées soit de l'immunothérapie. En particulier, deux nouveaux traitements sont actuellement disponibles à la commercialisation avec une AMM (Autorisation de Mise sur le Marché) permettant leur utilisation pour le traitement des formes non-réséquables et/ou métastatiques de mélanome. Il s'agit des thérapies ciblées avec des inhibiteurs de la forme mutée de BRAF : vemurafenib (ZELBORAF®) et dabrafenib (TAFINLAR®) et de l'immunothérapie par ipilimumab (YERVOY®, anti-

CTLA-4). Ces traitements ont amélioré la médiane de survie sans progression dans le traitement du mélanome métastatique dans des études de phase III distinctes et ont apporté de nouvelles perspectives dans la prise en charge des patients atteints de mélanome (Chapman et al. 2011; Hauschild et al. 2012; Hodi et al. 2010).

Les inhibiteurs de BRAF sont exclusivement utilisés dans le traitement des mélanomes porteurs d'une mutation V600 à un stade avancé non résecable ou métastatique. L'essai clinique de phase III de l'étude BRIM-3 (Chapman et al. 2011) a montré que 84% des patients avec une mutation BRAF V600E traités par vemurafénib, étaient vivants 6 mois après le début de l'étude contre 64% pour les patients traités par dacarbazine (chimiothérapie de référence en monothérapie). La survie sans progression était supérieure pour les patients sous vemurafénib (5,3 mois versus 1,6 mois). La médiane de survie était de 13,6 mois chez les patients sous vemurafénib contre 9,7 mois pour ceux sous dacarbazine. Dans l'étude BREAK-3, les patients sous dabrafénib ont présenté une amélioration de la survie sans progression par rapport à la dacarbazine (5,1 mois versus 2,7 mois) (Hauschild et al. 2012).

Les molécules reposant sur l'immunothérapie ont pour but de rompre la tolérance immunitaire vis-à-vis du mélanome et ainsi de favoriser la destruction des cellules tumorales par le système immunitaire. La molécule CTLA-4 (Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4), exprimée à la surface des lymphocytes T, interagit avec les molécules B7 (CD80, CD86 (CD : cluster of differentiation)) à la surface des cellules dendritiques. Le signal passant par la molécule CTLA-4 est inhibiteur et régule négativement l'activation lymphocytaire T. L'ipilimumab est un anticorps monoclonal inhibant ce processus de rétrocontrôle et favorisant l'activation des populations lymphocytaires à spécificité anti-tumorale. L'étude de phase III, comparant l'ipilimumab associé ou non au vaccin glycoprotéine gp100, a montré une amélioration de la survie globale sous ipilimumab avec ou sans gp 100 par rapport au vaccin seul (10 mois versus 6,4 mois) (Hodi et al. 2010). Des études et des essais sont en cours pour d'autres molécules comme par exemple la vaccination par des antigènes tumoraux spécifique du mélanome comme MAGE-3 (Melanoma-associated antigen 3), des inhibiteurs de MEK (étude METRIC) (Flaherty et al. 2012), des inhibiteurs de PD-1, des inhibiteurs de PD-L1, avec des résultats précoces encourageants. En particulier, les inhibiteurs de PD-1, ciblant les récepteurs PD-1 exprimé par les lymphocytes T, semblent très prometteurs en permettant une levée d'inhibition de la réponse immune et ainsi une régression tumorale (Hamid et al. 2013). Les associations des

molécules d'immunothérapie entre elles ou entre immunothérapie et thérapie ciblée semblent prometteuses et sont étudiées actuellement dans différents essais cliniques.

VI – Stratégie thérapeutique

Les options thérapeutiques sont discutées en fonction du stade, de la localisation et de l'espérance de vie (**Tableau 2**) (recommandations dans le mélanome cutané - HAS 2012 et recommandations dans le mélanome métastatique - INCA 2013) (HAS 2012 mélanome 12 A.D.; Institut National du Cancer 14 A.D.). La chirurgie est le traitement de référence du mélanome cutané non métastatique. Elle est réalisée seule dans les stades I et peut être associée à une immunothérapie par interféron alpha à faibles doses pour les stades II. Pour les stades III, un curage ganglionnaire est réalisé et peut être associé à une immunothérapie par interféron alpha à fortes doses ou à une radiothérapie. Une chimiothérapie est proposée dans les formes non résecables. Dans les stades IV, le choix thérapeutique tient compte de l'espérance de vie, de l'indice de performance de l'Organisation mondiale de la santé, du nombre et de la localisation des métastases. L'exérèse chirurgicale des métastases doit être systématiquement discutée éventuellement associée à une radiothérapie. Le traitement des mélanomes cutanés métastatiques non résecables (stades IIIc, IV) repose sur le statut mutationnel BRAF de la tumeur. Le traitement en première ligne, en cas de présence d'une mutation du gène BRAF, repose sur le vémurafénib en monothérapie ou la dacarbazine en fonction du mode évolutif. En deuxième ligne, il peut être envisagé de débiter une autre monothérapie (dacarbazine, témozolomide, ipilimumab). En l'absence de mutation BRAF, la chimiothérapie de référence en première ligne reste la dacarbazine en monothérapie et une autre monochimiothérapie en deuxième ligne. Dans ces formes non résecables, les durées de réponse étant en général inférieures à un an, l'inclusion des patients dans des essais thérapeutiques reste une priorité.

Stade TNM	Chirurgie	Curage ganglionnaire	Immunothérapie	Chimiothérapie	Radiothérapie
Stade I	oui				
Stade II	oui		discuté		
Stade III*	oui	oui	discuté		discuté
Stade IV	discuté	discuté	discuté	discuté	discuté

* le stade III inopérable rejoint le stade IV

Tableau 2 : Stratégies thérapeutiques en fonction du stade du mélanome - Recommandations HAS Janvier 2012 (HAS 2012 mélanome 12 A.D.).

La prise en charge thérapeutique à un stade précoce (stades I et II-AJCC) est essentiellement chirurgicale avec un taux de guérison à 10 ans qui s'approche des 90% pour les stades I. Par contre, le taux de guérison chute dans les formes les plus avancées avec un taux de survie moyen à 10 ans de 30% pour les stades III AJCC et inférieur à 10% pour les stades IV AJCC (Balch et al. 2001).

9) Dépistage et prévention

La détection du mélanome cutané à un stade précoce est importante pour la guérison du patient. La prévention et le dépistage précoce sont essentiels. Le risque lié à l'exposition solaire ou aux UV artificiels est le seul facteur de risque sur lequel il est possible d'intervenir en sensibilisant les populations à la protection vis-à-vis de ce risque.

La prévention primaire consiste à lutter contre une exposition aux UV (facteur de risque majeur) par une photoprotection efficace. Elle consiste à recommander le port de vêtements couvrants (tee-shirt, casquette, pantalon) aux heures d'ensoleillement intense et en particulier pour les enfants, à éviter l'exposition solaire aux heures d'ensoleillement maximum entre 12h et 16h et d'appliquer de façon adéquate des écrans solaires. Ces mesures ont fait l'objet de recommandations de la HAS (HAS Juillet 2012).

La prévention secondaire consiste à identifier les sujets à risque et à reconnaître les lésions suspectes par autosurveillance et à se soumettre à un examen dermatologique régulier. La fréquence de l'examen de dépistage sera adaptée aux caractéristiques phénotypiques, à l'historique du patient et de sa famille et aux signes cliniques de photoinsolation.

Des campagnes d'information et de sensibilisation de la population sont régulièrement réalisées. Depuis 1998, le syndicat des dermatologues organise une journée nationale de dépistage soutenue par l'Institut National du Cancer. Cette journée n'assure pas un dépistage de la totalité de la population, mais permet de sensibiliser la population générale à l'importance d'un examen dermatologique régulier et d'une photoprotection efficace.

10) Perspectives

Le mélanome cutané est une des tumeurs malignes dont la fréquence augmente le plus. C'est une pathologie qui touche tous les âges même si elle est rare chez l'enfant. Il est important de le diagnostiquer tôt car la majorité des formes localisées guérissent. Une fois

la maladie devenue métastatique, le pronostic reste très sombre malgré les récents progrès thérapeutiques.

L'indice de Breslow est le facteur pronostique indépendant le plus robuste dans le mélanome localisé et guide la conduite thérapeutique à tenir et les modalités de surveillance. Dans certains cas, il ne représente pas un indicateur suffisant pour prédire le comportement futur du mélanome et les informations qu'il fournit ne permettent pas de discriminer avec suffisamment de précision les populations nécessitant une prise en charge thérapeutique d'emblée intensifiée. L'identification des mélanomes à haut risque de développer des métastases locales ou à distance et l'identification d'un marqueur précoce de récurrence demeurent des enjeux importants dans la prise en charge des patients. De nombreuses recherches s'intéressent à la détection de biomarqueurs prédictifs du caractère agressif du mélanome, de la récurrence ou de la réponse aux traitements afin d'améliorer la prise en charge du mélanome. Cependant aucune n'a actuellement permis de valider un nouveau biomarqueur pour la pratique clinique courante. Un nombre croissant d'études montre que les microARNs ont des rôles oncogènes ou suppresseurs de tumeurs dans une large variété de cancers dont le mélanome. De plus, certains microARNs sont impliqués dans le processus de métastase (Zhang et al. 2010a). Ils sont actuellement activement étudiés en oncologie. Nous allons, dans la partie suivante, décrire les connaissances sur les microARNs.

Deuxième partie: Les microARNs

Notre étude a porté sur l'étude des microARNs plasmatiques dans le mélanome. Nous aborderons dans une première partie les connaissances générales sur les microARNs (miARNs) puis leurs rôles dans l'oncogénèse et dans le mélanome enfin nous décrirons leurs formes circulantes.

1) Généralités sur les microARNs

La découverte en 1993 chez le nématode *C. elegans* puis la description détaillée en 2001 des microARNs, classe de courts ARNs non codants, capables d'inhiber l'expression d'un gène, a révolutionné la biologie (Lagos-Quintana et al. 2001).

I – Définition

Les microARNs sont des molécules d'ARN de petite taille de 19 à 25 nucléotides, simple brin, non codants et endogènes. Ils contrôlent l'expression génique au niveau post-transcriptionnel.

L'expression génique commence par l'étape de transcription qui permet la synthèse d'ARN à partir d'ADN grâce à des ARN polymérases soit de type I, de type II ou de type III pour respectivement la synthèse d'ARN ribosomique (ARNr), messagers (ARNm) et de transfert (ARNt). La transcription des ARN messagers nécessite au préalable la liaison de facteurs de transcription spécifiques à proximité de l'ARN polymérase II. Dans le noyau des cellules eucaryotes, la grande majorité des ARN pré-messagers transcrits subissent des modifications post-transcriptionnelles (ajout de la coiffe en 5', épissage des introns, maturation en 3'). Puis, les ARN messagers des cellules eucaryotes sont traduits dans le cytoplasme en protéines et peuvent subir des modifications post-traductionnelles. Ces ARNs sont utilisés comme intermédiaires par les cellules pour la synthèse de protéines. Chez les eucaryotes, un ARNm correspond en général à un seul gène et code une seule protéine.

Les miARNs sont des régulateurs post-transcriptionnels de l'expression génique en régulant l'expression des ARN codants. En effet, les miARNs sont capables d'éteindre l'activité d'un gène en agissant directement sur l'ARNm correspondant. En s'appariant avec les ARNm, ils guident leur dégradation ou la répression de la traduction en protéines. Ainsi

les miARNs participent au contrôle de l'expression d'une protéine en inhibant la traduction et/ou en induisant la dégradation de l'ARNm correspondant.

La transcription des gènes des miARNs est assez similaire à celle des gènes codants. La découverte des miARNs a révolutionné la biologie et les projets de recherche sont nombreux à s'intéresser à ces ARNs non codants.

L'identification de nouveaux miARNs ne cesse de croître. Un registre de miARNs a été créé, la base de données appelée miRBase, pour lister les différents miARNs et faciliter l'appellation des nouveaux miARNs (Griffiths-Jones 2004). La version la plus récente, à ce jour, est la version 20.0 de Juin 2013 et elle recense 2578 miARNs matures chez l'homme (<http://www.mirbase.org/>).

II – Découverte des miARNs chez le nématode

Le concept de miARN remonte en 1974 avec les travaux pionniers de Heywood (Heywood et al. 1974). Ces travaux montraient le rôle de nouveaux ARNs dans la régulation de la traduction et leur complémentarité avec les ARN messagers.

Il a fallu attendre, l'année 1993, pour voir relancer ce concept et montrer l'existence du premier petit ARN non codant. L'équipe de Victor Ambros étudiait les mécanismes moléculaires régissant le développement au cours de temps du nématode *Caenorhabditis elegans*. Le cycle de développement de ce ver comporte six stades successifs : l'embryogénèse, quatre stades larvaires (de L1 à L4) et le stade adulte. Chez le nématode, présentant une mutation du gène *lin-4*, le développement larvaire se bloquait au premier stade L1 et l'apport de ce gène permettait de terminer le cycle des stades larvaires et de restaurer le phénotype sauvage. De plus, la protéine *lin-14* était un répresseur de la transition L1-L2 et avait été identifié comme étant la cible de *lin-4*. Ces chercheurs ont mis en évidence que le produit du gène *lin-4* n'était pas une protéine mais deux transcrits : *lin-4S*, le plus abondant, de 22 nucléotides et *lin-4L* de 61 nucléotides (Lee et al. 1993). Ces ARN contiennent des séquences complémentaires à des éléments répétés situés dans le 3' UTR (UnTranslated Region) de l'ARNm de *lin-14* (Lee et al. 1993;Wightman et al. 1993). Cette découverte a permis de suggérer qu'une régulation de la traduction de *lin-14* par *lin-4* se faisait via une interaction de type ARN-ARN antisens entraînant un arrêt de la synthèse protéique de *lin-14*. La fixation du miARN *lin-4* sur la région 3'UTR du messager codant pour la protéine *lin-14* inhibe la synthèse de cette protéine, ce qui permet la transition du stade larvaire L1 à L2. Les auteurs ont suggéré que le plus petit transcrit était le produit final, tandis que le plus long formerait une structure double brin en tige-boucle comprenant

le plus petit dans l'un des bras de la tige. Ils ont été les premiers à caractériser un microARN mature de 22 nucléotides et son précurseur de 61 nucléotides.

Plusieurs gènes-cible de lin-4 ont été découverts (Moss et al. 1997). Cette particularité, de petit ARN non codant régulateur, resta un cas isolé propre au développement des nématodes jusqu'en 2000. Cette année-là, un nouveau petit ARN, let-7, a été découvert chez *C. elegans* contrôlant cette fois-ci le passage du stade larvaire L4 au stade adulte. Le gène let-7, code pour un ARN de 21 nucléotides, qui inhibe les protéines lin-14, lin-28, lin-41, lin-42 (Reinhart et al. 2000), et lin-57 (Slack et al. 2000).

Lin-4 et let-7 furent appelés initialement stARNs (pour small temporal ARN) par leur rôle dans le contrôle du développement au cours du temps (Pasquinelli et al. 2000). Ils furent renommés en 2001, **microARNs**, car il a été montré qu'ils pouvaient être exprimés sans relation avec les étapes du développement (Lagos-Quintana et al. 2001; Lau et al. 2001; Lee and Ambros 2001).

III – Caractérisation des miARNs dans de nombreuses espèces

Il a été montré que, quelle que soit l'espèce considérée, l'expression de let-7 était contrôlée au cours du développement. Des homologues de let-7 ont été retrouvés chez le mollusque, la drosophile, la souris et chez l'homme. L'observation de la conservation de séquence de let-7 au cours de l'évolution et sa découverte dans beaucoup d'espèces et chez tous les métazoaires, a suggéré un rôle fondamental de ces miARNs et a permis de généraliser le mode d'action de lin-4 et let-7 aux ARN non codants (Pasquinelli et al. 2000) (Pasquinelli, 2000).

En Octobre 2001, les résultats de clonages de trois laboratoires ont été publiés dans Science montrant l'identification d'une centaine de gènes de miARNs chez la drosophile, des nématodes et l'homme (Lagos-Quintana et al. 2001; Lau et al. 2001, Lee et al. 2001). Les années suivantes, d'autres miARNs ont été mis en évidence par clonage chez les mammifères, les poissons, les vers, les oiseaux et les plantes (Ambros et al. 2003; Aravin et al. 2003; Dostie et al. 2003; Houbaviy et al. 2003; Lagos-Quintana et al. 2002; Lagos-Quintana et al. 2003; Michael et al. 2003; Mourelatos et al. 2002).

L'identification d'un nombre croissant et maintenant conséquent de ces miARNs, leur généralisation à la plupart des espèces et leur conservation a suggéré leur rôle physiologique important.

IV – Biosynthèse des microARNs

La biosynthèse des miARNs se fait en quatre étapes. Elle commence par la transcription du gène du miARN en transcrit primaire, suivie par le clivage en précurseur qui est ensuite exporté dans le cytoplasme puis clivé en microARN mature.

A – Organisation génomique

Les unités géniques contenant les miARNs se situent soit au sein d'unités transcriptionnelles codant des protéines (régions intragéniques), soit non codant des protéines (régions intergéniques indépendantes). Dans le génome humain, la répartition est équivalente entre les unités intergéniques et intragéniques (Saini et al. 2007; Saini et al. 2008). Les miARNs situés sur des unités intergéniques possèdent leur propre promoteur. Les miARNs situés dans des gènes codant des pré-ARNm se situent majoritairement dans des introns. Ils sont en général sous le contrôle transcriptionnel du même promoteur que le gène qui le porte (Baskerville and Bartel 2005). Cependant, environ 35% des miARNs de gènes codant un pré-ARNm seront transcrits par leur propre promoteur et leur transcription sera indépendante de celle du pré-ARNm (Monteys et al. 2010; Ozsolak et al. 2008). Les miARNs peuvent être classés en quatre groupes selon leur localisation génomique. Les loci des miARNs se situent autour de 40% au niveau d'introns et environ 10% au niveau d'exons que ce soit pour les unités intergéniques ou les unités intragénomiques (Kim et al. 2009) (**Figure 8**).

Les gènes des miARNs peuvent être regroupés sur certains transcrits primaires en « cluster » de pré-miARN et seront transcrits sous forme de polycistrons. Les miARNs issus de polycistron ont, en général, une expression similaire (Ozsolak et al. 2008).

B – L'étape de transcription du pri-miARN

La transcription des gènes de miARN ressemble beaucoup à celle des gènes codants. Ils sont transcrits, dans le noyau, majoritairement par une ARN-polymérase II en microARN primaires: les **pri-microARN (Figure 9)**. Ces ARN sont de très grande taille (entre 500 et 3000 bases) portant une coiffe en 5' et une queue polyadénylée en 3' (Cai et al. 2004; Lee et al. 2004). Une transcription des gènes codant les miARNs, par une ARN polymérase de type III, peut avoir lieu notamment. Elle a été décrite pour certains miARNs viraux (Diebel et al. 2010) mais de façon très minoritaire et discutée (Bortolin-Cavaille et al. 2009).

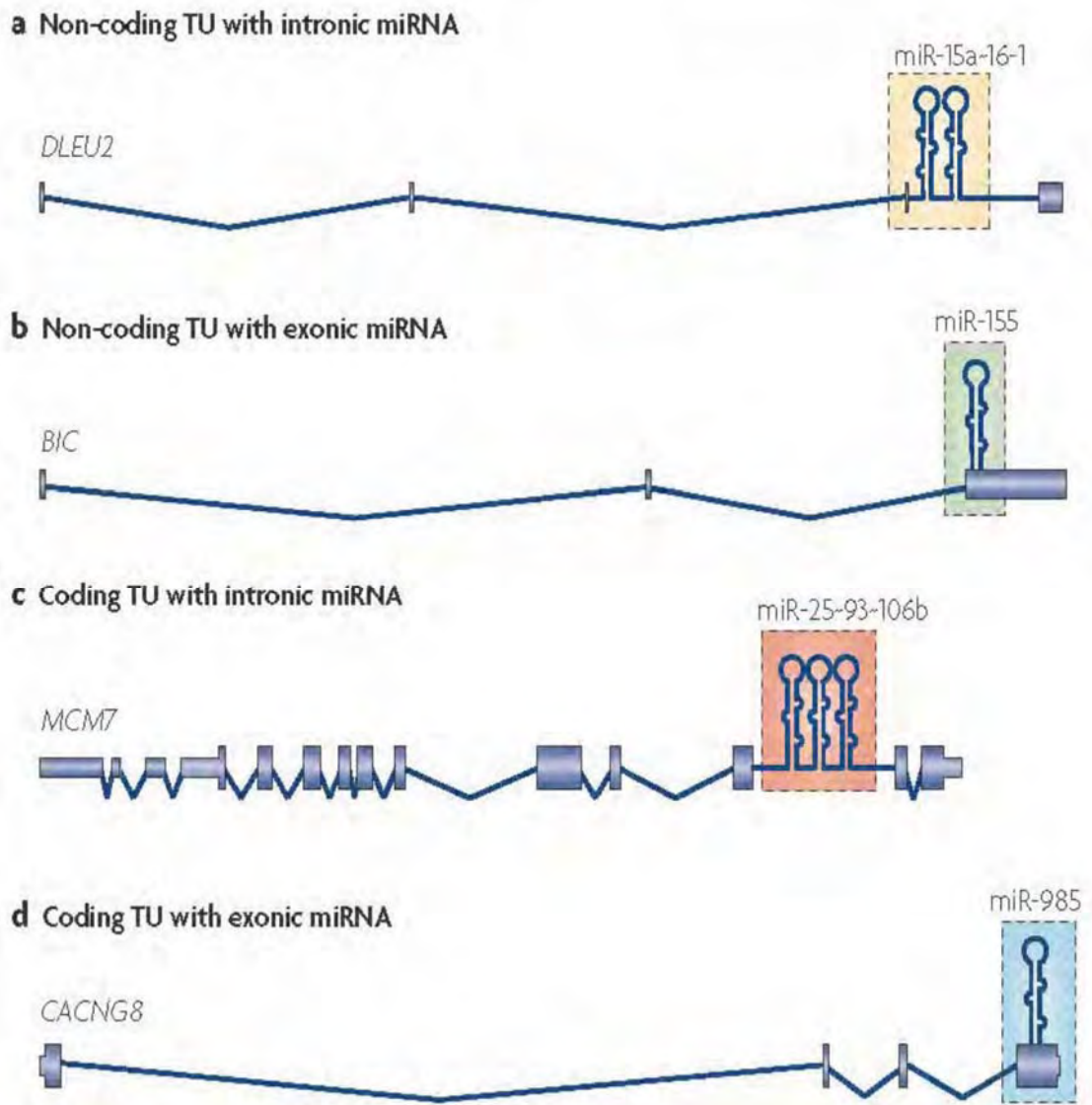


Figure 8 : Localisation génomique des miARNs. Les microARNs peuvent être classés en quatre groupes selon leur localisation génomique : **a)** localisation dans l'intron de région non codante (40%) comme miR-15a-16-1 sur le gène DLEU2 (deleted in lymphocytic leukemia 2). **b)** localisation dans l'exon de région non codante (10%) comme miR-155 sur le gène BIC (B-cell Integrated Cluster). **c)** localisation dans l'intron d'une région codante (40%) comme miR-25-93-106b sur le gène MCM7 (Minichromosome maintenance complexe component 7). **d)** localisation dans l'exon d'une région codante (10%) comme miR-985 sur le gène CACNG8 (Calcium channel gamma subunit 8). Figure issue de Kim 2009 (Kim et al. 2009).

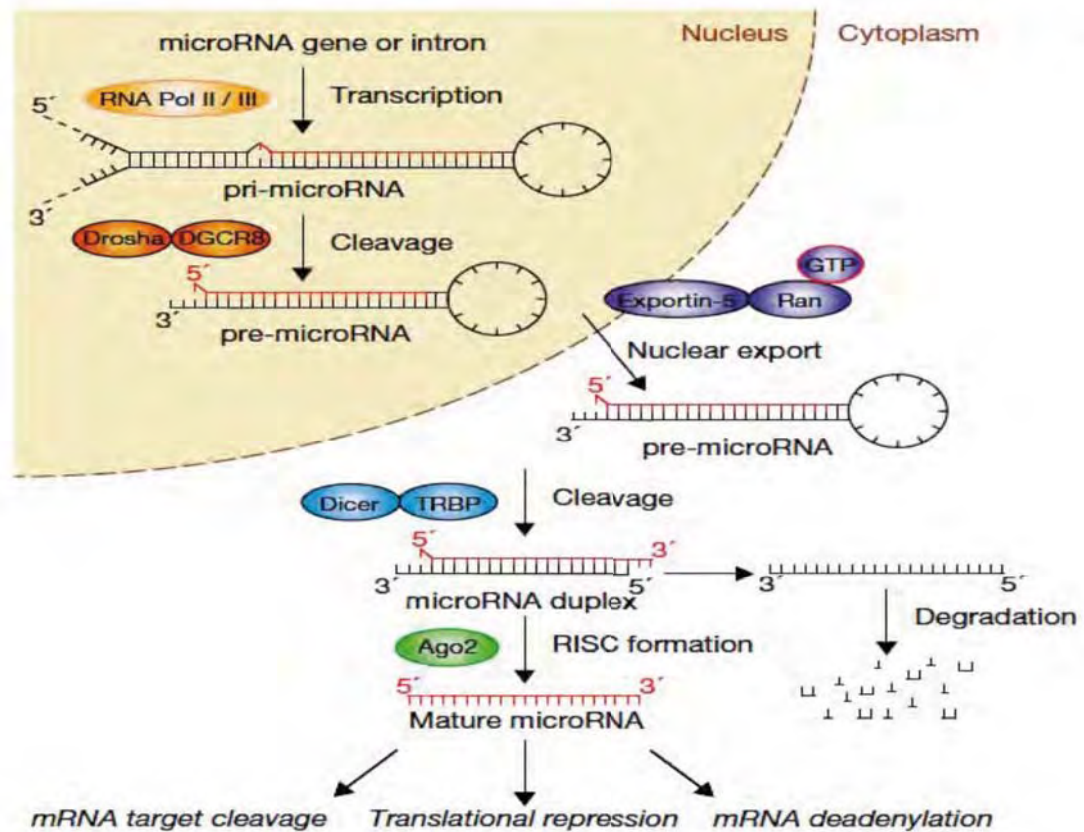


Figure 9 : Biosynthèse et mode d'action des miARNs. La première étape de biosynthèse est la transcription en pri-microARN grâce à une ARN polymérase. La deuxième étape est le clivage en pré-microARN grâce au complexe Drosha-DGCR8 (voie canonique). La troisième étape est l'exportation du pré-microARN du noyau vers le cytoplasme grâce à l'exportine-5. La quatrième étape est le clivage en duplex miR/miR* grâce au complexe Dicer-TRBP. La dernière étape est la libération du microARN mature grâce au complexe RISC. Les microARNs peuvent induire le clivage, la répression de la traduction ou la déadénylation de l'ARNm cible. Figure issue de Winter, 2009. (Winter et al. 2009)

C – L'étape de maturation dans le noyau en pré-miARN

Il existe ensuite deux voies possibles : la voie canonique et la voie alternative des mirtrons aboutissant à l'obtention du pré-miARN.

1 – La voie canonique : clivage du pri-miARN par le complexe « microprocesseur »

Le pri-miARN est clivé en un précurseur d'environ 70 nucléotides appelés : **pré-microARN** (Gregory et al. 2004; Han et al. 2004; Lee et al. 2003). Ce clivage est réalisé par une RNase de type III appelée Drosha au sein d'un complexe appelé « microprocesseur ». Ce complexe protéique est formé également par une protéine de liaison à l'ARNdb appelée DGCR8 (DiGeorge syndrome Critical Region 8). Cette protéine est appelée Pasha chez *D. melanogaster* et *C. elegans* (Landthaler et al. 2004). Ce clivage se fait de manière asymétrique

sur les deux brins d'ARN de la tige provoquant la libération de la tige-boucle du transcrit primaire. Ces pré-miARNs forment une structure tige-boucle comportant une tige en double chaîne surmontée d'une boucle en simple chaîne avec une extrémité 3' sortante de 2 nucléotides et un groupement phosphate en 5' (Denli et al. 2004). La fixation de DGCR8, par l'intermédiaire de son domaine de liaison à l'ARNdb, au niveau de la jonction simple brin – double brin permettrait au domaine de liaison à l'ARNdb de Drosha d'interagir avec la tige, de positionner son centre catalytique et de réaliser ce clivage (Han et al. 2006). Ces deux protéines constituent les éléments nécessaires et suffisants à l'obtention de pré-miARNs (**Figure 10a**).

Cette synthèse de pré-miARNs peut être soumise à une régulation. Des mécanismes de régulation positifs ou négatifs du complexe microprocesseur ont été décrits pour certains miARNs. Certains miARNs ont besoin de facteurs spécifiques, en plus du complexe Drosha-DGCR8, par exemple, les ARN hélicases p68 et p72 (**Figure 10b**). En effet, le niveau d'expression de certains miARNs est diminué chez des souris knock-out pour p68 ou p72 (Fukuda et al. 2007). L'interaction spécifique du pri-miR-18a avec la protéine de liaison à l'ARN hnRNP A1 (« heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1 ») facilite le clivage spécifique par Drosha (**Figure 10c**). Les protéines SMAD (mothers against decapentaplegic homolog), impliquées dans la transduction du signal de la voie du TGF β , se lient au pri-mi-21 et facilitent la maturation par Drosha (**Figure 10d**). D'autres facteurs sont également capables de réguler négativement la maturation de certains pri-miARNs par le complexe microprocesseur. Les enzymes appelées ADARs (« Adenosine deaminase acting on RNA ») sont des enzymes catalysant la désamination d'adénosine en inosine. Ce phénomène d'édition va modifier les propriétés d'appariement du miARN pouvant favoriser ou au contraire inhiber le clivage par Drosha. Ce phénomène d'édition peut donc influencer la maturation à plusieurs niveaux ou peut induire un changement dans les séquences cibles, l'ensemble permettant d'augmenter la diversité du répertoire des miARNs.

Il existe différents mécanismes concernant l'inhibition de la biosynthèse de let-7 par la protéine Lin-28 et notamment Lin-28 inhibe la maturation du pri-let-7 induite par Drosha (Newman et al. 2008; Viswanathan et al. 2008). Il existe également une autorégulation du complexe microprocesseur. Par exemple, les deux composants de ce complexe se régulent l'un l'autre. DGCR8 stabilise Drosha par une interaction entre son domaine carboxy-terminal avec le domaine central de Drosha (Yeom et al. 2006). De son côté, Drosha clive deux structures de type tige-boucle en 5' de l'ARNm de DGCR8

induisant sa dégradation (Han et al. 2009). Ceci permettant de réaliser un rétrocontrôle négatif lorsque l'activité du complexe est suffisante.

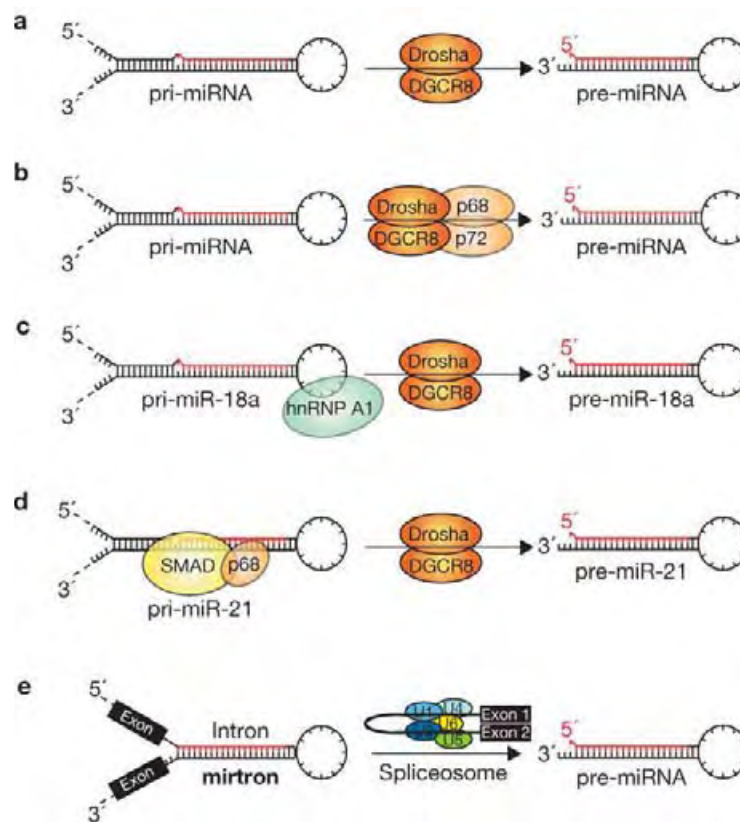


Figure 10 : Exemples de régulation sur la synthèse des pré-miARNs. a) Le pri-miARN est clivé par le complexe Droscha-DGCR8 en pré-miARN. Certains requièrent en plus un facteur spécifique pour que le clivage soit efficace par exemple les ARN hélicases p68 et p72 (b). L'interaction entre le pri-miR-18a et la protéine de liaison à l'ARN : hnRNP A1 facilite le clivage par Droscha (c). La voie TGF β induit la liaison de SMAD au pri-miR-21 et facilite la maturation par Droscha (d). Pour les mirtrons, le spliceosome remplace Droscha et permet la synthèse de pré-miRs. Figure issue de Winter 2009 (Winter et al. 2009).

2 – Voie alternative de synthèse des pré-miARNs, les mirtrons

Certains miARNs ne nécessitent pas de clivage du pri-miARN par le complexe microprocesseur et subissent directement un phénomène d'épissage. La séquence spécifique du futur miARN est incluse dans un intron court. Ce type de pri-miARN-intron particuliers, a été appelé **Mirtrons** (Okamura et al. 2007; Ruby et al. 2007). La maturation ne se fait pas par Droscha mais par le spliceosome (**Figure 10e**). L'épissage du transcrit contenant le mirtron conduit à la formation d'un ARN en lasso puis à la formation d'une structure tige-boucle de type pré-miARN. Ils ont été retrouvés dans différentes espèces dont les mammifères. Ces mirtrons rejoignent ensuite les pré-miARNs formés par la voie canonique.

D – L'étape d'export des pré-miARNs dans le cytoplasme

Les pré-miARNs formés sont ensuite transportés par l'exportine-5 du noyau vers le cytoplasme (Bohnsack et al. 2004;Lund et al. 2004;Yi et al. 2003). Ce transport, à travers des pores nucléaires, nécessite un gradient par hydrolyse du cofacteur Ran-GTP en Ran-GDP. La formation du complexe pré-miARN-exportine-Ran-GTP protège le pré-miARN de la dégradation par des nucléases. L'hydrolyse du Ran-GTP en Ran-GDP dans le cytoplasme permet la dissociation du complexe et ainsi la libération du pré-miARN (Zeng and Cullen 2004).

E – L'étape de maturation cytoplasmique du pré-miARN

Ils subissent ensuite une maturation complémentaire par l'endonucléase RNase III nommée Dicer (Gregory and Shiekhattar 2005;Hutvagner et al. 2001). Cette enzyme élimine la boucle du pré-miARN pour former un duplex **miARN/miARN*** d'environ 22 nucléotides qui correspond à l'hybridation d'un miARN mature à un fragment de taille similaire provenant du bras opposé du pré-miARN. L'un des deux brins du duplex miARN-miARN* est appelé le brin guide ou miARN mature et l'autre brin appelé brin passager ou miARN*. Dicer interagit avec des protéines de liaison à l'ARNdb: TRBP (transactivating response (TAR) RNA-binding protein) et/ou PACT (protein activator of the interferon-induced protein kinase). Ces protéines ne sont pas indispensables à l'activité catalytique de Dicer mais semblent le stabiliser (Chendrimada et al. 2005;Lee et al. 2006).

En principe, le brin miARN mature se fixe à un complexe multiprotéique appelé RISC (RNA-induced Silencing Complex) formé notamment de la RNase III Dicer et d'une endonucléase de la famille des protéines Argonaute (Meister et al. 2004). Le miARN* se sépare du duplex et va être généralement dégradé. Le miARN mature associé avec l'unité RISC va permettre sa fixation sur son ARNm cible et ainsi réprimer l'expression post-transcriptionnelle de sa cible (Bartel 2004;Kim 2005) (Winter et al. 2009).

La sélection du brin guide au sein du duplex va dépendre de la stabilité thermodynamique des extrémités du duplex. Ainsi le brin le plus faiblement apparié à son extrémité 5' est majoritairement incorporé au complexe RISC (Schwarz et al. 2003). Cependant certains pré-miARNs peuvent, après maturation, donner des miARNs matures provenant des deux brins notés miR-X-3p et miR-X-5p provenant respectivement du brin 3' ou 5' ou bien miR-X et miR-X*. Ces miARNs* peuvent être fonctionnels (Ro et al. 2007). Le complexe pré-RISC est constitué de Dicer-TRBP, d'une protéine effectrice de la famille argonaute et du duplex. Le complexe RISC va être activé par la dissociation du

duplex. Le miARN mature va servir de guide vers l'ARNm complémentaire. Les protéines argonautes (Ago) possèdent trois domaines conservés : les domaines PAZ (« PIWI Argonaute Zwillie ») et MID reconnaissant respectivement l'extrémité 3' et 5' phosphate du duplex et le domaine PIWI constituant le domaine catalytique des protéines Ago compétentes pour le clivage endonucléolytique comme Ago 2 chez l'Homme. Le complexe RISC peut être assisté de protéines auxiliaires comme des ARN hélicases par exemple p68 (Salzman et al. 2007), Gemin 3 (Mourelatos et al. 2002), RHA (ARN hélicase A) (Robb and Rana 2007) dont le rôle reste à déterminer. Ce complexe RISC s'associe donc de manière spécifique à un ARNm cible.

F – L'appariement à l'ARNm cible

L'appariement du miARN mature sur son ARNm cible est primordial pour permettre une régulation spécifique de l'ARNm. Cette régulation étant, dans la majorité des cas, négative en agissant sur la traduction et/ou la dégradation de l'ARNm. Cette spécificité est permise grâce à une certaine complémentarité entre la séquence dans l'ARNm cible appelée MRE (MicroRNA Response Element) et la séquence du miARN. Cette séquence MRE est le plus souvent située dans le 3' UTR de l'ARNm cible.

Plusieurs règles établies par des analyses expérimentales et informatiques ont été établies pour prédire la fixation d'un miARN sur son ARNm cible. Le critère le plus déterminant est un appariement parfait entre l'ARNm cible et les nucléotides 2-8 en 5' du miARN appelé « seed » région (Lewis et al. 2005). Cet appariement peut être suffisant pour réprimer l'ARNm cible (Brennecke et al. 2005). Dans la région centrale, des mésappariements sont en général présents ce qui pourraient limiter le clivage endonucléolytique par Ago2. Au niveau de l'extrémité 3' du miARN, l'appariement est variable mais en général il est au moins minimal pour permettre de stabiliser l'interaction du miARN à sa cible. Un seul appariement étendu en 3' n'est pas suffisant pour réprimer l'ARNm. Cependant, cet appariement étendu peut compenser, dans certains cas, un mésappariement dans la région en 5' (Bartel 2009; Brennecke et al. 2005).

La séquence MRE est majoritairement située dans le 3'UTR des ARNm mais différentes études ont mis en évidence l'existence de MRE fonctionnels soit au niveau des séquences codantes ORF (Duursma et al. 2008; Forman et al. 2008) soit dans le 5'UTR. Dans ce dernier cas, cela s'accompagne d'une activation de la traduction contrairement à la répression induite normalement par les miARNs (Orom et al. 2008; Tsai et al. 2009). Ainsi, miR-148 et let-7 inhibent respectivement l'expression du gène de l'ADN méthyltransférase

3b (Dnmt3b) (Duursma et al. 2008) et Dicer (Forman et al. 2008). MiR-10a et miR-346 agissent respectivement en 5'UTR des ARNm de protéines ribosomales (Orom et al. 2008) et de RIP-140 (receptor interacting protein 140) (Tsai et al. 2009) et activent la traduction de ces protéines.

V – Les modes de régulation de l'expression de l'ARNm cible

Les miARNs régulent l'expression génique en agissant sur la traduction et/ou la dégradation des ARNm. Le mécanisme de cette régulation dépend de la complémentarité du miARN à l'ARNm. Si la complémentarité des bases est parfaite, le complexe miARN-RISC va dégrader la cible par clivage endonucléolytique par Ago2. Ce cas est rare pour les métazoaires et largement décrit chez les plantes. Si la complémentarité est imparfaite, soit la traduction de l'ARNm va être bloquée (Filipowicz et al. 2008) soit se produira une déadénylation suivie de la dégradation de l'ARNm. Dans certains cas particuliers, les miARNs peuvent, au contraire, activer la traduction de l'ARN cible, comme c'est le cas nous l'avons vu pour les miR-10a et miR-346 (Orom et al. 2008 ; Tsai et al. 2009).

Il existe des facteurs, autres que l'appariement, intervenant dans la reconnaissance par un miARN de sa cible et influençant sa fonctionnalité. La multitude des sites de liaison d'un miARN sur un même transcrite est parfois nécessaire pour réprimer la traduction et permet une action coopérative (Grimson et al. 2007). La structure secondaire de l'ARNm joue un rôle important dans l'accessibilité de la séquence MRE (Kertesz et al. 2007). La composition du complexe RISC (type de protéine Ago, type de protéines de liaison associées au complexe), peuvent également moduler l'effet du miARN sur la cible (Brodersen and Voinnet 2009).

Les miARNs régulent l'expression post-transcriptionnelle des ARNm cibles par trois processus différents : un clivage spécifique, une inhibition de la traduction (ou rarement une activation), une dégradation de l'ARNm. Le clivage spécifique est fait, dans des cas très rares, lors d'un appariement parfait entre le miARN et sa cible (Yekta et al. 2004). Chez les mammifères, seule la protéine Ago2 est capable de faire ce clivage. Pour l'inhibition de la traduction et la dégradation des ARNm, il n'est pas encore défini si ces deux processus sont liés, dans ce cas la répression résulterait de la combinaison des deux, ou bien si ces évènements sont exclusifs. Les études publiées sont contradictoires.

A – Répression de la traduction par les miARNs

Le mécanisme d'inhibition de la traduction par les miARNs est controversé. Certaines études montrant que le blocage de la traduction se ferait à l'initiation et d'autres études aux stades post-initiation. Ces études sont parfois contradictoires entre elles.

Le mécanisme d'initiation de la traduction canonique est dit « coiffe dépendante ». Il existe, cependant, des mécanismes d'initiation alternatifs tels que l'entrée interne des ribosomes appelée IRES (Internal Ribosome Entry Site). L'initiation de la traduction à la coiffe commence par une dissociation des sous unités ribosomiques par liaison de chaque sous unité à des facteurs d'initiation: les facteurs eIF1A, 2 et 3 (eIF: eukaryotic translation initiation factor) pour la sous-unité 40S et eIF6 pour la sous-unité 60S. La sous-unité 40S, les facteurs d'initiation et l'ARN de transfert initiateur forment le complexe de pré-initiation. Il y a un recrutement de ce complexe à la coiffe de l'ARNm grâce au complexe de liaison à la coiffe : eIF4. Ce complexe d'initiation glisse le long de l'ARNm jusqu'au codon de départ. La sous-unité 60S vient se fixer, forme un ribosome 80S et l'élongation commence. Plusieurs études ont montré que la répression de la traduction se faisait à l'étape d'initiation. La répression passerait par une reconnaissance de la coiffe. Les ARNm étudiés traduits par une séquence IRES ou porteur d'une coiffe synthétique (non reconnue par le complexe d'initiation) sont insensibles à la répression de la traduction par les miARNs (Humphreys et al. 2005; Pillai et al. 2005). L'hypothèse mécanistique proposée, par la suite par les travaux de Kiriakidou, est que la protéine Ago2 est capable de se fixer spécifiquement à la coiffe et entrer en compétition avec le facteur eIF4E (unité permettant la liaison de la coiffe de l'ARNm au complexe d'initiation) et ainsi inhiber la traduction (Kiriakidou et al. 2007; Mathonnet et al. 2007).

Les travaux de Chendrimada ont suggéré que la répression de la traduction pouvait être induite par un mécanisme différent de la coiffe par une inhibition du recrutement de la sous-unité 60S. Le facteur eIF6, qui est impliqué dans la maturation de la sous-unité 60S et qui permet à la sous-unité 60S d'être libre et donc disponible pour un nouveau cycle de traduction, a été identifié comme faisant partie des facteurs associés au complexe RISC des miARNs. Il pourrait ainsi bloquer le recrutement de la sous-unité 60S sur des ARNm cible (Chendrimada et al. 2007).

D'autres travaux font penser que l'inhibition de la traduction induite par les miARNs se fait après l'étape d'initiation. Plusieurs mécanismes ont été proposés notamment le détachement des ribosomes pendant l'élongation (Petersen et al. 2006) ou la dégradation des polypeptides naissants par des enzymes non identifiées (Nottrott et al. 2006). Les

travaux de Petersen ont montré également que la traduction d'un ARNm par un mécanisme IRES pouvait être réprimée par des miARNs.

B – Déadénylation et dégradation de l'ARNm dans les P-bodies

De nombreuses études ont montré que la répression de nombreuses cibles de miARNs s'accompagne de leur déadénylation et de leur dégradation (Giraldez et al. 2006; Lim et al. 2005) contrairement à ce qui avait été suggéré initialement (Olsen and Ambros 1999; Seggerson et al. 2002). La déadénylation est la première étape de dégradation des ARNm, elle permet de déstabiliser l'ARNm cible du miARN. Les composants de ce complexe de déadénylation se localisent dans des P-bodies (Processing-Bodies). Un complexe de décoiffage (DCP1 et 2) intervient et enfin une digestion exonucléolytique 5'-3' se produit. Les P-bodies ou GW-bodies sont des structures cytoplasmiques permettant le catabolisme et/ou le stockage temporaire des ARNm non traduits (Eulalio et al. 2007). Ils contiennent des ARNm, des miARNs, des effecteurs protéiques impliqués dans la répression des ARNm induite par les miARNs (Ago2, la protéine GW182) ainsi que des enzymes impliquées dans la dégradation de ces ARNm (déadénylase, enzymes de décoiffage). Il existe une corrélation entre la répression de la traduction engendrée par les miARNs et l'accumulation des ARNm cibles dans les P-bodies (Bhattacharyya et al. 2006). Les P-bodies ne sont pas essentiels à l'action des miARNs, ils apparaissent être la conséquence de la répression de la traduction induite par les miARNs (Eulalio et al. 2007).

Les miARNs inhibent l'expression de leurs cibles par des mécanismes d'inhibition ou par dégradation des ARNm. Ces deux mécanismes pourraient être également couplés. La dégradation des ARNm pourrait être la conséquence du blocage de traduction ou inversement, la déadénylation pourrait entraîner une inhibition de la traduction. Les mécanismes exacts ne sont pas encore non élucidés. Ces mécanismes pourraient être couplés ou au contraire indépendants l'un de l'autre.

C – Cas particulier de l'activation de la traduction

Dans certains cas particuliers, les miARNs peuvent, non plus réprimer la traduction mais au contraire, activer la traduction. L'équipe de Vasudevan est la première à avoir décrit cette possibilité d'activation de la traduction par des miARNs. Lors de l'arrêt cellulaire, cette équipe a montré que le miR-369 se fixe au niveau de l'ARNm du TNF α , dans la région 3'UTR, induisant une activation de la traduction (Vasudevan et al. 2007). Depuis,

d'autres équipes ont démontré que les miARNs pouvaient activer la traduction en se fixant le plus souvent dans la région 5'UTR de l'ARNm cible (Henke et al. 2008) (Orom et al. 2008).

VI – Fonctions physiologiques des miARNs

Les microARNs modulent entre 30% (Bartel 2004) et 60% (Friedman et al. 2009) de nos gènes. Chaque miR peut réguler une centaine de cibles (Selbach et al. 2008) et chaque gène peut être modulé par plusieurs miRs.

Il a été montré que les miRs sont impliqués dans un grand nombre de fonctions physiologiques essentielles telles que le développement, la croissance, la prolifération, l'apoptose, la différenciation cellulaire et la régulation du cycle cellulaire (Ambros 2004; Bartel 2004; Hwang and Mendell 2006; Miska 2005). Par conséquent, les miRs pourraient être des régulateurs pivots dans le développement normal ainsi que dans le développement des diverses pathologies. Ils ont été particulièrement étudiés en oncologie, comme développé dans le chapitre suivant.

2) MicroARNs et cancer

De nombreuses études ont montré l'implication des miARNs dans la quasi-totalité des processus cellulaires physiologiques. D'autre part, il a été estimé qu'environ 50% des gènes humains codants pour les miARNs sont localisés au niveau de régions fragiles ou de régions fréquemment altérées dans les cancers (Calin et al. 2004b). Leur large spectre d'action ainsi que leur localisation génomique ont conduit à une investigation particulière sur le rôle des miARNs dans les cancers.

La première étude, suggérant l'implication de miARNs dans l'oncogénèse, est celle de l'équipe de Croce, en 2002, dans les leucémies lymphoïdes chroniques de type B (LLC-B) (Calin et al. 2002). Dans les LLC, l'anomalie cytogénétique la plus fréquente est la délétion de la région 13q14 du chromosome 13, retrouvée dans plus de la moitié des LLC-B. Cette équipe a montré que les miR-15a et miR-16 étaient situés dans cette région délétée et qu'ils étaient sous exprimés ou délétés dans 68% des LLC. Cette étude, a été la première, a suggéré l'implication de miARNs dans la tumorigénèse et a souligné l'importance croissante de ces régulateurs. Le groupe de Croce a ensuite montré que ces deux miRs avaient pour cible l'ARN de bcl-2 mettant en évidence une corrélation inverse entre l'expression de bcl-2 et l'expression de ces 2 miRs. La protéine anti-apoptotique bcl-2 est surexprimée dans

une variété de cancers. Ces miRs favorisent l'apoptose en régulant négativement l'oncogène anti-apoptotique bcl-2 (Cimmino et al. 2005). C'est le premier miR dont le rôle de suppresseur de tumeur a été démontré.

Un grand nombre d'étude a, depuis, démontré que les miARNs sont exprimés de façon aberrante dans différents cancers et seraient ainsi impliqués dans l'apparition et le développement des cancers. Nous aborderons les mécanismes de dérégulation de l'expression des miARNs, les rôles des miARNs dans l'oncogénèse en développant les miRs suppresseurs de tumeurs et oncogènes et enfin nous décrirons les études sur l'expression des miARNs en oncologie.

I – Mécanismes de dérégulation de l'expression des miARNs dans le cancer

L'expression des miARNs dans le cancer peut être dérégulée par différents mécanismes : anomalies chromosomiques, modifications épigénétiques, mutations et polymorphismes (SNPs) et anomalies de la biosynthèse des miARNs (**Figure 11**).

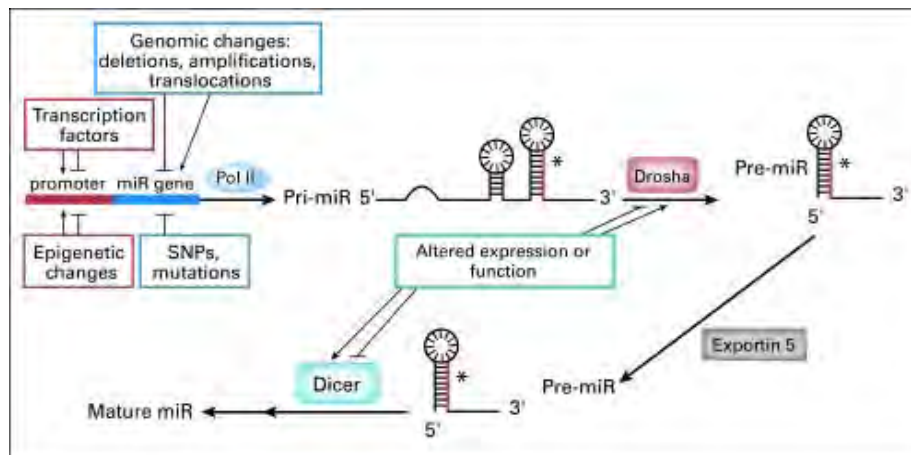


Figure 11 : Mécanismes de régulation de l'expression des miARNs. Les dérégulations de l'expression de miRs dans les cancers peuvent être dues à des anomalies chromosomiques (par exemple : délétions, amplifications ou translocations), des modifications épigénétiques, des mutations ainsi que des polymorphismes et enfin des anomalies dans la biosynthèse de ces miRs. Figure issue de Iorio et Croce, 2009 (Iorio and Croce 2009).

A – Anomalies chromosomiques

Quelle que soit la tumeur considérée, la transformation cancéreuse résulte de plusieurs événements moléculaires touchant différents gènes. Les gènes des miARNs sont localisés dans les régions génomiques fréquemment altérées dans les cancers ou des sites fragiles. Il peut s'agir de perte d'hétérozygotie au niveau d'un gène suppresseur de tumeur ou d'amplification génique d'un proto-oncogène ou encore de translocations chromosomiques (Calin et al. 2004b).

L'anomalie la plus fréquemment observée dans les LLC est une délétion du bras long du chromosome 13. La région délétée contient les miR-15a et miR-16. Calin et coll. ont montré la corrélation entre la délétion 13q14 et la diminution d'expression des miR-15a et miR-16 (Calin et al. 2002 ; Calin et al. 2004a). Dans les cancers du poumon notamment, les miRs du cluster miR-17-92 sont surexprimés par une amplification génique de la région 13q31 (Hayashita et al. 2005).

La grande fréquence d'altérations génomiques sur les loci de miARNs a été confirmée par une large étude utilisant la technique de CGH-array (Comparative Genomic Hybridization-array) (Zhang et al. 2006). Cette étude a été faite sur 283 miARNs et sur un panel de 227 tumeurs humaines provenant de trois pathologies tumorales : cancers mammaires, cancers ovariens et mélanome. Elle a montré qu'une proportion importante de miARNs présentait des anomalies du nombre de copies (37.1% des cancers de l'ovaire, 72.8% des cancers du sein et 85.9% des mélanomes).

B – Modifications épigénétiques

Au cours de la cancérogénèse, les cellules accumulent des anomalies génétiques mais également épigénétiques. Les dérégulations épigénétiques sont fréquentes dans les cellules tumorales. Elles sont définies comme des modifications de l'expression des gènes transmissibles au cours des divisions cellulaires, sans modification de la structure primaire de l'ADN. Elles sont en général réversibles. Ces modifications épigénétiques incluent la méthylation de l'ADN et les modifications des protéines histones au niveau de la chromatine par acétylation ou méthylation. Ce sont les deux modifications épigénétiques les plus étudiées en raison de leur impact majeur sur la transcription. Le niveau de méthylation de l'ADN au niveau des cytosines des îlots CpG (Cytosine-phosphate-Guanine), situés dans la région promotrice de certains gènes, est un régulateur important de l'expression dans le génome humain. L'hyperméthylation induit une inhibition transcriptionnelle de l'expression des gènes. Elle participe fréquemment à la carcinogénèse par inactivation de gènes suppresseurs. Le profil d'expression d'un gène est dépendant de l'accessibilité à l'ADN aux facteurs de transcription et aux enzymes. Par exemple, l'acétylation des histones favorise la relaxation de l'ADN et l'accessibilité favorisant ainsi l'expression des gènes.

Les modifications épigénétiques affectent également l'expression des miARNs. Une analyse des séquences génomiques des miARNs a montré qu'environ la moitié de ces gènes sont associés à des îlots CpG suggérant que les miARNs pouvaient représenter des cibles

de la méthylation de l'ADN (Weber et al. 2007). Beaucoup d'études ont montré que certains miARNs étaient régulés de manière épigénétique. Trois premières études distinctes ont montré que des changements de méthylation de l'ADN induits par les tumeurs pouvaient affecter l'expression de certains miARNs (Brueckner et al. 2007; Lujambio and Esteller 2007; Saito et al. 2006). Tout d'abord, Saito et collaborateurs ont analysé l'expression des miARNs dans les cellules de la lignée T24, issue de cancer de la vessie, après traitement associant un inhibiteur de méthylation d'ADN et un inhibiteur d'histone déacétylase (Saito et al. 2006). L'analyse du profil d'expression des miARNs montre que 17 des 313 miARNs analysés sont surexprimés de manière significative après traitement. Parmi eux, le miR-127, situé au sein d'îlots CpG, silencieux dans les cellules tumorales, est le plus fortement surexprimé après traitement, tandis que sa cible potentielle, le proto-oncogène BCL-6, est inhibée. Une autre étude, avec une approche expérimentale similaire, a identifié d'autres miARNs dont l'expression était dépendante du niveau de méthylation de l'ADN (Lujambio et al. 2007; Lujambio & Esteller 2007). Lujambio et collaborateurs ont étudié le profil d'expression des miARNs entre des lignées cellulaires sauvages HCT 116 de cancers du colon et ces mêmes lignées déficientes en deux méthyltransférases (DNMT1 et DNMT3b). Parmi les différents miARNs inhibés dans les lignées tumorales par hyperméthylation, miR-124a voit son expression fortement augmenter dans les cellules déficientes en activité DNMT ou dans les cellules traitées par un agent déméthylant, tandis que ses cibles CDK6 (Cyclin Dependent Kinase 6) et Rb sont inhibées. Ces résultats démontrent que, dans les cellules tumorales, l'hyperméthylation de miRs suppresseurs de tumeurs inhibent ces derniers induisant ainsi l'expression de leurs cibles oncogéniques. Inversement, l'activation d'un miR oncogène peut être due à une hypométhylation de l'ADN comme cela a été mis en évidence dans des lignées A549 de cancer du poumon pour let-7a-3 et est associée au phénotype tumoral (Brueckner et al. 2007). Depuis, de nombreuses autres études ont mis en évidence d'autres miARNs régulés de manière épigénétique : par exemple miR-9-1 est hyperméthylé et sous-exprimé dans le cancer du sein (Lehmann et al. 2008), miR-34b/c dans le cancer du colon (Toyota et al. 2008), miR-375 dans le mélanome (Mazar et al. 2011a).

La méthylation n'est pas le seul mécanisme épigénétique pouvant affecter l'expression des miARNs. Scott et collaborateurs ont montré que dans les lignées de carcinomes mammaires, SKBR3, l'inhibition des histones déacétylases était suivie d'une altération du niveau d'expression des miARNs (Scott et al. 2006). De plus, les miARNs, eux-mêmes, peuvent réguler l'expression des composants de la machinerie épigénétique

(notamment les ADN méthyltransférases ou les histones déacétylases) induisant un puissant mécanisme de rétrocontrôle. Par exemple, le miR-29 a pour cible les ADN méthyltransférases DNMT-3A et 3B. Le miR-29 induit une hypométhylation permettant la réexpression de gènes suppresseurs de tumeur induisant une inhibition de la tumorigénèse dans les cancers du poumon ou dans des leucémies aiguës myéloïdes (Fabbri et al. 2007; Garzon et al. 2009).

C – Mutations ou polymorphismes au niveau des gènes codants les miARNs ou leurs messagers cibles

Une mutation ou un SNP (Single Nucleotide Polymorphism) sur un miARN peuvent affecter la reconnaissance de sa cible et inversement une mutation ou un SNP dans les messagers cibles peuvent changer leur capacité à être reconnus par les miARNs.

Dans les LLC-B, Calin et collaborateurs ont décrits des mutations germinales des précurseurs de miR-15a et miR-16 responsables de faible taux d'expression de ces miRs *in vitro* et *in vivo* (Calin et al. 2005). Hu et collaborateurs ont étudié l'association de quatre SNPs dans quatre miARNs (miR-146a, miR-196a2, miR-499, miR-149) par rapport à la survie de patients atteints de cancers pulmonaires non à petites cellules (Hu et al. 2008). Ils ont mis en évidence que les patients porteurs d'un SNP variant homozygote en 3p du miR-196a-2 avaient une faible survie. Il s'agit d'une des premières études mettant en évidence une corrélation entre SNP et survie, suggérant leur intérêt potentiel comme marqueur pronostique.

D – Anomalies de la biosynthèse des miARNs

Dans les cancers, de nombreux miARNs sont régulés aux étapes post-transcriptionnelles de maturation induisant une modulation de l'expression de ces derniers. En dépit d'un taux normal d'expression des pri-miARNs, certains cancers ont un taux réduit des miARNs matures. Thomson et collaborateurs ont expliqué cette différence par une défaillance de la biosynthèse par la perte de l'enzyme Drosha (Thomson et al. 2006). Inversement, dans les leucémies aiguës lymphoblastiques, l'enzyme Drosha est ciblée par le gène de fusion ALL1 (Acute Lymphoblastic Leukemia) et est responsable de la surexpression du miR-191 (Nakamura et al. 2007). Le travail de Zhang et collaborateurs a montré une fréquence élevée d'amplification des gènes pour les protéines Dicer et Ago2 (Zhang et al. 2006). De plus, la diminution d'activité de l'endonucléase Dicer, observée dans certains cancers du poumon non à petites cellules, est corrélée à la sous-expression de let-7 et un mauvais pronostic de ces tumeurs (Karube et al. 2005).

II – Les miARNs suppresseurs de tumeurs et les miARNs oncogènes

Il apparait maintenant bien établi que les miARNs sont des acteurs essentiels de l'oncogénèse. Certains miARNs peuvent agir comme des gènes suppresseurs de tumeur ou comme des oncogènes en fonction des cibles géniques qu'ils contrôlent. Les miARNs suppresseurs de tumeurs répriment des oncogènes. Leur sous-expression, dans certains cancers, induit l'augmentation d'oncogènes et contribue à la transformation maligne ainsi qu'à la progression tumorale. A l'inverse, d'autres miARNs peuvent agir comme des oncogènes en ciblant des gènes suppresseurs de tumeur. Ils sont appelés des oncomiRs. Leur sur-expression dans les tumeurs contribue à l'oncogénèse en inhibant des gènes suppresseurs (**Figure 12**). Nous allons décrire plus en détails les premiers miARNs suppresseurs de tumeur et oncogènes décrits.

A – Les microARNs suppresseurs de tumeurs

Les gènes suppresseurs de tumeur sont définis par le fait que, soit leur délétion soit leur inactivation, est associée avec le développement d'un cancer. Parmi ces miRs suppresseurs, les miRs -15 et -16, let-7 et miR-34 ont été les premiers identifiés.

1 – miR-15a et miR-16

Comme nous l'avons évoqué précédemment, Calin et collaborateurs ont été les premiers à mettre en évidence, d'une part que les miARNs jouaient un rôle important dans l'oncogénèse, et d'autre part le rôle de gènes suppresseurs de tumeurs de certains miARNs. En 2002, ils ont identifié deux miRs : miR-15a et miR-16 comme gènes potentiels des cancers dans la pathogénèse des LLC. Ils ont montré que les patients atteints de LLC-B avaient souvent des délétions ou des dérégulations au niveau du locus q14 du chromosome 13 (Calin et al. 2002). Ces observations ont fait rechercher un ou plusieurs gènes suppresseurs de tumeur au niveau d'une zone de 30 kilobases du locus 13q14 et c'est au niveau de ce site que se situent les gènes de ces deux miRs. De plus, ces miRs sont sous-exprimés par rapport aux lymphocytes normaux dans environ 68% des LLC. Des délétions du locus 13q14 surviennent dans 50% des cas de LLC-B, mais également dans 50% des lymphomes du manteau, entre 16 et 40% des myélomes multiples et 60% des cancers de la prostate (Dong et al. 2001). Ils ont démontré le rôle de gènes suppresseurs de tumeur de ces deux miRs. Cimmino et collaborateurs ont par la suite montré que ces deux miRs régulent négativement BCL-2 qui est un gène anti-apoptotique qui est souvent surexprimé

dans les tumeurs notamment les leucémies et les lymphomes (Cimmino et al. 2005). Le niveau d'expression de ces miARNs est inversement corrélé à l'expression de bcl-2.

Les principaux mécanismes d'altération des miRs-15a/16 sont des délétions, des sous-expressions ou des mutations. Dans les cellules tumorales, ces deux miRs sont le plus souvent altérés et n'agissent pas sur leurs cibles (tel que le proto-oncogène bcl-2) ce qui entraîne la survie cellulaire, la prolifération et la progression tumorale. Alors que la réexpression de miRs-15a/16 inhibe l'expression de proto-oncogènes tel que bcl-2, induisant l'apoptose et entraînant une régression tumorale.

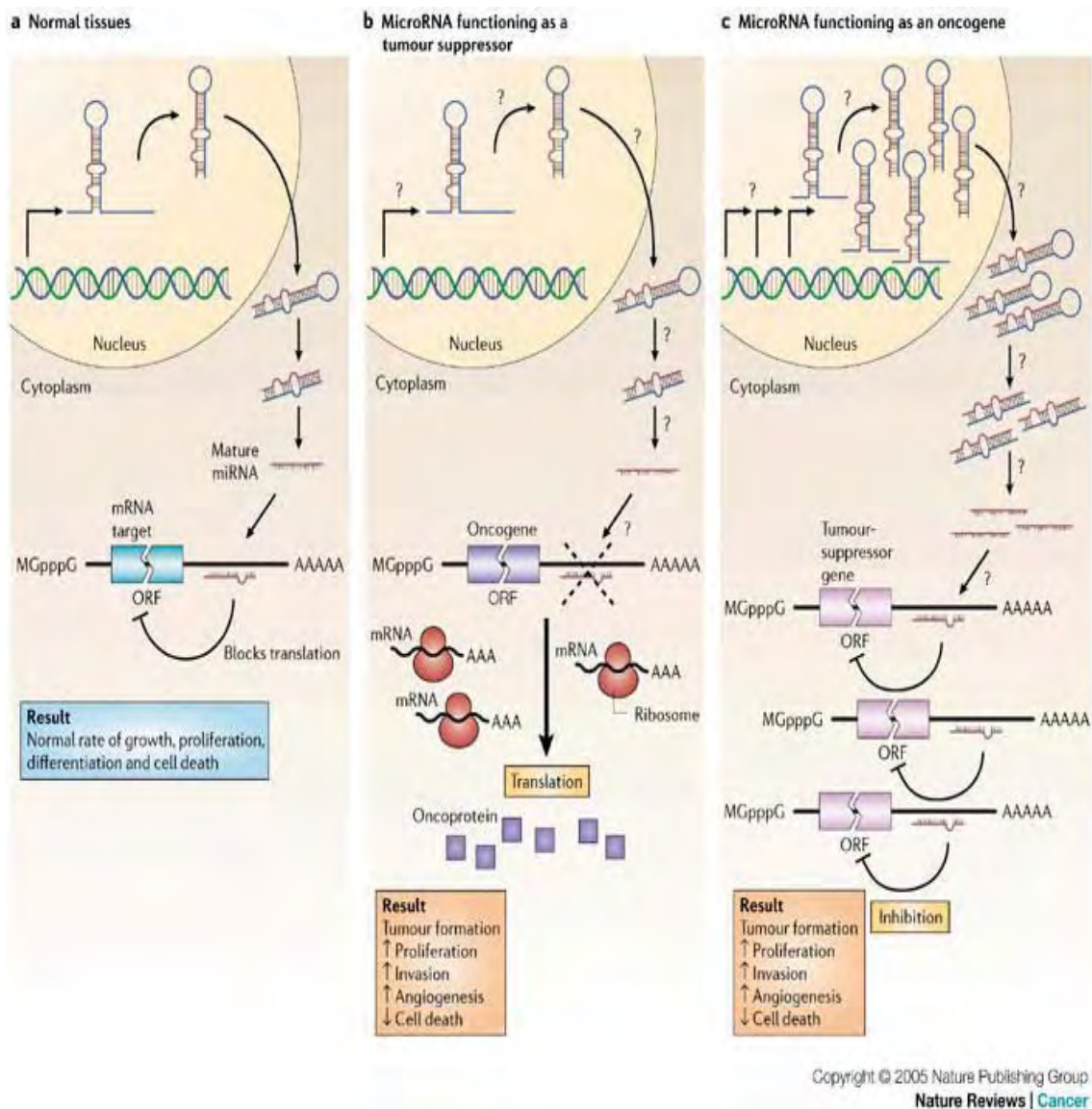


Figure 12 : Les miARNs peuvent fonctionner comme des suppresseurs de tumeur ou des oncogènes. a. Dans les tissus normaux, les miARNs inhibent l'expression de gène-cible aboutissant à une croissance, prolifération, différenciation et mort cellulaire normales. b. La diminution ou la délétion de miARNs suppresseurs de tumeur induit la formation tumorale par majoration de l'activité d'oncogènes cibles en augmentant la prolifération, l'invasion, l'angiogénèse et en diminuant de l'apoptose. c. L'amplification ou la surexpression d'oncomir induit la formation tumorale en diminuant l'activité de gènes suppresseurs de tumeur cibles. Figure issue de Esquela-Kerscher 2006 (Esquela-Kerscher and Slack 2006).

2 – La famille let-7

Let-7 a été le deuxième miARN mis en évidence chez *C. elegans* après lin-4 (Reinhart et al. 2000) et le premier miARN décrit chez l'homme (Pasquinelli et al. 2000). La famille let-7 comprend chez l'homme 12 membres: let-7a-1, -2, -3, let-7b, let-7c, let-7d, let-7e, let-7f-1, -2, let-7g, let-7i et miR-98, localisés sur 9 chromosomes.

Les gènes de la famille let-7 se trouvent au niveau de régions altérées ou délétées dans les tumeurs humaines (Calin et al. 2004b). De plus, let-7a et let-7f sont exprimés à des taux faibles dans les cancers du poumon par rapport aux tissus sains (Takamizawa et al. 2004). La surexpression de let-7 *in vitro* dans des lignées cellulaires tumorales de poumon entraîne une inhibition de la croissance cellulaire mettant en évidence son rôle suppresseur de tumeur. Cette famille régule négativement les gènes oncogènes Ras (Johnson et al. 2005). 15 à 30% des tumeurs humaines portent des mutations des gènes Ras. Les mutations activatrices induisent une augmentation d'activité de Ras causant une transformation cellulaire. Les tissus tumoraux pulmonaires sous-expriment let-7 par rapport à des tissus sains. De plus, l'expression de let-7 est inversement corrélée à l'expression de la protéine Ras (Takamizawa et al. 2004). La surexpression de let-7 dans les lignées cellulaires tumorales induit une diminution d'expression de Ras. Let-7 contrôle directement la prolifération cellulaire en régulant négativement Ras (Johnson et al. 2007). De plus, le niveau de let-7 est corrélé au pronostic du cancer du poumon : les patients avec une faible expression de let-7 ont un taux de survie plus faible que les patients ayant une forte expression dans le cancer du poumon (Yanaihara et al. 2006).

Cette famille régule également d'autres oncogènes : c-myc (Sampson et al. 2007), HMGA2 (high-mobility group AT-hook 2) (Peng et al. 2008) ou des régulateurs clé au niveau du cycle cellulaire comme les cyclines D1, D3, A et cdk4 (Johnson 2005; Schultz 2008), de la prolifération cellulaire et de l'apoptose (Barh et al. 2010; Esquela-Kerscher et al. 2008). Elle est également dérégulée dans beaucoup d'autres tumeurs que le poumon comme le sein, l'ovaire, le colon et le mélanome (Nam et al. 2008; Schultz et al. 2008) (Barh et al. 2010). Son rôle exact dans l'oncogénèse n'est pas encore connu.

3 – La famille des miR-34

Cette famille est composée de trois miRs : miR-34a, miR-34b, miR-34c. Chez l'homme, miR-34a est localisé sur le chromosome 1 tandis que les miR-34b et miR-34c ont un précurseur commun et se situent au niveau du chromosome 11. Le premier lien montré entre la famille miR-34 et les cancers provient de l'observation de la faible expression de

miR-34a dans les neuroblastomes de mauvais pronostic (Welch et al. 2007). Dans cette étude, la réintroduction de ce miR dans des cellules de neuroblastomes induit une réduction de la prolifération cellulaire par l'induction de la voie apoptotique des caspases. Dans les neuroblastomes de mauvais pronostic, une délétion 1p36 est observée, zone contenant le gène de miR-34a, expliquant la faible expression du miR, lui-même inhibiteur de facteur induisant la progression du cycle cellulaire. En 2007, différentes équipes ont ensuite montré l'implication de miR-34 dans la voie de p53 (Bommer et al. 2007; Chang et al. 2007; Corney et al. 2007; He et al. 2007; Raver-Shapira et al. 2007; Tarasov et al. 2007; Tazawa et al. 2007). Elles sont toutes arrivées à la même conclusion : les membres de la famille miR-34 sont des cibles directes de p53 et leur surexpression peut induire l'apoptose, l'arrêt du cycle cellulaire et la sénescence. L'expression des miR-34 est régulée directement par p53. Ces mêmes études ont montré qu'ils agissent comme des gènes suppresseurs de tumeur et leur réintroduction dans des cellules déficitaires inhibe la prolifération et la survie cellulaire.

Les analyses expérimentales et les prédictions bioinformatiques ont montré l'implication de la famille miR-34 dans la régulation de gènes impliqués dans le contrôle du cycle cellulaire et l'apoptose comme E2F3 (Welch et al. 2007; Lujambio et al. 2008), CDK6 (Bommer et al. 2007; Lujambio et al. 2008), Bcl-2 (Bommer et al. 2007), c-myc (Lujambio et al. 2008). MiR-34a est retrouvé sous-exprimé dans les LLC (Mraz et al. 2009; Zenz et al. 2009). Ce statut est associé à la mutation p53, à une résistance à la chimiothérapie et à la diminution d'apoptose. MiR-34a est inhibé par méthylation des îlots CpG dans différents cancers dont le mélanome (Lodygin et al. 2008). Dans le mélanome oculaire, miR-34a inhibe la prolifération et la migration par inhibition du facteur c-Met (proto-oncogène). Dans le mélanome cutané, la surexpression de miR-34a et miR-34c inhibe l'invasion cellulaire de lignées de mélanome non mutées pour p53 (Yamazaki et al. 2012).

Cette liste des premiers miRs suppresseurs de tumeur n'est pas exhaustive, il existe beaucoup d'autres miARNs reconnus depuis comme suppresseurs tels que miR-29 dans les LLC (Pekarsky et al. 2006), miR-145 (Iorio et al. 2005) et miR-125a et b (Scott et al. 2007) dans les cancers du sein.

B – miARNs oncogènes (oncomirs)

Parmi les oncomirs : le polycistron miR-17-92, miR-21 et miR-155 ont été les premiers et les mieux caractérisés.

1 – Le polycistron miR-17-92

Les miRs du polycistron miR-17-92 ont été les premiers identifiés comme étant potentiellement oncogènes (He et al. 2005b). Le locus miR-17-92 code pour sept miARNs (miR-17-3p, -17-5p, -18a, -20a, -19a, -19b, et -92) exprimés à partir d'un même site de transcription d'où leur appellation de polycistron. Ces miRs sont localisés dans des régions fréquemment amplifiées dans les lymphomes B et le cancer du poumon et sont surexprimés dans différents cancers (Ota et al. 2004 ;Hayashita et al. 2005). Les ARNs régulés par le cluster miR-17-92 codent pour des facteurs pro-apoptotiques ou des inhibiteurs du cycle cellulaire.

Une des premières cibles identifiées est le facteur de transcription E2F1 connu comme régulateur du cycle cellulaire (O'Donnell et al. 2005). Il a été montré, chez la souris, que l'expression du cluster miR-17-92 pouvait potentialiser l'action oncogénique du proto-oncogène c-myc en accélérant la tumorigénèse et en inhibant l'apoptose (He et al. 2005b). De plus, c-myc est directement responsable de l'induction de l'expression du polycistron miR-17-92 (Tagawa et al. 2007). En ajustant le niveau d'expression de facteurs pro-apoptotiques (E2F1) et anti-prolifératifs (p21), le cluster miR-17-92 induirait soit la prolifération cellulaire soit l'apoptose. L'action oncogénique est toutefois liée au contexte cellulaire dans lequel survient la surexpression.

2 – miR-21

Le miR-21 est le miARN surexprimé dans le plus grand nombre de tumeurs solides, notamment dans les cancers du sein (Iorio et al. 2005), du poumon (Volinia et al. 2006), du colon (Asangani et al. 2008), des ovaires (Iorio et al. 2007), du foie (Meng et al. 2007), de la prostate (Volinia et al. 2006) et dans les glioblastomes (Chan et al. 2005). Il est surexprimé également dans les pathologies hématologiques telles que les leucémies, les lymphomes, le myélome multiple (Fulci et al. 2007;Lawrie et al. 2007;Pichiorri et al. 2008). Les études de Iorio et coll. et de Si et coll. ont montré que miR-21 est surexprimé dans les tumeurs mammaires par rapport aux tissus normaux suggérant son rôle oncogène (Iorio et al. 2005; Si et al. 2007). L'inhibition de ce miR induit une diminution de la croissance cellulaire *in vitro* et *in vivo* produisant une augmentation de l'apoptose et une diminution de l'expression de BCL-2 suggérant ainsi que BCL-2 est une cible de miR-21 (Si et al. 2007).

Sa surexpression dans l'ensemble des pathologies tumorales suggère un rôle d'oncogène ubiquitaire. Les données expérimentales montrent qu'il joue un rôle important dans l'oncogénèse. Un grand nombre de ces cibles a été identifié. Elles sont principalement des gènes suppresseurs de tumeurs qui participent directement ou indirectement à

l'apoptose comme PTEN (Meng et al. 2007;Zhang et al. 2010b), ou PDCD4 (Chen et al. 2008b;Lu et al. 2008;Yao et al. 2009) ou à l'invasion (Gabriely et al. 2008;Zhang et al. 2008;Zhu et al. 2008). MiR-21 agit notamment sur RhoB. MiR-21 réprime l'expression de RhoB (Connolly et al. 2010) et régule ainsi la prolifération, l'invasion et l'apoptose (Liu et al. 2011). L'inhibition de miR-21 induit un arrêt du cycle cellulaire, une augmentation de l'apoptose et une augmentation de la chimiosensibilité aux agents anticancéreux dans les tumeurs du pancréas (Park et al. 2009a). Des études *in vitro* et *in vivo* suggèrent que miR-21 pourrait être un marqueur diagnostique et pronostique dans différentes pathologies tumorales (Gao et al. 2011;Li et al. 2009;Markou et al. 2008;Rossi et al. 2010).

3 – miR-155

Le miR-155 a été décrit d'abord dans l'oncogénèse des pathologies hématologiques : lymphomes et leucémies (Eis et al. 2005). Il est également surexprimé dans certaines tumeurs solides du sein (Iorio et al. 2005), du poumon (Yanaihara et al. 2006), du colon (Volinia et al. 2006), du pancréas (Greither et al. 2010) ou de la thyroïde (Nikiforova et al. 2008). De plus, un haut niveau d'expression de miR-155 est corrélé à un mauvais pronostic dans les cancers du poumon et du pancréas (Yanaihara et al. 2006; Greither et al. 2010). Il est ainsi considéré comme un oncomir.

Plusieurs cibles ont été identifiées comme RhoA (Kong et al. 2008) ou SOCS1 (suppressor of cytokine signaling 1) (Jiang et al. 2010). Dans le cancer du sein, l'expression de miR-155 est inversement corrélée à l'expression du gène suppresseur SOCS1. MiR-155 joue le rôle d'oncogène en inhibant SOCS1 et induisant ainsi une activation de STAT3 (signal transducer and activator of transduction) qui va jouer son rôle protumoral. MiR-155 pourrait également jouer un rôle clé entre l'inflammation et la pathologie tumorale car son expression est augmentée par des stimuli inflammatoires.

Le rôle de chaque miARN et le type d'ARNm qu'ils ciblent peuvent être différents suivant le tissu étudié. Ainsi, un miR peut agir comme oncogène lorsqu'il est surexprimé dans certains cancers et avoir des caractéristiques de suppresseurs de tumeurs dans d'autres cancers. Le miR-17-5p, appartenant au cluster miR-17-92, est capable d'inhiber des facteurs anti-prolifératifs (tels que TSG101 : Tumor Susceptibility gene 101, RBL1 : Retinoblastoma-like 1, MAPK9 : Mitogen-activated protein kinase 9) et des facteurs prolifératifs (tels que N-myc, NCOA3 : Nuclear receptor coactivator 3) selon la composition moléculaire des tissus considérés induisant un effet oncogène ou au contraire

un effet suppresseur de tumeurs. Les exemples sont nombreux par exemple le cluster miR-17-92 est oncogène dans les lymphomes B (Ota et al. 2004), le cancer du poumon (Hayashita et al. 2005), de la prostate (Volinia et al 2006) et du colon (Volinia et al. 2006) mais semble être suppresseur de tumeur dans le cancer du sein (Hossain et al. 2006). De même, MiR-15a et 16 sont sous-exprimés dans les LLC (Calin et al. 2002) et surexprimés dans certaines tumeurs pancréatiques endocrines (Volinia et al. 2006).

III – Expression des microARNs dans les cancers

Nous développerons les connaissances sur l'expression des miARNs en oncologie en ce qui concerne leur intérêt diagnostique et pronostique, leur rôle pro-métastasant et enfin leur intérêt dans l'étude de réponse aux traitements.

A – Leur intérêt diagnostique

Deux études comparatives ont été réalisées, concernant les profils d'expression des miARNs dans les tissus tumoraux par rapport à des tissus sains, sur différentes tumeurs utilisant deux technologies distinctes (Lu et al. 2005, Volinia et al. 2006).

Lu et ses collaborateurs ont développé une technique de cytométrie en flux utilisant des microbilles associée à une amplification par RT-PCR (Lu et al. 2005). Leur analyse a porté sur 217 miARNs étudiés sur 334 échantillons tissulaires ou cellulaires. Ils ont montré que l'analyse des profils d'expression de miARNs était très informative. En effet, elle a permis de classer les tissus tumoraux selon l'origine embryologique et leur stade de différenciation. Ils ont observé majoritairement une sous-expression des miARNs dans les tumeurs par rapport aux tissus sains. De plus, ils ont été capables de classer, grâce aux profils d'expression, des tumeurs très indifférenciées dont l'étude histologique avait été mise en défaut. Ceci permettrait de renseigner l'origine tumorale en cas de localisation métastatique d'un cancer dont le primitif est inconnu, pour une meilleure prise en charge thérapeutique de ces tumeurs en adaptant le traitement à la pathologie rattachée.

L'équipe de Volinia a utilisé une technique par microarray (Volinia et al. 2006). L'analyse de l'expression de 228 miARNs a porté sur 540 échantillons dont 363 échantillons correspondant à 6 types de tumeurs solides (provenant de poumon, sein, estomac, prostate, colon et pancréas) et 177 échantillons sains. Une première analyse d'étude de classification a permis de sélectionner 137 miARNs permettant une bonne séparation entre les différents tissus en fonction de leur origine. Ensuite, cette équipe a comparé les tissus tumoraux et les tissus sains et mis en évidence un spectre d'expression différent entre tumeurs et tissus

sains. Elle a ainsi identifié 26 miARNs surexprimés et 17 miARNs sous-exprimés soit 43 miARNs dérégulés sur les 137 étudiés. Parmi ces miARNs, certains sont déjà connus pour leur association aux cancers tels que miR-17-5p, miR-20a, miR-21, miR-92, miR-106, miR-155. Cette étude a permis d'identifier une signature de miARNs, majoritairement sur-exprimés, spécifiques de six types de tumeurs.

L'ensemble de ces résultats suggère le potentiel de l'utilisation d'un profil d'expression de miARNs dans le diagnostic des tumeurs. Cependant ces deux études de comparaison de tissus tumoraux et sains montrent des résultats différents. La première a montré majoritairement une sous-expression des miARNs dans les tumeurs par rapport aux tissus sains et la deuxième majoritairement une sur-expression des miARNs dans les tissus tumoraux. Ces différences proviennent de la différence de nombre et de nature des échantillons mais également de la technique utilisée. Ces différences seront plus largement développées par la suite.

De nombreuses études ont comparé l'expression des miARNs, dans un type particulier de tumeur par rapport au tissu normal correspondant. Elles ont montré des signatures d'expression des miARNs tumoraux dans de nombreux types de tumeurs notamment dans les LLC (Calin et al. 2004a), les cancers mammaires (Iorio et al. 2005), les cancers du poumon (Lu et al. 2012;Saito et al. 2011;Voortman et al. 2010) (Yanaihara et al. 2006), les glioblastomes (Ciafre et al. 2005), les carcinomes papillaires de la thyroïde (He et al. 2005a), les cancers de la prostate (Porkka et al. 2007;Schaefer et al. 2010), les cancers du colon (Cummins et al. 2006;Nagel et al. 2008) et les tumeurs endocrines du pancréas (Roldo et al. 2006). Par exemple, l'étude de Iorio, à partir de 76 tumeurs mammaires et 10 échantillons contrôles, a mis en évidence 29 miARNs exprimés différenciellement dans les tumeurs par rapport au contrôle et qu'une signature de 15 miARNs suffirait pour prédire si le tissu est tumoral ou non. Parmi les miARNs les plus dérégulés, les miRs-155, -21 sont retrouvés surexprimés et les miRs-125b, -145 et -10b sont sous-exprimés (Iorio et al. 2005).

B – Leur intérêt pronostique

De nombreuses études se sont intéressées à la valeur pronostique de l'expression de miARNs dans différentes tumeurs. Les études ont montré, soit des signatures d'expression de plusieurs miARNs, soit des miARNs seuls, ayant une association significative avec le pronostic de la tumeur. Elles ont été réalisées dans diverses tumeurs notamment dans les LLC (Calin et al. 2005), dans les tumeurs du poumon (Garofalo et al. 2009;Yu et al. 2008) (Yanaihara et al. 2006 ;Takamizawa et al. 2004), du sein (Iorio et al. 2008) (Buffa et al.

2011 ;Yan et al. 2008 ;Roldo et al. 2006), de la prostate (Schaefer et al. 2010). Shen et coll. ont réalisé une revue non exhaustive des principales études étudiant le potentiel pronostique des miARNs (Shen et al. 2013). Par exemple, Calin et collaborateurs ont mis en évidence une signature de 13 miARNs associés aux facteurs pronostiques [expression de ZAP70 (Zeta-chain-associated protein kinase 70) et statut mutationnel de la chaîne lourde d'immunoglobuline : IgVH] et à la progression tumorale (Calin et al. 2004a). Une signature de deux miRs (miR-155 et let-7) est corrélée à la survie dans les cancers du poumon non à petites cellules (Yanaiharu et al. 2006). La surexpression de miR-155 et la sous-expression de let-7a-2 sont corrélées à un mauvais pronostic. Buffa et coll ont identifié des signatures d'expression de miRs associés au pronostic de tumeurs mammaires. Une surexpression de miR-128a, miR-767-3p et /ou miR-769-3p dans les tumeurs ER positif (Estrogen Receptor) et une surexpression de miR-27b, miR-144 et/ou miR-210 dans les tumeurs ER négatif sont associées à un mauvais pronostic (Buffa et al. 2011). L'étude de Takamizawa a été une des premières à mettre en évidence la valeur pronostique d'un miR particulier. Dans les cancers du poumon, la sous-expression de let-7a et -f est associée à une durée de survie plus courte et donc de plus mauvais pronostic (Takamizawa et al. 2004). La surexpression de miR-21 est corrélée aux stades avancés de cancers mammaires et à un mauvais pronostic de survie (Yan et al. 2008) ainsi qu'avec une forte expression de l'index de prolifération Ki67 dans les tumeurs endocrines pancréatiques (Roldo et al. 2006).

C – MiARNs et métastases

Le profil des miARNs est important également dans l'invasion et l'évolution métastatique, de par le large spectre d'action des miARNs sur des gènes connus pour leurs actions prométastatique et anti-métastatique ou dans la transition épithélio-mésenchymateuse. Ce rôle dans la formation de métastases ne fut démontré qu'en 2007 (Ma et al. 2007). Depuis, un nombre croissant de miARNs pro-métastatiques et anti-métastatiques a été identifié (Zhang et al. 2010a).

Ma et collaborateurs ont été les premiers à mettre en évidence le rôle d'un miARN dans l'induction du processus métastatique (Ma et al. 2007). Ces derniers ont montré que miR-10b était fortement exprimé seulement dans les cellules métastatiques des cancers du sein et qu'il régulait de manière positive la migration cellulaire et l'invasion *in vitro*. De plus, la surexpression de miR-10b dans les tumeurs du sein non métastatiques *in vivo* induisait l'invasion et l'apparition de métastases. Le rôle du facteur de transcription Twist et la régulation de l'expression de la protéine RhoC ont été reportés. Ils ont mis en évidence

l'induction par Twist de la transcription de miR-10b. Ce dernier inhibe la traduction de l'ARNm du gène HOXD10 (Homeobox D10) ce qui induit la transcription du gène pro-métastatique RhoC. L'inter-relation Twist/miR-10b/HOXD10/RhoC est le premier exemple de relation entre les miARNs et les gènes des cancers associés aux métastases.

MiR-21 est surexprimé dans de nombreuses tumeurs solides. Il semble jouer un rôle important particulièrement dans le processus métastatique. Des études ont montré son implication dans l'invasion cellulaire et la formation de métastases. Elles ont été réalisées dans différents modèles tumoraux et sur des analyses *in vitro* et *in vivo*, par exemple, dans les cancers du colon (Asangani et al. 2008), les cancers mammaires (Zhu et al. 2008) ou dans les gliomes (Gabriely et al. 2008). MiR-21 agit, pour cela, sur différents gènes suppresseurs de tumeurs tels que, par exemple, RhoB. MiR-21 réprime l'expression de RhoB (Connolly et al. 2010) et régule ainsi la prolifération, l'invasion et l'apoptose (Liu et al. 2011). Ainsi, la surexpression de miR-21 agit, comme une extinction de RhoB, en induisant la prolifération et l'invasion cellulaire et en inhibant l'apoptose dans les cancers colorectaux. L'inhibition de miR-21 induit l'effet inverse.

Dans le mélanome, le miR-182 est surexprimé dans les lignées cellulaires de mélanome métastatique. Segura et coll ont montré que l'expression ectopique de miR-182 stimule la migration des cellules de mélanome *in vitro* et *in vivo* en réprimant les facteurs de transcription MITF (microphthalmia-associated transcription factor) et FOXO3 et induit ainsi la formation de métastases (Segura et al. 2009).

D – Leur intérêt dans la prédiction de la réponse aux traitements

Il a été montré par plusieurs études que la réponse à différentes classes de médicaments pouvait être modulée par le niveau d'expression de certains miARNs. Ceci a été le cas notamment pour la prédiction de la réponse aux traitements anticancéreux (Hummel et al. 2010). Par exemple, l'expression de miR-214 influencerait la réponse au cisplatine dans le cancer de l'ovaire (Yang et al. 2008) ou les expressions de let-7, miR-21, miR-27b, miR-28 influencerait la réponse à la doxorubicine dans le cancer du sein (Kovalchuk et al. 2008). La surexpression du miR-17 via STAT3 induirait une résistance à l'inhibiteur de MEK (AZD6244) dans des lignées cellulaires pulmonaires (Dai et al. 2011).

En oncologie, les profils d'expression des miARNs tumoraux paraissent intéressants dans le diagnostic, le pronostic et la réponse aux traitements dans un grand nombre de

tumeurs. Nous allons maintenant développer les connaissances des microARNs dans le mélanome.

3) Les microARNs dans le mélanome

Les premières études concernant le mélanome ont été surtout descriptives de profils de miARNs. Ces profils d'expression ont été définis dans des échantillons de tissus tumoraux ou des échantillons de lignées cellulaires de mélanome. Les expressions différentielles par rapport à des échantillons contrôles ont été considérées comme associées à la formation du mélanome et à la progression. Les études se sont ensuite intéressées aux rôles fonctionnels des miRs et ont montré leur importante contribution à la complexité moléculaire de ces tumeurs. Récemment, ils ont commencé à être étudiés dans les fluides biologiques. Nous allons décrire les études des profils d'expression ainsi que les études fonctionnelles.

I – Etudes sur l'expression des microARNs dans le mélanome

A – Premières études sur les microARN dans le mélanome (2005-2008)

Les toutes premières données publiées sur l'expression des microARNs dans le mélanome ont été réalisées par les travaux de Lu en 2005 (Lu et al. 2005). Cette équipe avait examiné l'expression de 217 microARNs dans 334 échantillons de différents types de pathologies cancéreuses incluant des lignées cellulaires et des tissus tumoraux. Les profils d'expression des microARNs étaient très informatifs de l'origine et du niveau de différenciation des tumeurs. Ils ont permis la classification de tumeurs peu différenciées. Un nombre aux alentours de 200 microARNs pourrait être suffisant pour classer les tumeurs chez l'homme. Cependant, dans cette étude il n'y avait que trois échantillons tissulaires et deux lignées cellulaires de mélanome. De plus, il n'y avait pas eu de comparaison par rapport au tissu sain pour le mélanome, contrairement à d'autres tumeurs.

En 2006 et 2007, l'expression des microARNs dans le mélanome a été publiée dans des études analysant un large panel de tissus et de lignées cellulaires dans différents types de tumeurs (Blower et al. 2007;Gaur et al. 2007) (Zhang et al. 2006).

L'étude de Zhang (Zhang et al. 2006) a porté sur 227 échantillons tissulaires et cellulaires de tumeurs mammaires, ovariennes et mélanomes. Pour le mélanome, cette étude comprenait 45 lignées cellulaires mais pas de tissus. Ils ont identifié 243 microARNs qui sont retrouvés uniquement dans le mélanome (dont 83 gains et 160 pertes) et 41 microARNs ont été trouvés communs aux trois pathologies. 86% des lignées de mélanome

ont une altération génomique sur les gènes correspondant aux gènes des microARNs. Ces altérations génomiques sur les gènes des microARNs pourraient constituer une étape critique dans le développement des cancers. Cette étude sert de référence bibliographique pour élaboration de la carte moléculaire du mélanome réalisée sur le site Melanoma Molecular Map Project (MMMP, <http://www.mmmp.org/MMMP/>) (www.mmmp.org/MMMP/public/glossary 14 A.D.).

Gaur et collaborateurs ont étudié l'expression de 241 microARNs matures dans 60 lignées cellulaires tumorales. Ils ont identifié 15 microARNs ayant la même expression dans 8 lignées cellulaires de mélanome et différentes des autres lignées cellulaires (4 étant surexprimés et 11 sous-exprimés dans ces lignées de mélanome) (Gaur et al. 2007). Une étude complémentaire aux travaux précédents sur 60 lignées cellulaires tumorales a montré le rôle potentiel des microARNs dans la chimiorésistance et la chimiosensibilité (Blower et al. 2007).

En janvier 2008, une étude a résumé les données concernant l'expression des microARNs dans les tumeurs solides et leurs gènes cibles. Elle s'est intéressée plus particulièrement au mélanome (Molnar et al. 2008). Dans cette étude préliminaire, les auteurs ont recherché si les gènes des microARNs pouvaient faire une discrimination entre mélanomes et mélanocytes. Ils ont étudié 4 lignées cellulaires de mélanome dont certaines ayant un potentiel métastatique, 2 échantillons tissulaires provenant de mélanome primaire et 2 cultures de mélanocytes. Ils ont examiné 28 microARNs dans les expressions étaient différentes entre mélanomes et mélanocytes. Ils ont souligné le rôle potentiel futur des profils de microARNs comme valeur pronostique dans le diagnostic et dans la classification des mélanomes.

B – Déterminations de profils de microARN dans le mélanome

La première étude, portant sur la comparaison des profils de microARN de mélanocytes épidermiques humains normaux (NHEM) par rapport aux lignées cellulaires de mélanome, a été publiée en juillet 2009 (Mueller et al. 2009). Cette étude a analysé, par microarray, 461 microARNs dans des NHEM et sept lignées tumorales de mélanome dont trois dérivées de mélanomes primaires et quatre de mélanomes métastatiques afin d'identifier les microARNs impliqués dans la tumorigénèse, la progression et dans le processus métastatique. De larges cohortes de microARNs associés à une progression précoce ou tardive du mélanome malin, pouvant être de potentiels oncogènes ou gènes

suppresseurs de tumeurs, ont pu être définies (**Figure 13**).

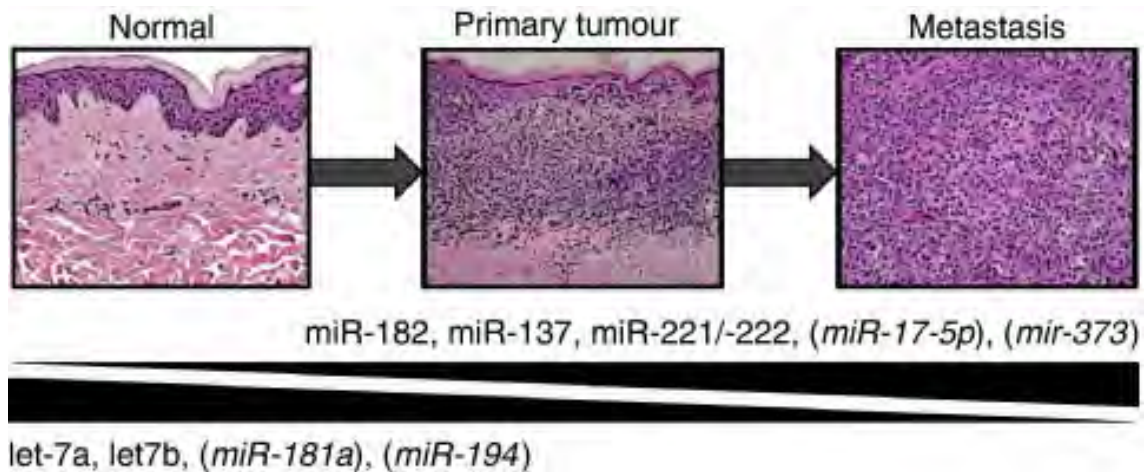


Figure 13: Représentation schématique des miARNs dérégulés durant la tumorigénèse du mélanome. L'expression des miRs: -182, -137, -221/222, -17-5p et -373, est plus importante dans les métastases par rapport à la tumeur primaire et let-7a, let-7b, miR-181a, miR-194 sont au contraire diminués d'après les études de Mueller et coll. Figure d'après Mueller, 2009 (Mueller and Bosserhoff 2009)

Une autre étude a évalué, sur un panel de 17 lignées cellulaires de mélanome et des mélanocytes normaux provenant de 10 donneurs sains, le niveau d'expression par RT-PCR de sept microARNs (Levati et al. 2009). Les miRs -17-5p, -18a, -20a et -92a étaient surexprimés, et les miRs -146a, -146b, -155 sont sous-exprimés dans la majorité des lignées tumorales par rapport aux mélanocytes normaux. Les auteurs se sont intéressés plus particulièrement au miR-155. Les résultats montrent, pour la première fois, que miR-155 pourrait être classé comme régulateur négatif de la prolifération et de la survie du mélanome.

Les différentes études réalisées, en 2009 et 2010, sur les microARNs dans le mélanome ont mis en évidence différents microARNs régulateurs associés de manière précoce ou tardive à la progression du mélanome malin (Schulz et al. 2008) (Caramuta et al. 2010;Chen et al. 2010;Mueller & Bosserhoff 2009;Mueller and Bosserhoff 2010;Segura et al. 2010). Ces microARNs sont intéressants car ils peuvent représenter des marqueurs diagnostiques ou des cibles thérapeutiques potentiels.

Des études se sont intéressées plus globalement à des profils d'expression des microARNs (Philippidou et al. 2010;Stark et al. 2010). L'équipe de Philippidou a étudié certains microARNs ainsi que leurs gènes cibles sur 10 lignées cellulaires de mélanome ainsi que sur 20 tissus de patients correspondant à des naevus bénins, des mélanomes primaires et des métastases de mélanome. Cette étude a montré que le miR-200c était diminué dans tous les échantillons tissulaires et cellulaires de mélanome, les miRs-205 et -23b étaient

diminués uniquement dans les échantillons tissulaires de mélanome. De plus, les miRs-146a et -155 étaient augmentés dans les tissus de mélanome mais pas dans les lignées cellulaires. Leur étude a permis de définir certains microARNs et leur gène cible. Ces derniers pourraient être des candidats intéressants comme biomarqueurs de mélanome.

De récentes études ont inclus l'identification d'une signature de microARNs dont l'expression est un facteur prédictif indépendant de la survie (Segura et al. 2010). Cette étude a porté sur 59 échantillons tissulaires fixés et inclus en paraffine de mélanomes métastatiques. Une signature de 18 microARNs a été mise en évidence permettant de distinguer les mélanomes de mauvais pronostic. Par ailleurs, une surexpression de certains microARNs était corrélée à une longue survie.

Ma et collaborateurs ont démontré la faisabilité de réaliser un profil de microARNs sur des échantillons tissulaires fixés au formol inclus en paraffine (FFPE : Formalin-Fixed Paraffin Embedded) (Ma et al. 2009). Leur étude s'est intéressée à 53 microARNs. Les membres de la famille let-7 étaient parmi les microARNs les plus représentés, avec une diminution d'expression, sauf let-7e et let-7i qui étaient surexprimés.

II – Etudes fonctionnelles des microARNs dans le mélanome

Un état actuel des principaux miARNs connus pour être impliqués dans le développement et la progression du mélanome est répertorié dans la **figure 14** et le **Tableau 3** (Glud and Gniadecki 2013;Schneider 2012;Segura et al. 2012;Voller et al. 2013). Les principales cibles des miARNs peuvent être divisés en trois classes : les récepteurs ou canaux, les protéines des voies de signalisation, les facteurs de transcription (Völler et al. 2013). Ces miARNs interviennent dans quatre principaux processus qui dictent la genèse et la progression du mélanome : la prolifération, l'invasion, la survie et la réponse immune (Segura et al. 2012 ;Glud and Gniadecki 2013). Un grand nombre d'altérations moléculaires apparaissent dans la mélanomagénèse. Comme vu précédemment, les principales voies de signalisation dérégulées dans le mélanome sont la voie des MAP Kinases, la voie PI3K/AKT, la voie p16 et p14 avec la cascade CDKN2A/p53, la voie MITF et la voie Wnt/Béta-caténine (**Figure 4**).

Nous développerons plus précisément certains de ces miARNs avec leurs principales cibles et leurs rôles. Nous nous focaliserons sur les connaissances de l'implication de certains miARNs sur la voie des MAP Kinases et PI3K, sur les cyclines, sur la voie MITF, sur l'hypoxie et le pouvoir invasif par la formation de métastases.

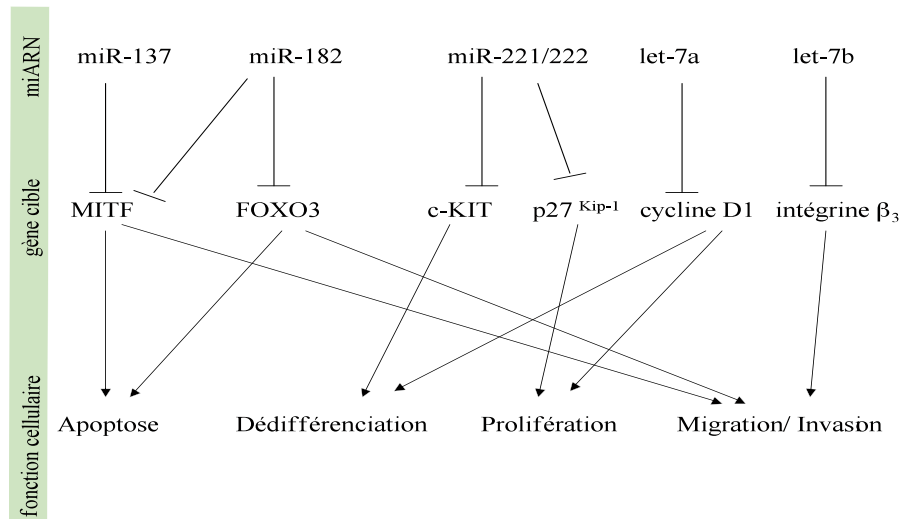


Figure 14. Figure schématique des principaux miRNAs et gènes-cibles impliqués dans la mélanomagenèse d'après Mueller et Bosserhoff 2009 (Mueller & Bosserhoff 2009)

MicroARNs	Expression	Cibles directes	Fonctions dans le mélanome	Références
	augmentée			
miR-15b	↑	-	survie, prolifération, apoptose	Satzger et al. 2010
miR-21	↑	PTEN, PDCD4, BTG2 ↓	prolifération	Yang et al. 2011, Satzger et al. 2012
miR-25	↑	PTEN ↓		Karreth et al. 2011
miR-30b/d	↑	GALNT1 et 7	métastase, réponse immunitaire	Gaziel-Sovran et al. 2011
miR-92a	↑	PTEN ↓	motilité, migration	Karreth et al. 2011
miR-148	↑	MITF ↓	prolifération, survie, arrêt cycle cellulaire	Hafliadottir et al. 2010
miR-149	↑	cKit ↓		Igoucheva et al. 2009
miR-181a	↑	PTEN ↓		Karreth et al. 2011
miR-182	↑	MITF, FOXO3 ↓	métastase	Segura et al. 2009
miR-200b	↑	PTEN ↓	invasion	Karreth et al. 2011
miR-214	↑	TFAP2C ↓	progression cycle cellulaire, invasion, métastase	Penna et al. 2011
miR-221	↑	p27 ^{Kip1} , cKit ↓	arrêt cycle cellulaire	Igoucheva et al. 2009
miR-222	↑	cKit ↓	prolifération, invasion, migration, métastase	Igoucheva et al. 2009
miR-302a	↑	Notch4 ↓		Costa et al. 2009
miR-338	↑	cKit ↓		Igoucheva et al. 2009
miR-532	↑	RUNX3 ↓	développement	Kitago et al. 2009
	diminuée			
miR-9	↓	NF-KB1 ↑	prolifération	Liu et al. 2012
miR-29c	↓	DNMT3A et B ↑		Nguyen et al. 2011
miR-34a/c	↓	ULBP2 ↑	prolifération, invasion, réponse immunitaire	Heinemann et al. 2012
miR-34a/b	↓	c-Met, pAkt, p-Rb, CDK4/6 ↑		Dong et al. 2012
miR-137	↓	MITF, CtBP1 ↑	prolifération, survie, arrêt cycle cellulaire, apoptose	Bemis et al. 2008, Deng et al. 2011
miR-145	↓	c-MYC		Noguchi et al. 2012a
miR-155	↓	SKI ↑	prolifération, apoptose	Levati et al. 2011
miR-193b	↓	Cycline D1 ↑	prolifération	Chen et al. 2010
miR-196a	↓	HoxB7, HoxC8 ↑	prolifération, invasion, migration, invasion	Braig et al. 2010, Mueller et al. 2011
miR-199a*	↓	c-Met ↑	invasion	Migliore et al. 2008
miR-203	↓	E3F3 ↑		Noguchi et al. 2012b
miR-205	↓	pAkt, E2F1, E2F5 ↑	apoptose, prolifération, sénescence	Dar et al. 2011
miR-211	↓	TGFBR2, KCNMA1, BRN2 ↑	prolifération, invasion, migration	Mazar et al. 2010, Boyle et al. 2011
let-7	↓	KRAS ↑	prolifération, différenciation	Kundu et al. 2012
let-7a	↓	Intégrine β3 ↑	métastase	Muller et al. 2008
let-7b	↓	Cyclines D1, D3, A, CDK4 ↑	progression cycle cellulaire, prolifération	Schultz et al. 2008

Tableau 3: Principaux miARNs impliqués dans le développement et la progression du mélanome. Pour chaque miR est noté si son expression est augmentée ou diminuée, leurs cibles et leurs fonctions connues. Complément de références (Braig et al. 2010;Costa et al. 2009;Deng et al. 2011;Dong and Lou 2012;Gaziel-Sovran et al. 2011;Heinemann et al. 2012;Kitago et al. 2009;Kundu et al. 2012;Migliore et al. 2008;Mueller and Bosserhoff 2011;Noguchi et al. 2012a;Noguchi et al. 2012b)

A – Rôles des miRs dans les voies MAPK et PI3K

Différentes voies de signalisation sont altérées dans le mélanome dont les voies MAPK et PI3K qui jouent un rôle clé dans la mélanomagenèse.

La voie MAPK régule le devenir des cellules en réponse à une grande variété de stimuli via des ligands activant les récepteurs aux tyrosines kinases (RKTs). Ras est activé par différents facteurs de croissance entraînant le recrutement de la kinase Raf et conduisant à la cascade de phosphorylation Raf-MEK-ERK. La protéine ERK activée induit l'activation de facteurs de transcription important pour la prolifération cellulaire. Les intégrines sont des récepteurs glycoprotéiques transmembranaires capables après liaison à leurs ligands matriciels d'activer la cascade des MAPK. L'expression de l'intégrine bêta 3 (β_3) et celle de NRAS sont régulées par let-7a dans le mélanome (Muller and Bosserhoff 2008). L'intégrine β_3 est connue pour jouer un rôle important dans la progression et l'invasion du mélanome. La transfection de cellules de mélanome par let-7a induit une diminution de l'expression de l'intégrine β_3 , suggérant que la perte d'expression de let-7a pourrait être un mécanisme régulateur conduisant à l'augmentation de l'expression de l'intégrine β_3 . Ces données ont montré que let-7a était un régulateur important de l'intégrine β_3 . En effet, la perte d'expression de let-7a dans le mélanome est impliquée dans le développement et la progression de ce cancer. A l'heure actuelle, peu de miARNs semblent cibler directement la voie des MAPK pourtant fortement impliquée dans la mélanomagenèse.

La voie PI3K-AKT est activée dans des mélanomes métastatiques par amplification ou mutation activatrice d'AKT, par mutation inhibitrice ou délétion de PTEN, par mutation activatrice de NRAS. PI3K peut être activée directement par un récepteur à tyrosine kinase ou par l'intermédiaire de la protéine RAS. Elle peut être inhibée par PTEN. Elle permet le recrutement de la kinase AKT induisant sa phosphorylation. AKT est un proto-oncogène qui a diverses protéines effectrices en aval dont la protéine mTOR (mammalian Target Of Rapamycin) qui agit sur la synthèse protéique intervenant dans le cycle cellulaire et l'apoptose. AKT3 a été montré comme inversement corrélé au taux de miR-125b et pourrait être une cible de ce miR (Glud et al. 2011). MiR-21, miR-25, miR-92a, miR-181a, miR-200b, miR-221 et miR-222 sont surexprimés dans le mélanome et ont été identifiés comme régulateurs directs de PTEN (Garofalo et al. 2009) (Karreth et al. 2011; Yang et al. 2011).

c-Kit, est un récepteur de tyrosine kinase pour le facteur de croissance SCF, son activation induit l'activation des voies MAPK et PI3K/AKT. Il joue un rôle central dans le

développement des mélanocytes et dans la survie cellulaire. Les miRs-221, -222, -149 et -338 sont surexprimés dans le mélanome et sont connus pour réguler l'expression de c-Kit (Igoucheva and Alexeev 2009). Les miRs-221 et -222 sont surexprimés dans différents cancers dont le mélanome dans lesquels ils exercent leur fonction en réprimant le récepteur c-kit. Felicetti et collaborateurs ont montré que ces deux microARNs sont directement impliqués dans la pathogénèse du mélanome (Felicetti et al. 2008a; Felicetti et al. 2008b). La majorité des mélanomes invasifs et métastatiques présentent une sous-expression du récepteur c-kit. Ils ont montré que cette diminution d'expression de c-kit était le résultat d'une surexpression de miRs-221 et -222 pendant la progression du mélanome de la tumeur primaire au mélanome invasif. La surexpression des miRs-221 et -222 induit la prolifération, l'augmentation des capacités invasives et chémotactiques, une augmentation de la croissance tumorale dans des modèles murins de mélanome. Des résultats similaires ont été publiés en 2009 (Igoucheva & Alexeev 2009). Igoucheva et ses collaborateurs ont confirmé que c-kit était dérégulé par miRs-221 et -222 et ont montré que la régulation de c-kit était basée sur un mécanisme de régulation miARN-dépendante et non dépendante du facteur de transcription AP-2 (Activating protein 2).

B – Action des miRs sur l'expression des cyclines

Le cycle cellulaire est contrôlé par la modulation de l'expression des cyclines et leur capacité à activer des kinases spécifiques (CDK). Plusieurs microARNs interviennent dans la voie p16-CDK4/6-Rb. P16, un inhibiteur de CDK4, régule négativement l'activité du complexe CDK4-cycline D1. Il empêche l'inactivation de la protéine Rb (normalement inactivée par phosphorylation par le complexe CDK4-cycline D) ce qui empêche la libération de facteurs de transcription essentiels (E2F) au passage de la phase G1 vers la phase S du cycle cellulaire. L'augmentation de l'expression des cyclines D1 et D3 a été démontrée dans le mélanome. Plusieurs miARNs ciblent directement ces cyclines notamment let-7b (Schultz et al 2008), miR-193b (Chen et al. 2010). MiR-205 a pour cible E2F (Dar et al. 2011). L'équipe de Kunz a montré que let-7b ciblait des molécules importantes du cycle cellulaire (Schultz et al. 2008). L'analyse a porté sur 157 microARNs différents sur 10 naevus mélanocytaires bénins et 10 mélanomes primaires. Une expression différentielle a été trouvée pour 72 miARNs. Les cinq membres de la famille let-7 (a, b, d, e, g) étaient significativement diminués dans les échantillons mélanomes par rapport aux naevus bénins suggérant les rôles possibles de ces molécules comme suppresseurs de tumeur. La surexpression *in vitro* de let-7b, dans des cellules mélaniques transfectées, a

diminué l'expression des cyclines D1, D3, A et de CDK4 jouant ainsi un rôle dans le développement du mélanome. Ces données montrent que let-7b joue un rôle important, comme régulateur négatif de la croissance cellulaire et de la prolifération, par inhibition de la progression du cycle cellulaire. Par ailleurs, l'activité des complexes cycline-CDK peut être inhibée par p27. La protéine p27 est une cible directe des miR-221 et miR-222 (Das et al. 2010).

C – Action des miRs sur le facteur MITF

La première étude rapportant la dérégulation d'un seul microARN et ses fonctions dans la tumorigénèse du mélanome a été publiée par Bemis et coll. (Bemis et al. 2008). Le facteur de transcription MITF (microphthalmia-associated transcription factor) joue un rôle clé dans le lignage mélanocytaire (mélanoblastes, mélanocytes, mélanomes). Il contrôle l'expression de gènes impliqués dans la différenciation (mélanomagénèse, morphologie), la survie et la prolifération cellulaire. Des altérations de l'expression de MITF sont retrouvées dans le mélanome. Dans cette étude, le miR-137 a été identifié comme un des régulateurs de l'expression de MITF. Dans des lignées cellulaires de mélanome, miR-137 diminue l'expression de MITF. Par la suite, d'autres microARNs ont été identifiés comme régulateurs du facteur MITF dans le mélanome comme les miRs-148 et -182 (Haflidadottir et al. 2010) (Segura et al. 2009). Le miR-182, en plus de son action sur MITF, agit sur l'expression de FOXO3, facteur impliqué dans le développement du mélanome.

D – MicroARNs et hypoxie

En 2007, les premières analyses, étudiant les miARNs en hypoxie, ont mis en évidence une expression différentielle de certains miARNs en réponse à la baisse de pression en oxygène (Donker et al. 2007;Kulshreshtha et al. 2007). En 2008, différentes études ont mis en évidence l'induction de miR-210 dans l'hypoxie (Camps et al. 2008;Fasanaro et al. 2008;Giannakakis et al. 2008;Pulkkinen et al. 2008). Les cellules cancéreuses en hypoxie ont un caractère invasif et métastatique et sont plus résistantes aux traitements. Le facteur de transcription HIF (hypoxia inducible factor) joue un rôle central dans l'expression de plusieurs gènes impliqués dans différentes fonctions liées aux développements cancéreux telles que la survie cellulaire, l'angiogénèse et l'invasion tumorale. Zhang et collaborateurs ont démontré que l'expression de miR-210, principal microARN surexprimé par l'hypoxie, était élevée dans différents types de cancers et corrélée au caractère invasif du mélanome (Zhang et al. 2009). La surexpression de miR-

210 inhibe l'expression de Mnt (Max's next tango), un antagoniste du proto-oncogène myc. Ces données indiquent que ce miR influence la réponse à l'hypoxie dans les cellules tumorales en ciblant la protéine myc via l'inhibition de l'expression de Mnt. MiR-210 interviendrait dans l'adaptation des cellules cancéreuses aux conditions d'hypoxie en favorisant la croissance cellulaire et la survie.

E – MicroARNs et pouvoir métastatique

Les transitions entre phase non invasive (phase de croissance horizontale ou radiale du mélanome :RGP), phase invasive (phase de croissance verticale du mélanome : VGP) et phase métastatique (mélanome métastatique) s'accompagnent d'un gain de fonction comme pour certains facteurs de transcription (CREB/ATF-1, ATF-2, NFκB, SNAIL, STATs) ainsi que de la perte du facteur AP-2α (Melnikova and Bar-Eli 2008) (ATF-1 et 2 : Cyclic AMP-dependent transcription factor 1 and 2, NF-κB : nuclear factor-kappa B). L'altération des molécules d'adhésion comme les E-cadhérines, N-cadhérines et de différentes intégrines, la modification des gènes impliqués dans l'angiogénèse, dans l'invasion et la survie (VEGF, c-kit, EGFR) (VEGF : vascular endothelial growth factor, EGFR : epidermal growth factor receptor) sont liées à l'acquisition d'un haut potentiel métastatique. Comme cité plus haut, plusieurs miRs, incluant miRs-137, -221/222, -182, -34a ont montré leur implication dans la progression du mélanome en régulant des gènes-clé comme c-kit, MITF, FOXO3, l'intégrine β_3 , cycline D1, p27^{Kip1} (Mueller & Bosserhoff 2009). Segura a montré que la surexpression de miR-182 induisait le potentiel métastatique du mélanome en réprimant les facteurs de transcription MITF et FOXO3 (forkhead family transcription factor) en augmentant la survie et le potentiel invasif (Segura et al. 2009). Penna et collaborateurs ont identifié une nouvelle voie coordonnée par miR-214 et le facteur de transcription AP-2 contribuant à la progression et au processus de dissémination métastatique (Bar-Eli 2011;Penna et al. 2011). Une surexpression de miR-34b, induite par hypométhylation, réduit l'invasion et la migration de lignées de mélanome métastatique permettant de penser que des modulations épigénétiques de miR-34b induiraient un potentiel métastatique dans le mélanome (Mazar et al. 2011b).

III – Synthèse

La majorité des études d'expression des microARNs dans le mélanome ont utilisé les mélanocytes comme référence pour comparer l'expression des lignées cellulaires ou des échantillons tissulaires (Caramuta et al. 2010 ;Chen et al. 2010 ;Levati et al. 2009 ;Molnar et al 2008 ;Mueller et al. 2009 ; Philippidou et al. 2010 ;Schultz et al. 2008) (Chan et al. 2011;Greenberg et al. 2011;Jukic et al. 2010;Satzger et al. 2010). Cette comparaison par rapport aux mélanocytes, cellules dont sont issues les cellules mélaniques, est certes importante mais présente des limites puisqu'elle ne tient pas compte de l'environnement complexe du mélanocyte.

Les profils d'expression des microARNs sur les lignées cellulaires (Chen et al. 2010 ; Levati et al. 2009 ;Mueller et al. 2009 ;Satzger et al. 2010) et sur des échantillons tissulaires (Caramuta et al. 2010 ;Segura et al. 2010) peuvent permettre de renseigner sur la différenciation entre les différentes tumeurs solides, entre les différents types de mélanomes, l'identification de potentiels biomarqueurs pour le diagnostic et le pronostic. Les différentes études bibliographiques ont permis notamment de mettre en évidence une expression différentielle de certains microARNs entre le mélanome et les autres pathologies cancéreuses. Il existe également des expressions différentes entre les naevus bénins, les mélanomes primaires et les mélanomes métastatiques. Certains ont montré leur intérêt dans le pronostic et dans la survie : miR-191 et miR-193b (Caramuta et al. 2010), miR-15b (Satzger et al. 2010), miR-29c (Nguyen et al. 2011).

Toutes les études réalisées sur les microARNs amènent à penser que ces marqueurs seraient des potentiels biomarqueurs pouvant jouer un rôle dans le diagnostic, le pronostic des mélanomes. Cependant pour l'instant, les résultats sont encore discordants entre les différentes études. En effet, de nombreuses études ont été réalisées sur les microARNs tissulaires et cellulaires dans le mélanome. Elles ont mis en évidence un grand nombre de microARNs dérégulés, même si quelques-uns sont communs, beaucoup de discordances apparaissent. Ces différences proviennent entre autre de la très grande hétérogénéité des panels d'échantillons et des effectifs étudiés. De plus larges cohortes doivent être analysées. Le rôle que joue chaque microARN dans la tumorigénèse reste encore largement à explorer notamment leur implication dans les voies de signalisations cellulaires. De nombreuses études sont encore à réaliser pour que ces microARNs puissent être utilisés en clinique comme biomarqueur ou comme cible thérapeutique.

Récemment en 2008, les microARNs ont été décrits et dosés dans les fluides biologiques. De nombreuses études s'intéressent à ces microARNs circulants. Leur

détection offre une perspective intéressante car ils permettraient de posséder des biomarqueurs relativement peu invasifs.

4) Les microARNs circulants

Nous aborderons, tout d'abord, l'expression de ces microARNs circulants en physiopathologie puis leur quantification et enfin nous décrirons les connaissances actuelles sur leurs formes, leurs origines et leurs fonctions.

I – L'expression des miRs circulants en physiopathologie

Les miRs circulants ont été décrits dans le sérum et le plasma pour la première fois en 2008. La première étude a été réalisée chez la femme enceinte (Chim et al. 2008). En oncologie, ils ont d'abord été décrits chez des patients atteints de lymphome B (Lawrie et al. 2008). Depuis, les miRs circulants ont été étudiés dans diverses pathologies et en particulier dans les pathologies cancéreuses ou les maladies cardiovasculaires.

Nous développerons les connaissances actuelles sur les miARNs circulants chez les sujets sains, dans la grossesse (domaine dans lequel les miRs circulants ont été étudiés pour la première fois) et enfin en oncologie.

A – Les miRs circulants chez les individus sains

Différentes plateformes ont étudié le spectre normal des miRs circulants chez les individus sains. Ces études ont d'abord réalisé une étape d'identification par séquençage (Chen et al. 2008a; Mitchell et al. 2008) ou microarray (Tanaka et al. 2009; Wang et al. 2010a) puis une phase de validation par RT-qPCR. Des profils ont été recherchés à partir du sérum (Chen et al. 2008 ; Mitchell et al. 2008), du plasma (Tanaka et al. 2009; Wang et al. 2010a) ou de microvésicules du sang (Hunter et al. 2008). Dans l'étude de Chen, tous les petits ARNs isolés à partir du sérum de sujets sains ont été séquencés puis validés par RT-qPCR au total 101 miRs connus dans la miRbase ont été trouvés (Chen et al. 2008). Les autres études ont mis en évidence respectivement 130 (Mitchell et al. 2008), 148 (Tanaka et al. 2009), 170 (Wang et al. 2010a) et 104 miRs (Hunter et al. 2008). Entre ces cinq études, plus de 270 miRs circulants différents ont été détectés chez des individus sains. 20 miRs sont identiques, dans au moins 4 études, ce sont les miRs suivants: let-7b, miR-16, -21, -223, -24, -25, -30d, -320, -106b, -142-3p, -15a, -183, -186, -19b, -20a, -22, -26a, -451, -484, -92a. Cela a permis de commencer à construire une image du spectre de miARNs présents dans la circulation sanguine dans des conditions physiologiques normales.

L'ensemble des études sont unanimes pour dire que les taux de miARNs sériques ou plasmatiques sont très constants chez les individus sains (Chen et al. 2008; Gilad et al. 2008). Un point intéressant est qu'en situation normale, les profils de ces miRs ont montré un chevauchement important par rapport au profil des miRs des cellules sanguines (Chen et al. 2008). Cela suggère que la majorité des miRs circulants est libérée dans la circulation par les cellules sanguines. Ceci est cohérent avec une étude sur les miRs contenus dans les microvésicules isolés à partir du sang périphérique où 71 des 104 miRs des microvésicules sont issus des cellules mononucléées du sang (Hunter et al. 2008).

Les profils de miRs circulants sont relativement proches chez les hommes et les femmes (Chen et al. 2008; Hunter et al. 2008). De plus, il ne semble pas y avoir de différence significative en fonction de l'âge (Hunter et al. 2008). Cependant, aucune étude n'a étudié, pour l'instant, les profils de miRs chez un même individu au cours du temps. En résumé, chez les sujets sains, les miRs sont présents, à un taux constant, provenant majoritairement des cellules sanguines. Ainsi des modifications de l'expression des miRs circulants peuvent être le signe de changements physiologiques ou pathologiques et ainsi être utilisés comme potentiels biomarqueurs ce qui explique l'intérêt croissant des études sur ce type de biomarqueur.

B – L'expression des miRs circulants durant la grossesse

La première étude sur les miRs circulants a été réalisée chez des femmes enceintes (Chim et al. 2008). Cette étude a analysé les taux de miRs placentaires, plasmatiques et des cellules sanguines. Ces derniers ont sélectionné les miRs potentiellement candidats sur la base d'un taux dix fois supérieur dans le placenta par rapport aux cellules sanguines et leur absence après l'accouchement. De cette manière, 17 miRs ont été sélectionnés et seuls les 4 miRs présentant les taux les plus importants ont été étudié par RT-qPCR (miR-141, -149, -299-5p, -135b). Les miRs-141 et -149 étaient les plus significatifs et le taux de miR-141 était bien corrélé au stade de la grossesse.

Dans une deuxième étude, les miRs circulants ont été retrouvés dans les sérums ou les plasmas de femmes enceintes (Gilad et al. 2008). Un ensemble de 28 miRs ont été mesurés dans le sérum de femmes enceintes à différents trimestres et de femmes contrôles. Douze miRs étaient présents à des niveaux supérieurs à cinq fois au troisième trimestre par rapport aux échantillons contrôles. Les miRs-526a, -527 et -520d-5p ont montré un fort taux de variation et permettent de distinguer les femmes enceintes et non enceintes avec une grande précision. En 2009, l'équipe de Luo a cherché à identifier des miRs placentaires

par séquençage d'une banque de tissus placentaires et a testé l'hypothèse que la sécrétion de ces miRs placentaires se faisait via des exosomes (Luo et al. 2009). Elle a mis en évidence que les miRs spécifiques du placenta (dont miR-517a) sont abondants dans le plasma des femmes enceintes et diminuent après l'accouchement.

Sur l'ensemble des études faites sur les miRs circulants dans la grossesse, il en ressort que les miRs produits par les cellules trophoblastiques peuvent être sécrétés dans le sérum et le plasma maternel (Luo et al. 2009) et ont le potentiel pour servir de biomarqueur (Gilad et al. 2008) (Morales Prieto and Markert 2011). Certains miRs placentaires ont été détectés dans le plasma maternel et sont associés à la grossesse. Certains miRs sont beaucoup plus élevés dans le plasma des femmes enceintes que celles non enceintes. Certains, comme le miR-141, ont leur taux qui augmente avec la progression de la gestation (Chim et al. 2008). De plus, les taux de certains miRs ont été modifiés lors de problèmes au cours de la grossesse et notamment dans la prééclampsie (Fu et al. 2013).

Ces études, chez la femme enceinte, ont permis de montrer la faisabilité d'analyse de tel biomarqueur dans le sang et ont conduit à susciter leur intérêt dans d'autres domaines notamment en oncologie.

C – L'expression des miRs circulants en oncologie

Nous décrivons, tout d'abord, les premières études faites en oncologie sur les miRs sériques et plasmatiques puis nous décrivons les principales études réalisées par la suite et enfin nous parlerons des études dans le mélanome.

1 – Les premières études

La première description de miARNs dans les fluides biologiques en oncologie a été faite en mars 2008 par Lawrie et collaborateurs (Lawrie et al. 2008). Ils ont montré que les miRs circulants étaient détectables dans le sérum et le plasma. Lawrie et coll. ont mis en évidence que certains miRs spécifiques avaient un niveau d'expression différent entre les patients atteints de lymphome-B et les sujets sains. Dans leur étude portant sur les sérums de 60 patients atteints de lymphome-B, ils ont constaté une augmentation significative de l'expression des miRs-155, -21 et -210 par rapport aux témoins. Les patients, ayant une expression élevée de miR-21, avaient une survie sans récurrence plus longue. Cette étude a été la première à suggérer l'intérêt des miRs circulants comme biomarqueur non invasif dans le diagnostic et le pronostic en oncologie.

Suite à cette première étude, d'autres équipes ont confirmé la possibilité d'identifier et de détecter des miRs circulants et ont étudié leur profil d'expression. Deux grandes stratégies ont été utilisées, soit les équipes ont utilisé des techniques de screening haut débit afin de déterminer des profils de miRs et trouver une signature des différents cancers, soit les équipes ont réalisé des analyses ciblées en étudiant un ou plusieurs miRs par RT-qPCR.

Mitchell et collaborateurs ont utilisé une combinaison de techniques de clonage, de séquençage et de RT-qPCR pour analyser le plasma d'individus sains, de patients atteints de cancer de la prostate et de souris (Mitchell et al. 2008). Ils ont montré que certains miRs dérivés de tumeurs épithéliales de la prostate étaient rapidement libérés dans la circulation sanguine. Pour cela, ils ont utilisé un modèle de souris pour montrer que des miRs étaient détectés dans le sang de souris après une xénogreffe de lignées cellulaires de cancer de la prostate. La quantité de ces miRs a été corrélée à la masse tumorale de la xénogreffe. Ces résultats démontrent que les miRs circulants associés aux tumeurs peuvent se retrouver dans le sang. L'ensemble de ces travaux a permis d'identifier des miRs circulants associés aux tumeurs. Ils ont constaté que le miR-141 plasmatique ou sérique était significativement élevé chez les patients atteints de cancers métastatiques de la prostate et pouvait permettre de discriminer ces patients des sujets sains avec une sensibilité de 60% et une spécificité de 100%. Une autre étude similaire, menée par Chen et collaborateurs, a utilisé une technique de séquençage par la technologie Solexa. Ils ont identifié les miRs présents dans le sérum de sujets sains et les ont comparé aux sérums de patients atteints de cancers du poumon, de cancers colorectaux ou de diabète de type 2 (Chen et al. 2008). Plusieurs miARNs ont été détectés spécifiquement dans le sérum des patients pour chaque pathologie mais avec un grand nombre de miRs communs. Par exemple, 63 miRs ont été retrouvés uniquement chez les sujets ayant un cancer du poumon et 69 miRs sont communs aux sérums de ces patients et des sujets sains. Les résultats sont similaires pour les sérums de patients atteints de cancers colorectaux. 55 miRs sont apparus communs dans les sérums des patients atteints de ces deux cancers et absents des sujets sains. De plus, ils ont montré que le profil d'expression de ces miRs était différent entre le sérum et le sang de patients dans le cancer du poumon. Ces résultats obtenus par séquençage ont ensuite été validés par une technique de RT-qPCR sur une cohorte de 152 sérums de patients atteints de cancers du poumon versus 75 sérums de sujets sains. Ils ont mis en évidence l'augmentation significative des miRs-25 et -223 dans les sérums de patients par rapport aux sujets sains. L'ensemble de ces résultats suggère fortement qu'au cours de la progression de la maladie les miRs circulants

dérivent non plus seulement des cellules sanguines mais également des tumeurs. Ces miRs liés à la pathologie présentent donc un intérêt comme biomarqueur.

2 – Description des miRs circulants en oncologie

Les miRs circulants sont largement étudiés dans le sang et également dans d'autres fluides biologiques.

a – miRs circulants analysés à partir du sang

Depuis la première description de leur association dans le lymphome (Lawrie et al. 2008), les miRs circulants ont été décrits et étudiés dans un grand nombre de cancers (**Tableau 4**). Ce grand nombre d'études indépendantes a réussi à prouver l'importance des miARNs circulants comme potentiel outil de diagnostic en oncologie.

L'étude par microarray du profil d'expression plasmatique de patients atteints de leucémie aiguë a mis en évidence la sous-expression de miR-92a (Tanaka et al. 2009). Tanaka et coll. ont mis en évidence que l'expression plasmatique de miR-92a, par rapport au miR-638 (miR de référence) est très utile pour distinguer des patients atteints de leucémie par rapport à des sujets sains.

Dans le cancer du poumon, nous avons vu précédemment que Chen et collaborateurs avaient mis en évidence une augmentation significative des miRs-25 et -223 sériques chez les patients atteints de cancers du poumon non à petites cellules par rapport aux sujets sains (Chen et al. 2008). Dans une étude plus récente du même groupe, les auteurs ont comparé les profils de miRs sériques de patients avec des temps de survie différents en utilisant le séquençage Solexa puis validés par RT-qPCR (Hu et al. 2010). Quatre miRs ont été confirmés pour être associés à l'évolution clinique du patient. Une augmentation d'expression des miRs-486 et -30d en combinaison avec une diminution des miRs-1 et -499 ont été fortement associés à une survie réduite. Différentes études sur les miRs plasmatiques ou sériques ont étudié leur association avec le diagnostic ou la progression tumorale dans le cancer du poumon (Bianchi et al. 2011;Boeri et al. 2011;Foss et al. 2011;Heegaard et al. 2012;Hennessey et al. 2012;Kaduthanam et al. 2013;Shen et al. 2011;Wei et al. 2011;Zheng et al. 2011). L'équipe de Zheng a cherché à évaluer le potentiel des miRs plasmatiques dans la détection précoce du cancer du poumon (Zheng et al. 2011). L'expression des miRs a été détectée par RT-qPCR chez 74 patients atteints de différents types de cancer du poumon à différents stades versus 68 sujets sains.

Tumeurs	Source	Méthodes d'analyse	Liste des miRs augmentés	miRs diminués	Références
Lymphome B	sérum	RT-qPCR	miR-155, -21, -210	-	Lavie et al. 2008
Leucémie aigüe	Plasma	Microarray, RT-qPCR	-	miR-92a	Tanaka et al. 2009
	Plasma, sérum	séquençage Solexa, RT-qPCR	miR-25, -233	-	Chen et al. 2008a
	exosomes	microarray	miR-17-3p, -21, -106a, -146, -155, -191, -197, 203, 205, 212, 214	miR-1, -499	Rabinowitz et al. 2009
	Sérum	séquençage Solexa, RT-qPCR	miR-486, -30d		Hu et al. 2010
	sérum		miR-1254, -574-5p		Foss et al. 2011
	Plasma		miR-21		Wei et al. 2011
	Plasma	RT-qPCR	miR-155, -197, -182		Zheng et al. 2011
	Sérum	RT-qPCR			Bianchi et al. 2011
	Plasma		miR-21, -126, -210, -486-5p	miR-126, -486-5p	Boen et al. 2011
	Plasma	RT-qPCR		miR-155	Shen et al. 2011
	Sérum	RT-qPCR			Heegaard et al. 2012
	Sérum	RT-qPCR	miR-142-3p, -29b		Hennessey et al. 2012
	Sérum	RT-qPCR			Kadluthan et al. 2013
	exosomes	microarray	miR-21, -141, -200a, -200b, -200c, -203, -205, -214		Taylor et al. 2008
	Sérum	RT-qPCR	miR-21, -29a, -126, -92, -93	miR-127, -99b, -155	Resnick et al. 2009
	sérum	RT-qPCR	miR-200a,b,c		Kan et al. 2012
	sérum	RT-qPCR	niveau miR-155 haut chez patientes-PR+		Zhu et al. 2009
	sérum	RT-qPCR	miR-195, let-7a		Herrighan et al. 2010b
	sérum	RT-qPCR	miR-10b, -34a, -155		Roth et al. 2010
	sérum	RT-qPCR	miR-21, -106a, -155	miR-126, -199a, -385	Wang et al. 2010a
	sérum	RT-qPCR	miR-29a		Wu et al. 2011
	sérum	RT-qPCR	miR-21		Asaga et al. 2011
	sérum	RT-qPCR	miR-214	miR-215, -299-5p, -411	van Schooneveld et al. 2012
	plasma	clonage séquençage RT-qPCR	miR-141		Schwarzenbach et al. 2012
	sérum	array	miR-16, 92a, 92b, 103, 107, 197, 340, 328, 485-3p, 486-5p, 574-3p, 636, 640, 766, 885-5p		Mitchell et al. 2008
	sérum	RT-qPCR	miR-141, -375		Lodges et al. 2009
	prostate	RT-qPCR	miR-17-3p, -92		Brase et al. 2010
	colorectal	RT-qPCR	miR-17-3p, -92		Ng et al. 2009
	plasma	RT-qPCR	miR-29a, 92a		Huang et al. 2010
	plasma	RT-qPCR	miR-21, -210, -155, -196a		Wang et al. 2009
	pancréas	RT-qPCR	miR-210		Ho et al. 2010
	plasma	RT-qPCR	miR-17-5p, -21, -106a, -106b	let-7a	Tsujitani et al. 2010
	gastrique	RT-qPCR	miR-500		Yamamoto et al. 2009
	foie	RT-qPCR	miR-184		Wong et al. 2008
	langue	RT-qPCR			

Tableau 4 : Principaux miRs circulants décrits en oncologie. Dans chaque pathologie tumorale est indiqué quelques exemples de miRs circulants dérégulés ainsi que la technique d'analyse. Synthèse à partir des revues de Reid 2010 ; Brase 2010 et Ma2012 (Brase et al. 2010;Ma et al. 2012;Reid et al. 2011).

Cette étude a constaté que les expressions des miRs-155, -197 et -182 étaient significativement élevées dans tous les stades y compris le stade I par rapport aux témoins. La combinaison de ces trois miRs donne une sensibilité de 81% et une spécificité de 87% pour discriminer les patients des sujets sains. Les expressions des miRs-155 et -197 étaient plus élevées dans le plasma des patients ayant une pathologie métastatique par rapport à ceux ayant une pathologie non métastatique. Ces trois miRs étaient significativement diminués chez les patients répondeurs à la chimiothérapie. L'étude de Shen et

collaborateurs a mis en évidence un profil de quatre miRs (miR-21, -126, -210, -486-5p) permettant la distinction entre patients et témoin avec une sensibilité de 86% et une spécificité de 96% (Shen et al. 2011). Ces études ont mis en évidence l'intérêt des miRs dans le diagnostic précoce des cancers pulmonaires. D'autres équipes ont fait leur étude sur une population asymptomatique à haut risque de développer un cancer du poumon (Bianchi et al. 2011; Boeri et al. 2011). Une signature de 34 miRs sériques a été mise en évidence dans le diagnostic du cancer du poumon à un stade précoce (Bianchi et al. 2011). Récemment, l'équipe de Kaduthanam a montré que l'augmentation du miR-142-3p était associée à une rechute précoce dans les adénocarcinomes pulmonaires (Kaduthanam et al. 2013). L'ensemble des études faites dans cette pathologie pulmonaire montre l'intérêt des miRs plasmatiques ou sériques comme biomarqueurs prometteurs dans le diagnostic, le pronostic ou dans le suivi d'efficacité thérapeutique.

Dans le cancer de l'ovaire, l'équipe de Taylor a mis en évidence une signature de miRs circulants augmentés chez les patients (miR-21, -141, -200a/b/c, -203, -205, -214, -215) et est hautement corrélée à l'expression de la tumeur primitive (Taylor and Gercel-Taylor 2008). Il a été également montré que 5 miRs (miR-21, -29a, -92, -93, -126) sont surexprimés et trois sont sous-exprimés (miR-127, -155, -99b) dans les sérums permettant de distinguer les patients des sujets sains (Resnick et al. 2009). Chez trois patients, les miRs-21, -92, -93 sont augmentés alors que le marqueur sérique de référence, le Ca125, était normal en préopératoire. Récemment, une étude a confirmé l'augmentation des miRs-200a, -200b et -200c sérique chez les patients par rapport aux sujets sains (Kan et al. 2012). Dans cette pathologie, pour l'instant, les études s'intéressent à l'intérêt diagnostique de ces miRs.

Dans le cancer du sein, une dizaine d'études ont comparé par RTqPCR les taux circulants de patientes à ceux de sujets sains. Ces études ont recherché l'expression de certains miRs chez les patientes par rapport aux sujets contrôles. Il s'agissait de la surexpression des miRs suivants : miR-21 (Wang et al. 2010a ;Wu et al. 2011) (Asaga et al. 2011), miR-155 (Roth et al. 2010 ;Wang et al. 2010a), RNU6 (Appaiah et al. 2011), let-7a (Heneghan et al. 2010b), miR-10b (Roth et al. 2010), miR-29a (Wu et al. 2011), miR-34a (Roth et al. 2010), miR-106a (Wang et al. 2010a), miR-195 (Heneghan et al. 2010), miR-214 (Schwarzenbach et al. 2012) et de la sous-expression des miRs-126, -199a, -335 (Wang et al. 2010a) et des miRs-215, -299-5p, -411 (van et al. 2012). Seuls deux miRs : les miRs-21 et -155 ont été corroborés par plusieurs groupes indépendants. Depuis fin 2010, six études ont réalisé, cette fois-ci, une approche génomique globale en recherchant un large panel de miRs (Hu et al. 2012;Leidner et al. 2013;Schrauder et al. 2012;Sieuwerts et al. 2011;Wu et al.

2012;Zhao et al. 2010). L'analyse des cinq premières études par l'équipe de Leidner a montré que sur l'ensemble de ces études, 158 miRs ont été identifiés comme différentiellement exprimés dans le cancer du sein (Leidner et al. 2013). Au total 16 miRs sur 158 sont communs à au moins deux études mais aucun à plus de trois études. Les résultats des niveaux d'expression étaient contradictoires pour 10 miRs sur 16. 6 miRs ont des variations du taux des miRs dans le même sens. Il s'agit de la surexpression des miRs-25, -222, -451, -497 et de la sous-expression des miRs-31 et -151-5p chez les patients par rapport aux témoins. La comparaison de l'ensemble des études ciblées ou de génomique globale a montré peu de concordance et notamment sur les deux miRs ressortant des premières études.

Dans un modèle de xéno greffe de cancer de la prostate chez la souris, la présence de miR-629 et miR-660 circulants dérivés de la tumeur a été confirmée avec une sensibilité et une spécificité de 100% (Mitchell et al. 2008). De plus, en mesurant les taux sériques de miR-141 chez les patients atteints de cancer de la prostate, cette équipe a montré qu'ils étaient en mesure grâce aux taux de miR-141 de distinguer ces patients des sujets sains. Une autre étude chez des patients atteints de cancer de la prostate de stade 3 et 4 a mis en évidence un panel de 15 miRs sériques surexprimés chez les patients par rapport aux contrôles comprenant les miR-16 et miRs-92a et -b (Lodes et al. 2009). Brase et collaborateurs ont analysé les profils des miRs sériques entre des patients atteints de cancer agressifs par rapport à des cancers localisés (Brase et al. 2011). Ils ont ensuite étudié ces miRs sur une large cohorte de validation. Les miRs-141 et -375 sont apparus les miRs les plus prometteurs en corrélation avec la progression de la tumeur. Ces deux miRs sont les plus largement décrits au niveau des études des miRs circulants dans les cancers de la prostate et sont retrouvés élevés dans le sang et dans les tumeurs suggérant un rôle important dans le développement de la tumeur et/ou la progression tumorale (miR-141 : Mitchell et al. 2008 ; (Brase et al. 2011; Bryant et al. 2012; Gonzales et al. 2011; Selth et al. 2012; Yaman et al. 2011); miR-375 : Brase et al. 2011 ; Selth et al. 2011 ; Bryant et al. 2012). Ils semblent également avoir un intérêt pronostique (Brase et al. 2011 ; Bryant et al. 2012).

En plus de l'approche par séquençage réalisée par l'équipe de Chen (Chen et al. 2008), deux autres études ont étudié ensuite les profils des miRs plasmatiques de patients atteints de cancers colorectaux (CRC). La première étude a cherché à identifier des miRs surexprimés à la fois dans les tumeurs et au niveau plasmatique en comparaison aux tissus normaux adjacents et les plasmas de sujets sains (Ng et al. 2009). Des cinq miRs préalablement identifiés seuls deux miRs : miR-17-3p et miR-92 étaient significativement

différents dans le plasma dans la première cohorte étudiée. Les niveaux d'expression de ces miRs étaient significativement réduits après chirurgie dans la plupart des cas. Dans une large cohorte de validation, miR-92 a permis de différencier les patients des contrôles avec une sensibilité de 89% et une spécificité de 70%. La deuxième étude a analysé un panel de 12 miRs sur des patients atteints de néoplasie colo-rectale avancée (Huang et al. 2010). Cette étude a mis en évidence des niveaux élevés des miR-29a et -92a chez les patients par rapport aux contrôles. Ces deux miRs avaient une valeur diagnostique significative avec une sensibilité de 83% et spécificité de 84.7% pour discriminer les CRC des contrôles. De plus, ces deux miRs avaient également un pouvoir discriminant entre les adénomes avancés et les contrôles suggérant une valeur potentielle pour la détection précoce du cancer colo-rectal. Plus récemment cette équipe a constaté que les miRs-601 et -760 plasmatiques étaient significativement diminués dans les néoplasies colo-rectales par rapport aux contrôles (Wang et al. 2012). Ces deux miRs auraient une valeur diagnostique importante pour les néoplasies colo-rectales avancées. Ces miRs circulants ont été également étudiés en tant que facteur pronostique. Cheng et collaborateurs ont montré que le miR-141 plasmatique est un facteur pronostique indépendant pour le cancer du colon avancé et que des niveaux d'expression élevée étaient associés à un mauvais pronostic (Cheng et al. 2011). Une autre étude a identifié, le miR-221, comme facteur pronostique important pour la survie globale chez les patients atteints de cancers colorectaux (Pu et al. 2010).

Les miRs circulants ont été étudiés également dans les cancers du pancréas. Quatre miRs : miR-21, -210, -155 et -196a ont été décrits comme surexprimés chez les patients par rapport aux contrôles (Wang et al. 2009). Avec une approche similaire, Ho et collaborateurs se sont intéressés plus particulièrement au miR-210, qui est un miR augmenté par l'hypoxie, facteur important dans les cancers du pancréas. Ils ont confirmé l'augmentation de miR-210 dans leur étude. Cependant, dans les deux études un biais potentiel, mettant une réserve aux résultats, est le très haut niveau d'expression de miR-210 chez certains patients.

Depuis lors, plus d'une centaine d'études ont évalué ces miRs circulants en tant que biomarqueurs diagnostiques ou pronostiques dans une très grande variété de types de néoplasies. Des études cliniques ont démontré le potentiel des miRs circulants à prédire la réponse aux traitements tels que par exemple aux médicaments anticancéreux. Par exemple, la perte d'hétérozygotie de miR-128b, un régulateur de l'EGFR a été corrélé à la réponse à l'inhibiteur de l'EGFR : le gefitinib chez les patients en rechute de cancers du poumon

(Weiss et al. 2008). Dans le cancer colorectal, il a été démontré que let-7g et miR-181b peuvent être des indicateurs de la réponse à la chimiothérapie par 5-fluoro-uracile (Nakajima et al. 2006). Néanmoins, à ce jour, une seule étude a démontré une corrélation entre le niveau d'expression de miRs circulants et la réponse à un traitement anticancéreux. Dans cette étude, le taux du miR-21 sérique était plus élevé chez les patients atteints de cancer de la prostate dont la maladie était résistante à la chimiothérapie à base de docétaxel par rapport à ceux qui ont une maladie chimiosensible (Zhang et al. 2011).

b – Les miRs circulants analysés à partir des autres fluides biologiques

La majorité des études sur les miRs circulants repose sur leur analyse dans le plasma ou le sérum. Des études ont démontré l'intérêt diagnostique des miRs circulants dans d'autres fluides biologiques : les urines, la salive mais aussi les larmes, le liquide amniotique, les liquides d'épanchement comme le liquide d'ascite ou pleural. Par exemple, une étude a analysé un panel de quatre miRs dans la salive de patients atteints de carcinomes épidermoïdes oraux par rapport aux témoins sains. Les miRs-125a et -200a étaient présents à des niveaux significativement plus bas dans la salive des patients (Park et al. 2009b). Dans une autre étude, l'expression des miRs a été analysée dans la salive recueillie avant la chirurgie et 6 semaines après la chirurgie de neuf patients atteints de carcinomes épidermoïdes oraux et comparée à huit individus normaux (Liu et al. 2010). Ces résultats ont été confirmés en 2012 sur un effectif plus important (Liu et al. 2012a). Les patients présentaient des niveaux plus hauts de miR-31 dans la salive que les témoins et une diminution du taux après résection de la tumeur chez 8 des 9 patients. Des niveaux accrus des miRs-126, -152, -182 ont été trouvés dans des échantillons d'urines de patients atteints de cancer de la vessie et les ratios de miR-126 ou miR-182 par rapport à miR-152 permettaient de révéler la présence de cancer de la vessie avec une spécificité de 82% et une sensibilité de 72% (Hanke et al. 2010).

3 – Les miRs circulants dans le mélanome

Aucune étude sur les miRs circulants dans le mélanome n'avait été publiée lors du commencement de notre projet de recherche. Ensuite, deux études ont été publiées pendant nos analyses. La première étude a permis d'analyser, en microarray, l'expression de 866 microARNs dans le sang total de 20 donneurs sains et de 35 patients ayant un mélanome (Leidinger et al. 2010). 213 microARNs ont montré une expression différente dans le sang des patients atteints de mélanome en comparaison aux donneurs sains.

Leidinger et coll. ont identifié au final 51 microARNs d'expression significative incluant 21 sous-exprimés et 30 surexprimés. Leurs résultats ont validé par RT-PCR quantitative sur 13 microARNs. Au final, un panel de 16 microARNs a été mis en évidence permettant de distinguer les patients porteurs de mélanome par rapport aux donneurs sains avec une exactitude de 97.4%.

MiR-221 est connu pour être surexprimé dans le mélanome malin. Il induit un phénotype malin en diminuant l'expression de p27^{Kip1} et du récepteur de c-kit. En 2011, il a été montré que miR-221 était significativement élevé dans le sérum de patients ayant un mélanome malin par rapport à des donneurs sains (Kanemaru et al. 2011). Cependant ce miR est également surexprimé dans d'autres types de tumeurs. Cette étude avait porté sur le sérum de 90 patients atteints de mélanome ainsi que huit patients chez lesquels a été réalisée une excision de la tumeur primitive et ayant eu une reprise évolutive de la maladie. Ce miR pourrait être intéressant non seulement pour le diagnostic mais également pour distinguer un mélanome *in situ* des stades I à IV car le niveau d'expression est plus important pour les stades I à IV par rapport aux mélanomes *in situ*. Ils ont trouvé une corrélation entre le niveau d'expression de miR-221 et l'épaisseur de la tumeur. Le taux de miR-221 était bien corrélé à l'épaisseur de la tumeur. Le miR-221 pourrait donc être un marqueur pronostique important dans le mélanome. De futures études avec un nombre important d'échantillons sériques sont nécessaires pour confirmer si miR-221 peut être utilisé comme nouveau marqueur tumoral. Les études très récentes concernant les miRs circulants dans le mélanome seront développées dans la partie discussion du manuscrit.

II – Mesure et quantification des miRs circulants

L'ensemble des études portant sur les miARNs montrent de grandes différences au niveau des résultats obtenus que ce soit sur les échantillons tissulaires, cellulaires ou sanguins. Ces différences peuvent être expliquées par le fait que les miARNs ont été isolés et détectés par des méthodologies différentes, à partir de matériaux de base différents et quantifiés en utilisant des gènes de référence variés et différentes stratégies de normalisation. La contribution de ces facteurs à des différences dans les résultats obtenus peut être considérable et expliquer l'hétérogénéité des résultats obtenus dans ce domaine.

L'intérêt croissant concernant les miARNs sanguins provient de leur très grande stabilité. Nous développerons les études démontrant cette stabilité. Puis, nous décrirons, à travers les différentes méthodologies d'étude des miARNs, les échantillons utilisés et les

différents types de normalisation existantes, les principales causes de très grandes variabilités inter-études.

A – La grande stabilité des miRs circulants

Les miARNs circulants montrent une grande stabilité physique ce qui est un atout important pour un biomarqueur. Les taux de miARNs plasmatiques et sériques ne sont pas modifiés par des variations de température [échantillons mis à 4°C (Taylor et al. 2008) ou à température ambiante] (Mitchell et al. 2008 ; Gilad et al. 2008 ; Huang et al. 2010) (Ho et al. 2010), de pH [après traitement par des acides ou des bases] (Chen et al. 2008), par de multiples cycles de congélation-décongélation (Mitchell et al. 2008 ; Chen et al. 2008, Gilad et al. 2008, Ho et al. 2010) et par un stockage à long terme (Chen et al. 2008). Les miRs circulants sont capables de résister aux RNases (Mitchell et al. 2008 ; Chen et al. 2008) alors que le sang est connu pour avoir un fort taux de RNases, capables de dégrader rapidement tout ARN exogène. Cette capacité de résistance aux RNases s'explique par le fait que ces miRs ne circulent pas sous forme libre et ne sont pas donc accessibles aux RNases.

B – Méthodes de détection : arrays, qPCR, séquençage

Les miARNs ont des caractéristiques intéressantes pour être de potentiels biomarqueurs utilisables en pratique clinique. Cependant, de par leurs caractéristiques intrinsèques, leur détection est une étape délicate en raison : de leur petite taille, des séquences proches parmi les membres d'une même famille, des séquences proches entre miRs matures et leurs précurseurs, des taux très variables. Enfin, ils représentent une toute petite fraction des ARN totaux.

Malgré l'ensemble de ses difficultés, les miARNs peuvent être détectés par trois méthodologies différentes utilisables en pratique clinique : les puces ou microarrays, la RT-PCR quantitative et le séquençage haut débit. La RT-qPCR est la technique de référence pour la quantification de l'expression des gènes et une des méthodes les plus utilisées pour détecter de faible taux de miRs avec une grande sensibilité et spécificité. C'est une technique relativement rapide et simple. Elle est très utilisée pour confirmer des résultats de puces. Les microarrays, technique d'hybridation entre une molécule-cible et une amorce, permettent de détecter la présence d'un très grand nombre de miARNs simultanément sur un même échantillon. Elle nécessite cependant d'avantage de matériel biologique que la RT-qPCR. Les techniques de séquençage haut débit permettent d'isoler, de déterminer la

séquence des miRs et de les amplifier. Les puces et le séquençage sont très utilisés pour faire un screening haut débit de profils de miRs. Le séquençage haut débit a moins de bruit de fond et d'hybridation croisée que les puces mais il est plus coûteux, d'interprétation plus spécialisée. Les variations de résultats obtenus à partir de ces techniques différentes sont bien connues. Le manque de reproductibilité inter-technique nécessite un gros travail de standardisation des méthodes.

En ce qui concerne les miRs circulants, ces variations dues à la méthodologie sont bien mises en évidence lorsque l'on compare les profils obtenus par différentes plateformes concernant les sujets sains. Nous en avons parlé déjà dans le paragraphe « Les miRs circulants chez les sujets sains ». Les trois premières études répertorient le profil normal des miRs circulants ont été réalisées en utilisant, la première un séquençage Solexa à haut débit (Chen et al. 2008), une seconde par technique de clonage et séquençage (Mitchell et al. 2008) et la troisième par RT-PCR quantitative (Hunter et al. 2008). Les plateformes ont réalisé ces études la même année se basant sur la même version de miRbase (version V10.0). Plus tard, deux études, ont utilisé une miRbase plus récente et par conséquent, ont identifié de nouveaux miRs (Tanaka et al. 2009, Wang et al. 2010a). Ces études ont détecté de nombreux miRs communs mais de nettes différences apparaissent. Une liste des 20 miRs communs a été donnée précédemment (paragraphe « Les miRs circulants chez les sujets sains »). Il existe des différences inter-techniques et intra-techniques en termes de miRs présents et d'abondance. Par exemple, miR-223 est le miR le plus abondant dans les analyses par RT-qPCR (Mitchell et al. 2008 ; Hunter et al. 2008) par contre, il n'est pas retrouvé lors du séquençage par Solexa. MiR-451 a été retrouvé le plus abondant par technique de séquençage Solexa (Chen et al. 2008) et par microarray (Wang et al. 2010) dans des cohortes de patients sains chinois. Il est possible qu'il existe des variations ethniques au sein des profils normaux pouvant expliquer ces différences. Même au sein d'un même principe de technique telle que la qPCR, il existe des différences technologiques rendant difficiles la comparaison des différentes études entre elles. Ceci est vrai pour les sujets sains et est valable pour l'ensemble des pathologies étudiant les miRs circulants. Différents types d'amorces existent. Nous développerons le principe des amorces de deux fabricants que nous avons utilisé dans nos travaux (Exiqon et Qiagen) dans la section Matériels et Méthodes du manuscrit.

C – Les échantillons

Les miRs circulants sanguins sont extraits à partir d'échantillons différents soit à partir du sérum, du plasma, de microvésicules purifiés ou d'exosomes. Dans les études comparatives entre sérum et plasma, il existe une forte corrélation sur les profils obtenus (Mitchell et al. 2008 ; Gilad et al. 2008). Chaque approche a ses avantages et ses inconvénients. Le plasma et le sérum sont facilement obtenus après centrifugation du sang total et leur isolement nécessite une technique d'extraction simple. En revanche, l'isolement des miRs à partir des exosomes ou des microvésicules nécessite une préparation plus longue et plus complexe. Par contre, elle permet d'isoler spécifiquement des vésicules et d'avoir un enrichissement des miRs d'intérêt. Malgré le recouvrement partiel selon la source utilisée, les comparaisons entre les études indépendantes sont difficiles. D'après la littérature et une étude préliminaire au sein de notre laboratoire (données non montrées), le plasma permettrait de récupérer des quantités un peu plus importantes de miARNs que le sérum (Mitchell et al. 2008 et guide d'Exiqon-Profiling of microRNA in Sérum/Plasma and other biofluids-www.exiqon.com); (Heneghan et al. 2010a)

Plus récemment, l'ARN extrait de sang total a été utilisé pour l'étude des miRs circulants notamment en oncologie (Heneghan et al. 2010b ; Leidinger et al. 2010). Cependant, les résultats obtenus peuvent être également le reflet de variations provenant des cellules sanguines et non pas directement de la tumeur.

D – Normalisation des dosages des miARNs par RT-qPCR

Parmi les trois méthodes de détection des miARNs, c'est la technique de RT-qPCR qui permet leur quantification la plus sensible et plus reproductible. Les étapes d'isolement et de quantification des miARNs peuvent être sujettes à des variations expérimentales et doivent donc être contrôlées afin de ne pas apporter de biais aux résultats.

La première étape qui doit être normalisée est l'étape d'isolement. Il existe différents kits commerciaux proposant des protocoles d'extraction différents. Ces protocoles influent sur la qualité et le rendement d'extraction en ARN. Pour illustrer ces fluctuations, nous pouvons citer une étude américaine en décembre 2012 qui a comparé trois kits largement utilisés pour l'extraction de miARNs sériques. Il s'agit des kits miRNeasy (Qiagen), miRVana PARIS isolation (Ambion) et total RNA isolation ARN (Norgen Biotek) (Li and Kowdley 2012). Les résultats ont montré une qualité et des rendements d'extraction différents. Dans cette étude, le kit miRNeasy était le plus performant sur les critères étudiés avec des différences significatives entre les kits. Une étude récente a également comparé quatre kits d'extraction à partir du plasma (miRNeasy (Qiagen), miRVana PARIS isolation

(Ambion), miRNA purification kit (Norgen Biotek) et Trizol (Invitrogen) (Sourvinou et al. 2013). C'est le kit d'Ambion qui a montré de meilleur résultat lors du test de recouvrement dans leurs conditions expérimentales. Il est nécessaire que cette étape soit normalisée, cela est réalisé le plus souvent par l'utilisation d'un contrôle exogène (miR synthétique) ajouté à l'étape d'extraction.

La deuxième étape est la normalisation de l'étape de quantification. Les résultats bruts de RT-qPCR sont exprimés en valeur de Ct (Cycle threshold) maintenant dénommés Cq (quantification Cycle). Dans les études publiées, la quantification des miARNs dans le sérum ou plasma est exprimée de diverses manières : en delta Cq (comparant les Cq obtenus entre le miR cible et un ou plusieurs miRs de référence ou la moyenne géométrique de l'ensemble des valeurs), en expression relative par l'expression des $2^{-\Delta Cq}$ ou par la méthode des doubles delta Cq ($2^{-\Delta\Delta Cq}$), en copies d'ARN par ng ou copies par μl de sérum/plasma. Cette large gamme d'unités rend la comparaison entre études difficile. La conversion des valeurs de Cq en copies/ μl ou ng d'ARN est possible par l'utilisation de courbes standard générées en utilisant des oligonucléotides de synthèse correspondant à la séquence du miR d'intérêt. L'utilisation d'un rendu en copies/ μl est préférable pour une application de dosage en routine afin de pouvoir comparer directement les résultats interlaboratoires. L'expression relative par rapport à un gène de référence est très répandue et importante pour limiter les variations inter-individuelles. Le problème c'est qu'à l'heure actuelle aucune référence endogène ou exogène universelle n'a été validée. Les références sont multiples et créent un facteur de variation. Plusieurs miRs ont été proposés pour servir de miR de référence car ils ont été décrits comme ayant des taux constants entre individus. Pour les miRs cellulaires et tissulaires ce sont les RNU6 et RNU 44 et 48 qui ont été le plus souvent utilisés. Pour les miRs circulants c'est le miR-16 (Lawrie et al. 2008 ;Huang et al. 2010 ;Wang et al. 2009) ; (Heneghan et al. 2009;Wong et al. 2008;Yamamoto et al. 2009) qui a été initialement décrit. Cependant, son utilisation comme référence optimale a été remise en question par d'autres études montrant que son taux pouvait être très variable ou très sensible à l'hémolyse. Mais son expression a été retrouvée dérégulée dans différentes pathologies cancéreuses par exemple dans les LLC (Calin et al. 2002), dans les cancers de la prostate (Lodes et al. 2009), du poumon (Takamizawa et al. 2004), de l'ovaire (Iorio et al. 2007) et du colon (Schetter et al. 2008). D'autres gènes, tels que RNU6, ont été utilisés pour normaliser les données dans certaines études (Ng et al. 2009) ;(Ai et al. 2010;Lin et al. 2010;Tsujiura et al. 2010). Depuis, de nombreux autres miRs ont été pris comme gène de référence. Actuellement, l'utilisation de plusieurs miRs de référence au lieu d'un seul est

recommandée afin d'améliorer la précision et de limiter le biais de la variation potentielle du miR sélectionné. L'utilisation d'algorithme tel que GeNorm (Vandesompele et al. 2002) ou NormFinder (Andersen et al. 2004) est nécessaire pour le choix des meilleurs miRs de référence dans les conditions expérimentales utilisées.

A ce jour, il n'existe aucun consensus sur ces différentes étapes de quantification entraînant de grandes variations entre études et rendant la comparaison difficile. Une uniformisation dans ce domaine est nécessaire.

III – Formes, origine et fonctions des miRs circulants

Nous allons décrire les connaissances actuelles concernant les formes, l'origine et les fonctions des miRs circulants.

A – Les formes de miRs circulants

Les miARNs circulants sont très stable, leurs capacités de grande résistance s'expliquent par le fait qu'ils ne circulent pas sous forme libre. A ce jour, les études ont décrits les miRs circulants comme étant soit contenus dans des particules lipidiques (exosomes, microvésicules), soit liés à des protéines (lipoprotéines, protéines de liaison à l'ARN).

1 – Les miRs circulants peuvent être contenus dans des vésicules

Un grand nombre d'études ont démontré la présence des miRs circulants dans des vésicules membranaires. De par l'absence de nomenclature actuelle pour les vésicules, différentes terminologies sont utilisées entraînant des confusions dans la littérature. Le terme microvésicule doit être utilisé pour désigner des vésicules sécrétées de façon active par exocytose et les vésicules libérées par les cellules subissant l'apoptose et la sénescence. Alors que les exosomes se réfèrent à des vésicules d'origine endosomale dérivées de corps multivésiculaires qui fusionnent avec la membrane plasmique pour libérer leur contenu (Thery et al. 2009). L'ensemble de ces vésicules proviennent de différents types cellulaires, d'un part de cellules hématopoïétiques (lymphocytes B et T, cellules dendritiques, mastocytes, hématies, plaquettes) (Valadi et al. 2007 ;Thery et al. 2009) mais également de cellules non hématopoïétiques telles que les cellules épithéliales intestinales, les cellules gliales, les fibroblastes ainsi que les cellules tumorales.

La première étude, mettant en évidence que les exosomes contenaient des miRs, vient de l'équipe de Valadi en 2007 sur des mastocytes de moelle osseuse de souris et des lignées cellulaires humaines et murines de mastocytes (Valadi et al. 2007). Ils ont montré par ailleurs que les miARNs des exosomes pouvaient être transférés dans une autre cellule et être fonctionnels. La comparaison des miRs exosomaux et cellulaires a montré que certains miRs étaient à un taux plus important dans les exosomes que dans les cellules suggérant que les miRs sont concentrés sélectivement dans les exosomes.

La première démonstration de l'existence d'exosomes dérivés des tumeurs et surtout de l'existence d'une signature de miRs circulants des exosomes a été réalisée dans les tumeurs ovariennes (Taylor & Gerzel-Taylor 2008). Cette étude a montré la corrélation dans la composition des miRs entre les tissus tumoraux et les exosomes circulants dérivés de la tumeur. L'étude de huit miRs, contenus dans des exosomes sériques, a montré qu'ils avaient des taux significativement élevés chez des patientes atteintes de cancer ovarien par rapport à celle ayant une maladie ovarienne bénigne (Taylor et al. 2008).

Des vésicules sont également libérées par les cellules dans des conditions physiologiques normales et leur contenu en miRs a été isolé et caractérisé (Hunter et al. 2008). Hunter et collaborateurs ont été les premiers à étudier le profil des miARNs provenant des exosomes plasmatiques de sujets sains. Ils ont comparé les niveaux d'expression des miARNs des exosomes plasmatiques avec celle des plaquettes et des cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC). Des similitudes ont été trouvées. Cependant, il existe des différences significatives avec des miARNs présents uniquement dans les exosomes et non dans les cellules hématopoïétiques étudiées. Ils ont observé 71 miARNs co-exprimés entre exosomes et PBMC et ont trouvé 33 et 4 miARNs exprimés de manière différentielle dans les exosomes plasmatiques et les PBMC respectivement. La majorité des miARNs exprimés dans les exosomes plasmatiques sont connus pour réguler la différenciation cellulaire des cellules sanguines et des voies métaboliques.

Une similitude entre les signatures de miRs des exosomes plasmatiques et des cellules tumorales a été également trouvée dans l'adénocarcinome du poumon (Rabinowits et al. 2009). De plus, la comparaison des profils des miRs des exosomes plasmatiques entre patients et sujets sains a montré une différence significative montrant l'intérêt de ces marqueurs circulants.

Les corps apoptotiques peuvent contenir des miARNs et les transférer à des cellules. Par exemple, miR-126, contenu dans des corps apoptotiques issus de cellules endothéliales,

est transmis à d'autres cellules de la paroi vasculaire et peut stimuler la production de cytokines (Zernecke et al. 2009).

Les vésicules ne semblent pas être le seul moyen de protection des miRs circulants, ils sont également protégés par liaison à des protéines.

2 – Les miRs circulants peuvent être liés à des protéines

Des résultats plus récents montrent qu'une majorité de miARNs plasmatiques ne sont pas contenus dans des exosomes ou des microvésicules (Arroyo et al. 2011;Turchinovich et al. 2011;Wang et al. 2010b). Il semble qu'une fraction de miARNs circulants soit associée à des complexes protéiques.

Wang et collaborateurs ont montré qu'une fraction des miARNs sécrétés, par des cellules en culture privées de sérum, se trouvaient hors des vésicules. Des protéines de liaison à l'ARN ont été mises en évidence dont la protéine chaperonne nucléophosmine 1 (NPM1). Ils ont montré que NPM1 pouvait jouer un rôle dans la protection des miARNs. (Wang et al. 2010b).

Deux études ont montré que les miARNs pouvaient être également associées à Ago 2, protéine-clé effectrice de l'action répressive des miARNs (Turchinovich et al. 2011 ; Arroyo et al. 2011). Ago 2 est présente dans les microvésicules circulantes (Collino et al. 2010) mais également dans le plasma de manière indépendante des vésicules (Turchinovich et al. 2011 ;Arroyo et al. 2011). Le complexe miARN/Ago 2 serait un moyen de protection des miRs expliquant leur grande stabilité.

Un autre mécanisme a été découvert montrant que les lipoprotéines de haute densité (HDL) pouvaient transporter les miRs circulants et modifier aussi l'expression génique par transfert de miRs dans des cellules receveuses (Vickers et al. 2011).

Différentes études ont montré de manière contradictoire que les miRs étaient présents majoritairement tantôt dans des vésicules tantôt liés à des protéines. Dans les études les plus récentes, Gallo et collaborateurs ont montré que plusieurs miARNs étaient présents majoritairement dans des microvésicules (Gallo et al. 2012). Des résultats contradictoires ont été retrouvés pour les miR-16 et -92a par rapport à l'étude d'Arroyo (Arroyo et al. 2011). Ces différences pourraient provenir des protocoles différents utilisés par les deux équipes pour l'isolement des vésicules expliquant ainsi les différences de distribution des miRs entre microvésicules et fractions liées aux protéines de liaison à l'ARN. L'hétérogénéité des miRs circulants nécessitera une plus grande standardisation des protocoles de traitement des échantillons afin de pouvoir comparer les différentes études.

B – L'origine des miARNs circulants

A ce jour, peu de choses sont connues sur l'origine des miARNs circulants que ce soit chez les personnes en bonne santé ou lors de processus pathologiques ainsi que sur les facteurs qui influent leurs niveaux d'expression.

Chez les sujets sains, les miRs sont présents à un taux constant et semblent provenir majoritairement des cellules sanguines. Cette hypothèse est étayée par les observations que même de petites perturbations de la numération sanguine ou une hémolyse peuvent modifier de façon significative le taux de miARNs circulants (Pritchard et al. 2012). Cependant, une analyse comparative récente des miARNs liés à Ago1 et Ago2 du plasma et du sang total ont révélé que, dans des conditions normales, la plupart des miARNs ne proviennent pas des cellules sanguines (Turchinovich et al. 2012). D'autres organes doivent contribuer aux miARNs circulants, certains miARNs sont connus comme étant tissu-spécifique par exemple : miR-122 pour le foie (Zhang et al. 2010b) et miR-208a pour le cœur (Corsten et al. 2010).

En oncologie, nous avons vu que de nombreuses études ont montré que les profils d'expression des miRs circulants et tissulaires avaient de fortes similitudes. Certaines études ont démontré l'origine tumorale de certains miRs circulants (Mitchell et al. 2008, Skog et al. ;Taylor et al. 2008 ;Rabinowits et al. 2009). Comme de nombreux autres types cellulaires, les cellules tumorales sécrètent des microvésicules qui contiennent des signatures de miARNs spécifiques (Skog et al. ;Taylor et al. ;Rabinowits et al.). D'autres études ont montré que les miRs circulants pouvaient être produits par le microenvironnement tumoral (cellules endothéliales, fibroblastes, cellules immunitaires).

Néanmoins, l'origine tissulaire des miARNs circulants dans des conditions normales et pathologiques reste à être étudiée plus en détails.

C – Les rôles fonctionnels des miARNs circulants

Le rôle joué par les miARNs circulants n'est pas clairement connu. Les miRs circulants pourraient avoir des rôles spécifiques qui sont fonction de leur origine (**Figure 15**). Nous aborderons leurs rôles décrits en physiologie puis en pathologie.

1 – Dans l'état physiologique

Nous l'avons vu, un profil de miARNs circulants commence à être défini chez les sujets sains. De nombreuses publications ont proposé un rôle dans le maintien de l'homéostasie de la circulation sanguine. Ces études se basent sur le fait que beaucoup de

miRs circulants semblent provenir des cellules sanguines (Chen et al. 2008 ;Chim et al. 2008 ;Hunter et al. 2008) et sont impliqués dans la régulation de l'hématopoïèse. Par exemple, miR-223, miR majoritairement retrouvé dans les études de Mitchell et Hunter, est impliqué dans la régulation de la différenciation de diverses lignées de cellules sanguines ainsi que des cellules souches hématopoïétiques (Mitchell et al. 2008 ;Hunter et al. 2008). Fait intéressant, miR-223 est perdu dans les leucémies aiguës myéloïdes (Mi et al. 2007). MiR-16 régule le développement lymphoïde et le développement des hématies. MiR-451, est le plus exprimé dans les études de Chen et Wang (Chen et al. 2008 ;Wang et al. 2010a), est fortement exprimé dans les hématies (Merkerova et al. 2008).

Une des premières études démontrant la fonction des miARNs dans l'homéostasie vasculaire est une étude portant sur les miARNs contenus dans des corps apoptotiques (Zernecke et al. 2009). Au cours de l'apoptose, il y a libération de corps apoptotiques contenant des signaux paracrines pour les cellules voisines. Les corps apoptotiques dérivés des cellules endothéliales sont générés lors de l'athérosclérose et transmettent des signaux paracrines aux cellules vasculaires bénéficiaires. MiR-126, contenu dans les corps apoptotiques de cellules endothéliales, entre dans les cellules voisines et déclenche une protection vasculaire CXCL12-dépendante (CXCL : C-X-C chemokine receptor). CXCL12 se lie à son récepteur CXCR4 empêche l'apoptose et induit le recrutement de cellules progénitrices. Cette étude a mis en évidence une fonction des miRs sécrétés dans l'homéostasie vasculaire.

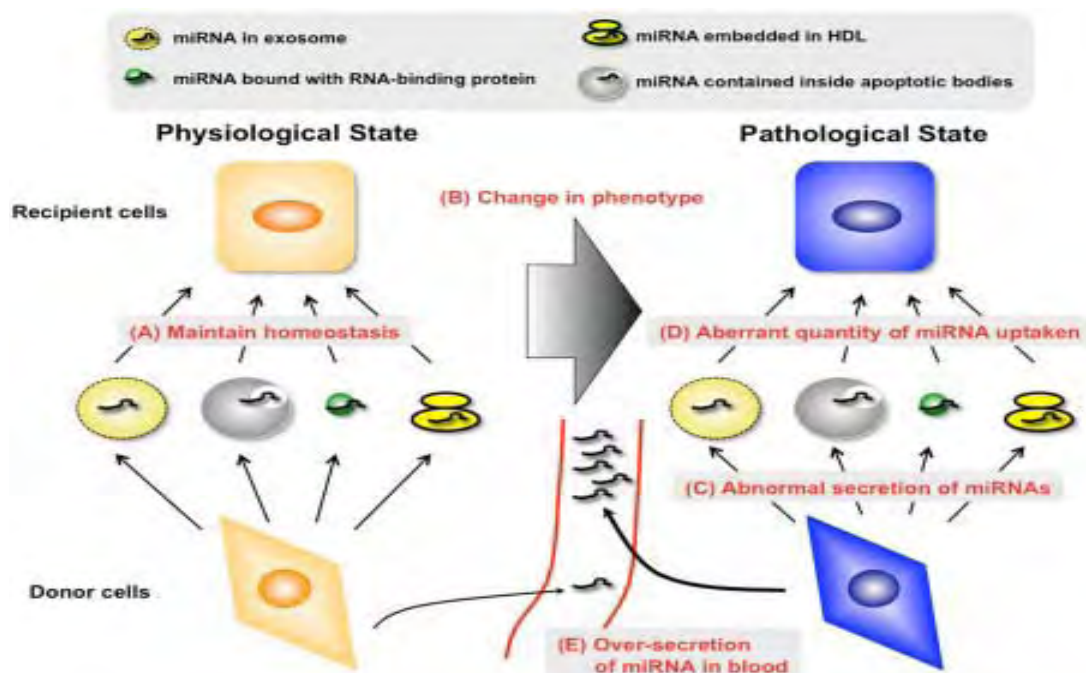


Figure 15. Rôles physiologiques et pathologiques des miRs circulants. (A) A l'état physiologique, les miRs circulants assureraient l'homéostasie des organes et des tissus via divers

types de supports des miRs (exosomes, corps apoptotiques, HDL ou liaison à des protéines). **(B)** Cependant, dans des conditions pathologiques, cet état va être perturbé par des variations phénotypiques des cellules donneuses ou des cellules réceptrices. **(C)** Au niveau des cellules donneuses, les changements dans le phénotype peuvent entraîner la modification de la sécrétion des miRs avec leurs transporteurs. **(D)** La quantité de miRs absorbée par les cellules receveuses peut être modifiée. **(E)** Il y a également une modification de la quantité de miRs circulants passant dans le sang. Figure issue de Kosaka 2011 (Kosaka and Ochiya 2011).

2 – Etats pathologiques

En oncologie, certains miRs sont retrouvés surexprimés dans différents types de tumeurs. Par exemple, miR-21 est retrouvé surexprimé à la fois dans les tissus et dans le sang de patients dans diverses tumeurs. De même, miR-155 possède des propriétés oncogéniques et est surexprimé dans divers cancers. L'apparition de ces miRs circulants surexprimés pourrait être la conséquence du fort taux de croissance tumorale et de lyse cellulaire des tumeurs par libération passive ou provenir des cellules tumorales via les exosomes par un mécanisme actif (Lawrie et al. 2007). Ces deux théories semblent possibles. Nous allons développer la théorie sur un mécanisme actif puis sur un mécanisme passif.

a – Théorie sur un mécanisme actif

Même si les microvésicules circulantes sont connues depuis 2007, leur génération et leur rôle physiologique ne sont pas connus. Elles semblent jouer un rôle important dans la communication intercellulaire. En effet, les cellules donneuses d'exosomes peuvent communiquer et influencer l'expression des gènes des cellules réceptrices. Il semble en être de même pour les miRs transportés par ces exosomes. Diverses études ont mis en évidence le transfert de ces miARNs entre diverses cellules et que ce transfert conduisait à une modification d'expression génique dans la cellule receveuse. Plusieurs rapports démontrent que la communication intercellulaire peut se produire via des miARNs exosomaux *in vitro* (Valadi et al. 2007 ;Yang et al. 2011) ;(Kogure et al. 2011;Kosaka et al. 2010b) et qu'ils participent à la communication cellulaire lors d'une infection virale (Pegtel et al. 2010), de la réponse immunitaire (Mittelbrunn et al. 2011) ou de la progression tumorale (Skog et al. 2008). Dans une étude sur des lignées de glioblastome, les cellules endothéliales cérébrales contiennent des exosomes contenant des ARNm et miARNs provenant des cellules de glioblastome (Skog et al. 2008).

L'équipe de Kosaka a également montré cette communication *in vivo* chez la souris (Kosaka et al. 2012). Cette étude a montré que miR-143, provenant de cellules épithéliales de la prostate non cancéreuses, pouvait inhiber la croissance de cellules cancéreuses de la

prostate *in vitro* et *in vivo*. Ces observations suggèrent que des miRs suppresseurs de tumeur peuvent être impliqués dans la compétition entre cellules cancéreuses et cellules non cancéreuses. Dans ce contexte, les cellules normales tentent d'empêcher la croissance tumorale en sécrétant des miRs anti-prolifératifs et maintenir ainsi un état sain.

L'hypothèse de l'existence d'un tri sélectif spécifique des miARNs a été émise après que plusieurs études indépendantes aient observé que certains miRs étaient exprimés à des taux plus élevés dans les microvésicules par rapport aux cellules parentales (Valadi et al. 2007 ;Mittelbrunn et al. 2011 ;Pigati et al. 2010). Par exemple, l'étude de Pigati suggère que la libération des miRs dans les fluides biologiques est sélective et que cette sélectivité pourrait être corrélée à la malignité. La majeure partie des miR-451 et miR-1246 produite par les cellules épithéliales mammaires malignes est libérée alors que ces miRs sont retenus dans les cellules mammaires bénignes (Pigati et al. 2010). Cela nécessite des recherches supplémentaires pour connaître le mécanisme déterminant la sécrétion ou la rétention dans les cellules. Le chargement des miARNs dans les exosomes pourraient être contrôlé par GW82, protéine appartenant au complexe RISC, qui est requise pour la liaison des miRs aux protéines Ago2 (Gibbins et al. 2009).

Pour comprendre les fonctions et l'importance de la sécrétion de ces miARNs, il faut aussi connaître le mécanisme de sécrétion de ces miARNs. Kosaka et collaborateurs ont montré que le mécanisme de libération de miRs à partir des exosomes impliquait un mécanisme de sécrétion céramide-dépendant (Kosaka et al. 2010a). Ils ont mis en évidence des changements des taux circulants de miR-16 et miR-146a après surexpression ou inhibition d'une enzyme clé de la biosynthèse de céramide : la sphingomyélinase neutre (nSMase) alors que leurs niveaux d'expression cellulaire restent inchangés. Lors de l'inhibition pharmacologique ou par des siARNs (petits ARNs interférents) de cette enzyme, une diminution de la sécrétion de ces miARNs a été observée. Au contraire, lors de la surexpression de cette enzyme, les auteurs ont observé une diminution de la sécrétion de ces miARNs. Ils ont également constaté que les miRs provenant des exosomes exerçaient une répression génique dans les cellules receveuses comme les miRs cellulaires ce qui se traduit par une inhibition de la croissance cellulaire. Les cellules peuvent donc sécréter activement des miRs cependant on ne sait pas s'il existe un mécanisme spécifique conduisant à une augmentation spécifique de certains miRs. Ces observations de sécrétion des miARNs des exosomes céramide-dépendant ont été confirmées par d'autres équipes sur d'autres lignées cellulaires (Mittelbrunn et al. 2011 ;Kogure et al. 2011). Cependant,

contrairement aux exosomes, l'exportation des miARNs associés aux HDL est régulée négativement par la nSMase 2 (Vickers et al. 2011).

Au cours de ces dernières années, il est devenu clair que les miRs exosomaux jouaient un rôle crucial dans la médiation de la communication cellulaire en particulier entre les cellules cancéreuses et les cellules du microenvironnement tumoral notamment les cellules immunitaires, les cellules endothéliales et les fibroblastes (Mittelbrunn et al. 2011 ; Kogure et al. 2011 ; Yang et al. 2011) (Hergenreider et al. 2012) (**Figure 16**). Certaines études indiquent que la sécrétion de miRs par les cellules tumorales pourrait influencer sur les cellules du microenvironnement tumoral. Des facteurs solubles comme les cytokines et les chimiokines, ont déjà été montrés pour être des outils de communication intercellulaire « classique » entre les cellules tumorales et le microenvironnement. Les miARNs, qui régulent des gènes cibles multiples, peuvent être transférés de cellules à cellules et induire des modifications fonctionnelles chez la cellule receveuse (Kosaka et al. 2010a). Certaines études ont émis l'hypothèse que les miARNs sécrétés par les cellules tumorales pouvaient affecter les cellules du microenvironnement tumoral et conduire à un échappement tumoral et par conséquent, permettre la progression tumorale (Skog et al. 2008). Ce phénomène n'a pas encore été prouvé *in vivo*. Des miARNs tumoraux ont pu être détectés dans des microvésicules sanguines de patients atteints de glioblastome à des taux plus élevés par rapport aux cellules donneuses. Ces microvésicules issues de glioblastome ont pu stimuler la prolifération d'une lignée cellulaire de gliome humain indiquant un aspect d'autocrine (Skog et al. 2008) et induire un phénotype angiogénique chez des cellules endothéliales du cerveau. Les cellules tumorales peuvent recruter des capillaires sanguins grâce à des miRs angiogéniques. Les miRs peuvent influencer l'angiogénèse en agissant sur les cellules progénitrices endothéliales jouant un rôle dans la néovascularisation. La surexpression du cluster miR-17-92 dans les tumeurs induit l'augmentation de l'angiogénèse par signalisation paracrine (Dews et al. 2006). Une autre observation est que let-7, miARN suppresseur de tumeur, voit son taux enrichi dans les exosomes issus de cellules de cancer gastrique métastatique. Les auteurs ont émis l'hypothèse que les cellules métastatiques pourraient éliminer les miARNs suppresseurs de tumeur en les exportant à l'extérieur par voie exosomale ce qui conduirait à maintenir l'oncogénèse et leur caractère invasif (Ohshima et al. 2010). Les cellules tumorales pourraient échapper aux Lymphocytes de type B et T en libérant des miRs immunosuppresseurs. Récemment, des travaux de Kosaka ont montré que des cellules cancéreuses métastatiques sont capables, *in vitro* et *in vivo*, de transférer des

miRs exosomaux angiogéniques, tel que miR-210, via nSMase 2, aux cellules endothéliales permettant de promouvoir l'efficacité de leur initiation métastatique (Kosaka et al. 2013). Cette étude est la première à relier la capacité métastatique tumorale à l'amélioration de l'angiogénèse par les miRs exosomaux.

Les miARNs sécrétés, contenus dans exosomes, influencent potentiellement les cellules du micro-environnement, y compris les cellules immunitaires, les cellules endothéliales et les cellules de fibroblastes. Les exosomes fonctionnent comme un outil de communication intercellulaire. Les miARNs, qui régulent plusieurs gènes cibles, peuvent également être transférées à partir de cellules tumorales à des cellules tumorales ou des cellules tumorales à des cellules du microenvironnement. Les cellules tumorales sécrètent des miRs qui pourraient agir sur les cellules du système immunitaire et ainsi moduler la réponse immune induisant soit une activation du système immunitaire soit une immunotolérance. Des microvésicules provenant de mélanomes ou de carcinomes colorectaux peuvent promouvoir la croissance tumorale et l'échappement immunitaire en empêchant la différenciation des monocytes en cellules suppressives sécrétant du TGF β (Valenti et al. 2006).

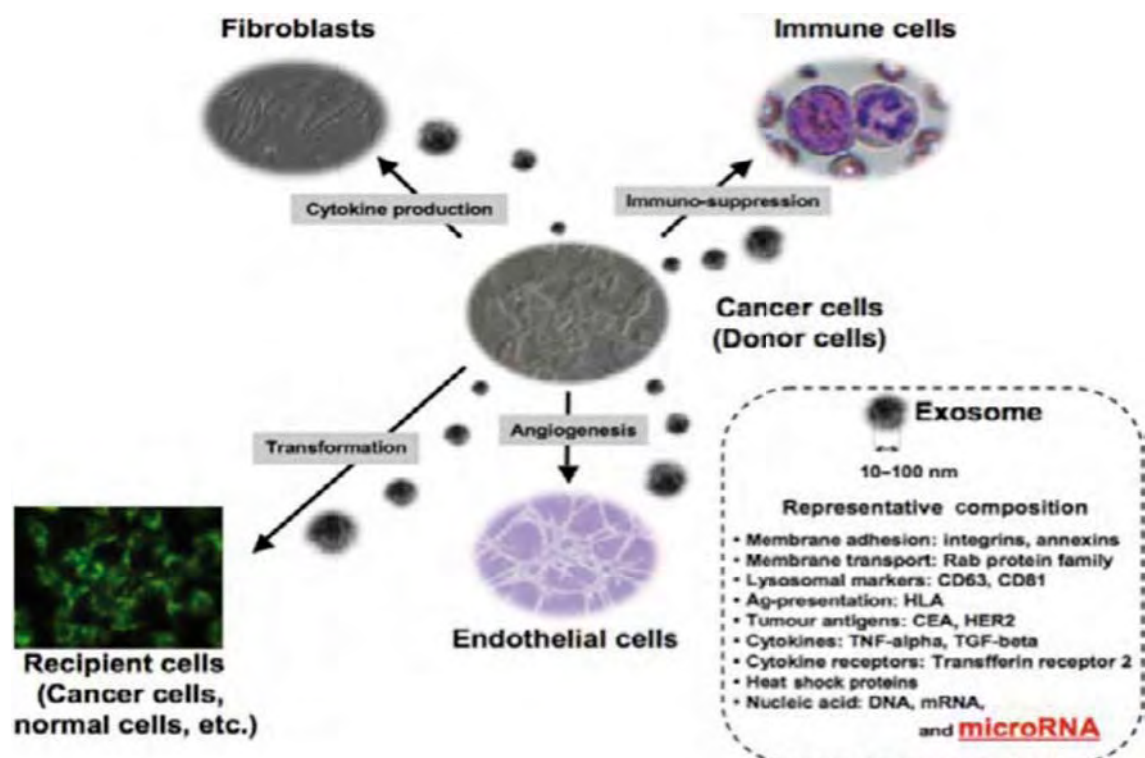


Figure 16. Les microARNs contenus dans les exosomes peuvent influencer les cellules du microenvironnement tumoral (fibroblastes, cellules immunitaires, cellules endothéliales) ainsi que les cellules tumorales. Figure issue de Kosaka 2010. Cancer Sciences (Kosaka et al. 2010a).

La modulation d'activité de certains miRs au sein des cellules du microenvironnement peut induire une inhibition de la croissance tumorale. Par exemple, la sous-expression de miR-320 dans les fibroblastes associés aux cancers du sein induit une inhibition de la croissance tumorale (Bronisz et al. 2012). Ainsi, les miRs circulants associés aux tumeurs pourraient provenir de la réponse du microenvironnement et non pas uniquement des cellules tumorales. Les cellules immunitaires pourraient sécréter des miRs qui favorisent ou inhibent la prolifération, l'invasion ou l'apoptose. Par exemple, il existe une corrélation inverse entre l'expression du cluster miR-17-92 et le récepteur de type 2 de TGF β . Ce récepteur est une cible du polycistron miR-17-92 dans les cancers solides. Il a donc été émis comme hypothèse que le cluster miR-17-92 exprimé par les lymphocytes T régule négativement l'expression du récepteur entraînant la synthèse de lymphocytes T plus résistants à TGF β qui est souvent exprimé à des niveaux élevés dans gliome (Okada et al. 2009; Okada et al. 2010). MiR-21 a un rôle dans le contrôle de l'inflammation en régulant PDCD4 ce qui favorise la production d'IL-10 dans les macrophages (Sheedy et al. 2010). Des études sont nécessaires pour préciser si l'expression différentielle des miRs est liée à la tumeur ou à une réponse médiée par le microenvironnement.

b – Théorie sur un mécanisme passif

L'hypothèse que de nombreux miARNs circulants sont dus à une lyse et/ou la mort cellulaire est également possible. Les protéines Ago2 et les miRs restent stables pendant plusieurs semaines dans des lysats cellulaires suggérant que ces miRs circulants non présents dans des vésicules pourraient provenir d'une libération passive lors de la mort cellulaire (Turchinovitch et al. 2011). En effet, les taux de ces miRs dans les milieux cellulaires sont corrélés avec un taux plus élevé de mort cellulaire (Turchinovitch et al. 2011). A ce jour, il n'y a pas d'indication que les complexes Ago2-miARN, non contenus dans les vésicules, soient libérés de manière active ou soient absorbés par des cellules receveuses et puissent ainsi exercer un effet de communication intercellulaire chez les mammifères. La libération passive pourrait aussi expliquer les multiples observations, lors de la toxicité dans certains tissus, les taux de miRs plasmatiques sont spécifiques à l'augmentation des tissus affectés (Corsten et al. 2010), (Zhang et al. 2010c).

La théorie selon laquelle les miARNs circulants seraient des médiateurs de communication intercellulaire repose sur des rapports démontrant le mode d'action paracrine et/ou autocrine. Il reste à démontrer ce processus *in vivo*. Deux théories,

concernant l'exportation et la fonction des miARNs circulants, ont été proposées. Selon la première théorie, les miARNs proviendraient d'une libération passive à la suite de lyses cellulaires. Dans la deuxième, les miARNs seraient spécifiquement sécrétés et auraient une fonction importante dans la communication intercellulaire. Bien que ces deux théories puissent être vraies, d'autres études sont nécessaires pour renforcer la théorie selon laquelle les miARNs circulants fonctionnent comme des médiateurs intercellulaires *in vivo*.

Il existe des résultats contradictoires concernant la relation entre les taux de miRs tissulaires et sanguins. Certaines études montrent une corrélation entre les taux de miRs tissulaires et sanguins. Par exemple, l'équipe de Brase a trouvé que miR-375 et miR-141 sont fortement exprimés dans des échantillons sériques et dans les tissus tumoraux de patients atteints de cancer de la prostate (Brase et al. 2011). Cependant, dans le cancer du poumon, la famille let-7 est surexprimée dans les tissus seulement et non détectée dans le sérum (Hu et al. 2010). Ainsi, les miRs circulants ne sont pas toujours directement associés au changement se produisant dans les tissus tumoraux mais peuvent refléter des effets indirects. Au contraire, dans la leucémie aiguë myéloïde, miR-92a est surexprimé dans les cellules blastiques mais retrouvé à un faible taux dans le plasma (Tanaka et al. 2009). Les auteurs suggèrent que les blastes peuvent capter les exosomes contenant les miRs et ainsi réduire le taux circulant. L'identification de la relation entre miRs circulants et miRs tissulaires est nécessaire pour la compréhension de l'origine de ces miRs circulants et comprendre leur fonction.

IV – Place des miRs circulants en tant que biomarqueurs potentiels

Les marqueurs tumoraux sanguins jouent un rôle important en pratique clinique dans le diagnostic, la surveillance, le suivi de l'efficacité thérapeutique en oncologie. Leur dosage peut être réalisé sur une prise de sang qui est un examen relativement peu invasif. Certains sont spécifiques d'un cancer particulier, d'autres sont plus généraux et augmentent dans différents types de cancers. Bien qu'ils soient largement utilisés, leur application clinique pour le diagnostic est limitée pour certains par leur manque de sensibilité et de spécificité. L'augmentation d'un marqueur tumoral dans le sang n'est pas toujours due à la présence d'une tumeur car ils peuvent être élevés dans certaines maladies non cancéreuses. Par exemple, l'alpha-foetoprotéine (AFP) est souvent augmentée dans le carcinome hépatocellulaire mais également dans d'autres pathologies telles que les cancers gastriques, biliaires et pancréatiques. De plus, certains patients atteints de carcinome hépatocellulaire ont un taux normal d'AFP. Ils sont en revanche très utiles pour détecter la récurrence d'un

cancer ou pour surveiller l'efficacité thérapeutique. Dans le mélanome, le seul biomarqueur pronostique validé pour la pratique courante est la LDH dans le mélanome métastatique. C'est un marqueur aspécifique ancien, qui relate approximativement de la masse tumorale de nombreuses tumeurs dont le mélanome.

La recherche de nouveaux biomarqueurs est donc un enjeu majeur pour l'amélioration de la prise en charge des cancers. Les miRs circulants présentent de nombreuses caractéristiques d'un bon biomarqueur pour éliminer les faux positifs et faux négatifs des marqueurs classiques:

- Une grande stabilité physique (pH extrêmes, ébullition, stockage prolongé, multiples cycles congélation-décongélation).
- Une grande stabilité d'expression chez les sujets sains.
- Un niveau d'expression associé à différentes pathologies et notamment les pathologies tumorales.
- Il existe différentes méthodes de dosage réalisable en routine (notamment par RTqPCR).

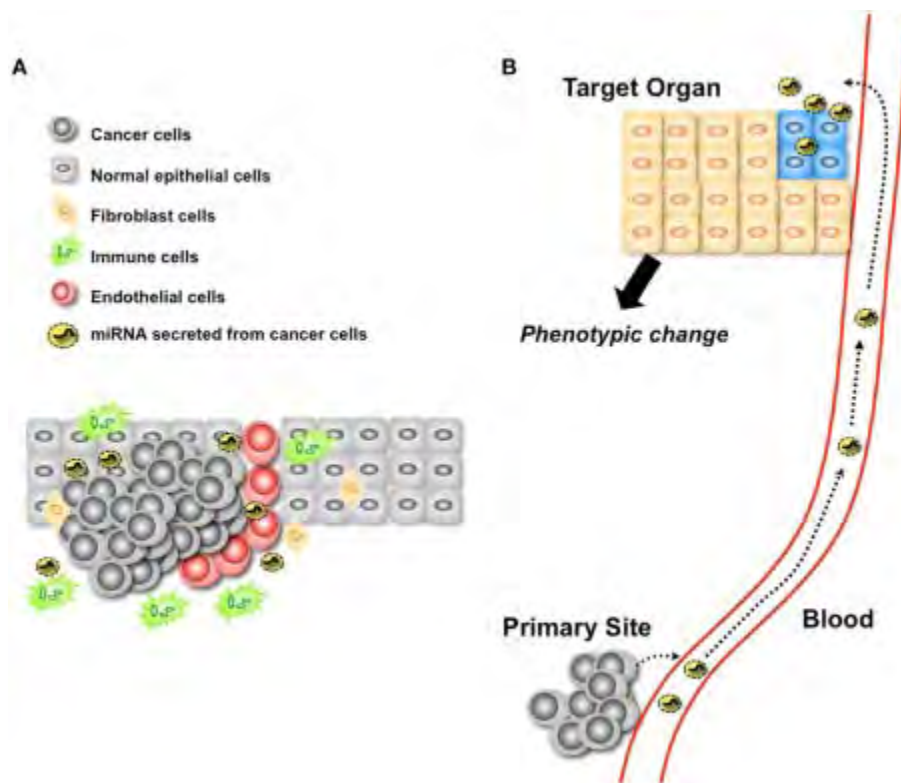


Figure 17. Deux hypothèses proposées concernant la progression du cancer médiée par les miARNs circulants. (A) Les miARNs sécrétés induisant la modulation des cellules du microenvironnement. Les miARNs sécrétés par des cellules cancéreuses contrôlent le comportement des cellules du micro-environnement pour leur propre bénéfice. (B) Les miARNs sécrétés peuvent être des molécules fonctionnelles dans un organe éloigné. Figure issue de Kosaka 2012 (Kosaka et al. 2012).

Pour les utiliser comme marqueur diagnostique en pratique courante, nous devons acquérir une meilleure compréhension des mécanismes par lesquels les miARNs sont libérés dans la circulation sanguine. Plusieurs études ont montré le transfert intercellulaire de cellules donneuses vers des cellules receveuses sur des analyses *in vitro* et récemment *in vivo*. Des études ont montré l'importance de la communication entre les cellules cancéreuses et leur microenvironnement notamment par le biais des exosomes. Bien que les mécanismes de sécrétion et d'incorporation des miARNs ne soient pas encore clairement identifiés, les miRs circulants semblent jouer un rôle central et général en tant que molécules de signalisation dans les phénomènes physiologiques et pathologiques. Ils représentent une voie alternative à la communication intercellulaire « classique » médiée par des facteurs solubles (hormones, cytokines, chimiokines). De par leur action sur une grande variété de molécules, les miARNs circulants pourraient être un facteur humoral qui exerce une action paracrine et peut être également une action à distance comme des hormones (Ma et al. 2012 ;Kosaka et al. 2011) (**Figure 17**). De nouvelles études sont nécessaires pour comprendre l'origine et le rôle fonctionnel de ces miRs circulants afin de mieux comprendre leur place dans l'oncogénèse et ainsi permettre leur utilisation appropriée en tant que biomarqueur.

OBJECTIFS

Le mélanome au stade métastatique est une pathologie de mauvais pronostic malgré les récents progrès thérapeutiques. Actuellement, les critères pronostiques utilisés ne sont pas suffisants pour appréhender l'hétérogénéité de la pathologie. L'indice de Breslow, le facteur pronostique actuellement le plus robuste, n'est pas un indicateur suffisant pour prédire le comportement futur du mélanome et les informations qu'il fournit ne permettent pas de discriminer avec suffisamment de précision les populations nécessitant une prise en charge thérapeutique d'emblée intensifiée. L'identification de nouveaux biomarqueurs seraient un atout important pour identifier des patients à risque d'évolution au stade métastatique et ainsi améliorer la prise en charge thérapeutique. De nombreuses recherches s'intéressent à la détection de biomarqueurs prédictifs du caractère agressif du mélanome, de la récurrence ou de la réponse aux traitements afin d'améliorer la prise en charge du mélanome. Cependant aucune analyse n'a actuellement permis de valider un nouveau biomarqueur pour la pratique clinique courante. Un nombre croissant d'études montre que les microARNs ont des rôles oncogènes ou suppresseurs de tumeurs dans une large variété de cancers, dont le mélanome, ou peuvent avoir un rôle dans le processus métastatique. De plus, les microARNs sous leur forme circulante apparaissent, depuis 2008, comme des biomarqueurs diagnostiques et pronostiques intéressants en oncologie.

L'objectif de ce travail a été, tout d'abord, de déterminer un profil de miARNs circulants discriminant les patients atteints de mélanome de sujets sains. Pour cela, nous avons cherché à identifier un profil de miARNs plasmatiques associé au mélanome métastatique et nous avons comparé les taux d'expression aux données cliniques afin d'étudier leur potentiel pronostic. Nous avons caractérisé des miARNs plasmatiques exprimés différemment entre des patients et des sujets sains par une technique de Biopuces. Puis, nous avons validé, par RT-qPCR, les principaux microARNs détectés dans cette analyse Biopuces ainsi qu'en parallèle les principaux microARNs associés au mélanome décrits dans la littérature. Ces analyses ont été réalisées sur trois cohortes indépendantes : une cohorte d'identification, une cohorte d'apprentissage et une cohorte de validation. Enfin, nous avons analysé l'expression tissulaire et cellulaire des principaux miARNs dérégulés au niveau plasmatique afin de connaître leur origine.

MATERIELS ET METHODES

1) Conception de l'étude plasmatique des miARNs

L'ensemble de notre étude a porté sur 74 échantillons plasmatiques de patients atteints de mélanomes métastatiques et 64 échantillons plasmatiques de sujets contrôles entre 2009 et 2013. Une première analyse d'**identification** par microarray de potentiels microARNs candidats a porté sur 14 plasmas patients et 5 sujets contrôles. Une deuxième analyse d'**apprentissage** réalisée par RT-qPCR a porté sur 29 échantillons patients et 16 sujets contrôle. Un échantillon patient analysé n'a pu être exploité. Une troisième analyse de **validation** par RT-qPCR a été réalisée sur 31 plasmas patients versus 43 sujets sains (Figure 18).

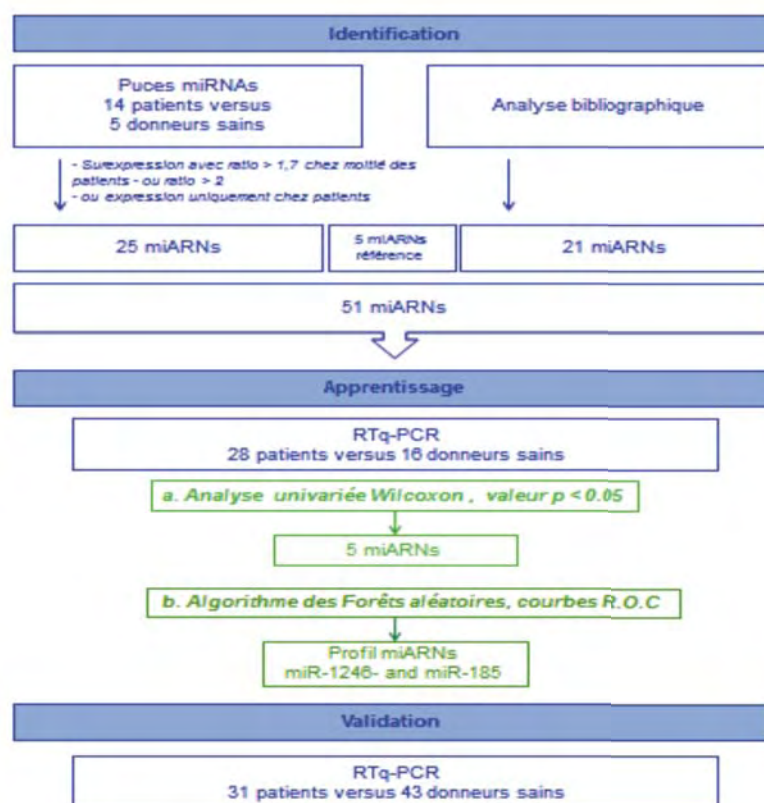


Figure 18 : Conception de l'étude plasmatique des miARNs.

2) Echantillons plasmatiques

Les prélèvements sont issus d'une collection biologique constituée à partir de patients de soins courants du service de dermatologie de l'Hôpital Larrey (CHU de Toulouse, France). Le critère de sélection était la présence d'une métastase active au moment du prélèvement. Les patients atteints de deux cancers simultanés et/ou d'antécédents d'autres cancers que le mélanome dans les cinq ans précédents le prélèvement n'ont pas été inclus à l'exception des carcinomes cutanés de résection complète. L'ensemble des individus a donné son consentement éclairé pour la participation à l'étude. Les prélèvements contrôles ont été obtenus auprès de l'Etablissement Français du Sang (EFS) de Pyrénées-Méditerranée sur le site Toulouse Purpan (France). Il n'y a pas eu de critères de sélection concernant les sujets sains. Les échantillons sanguins de l'ensemble des sujets de l'étude ont été prélevés sur anticoagulant EDTA. Les plasmas ont été séparés dans les 2 heures par centrifugation à 2400 g pendant 10 minutes à température ambiante puis conservés à -80°C. Certaines données cliniques ont été collectées. Les données recueillies pour les sujets sains sont le sexe et l'âge. Pour les patients, les données renseignées en plus du sexe et de l'âge sont : les données au moment du diagnostic (date, indice de Breslow, présence d'une ulcération, index mitotique, statut mutationnel de la tumeur avec recherche de mutation BRAF ou NRAS par séquençage et stade) et les données au moment de l'inclusion (âge, stade). Les prélèvements sanguins ont été réalisés au moment de l'inclusion pour l'analyse des microARNs et le dosage de la lactate déshydrogénase (LDH). Aucun plasma n'était hémolysé. Ces prélèvements ont été effectués avant l'instauration d'un traitement de chimiothérapie ou au minimum 3 semaines après l'administration de celle-ci. L'ensemble des données des populations est résumé dans le **Tableau 5**.

3) Culture cellulaire

15 lignées cellulaires de mélanome ont été étudiées. Parmi ces lignées, 2 sont à croissance horizontale (RGP), 3 à croissance verticale (VGP) et 10 lignées sont métastatiques. Les lignées WM115, WM266-4 et WM239A sont issus du même patient. C'est le cas aussi pour les lignées WM983A et WM983B. Des mélanocytes cutanés primaires (NHEM), provenant de l'entreprise Lonza ont été utilisés comme contrôle. Des lignées cellulaires d'autres pathologies tumorales (poumon, sein, ovaire et glioblastome) ont été également analysées. Les cellules ont été cultivées à 37°C en atmosphère humide à un taux de CO₂ constant de 5% avec le milieu cellulaire adapté. Les principales caractéristiques des lignées tumorales sont résumées dans le **Tableau 6**. Les cellules ont étéensemencées

dans des boîtes de Pétri de diamètre 100 mm et cultivées jusqu'à l'obtention de 5 millions de cellules. Trois recueils ont été réalisés sur des passages de cellules différents sauf pour les NHEM et les lignées ovariennes (deux recueils).

Variables	Identification		Apprentissage		Validation	
	n					
n	5	14	16	28	43	31
Age ** (ans; médiane; IQR)	43 [29; 58]	67 [45; 79]	43 [30; 52]	61 [54; 79]	43 [34; 53]	60 [44; 69]
Sex ratio (M/F)	0.66	0.75	1.29	0.81	1.26	1.21
Stade IIIc – M1a ** (n=)		3		9		3
Stade IV ** (n=)		11		20		28
Indice Breslow * mm (médiane; IQR)		3 [1.5; 6]		2.5 [1.5; 3.4]		2.2 [1.2; 4.2]
Ulcération * (présence; n=)		4		6		8
Index mitotique * $\geq 1/\text{mm}^2$ (n=)		3		3		10
Mutation BRAF V600 * (n=)		1		5		21
Mutation NRAS * (n=)		-		4		2
Taux de LDH ** par rapport à la normale (N= 234 UI/L)	nd	nd	0.71N [0.60; 0.74]	0.78N [0.63; 0.97]	0.70N [0.62; 0.75]	1.07N [0.73; 1.80]

IQR: écart interquartile; *: au moment du diagnostic; **: au moment de l'inclusion; nd: non déterminé.

Tableau 5 : Principales données démographiques et cliniques des patients et des contrôles sains.

Noms des cellules	Origines	Milieux de culture	Types histologiques et statuts invasifs	Oncogénétique
NHEM	Lonza	Medium 254 + HGMS-2 PMA free	mélanocytes	sauvage
Mélanomes				
WM35	Coriell Institute	MCDB 153/Leibovitz*	RGP	BRAF V600E
WM3211	Coriell Institute	MCDB 153/Leibovitz*	RGP	c-kit
WM115	ATCC	DMEM (4,5g/L glucose) + 10% SVF	VGP	BRAF V600D, FGFR3 P404L
WM983A	Coriell Institute	MCDB 153/Leibovitz*	VGP	BRAF V600E
WM793B	Coriell Institute	MCDB 153/Leibovitz*	VGP	BRAF V600E
WM239A	Coriell Institute	MCDB 153/Leibovitz*	métastatique	BRAF V600D
WM266-4	ATCC	DMEM (4,5g/L glucose) + 10% SVF	métastatique	BRAF V600D, FGFR3 P404L
WM983B	Coriell Institute	MCDB 153/Leibovitz*	métastatique	BRAF V600E
SK-Mel-28	ATCC	RPMI-1640 + 10% SVF décomplémenté	métastatique	BRAF V600E
A375	ATCC	DMEM (4,5g/L glucose) + 10% SVF	métastatique	BRAF V600E
501MEL	ATCC	RPMI-1640 + 10% SVF décomplémenté	métastatique	BRAF V600E
Lu1205	Coriell Institute	MCDB 153/Leibovitz*	métastatique	BRAF V600E, Cdk4 K22Q
RPMI-7951	ATCC	RPMI-1640 + 10% SVF décomplémenté	métastatique	BRAF V600E
SK-Mel-2	ATCC	DMEM/F12 10% SVF décomplémenté	métastatique	NRAS Q61R
MeI/USO	ATCC	DMEM (4,5g/L glucose) + 10% SVF	métastatique	NRAS Q61L FGFR3 D367
Lignées tumorales pulmonaires				
A549	ATCC	RPMI-1640 + 10% SVF décomplémenté	adéno carcinome	
Calu-1	ATCC	McCoy's + 10% SVF	carcinome épidermoïde	
Glioblastomes				
U251	ATCC	DMEM + 10% SVF	glioblastome	
U87	ATCC	DMEM + 10% SVF	glioblastome	
Lignées tumorales mammaires				
MCF-7	ATCC	RPMI-1640 + 5% SVF décomplémenté	adéno carcinome métastatique	
BT474	ATCC	RPMI-1640 + 10% SVF décomplémenté	carcinome ductal invasif	
Lignées tumorales ovariennes				
SKOV3	ATCC	McCoy's + 10% SVF	adéno carcinome métastatique	
OVCAR3	ATCC	RPMI-1640 + 20% SVF + insuline 0,01 mg/ml	adéno carcinome invasif	

* MCDB 153/Leibovitz: milieu de culture MCDB-153/Leibovitz L-15 (proportion 4/1) + 2% SVF décomplémenté + CaCl₂ 1,68 mM + Insuline 5 µg/ml

Tableau 6 : Principales caractéristiques des lignées cellulaires utilisées.

4) Collection de Tissus

Tous les échantillons tissulaires proviennent de la tumorotheque du département d'anatomo-pathologie de l'hôpital Purpan (Toulouse, France) et ont été obtenus avec le consentement des patients. Les biopsies étaient fixées au formol et incluses en paraffine. Dans chaque cohorte, nous avons récupéré 5 biopsies de métastase dont le prélèvement était concomitant au prélèvement plasmatique soit 10 échantillons au total. Quatre coupes de 10 µm ont été réalisées. Un médecin anatomopathologiste a séparé la partie tumorale et la partie saine pour chaque biopsie par macrodissection.

5) Extraction des ARNs pour détection des microARNs plasmatiques, tissulaires et cellulaires

Les extractions des miARNs ont été réalisées avec le kit « miRNeasy » (Qiagen) pour les microARNs plasmatiques et cellulaires et avec le kit « miRNeasy FFPE » (Qiagen) pour les microARNs tissulaires selon les instructions du fournisseur. Pour les miARNs plasmatiques, les extractions ont été réalisées à partir de 10 mL de plasma pour l'analyse par microarray et à partir de 200 µL de plasma pour les analyses par RT-qPCR. Pour les extractions des miARNs plasmatiques, un microARN synthétique (mispiké) (IDT®) a été ajouté au plasma après l'homogénéisation avec le réactif de lyse QIAzol®. Pour l'analyse cellulaire, 5 millions de cellules ont été repris par 700 µL de QIAzol®. La quantité et la pureté des ARNs totaux cellulaires et tissulaires ont été évaluées par un spectrophotomètre Nanodrop ND-1000 (Thermo Scientific). Les protocoles d'extractions des ARNs sont présentés en Annexes : ARNs plasmatiques pour microarray (**Annexe 1**), ARNs plasmatiques et cellulaires pour RT-qPCR (**Annexe 2**) et ARNs tissulaires (**Annexe 3**).

6) Amorces avec technologie LNA™ (Locked Nucleic Acid) d'Exiqon

Nous avons utilisé des amorces avec technologie LNA™ d'Exiqon lors de l'étude plasmatique des miARNs par Biopuces et par RT-qPCR ainsi que pour les dosages des miARNs cellulaires. Les microARNs sont de petites tailles, leur taux de GC est très variable, leurs séquences présentent un degré élevé de similitude. Certains membres d'une même famille de microARNs varient d'un seul nucléotide. La technologie LNA™ est utilisée pour améliorer le pouvoir discriminant des amorces et améliorer la sensibilité et la spécificité pour les cibles telles que les microARNs. Les acides nucléiques LNA™ sont des

analogues synthétiques de haute affinité pour l'ADN dans lesquels le cycle ribose est « bloqué » par un pont méthylène (www.exiqon.com 2014) (**Figure 19**). Cette conformation est idéale pour leur appariement avec leur paire complémentaire. En conséquence, les oligonucléotides LNATM présentent une grande stabilité thermique lorsqu'ils sont hybridés avec un ADN ou un ARN. Ces oligonucléotides peuvent être plus courts que les oligonucléotides d'ARN et conservent une grande température de dissociation (Melt temperature : T_m). Ceci est intéressant pour détecter des microARNs qui sont des cibles de petites tailles. Les oligonucléotides LNATM sont généralement constitués d'un mélange de LNATM et d'ADN ou ARN. Cette incorporation a permis d'améliorer de nombreuses technologies basées sur l'hybridation telles que la PCR, les puces à ADN et l'hybridation *in situ*. La température de dissociation entre le brin d'ADNc à amplifier et l'amorce est fortement modifiée par un mésappariement ce qui permet de discriminer une amplification spécifique, d'une amplification non spécifique. Les avantages de cette technologie sont principalement: une sensibilité augmentée par rapport à des oligonucléotides d'ARN ou d'ADN, une détection robuste de toutes des séquences de microARNs quelle que soit la teneur en GC, une détection supérieure à partir d'échantillons cliniques difficiles comme les fluides biologiques ou les blocs de paraffine, une augmentation de la spécificité de la cible par rapport aux sondes ARN ou ADN, la détection de discordances nucléotidiques simples, une discrimination supérieure des familles de microARNs, une haute stabilité *in vivo* et *in vitro*.

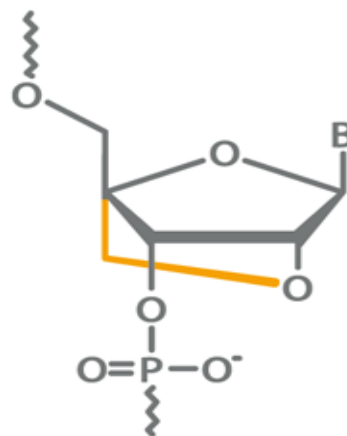


Figure 19 : Technologie LNATM. Dans la structure LNATM, l'acide nucléique présente un pont méthylène (représenté en orange) entre l'atome d'oxygène en 2' et l'atome de carbone en 4' du cycle ribose. Ceci permet un verrouillage du cycle ribose dans une conformation idéale pour leur appariement avec leur paire complémentaire. Ce couplage est plus rapide et augmente la stabilité du duplex obtenu (www.exiqon.com).

7) Marquage et hybridation des miARNs sur puces LNA™

Les puces utilisées ont été obtenues par un accord avec le Laboratoire Européen de Biologie Moléculaire (EMBL, GeneCore facility, Heidelberg). Elles ont été spottées à l'EMBL avec des oligonucléotides modifiés par des bases LNA™. Deux puces ont été utilisées par miARN. Cette étude a été réalisée dans le cadre d'un projet financé par la fondation RITC (Recherche et Innovation Thérapeutique en Cancérologie). Les ARNs totaux (3 µg) ont été marqués par un fluorochrome (Cyanine 3) grâce à une T4 ARN ligase sur une nuit à 4°C. L'hybridation des ARNs sur les puces LNA™ a été réalisée à 54°C sur une nuit. Après lavages, les lames ont été scannées par un Axon 4000B. Le protocole détaillé est donné dans l'**Annexe 4**. Les analyses ont été réalisées sur la plateforme Biopuces Toulouse Génopôle (INSA, Toulouse, France). Les oligonucléotides LNA™ ciblaient des miARNs d'origine humaine, murine et virale soit au total 862 sondes de miARNs d'intérêt, dont 576 d'origine humaine ont été analysées en Janvier 2011 (Exiqon, version 7).

8) Principe de la RT-qPCR pour la détection des microARNs

Les analyses par RT-qPCR ont été réalisées par deux types d'amorces différentes soit celles d'Exiqon avec des amorces LNA™ soit celles de Qiagen.

I – Amorces LNA™ d'Exiqon

Nous avons utilisé pour le dosage des microARNs par RT-qPCR le système d'Exiqon appelé « miRCURYLNA™ Universal RT microRNA PCR » (manuel d'instruction version 4.1 #203300 Août 2011. www.exiqon.com). Le principe de RT-qPCR d'Exiqon comprend une première étape de transcription réverse puis une deuxième étape d'amplification par LNA™ qPCR (**Figure 20**). D'abord, une queue polyA est ajoutée aux microARNs matures (étape 1A). L'ADNc est synthétisé en utilisant une sonde polyT comportant à son extrémité 3' un ancrage dégénéré et en 5' une séquence universelle (« tag ») (étape 1B). L'ADNc est amplifié en utilisant des amorces sens et anti-sens spécifiques du microARN étudié, optimisées par la technologie LNA™ (étape 2A). L'amorce sens est entièrement spécifique de la séquence du microARN tandis que l'amorce anti-sens est complémentaire de la sonde polyT et de la fin de séquence du microARN. Les agents intercalants SYBR® Green ou EvaGreen® sont utilisés pour la PCR (étape 2B). Nous avons utilisé l'EvaGreen® pour les analyses sur BioMark™ Fluidigm et du SYBR® Green pour les analyses sur CFX96™ (Bio-Rad).

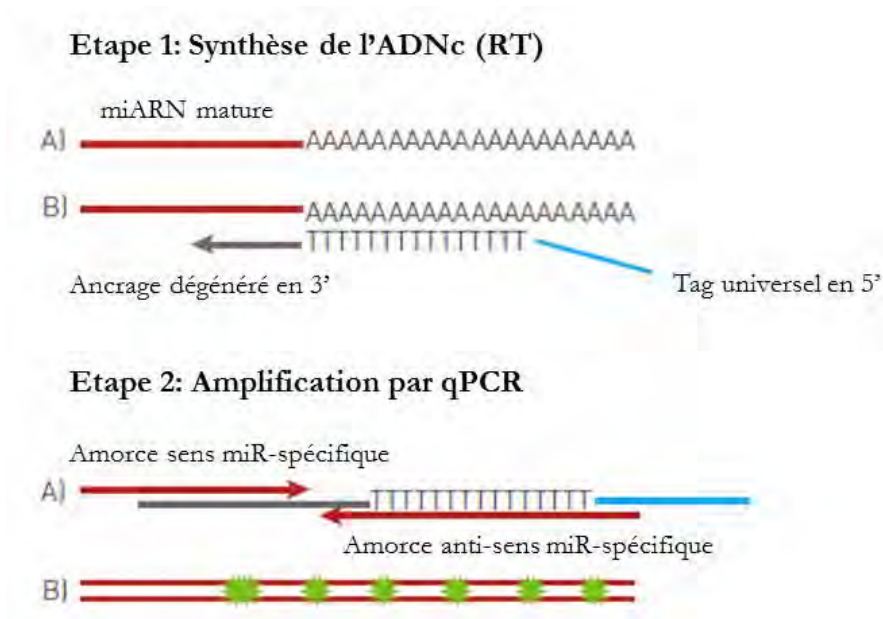


Figure 20. Principe de la RT-qPCR avec primers LNA™ d'Exiqon. Système miRCURY LNA™ Universal RT microRNA PCR d'Exiqon. (www.exiqon.com)

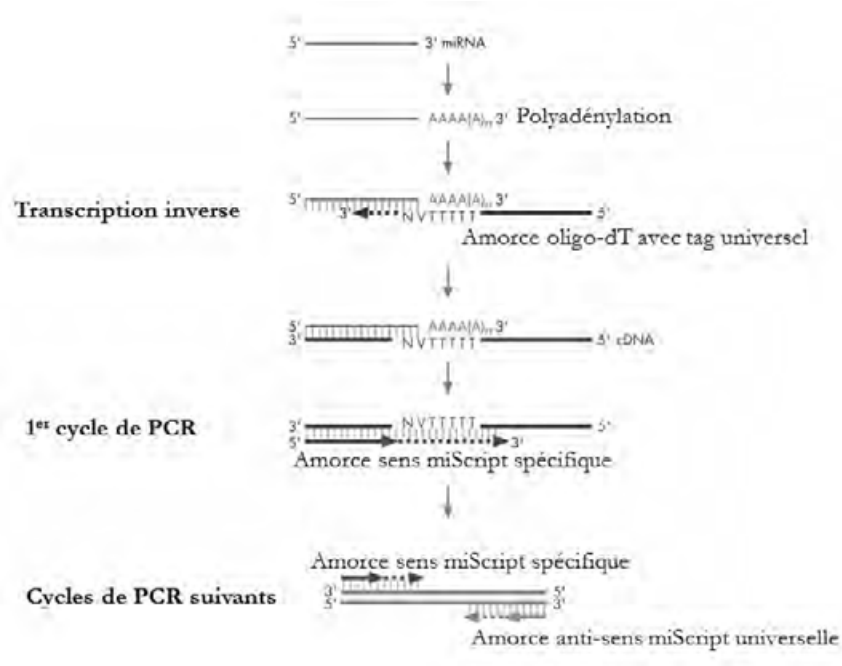


Figure 21 : Principe de la RT-qPCR du fournisseur Qiagen.

II – Amorces de Qiagen

Le principe de RT-qPCR de Qiagen comprend également une première étape de transcription réverse puis une deuxième étape d'amplification par qPCR (Figure 21). La première étape comprend une 3' polyadénylation puis une transcription réverse utilisant le

tampon miScript HiSpec et une amorce oligo-dT. Cette amorce présente une ancre 3' dégénérée et une séquence universelle en 5' comme pour Exiqon. Dans cette technique, l'ADNc est amplifié par qPCR grâce à une seule amorce spécifique complémentaire de la séquence du miARN cible, associée à une amorce universelle reconnaissant la séquence universelle. La détection se fait grâce au SYBR[®] Green.

9) Analyses des miARNs plasmatiques et cellulaires par RT-qPCR sur le système Biomark[™] Fluidigm avec les réactifs d'Exiqon

Ces analyses par RT-qPCR ont été réalisées sur la plateforme Génome et Transcriptome de Toulouse Génopôle (CHU Rangueil, Toulouse, France). Le protocole utilisé est celui d'Exiqon pour l'automate BioMark[™] Fluidigm (« Protocol for microRNA qPCR profiling using microRNA LNA[™] PCR primers sets with Fluidigm[®] Biomark system », www.exiqon.com). Cet automate permet de réaliser les étapes de PCR quantitative en micro-volumes par une technologie en microfluidique et en 96.96 DynamicArray[™] IFCs (Integrated Fluidic Circuits) (**Figure 22**) permettant d'amplifier 96 gènes sur 96 échantillons sur la même plaque permettant l'obtention de 9216 résultats simultanément.

La première étape à consister à la synthèse d'ADNc par transcription inverse (RT). Nous avons utilisé l'« Universal cDNAsynthesis kit, 16-32 rxn » (#203300) d'Exiqon. Pour chaque échantillon, nous avons préparé 16 µL de mix RT avec 4 µL d'ARN plasmatique soit un volume total de 20 µL. L'incubation s'est faite à 42°C pendant 60 min puis 5 min à 95°C et enfin à 4°C. La deuxième étape a été la préparation des primers LNA[™] d'Exiqon. Les primers sens et anti-sens ont été repris chacun dans 16,5 µL de tampon TE 1x et poolés soit une concentration finale de 20 µM. La troisième étape a été une étape de pré-amplification STA (Specific target Amplification) sur 1,25 µL d'ADNc dilué au 10^{ème} avec le « Taqman[®] preAmp Master Mix (Applied Biosystems) et les primers LNA[™]. L'amplification a comporté 15 cycles. La quatrième étape est l'étape d'amplification sur 1,25 µL de STA dilué au 10^{ème} avec le « Master Mix Taqman[®] Gene Expression » (Applied Biosystems) avec pour agent intercalant de l'EvaGreen[®] (Biotium) et les primers LNA[™]. Cette amplification a été réalisée sur 30 cycles. Les données ont été recueillies sur le logiciel « Fluidigm[®] Real-Time PCR Analysis Software ».

Pour les analyses cellulaires, nous avons utilisé le même protocole que pour les analyses plasmatiques. Nous avons utilisé 4 µL d'ARN à 5 ng/µL soit 20 ng d'ARN

cellulaire. Les étapes ont été les mêmes. Des étapes de RT, de pré-amplification (STA) et enfin d'amplification ont été réalisées.



Figure 22. Automate Fluidigm BioMark™ et la plaque d'analyse BioMark™ 96.96 DynamicArray IFC (www.fluidigm.com/biomark-hd-system.html 2014)

10) Analyses des miARNs plasmatiques et tissulaires par RT-qPCR sur l'automate CFX96™ (Bio-Rad) avec les réactifs d'Exiqon et de Qiagen

Certains miARNs ont été dosés en RT-qPCR sur l'automate CFX96™ soit avec des réactifs Exiqon soit avec des réactifs Qiagen.

I – Analyses avec les réactifs Exiqon

Les analyses par RT-qPCR ont été réalisées selon le protocole « miRCURY LNA™ Universal RT microRNA PCR » (version 4.1) d'Exiqon avec des amorces miARNs Exiqon. 4 μ L d'ARNs plasmatiques totaux ou 4 μ L d'ARNs tissulaires totaux à 5 ng/ μ L ont été rétro-transcrits avec le kit « Universal cDNA synthesis kit (16-32 rns # 203300) dans un volume de 20 μ L avec une incubation de 1 heure à 42°C. Les qPCRs ont été réalisées sur 4 μ L d'ADNc dilué au 80^{ème} dans un volume total de 10 μ L avec le kit « SYBR® Green master mix, Universal RT (# 203450). Le protocole de qPCR a été le suivant : dénaturation de 10 minutes à 95°C puis 40 cycles d'amplification de 10 secondes à 95°C et 1 minute à 60°C.

II – Analyses avec les réactifs Qiagen

Les analyses de RT-qPCR ont été réalisées selon le protocole « miScript PCR system » (version 4) de Qiagen avec des amorces miARNs Qiagen. 12 µL d'ARNs plasmatiques totaux ou 1 µg d'ARNs tissulaires totaux ont été rétro-transcrits avec le kit « miScript II RT kit (# 218161) en utilisant le tampon miScript HiSpec dans un volume de 20 µL avec une incubation de 1 heure à 37°C. Les qPCRs ont été réalisées sur 5 µL d'ADNc dilué au 10^{ème} dans un volume total de 20 µL avec le kit « miScript SYBR®Green PCR kit (# 218073). Le protocole de qPCR a été le suivant : dénaturation de 15 minutes à 95°C puis 40 cycles d'amplification de 15 secondes à 94°C 30 secondes à 55°C et 30 secondes à 70°C.

11) Analyses biostatistiques

Les analyses statistiques des données des Biopuces ont été réalisées par la plateforme Biopuces (INSA, Toulouse). Les analyses statistiques des miRs plasmatiques par RT-qPCR ont été réalisées par l'équipe de biostatistiques de la société GENCLIS (GenomicClinicalSynergy, Vandœuvre-lès-Nancy, France). Les résultats des analyses tissulaires cellulaires ont été illustrés avec le logiciel Prism (version 5.01, Graphpad software Inc). Les analyses ont été prises comme significatives avec une valeur de p inférieure à 0,05. Nous n'avons pas fait de correction de multiplicité comme par exemple l'approche de Bonferroni. Cette approche permet de corriger la valeur p au nombre de tests effectués : le seuil alpha est divisé par le nombre de tests. Ce choix de notre part est argumenté par le fait que les marqueurs significatifs sont utilisés pour comparer les deux cohortes de patients. Dans ce cas il est toléré de ne pas faire de corrections afin de ne pas réduire trop fortement la puissance du test et ainsi conserver un maximum de marqueur. La suite de l'analyse se charge de détecter les faux positifs lors de l'estimation des performances via la validation croisée.

12) Dosage de la LDH

Les dosages ont été effectués dans le laboratoire de biologie médicale du Pr Favre à l'Institut Claudius Regaud (Toulouse, France) dans le secteur de Biochimie. La technique utilisée est une méthode enzymatique en cinétique à 37°C en spectrophotométrie

d'absorption moléculaire sur l'automate RXL Max[®] Dimension[®] (Siemens). Les valeurs de référence sont inférieures à 234 UI/L.

RESULTATS

Première partie : Etude des microARNs plasmatiques dans le mélanome métastatique.

La première partie de notre projet a été l'étude de l'expression de microARNs plasmatiques dans le mélanome métastatique. Au commencement de notre projet, aucune publication n'existait sur les miARNs circulants dans le mélanome. C'est pourquoi, nous avons réalisé une phase d'identification de miARNs d'intérêt par technique Biopuces. Cette technique permet une identification sur un large panel de miARNs. Ensuite, nous avons dosé les miARNs potentiels par une technique de RT-qPCR sur une phase d'apprentissage et de validation. La population sélectionnée a été des patients atteints de mélanome au stade métastatique afin d'essayer de sélectionner des miARNs potentiellement agressifs.

1) Recherche d'un profil d'expression de microARNs plasmatiques dans le mélanome par biopuces.

Quand nous avons commencé ce projet en 2009, il n'existait pas d'étude publiée sur les microARNs plasmatiques dans le mélanome. L'équipe de Leidinger, en 2010, avait fait une étude sur sang total (Leidinger et al. 2010). Les données bibliographiques sur le mélanome concernaient des études sur tissus ou sur lignées cellulaires de mélanome. Notre objectif a été de rechercher un profil d'expression de microARNs plasmatiques par biopuces (« microarray ») afin de réaliser un screening sur un large panel de microARNs.

Une étude préliminaire réalisée dans notre laboratoire avait mis en évidence un meilleur rendement d'extraction à partir du plasma par rapport au sérum (données non montrées). C'est pourquoi, nous avons choisi de travailler sur du plasma recueilli sur tube EDTA. Notre population d'étude a porté sur 14 plasmas de patients atteints de mélanome métastatique et 5 sujets contrôles sains. Les biopuces utilisées étaient spottées avec des oligonucléotides LNA™ (Locked Nucleic Acid) de chez Exiqon. Cette technologie LNA™ consiste en l'utilisation de bases nucléotidiques modifiées permettant une amélioration de la spécificité des sondes. Pour plus de détails, il faut se reporter aux Matériels et Méthodes : « Amorces avec technologie LNA™ d'Exiqon ». Ces sondes étaient dirigées contre des miARNs d'origine humaine (*homo sapiens* nommés hsa) mais également de souris (*Mus musculus* : mmu), de rat (*Ratus norvegicus* : rno) et de différents virus. Au total, l'analyse a porté sur 862 miARNs différents dont 576 humains. Deux dépôts ont été réalisés par échantillons. Le **Tableau 7** contient la liste des microARNs analysés en biopuces.

Rang	Liste des microARNs humains	Rang	Liste des microARNs humains	Rang	Liste des autres microARNs
1	hsa-let-7a	289	hsa-miR-335*/mmu-miR-335-3p	576	ebv-miR-BART1-3p
2	hsa-let-7a*/mmu-let-7a*/mmu-let-7c-2*	290	hsa-miR-337-3p	577	ebv-miR-BART1-5p
3	hsa-let-7b*/mmu-let-7b*/rno-let-7b*	291	hsa-miR-338-5p/mmu-miR-338-5p/rno-miR-338*	578	ebv-miR-BART10
4	hsa-let-7b/mmu-let-7b/rno-let-7b	292	hsa-miR-339-5p/mmu-miR-339-5p/rno-miR-339-	579	ebv-miR-BART11-3p
5	hsa-let-7c*	293	hsa-miR-339	580	ebv-miR-BART11-5p
6	hsa-let-7c/mmu-let-7c/rno-let-7c	294	hsa-miR-340	581	ebv-miR-BART13
7	hsa-let-7d*/mmu-let-7d*/rno-let-7d*	295	hsa-miR-340*/mmu-miR-340-3p/rno-miR-340-3p	582	ebv-miR-BART14
8	hsa-let-7d/mmu-let-7d/rno-let-7d	296	hsa-miR-342-3p/mmu-miR-342-3p/rno-miR-342-	583	ebv-miR-BART14*
9	hsa-let-7e/mmu-let-7e/rno-let-7e	297	hsa-miR-342-5p/mmu-miR-342-5p/rno-miR-342-	584	ebv-miR-BART16
10	hsa-let-7f-1*/mmu-let-7f-1*	298	hsa-miR-346/mmu-miR-346-3p	585	ebv-miR-BART17-3p
11	hsa-let-7f-2*	299	hsa-miR-346-5p	586	ebv-miR-BART17-5p
12	hsa-let-7g/mmu-let-7g	300	hsa-miR-361-3p	587	ebv-miR-BART18-3p
13	hsa-let-7i*/mmu-let-7i*/rno-let-7i*	301	hsa-miR-361-5p/mmu-miR-361/rno-miR-361	588	ebv-miR-BART19-3p
14	hsa-let-7i/mmu-let-7i/rno-let-7i	302	hsa-miR-362-5p	589	ebv-miR-BART19-5p
15	hsa-miR-1/mmu-miR-1	303	hsa-miR-363*/rno-miR-363*	590	ebv-miR-BART2-3p
16	hsa-miR-101/mmu-miR-101a/rno-miR-101a	304	hsa-miR-363/mmu-miR-363/rno-miR-363	591	ebv-miR-BART2-5p
17	hsa-miR-103/mmu-miR-103/rno-miR-103	305	hsa-miR-367*	592	ebv-miR-BART3
18	hsa-miR-105	306	hsa-miR-367/mmu-miR-367	593	ebv-miR-BART4
19	hsa-miR-105*	307	hsa-miR-369-3p/mmu-miR-369-3p/rno-miR-369-	594	ebv-miR-BART5
20	hsa-miR-106a	308	hsa-miR-369-5p/mmu-miR-369-5p/rno-miR-369-	595	ebv-miR-BART6-3p
21	hsa-miR-106a*	309	hsa-miR-370/mmu-miR-370/rno-miR-370	596	ebv-miR-BART6-5p
22	hsa-miR-106b*/mmu-miR-106b*/rno-miR-106b*	310	hsa-miR-371-3p	597	ebv-miR-BART7*
23	hsa-miR-106b/mmu-miR-106b/rno-miR-106b	311	hsa-miR-372	598	ebv-miR-BART8*
24	hsa-miR-107	312	hsa-miR-373*	599	ebv-miR-BART9
25	hsa-miR-10a*/mmu-miR-10a*/rno-miR-10a-3p	313	hsa-miR-374a	600	ebv-miR-BART9*
26	hsa-miR-10a/mmu-miR-10a/rno-miR-10a-5p	314	hsa-miR-374b/mmu-miR-374/rno-miR-374	601	ebv-miR-BHRF1-1
27	hsa-miR-10b/mmu-miR-10b/rno-miR-10b	315	hsa-miR-376a	602	ebv-miR-BHRF1-2
28	hsa-miR-1180	316	hsa-miR-376b	603	ebv-miR-BHRF1-3
29	hsa-miR-1181	317	hsa-miR-376c	604	hcmv-miR-UL112
30	hsa-miR-1184	318	hsa-miR-377*	605	hcmv-miR-UL22A*
31	hsa-miR-1200	319	hsa-miR-377/mmu-miR-377/rno-miR-377	606	hcmv-miR-UL36
32	hsa-miR-1202	320	hsa-miR-378*/mmu-miR-378*/rno-miR-378*	607	hcmv-miR-UL70-3p
33	hsa-miR-1204	321	hsa-miR-378/mmu-miR-378/rno-miR-378	608	hcmv-miR-US25-1
34	hsa-miR-1207-3p	322	hsa-miR-379*	609	hcmv-miR-US25-2*
35	hsa-miR-1207-5p	323	hsa-miR-379/mmu-miR-379/rno-miR-379	610	hcmv-miR-US25-2-3p
36	hsa-miR-1208	324	hsa-miR-381/mmu-miR-381/rno-miR-381	611	hcmv-miR-US33-5p
37	hsa-miR-122*	325	hsa-miR-382/mmu-miR-382/rno-miR-382	612	hcmv-miR-US4
38	hsa-miR-122/mmu-miR-122/rno-miR-122	326	hsa-miR-383	613	hcmv-miR-US5-1
39	hsa-miR-1224-3p	327	hsa-miR-409-3p/mmu-miR-409-3p/rno-miR-409-	614	hcmv-miR-US5-2
40	hsa-miR-1224-5p	328	hsa-miR-409-5p/mmu-miR-409-5p	615	hsv1-miR-H1
41	hsa-miR-1225-3p	329	hsa-miR-411*/mmu-miR-411*	616	hsv1-miR-H1
42	hsa-miR-1227	330	hsa-miR-411/mmu-miR-411/rno-miR-411	617	ishv-miR-K12-1
43	hsa-miR-1228	331	hsa-miR-412/mmu-miR-412/rno-miR-412	618	ishv-miR-K12-10a
44	hsa-miR-1228*	332	hsa-miR-421/mmu-miR-421	619	ishv-miR-K12-10b
45	hsa-miR-1229	333	hsa-miR-422a	620	ishv-miR-K12-11
46	hsa-miR-1231	334	hsa-miR-423-5p/mmu-miR-423-5p	621	ishv-miR-K12-12
47	hsa-miR-1233	335	hsa-miR-424	622	ishv-miR-K12-2
48	hsa-miR-1234	336	hsa-miR-424*	623	ishv-miR-K12-3
49	hsa-miR-1236	337	hsa-miR-425/mmu-miR-425/rno-miR-425	624	ishv-miR-K12-3*
50	hsa-miR-1237	338	hsa-miR-429	625	ishv-miR-K12-5
51	hsa-miR-124/mmu-miR-124/rno-miR-124	339	hsa-miR-431*/mmu-miR-431*	626	ishv-miR-K12-6-3p
52	hsa-miR-1243	340	hsa-miR-432	627	ishv-miR-K12-6-5p
53	hsa-miR-1249	341	hsa-miR-432*	628	ishv-miR-K12-7
54	hsa-miR-1250	342	hsa-miR-449a/mmu-miR-449a/rno-miR-449a	629	ishv-miR-K12-8
55	hsa-miR-1254	343	hsa-miR-451/mmu-miR-451/rno-miR-451	630	ishv-miR-K12-9*
56	hsa-miR-1255a	344	hsa-miR-452	631	mcmv-miR-m101-1
57	hsa-miR-1255b	345	hsa-miR-452*	632	mcmv-miR-m107-1-3p
58	hsa-miR-1256	346	hsa-miR-453	633	mcmv-miR-m108-1
59	hsa-miR-1258	347	hsa-miR-454	634	mcmv-miR-m108-1*
60	hsa-miR-1259	348	hsa-miR-454*	635	mcmv-miR-M23-1-3p
61	hsa-miR-125a-3p/mmu-miR-125a-3p/rno-miR-12	349	hsa-miR-483-3p	636	mcmv-miR-M23-1-5p
62	hsa-miR-125a-5p/mmu-miR-125a-5p/rno-miR-12	350	hsa-miR-483-5p	637	mcmv-miR-M23-2*
63	hsa-miR-125b-1*/mmu-miR-125b-3p/rno-miR-12	351	hsa-miR-484/mmu-miR-484/rno-miR-484	638	mcmv-miR-m88-1
64	hsa-miR-125b-2*/rno-miR-125b*	352	hsa-miR-485-3p/mmu-miR-485*	639	mcmv-miR-m88-1*
65	hsa-miR-125b/mmu-miR-125b-5p/rno-miR-125b-	353	hsa-miR-487a	640	mcmv-miR-M95-1-3p
66	hsa-miR-126/mmu-miR-126-3p/rno-miR-126	354	hsa-miR-488	641	mqhv-miR-M1-2
67	hsa-miR-1260	355	hsa-miR-488*	642	mqhv-miR-M1-3
68	hsa-miR-1261	356	hsa-miR-489	643	mqhv-miR-M1-4
69	hsa-miR-1262	357	hsa-miR-490-3p/mmu-miR-490	644	mqhv-miR-M1-5
70	hsa-miR-1264	358	hsa-miR-490-5p	645	mqhv-miR-M1-6
71	hsa-miR-1265	359	hsa-miR-491-3p	646	mqhv-miR-M1-7-3p
72	hsa-miR-1268	360	hsa-miR-492	647	mqhv-miR-M1-8
73	hsa-miR-1269	361	hsa-miR-493*	648	mmu-let-7a/rno-let-7a
74	hsa-miR-127-3p/mmu-miR-127/rno-miR-127	362	hsa-miR-495/mmu-miR-495/rno-miR-495	649	mmu-let-7c-1*
75	hsa-miR-127-5p/mmu-miR-127*	363	hsa-miR-496/mmu-miR-496	650	mmu-miR-1-2-as
76	hsa-miR-1270	364	hsa-miR-497*	651	mmu-miR-101b/rno-miR-101b
77	hsa-miR-1272	365	hsa-miR-498	652	mmu-miR-106a
78	hsa-miR-1273	366	hsa-miR-499-3p	653	mmu-miR-107/rno-miR-107
79	hsa-miR-1274a	367	hsa-miR-499-5p/mmu-miR-499/rno-miR-499	654	mmu-miR-1187
80	hsa-miR-1274b	368	hsa-miR-500	655	mmu-miR-1192
81	hsa-miR-1275	369	hsa-miR-501-3p/mmu-miR-501-3p	656	mmu-miR-1193
82	hsa-miR-1276	370	hsa-miR-502-3p	657	mmu-miR-1196
83	hsa-miR-1279	371	hsa-miR-502-5p	658	mmu-miR-1198
84	hsa-miR-128/mmu-miR-128/rno-miR-128	372	hsa-miR-504/mmu-miR-504	659	mmu-miR-1224
85	hsa-miR-1281	373	hsa-miR-505*	660	mmu-miR-125b*
86	hsa-miR-1282	374	hsa-miR-505/rno-miR-505	661	mmu-miR-129-3p/rno-miR-129*
87	hsa-miR-1284	375	hsa-miR-506	662	mmu-miR-133b/rno-miR-133b
88	hsa-miR-1285	376	hsa-miR-507	663	mmu-miR-141*
89	hsa-miR-1286	377	hsa-miR-508-3p	664	mmu-miR-151-3p/rno-miR-151*
90	hsa-miR-1287	378	hsa-miR-509-3p-5p	665	mmu-miR-155

Rang	Liste des microARNs humains	Rang	Liste des microARNs humains	Rang	Liste des autres microARNs
91	hsa-miR-129-3p	379	hsa-miR-509-3p	666	mmu-miR-16*
92	hsa-miR-129-5p/ mmu-miR-129-5p/ rno-miR-129	380	hsa-miR-509-5p	667	mmu-miR-17*
93	hsa-miR-129*	381	hsa-miR-510	668	mmu-miR-17/ rno-miR-17/ rno-miR-17-5p
94	hsa-miR-1291	382	hsa-miR-511	669	mmu-miR-181a-2*
95	hsa-miR-1293	383	hsa-miR-512-3p	670	mmu-miR-181b/ rno-miR-181b
96	hsa-miR-1296	384	hsa-miR-512-5p	671	mmu-miR-186*
97	hsa-miR-1297	385	hsa-miR-513a-3p	672	mmu-miR-186
98	hsa-miR-1300	386	hsa-miR-513a-5p	673	mmu-miR-193*/ rno-miR-193*
99	hsa-miR-1301	387	hsa-miR-515-3p	674	mmu-miR-193b
100	hsa-miR-1304	388	hsa-miR-516a-3p/ hsa-miR-516b*	675	mmu-miR-201
101	hsa-miR-1306	389	hsa-miR-516a-5p	676	mmu-miR-202-3p
102	hsa-miR-1308	390	hsa-miR-516b	677	mmu-miR-207/ rno-miR-207
103	hsa-miR-130a*	391	hsa-miR-517*	678	mmu-miR-20a*/ rno-miR-20a*
104	hsa-miR-130b/ mmu-miR-130b/ rno-miR-130b	392	hsa-miR-517a	679	mmu-miR-20a/ rno-miR-20a
105	hsa-miR-132*	393	hsa-miR-518a-5p/ hsa-miR-527	680	mmu-miR-20b*/ rno-miR-20b-3p
106	hsa-miR-132/ mmu-miR-132/ rno-miR-132	394	hsa-miR-518b	681	mmu-miR-21*/ rno-miR-21*
107	hsa-miR-1321	395	hsa-miR-518c*	682	mmu-miR-215/ rno-miR-215
108	hsa-miR-1322	396	hsa-miR-518d-5p/ hsa-miR-520c-5p/ hsa-miR-520e	683	mmu-miR-28*
109	hsa-miR-1323	397	hsa-miR-518e	684	mmu-miR-290-3p
110	hsa-miR-133b	398	hsa-miR-518e*/ hsa-miR-519a*/ hsa-miR-519b-5p	685	mmu-miR-290-5p/ rno-miR-290
111	hsa-miR-135a*/ mmu-miR-135a*	399	hsa-miR-519f*	686	mmu-miR-291b-3p
112	hsa-miR-135a/ mmu-miR-135a/ rno-miR-135a	400	hsa-miR-519a	687	mmu-miR-292-3p/ rno-miR-292-3p
113	hsa-miR-135b*	401	hsa-miR-519c-3p	688	mmu-miR-292-5p/ rno-miR-292-5p
114	hsa-miR-135b/ mmu-miR-135b/ rno-miR-135b	402	hsa-miR-519d	689	mmu-miR-293
115	hsa-miR-138-1*/ mmu-miR-138*/ rno-miR-138*	403	hsa-miR-519e	690	mmu-miR-293*
116	hsa-miR-138-2*	404	hsa-miR-519e*	691	mmu-miR-294
117	hsa-miR-138/ mmu-miR-138/ rno-miR-138	405	hsa-miR-520a-3p	692	mmu-miR-297a*/ mmu-miR-297b-3p/ mmu-miR-297c*
118	hsa-miR-139-3p/ mmu-miR-139-3p/ rno-miR-139-	406	hsa-miR-520a-5p	693	mmu-miR-298/ rno-miR-298
119	hsa-miR-140-3p/ mmu-miR-140*/ rno-miR-140*	407	hsa-miR-520c-3p	694	mmu-miR-300*/ rno-miR-300-5p
120	hsa-miR-140-5p/ mmu-miR-140/ rno-miR-140	408	hsa-miR-520d-5p	695	mmu-miR-300/ rno-miR-300-3p
121	hsa-miR-141/ mmu-miR-141/ rno-miR-141	409	hsa-miR-520f	696	mmu-miR-301b/ rno-miR-301b
122	hsa-miR-142-3p/ mmu-miR-142-3p/ rno-miR-142-	410	hsa-miR-520g	697	mmu-miR-302a*
123	hsa-miR-142-5p/ mmu-miR-142-5p/ rno-miR-142-	411	hsa-miR-520h	698	mmu-miR-302b*
124	hsa-miR-144*	412	hsa-miR-521	699	mmu-miR-30b*/ rno-miR-30b-3p
125	hsa-miR-144/ mmu-miR-144/ rno-miR-144	413	hsa-miR-522	700	mmu-miR-322/ rno-miR-322
126	hsa-miR-145*/ mmu-miR-145*	414	hsa-miR-524-3p	701	mmu-miR-325*/ rno-miR-325-5p
127	hsa-miR-145/ mmu-miR-145/ rno-miR-145	415	hsa-miR-524-5p	702	mmu-miR-325/ rno-miR-325-3p
128	hsa-miR-146b-3p	416	hsa-miR-525-5p	703	mmu-miR-329/ rno-miR-329
129	hsa-miR-146b-5p/ mmu-miR-146b/ rno-miR-146b	417	hsa-miR-526b	704	mmu-miR-33/ rno-miR-33
130	hsa-miR-147	418	hsa-miR-526b*	705	mmu-miR-330*/ rno-miR-330*
131	hsa-miR-147b/ mmu-miR-147/ rno-miR-147	419	hsa-miR-532-3p/ mmu-miR-532-3p/ rno-miR-532-	706	mmu-miR-339-3p
132	hsa-miR-148a*/ mmu-miR-148a*	420	hsa-miR-532-5p/ mmu-miR-532-5p/ rno-miR-532-	707	mmu-miR-340-5p/ rno-miR-340-5p
133	hsa-miR-148a/ mmu-miR-148a	421	hsa-miR-541	708	mmu-miR-341/ rno-miR-341
134	hsa-miR-149*	422	hsa-miR-541*	709	mmu-miR-343
135	hsa-miR-149/ mmu-miR-149	423	hsa-miR-542-3p/ mmu-miR-542-3p/ rno-miR-542-	710	mmu-miR-345-3p/ rno-miR-345-3p
136	hsa-miR-150*/ mmu-miR-150*	424	hsa-miR-543/ mmu-miR-543/ rno-miR-543*	711	mmu-miR-346
137	hsa-miR-150/ mmu-miR-150/ rno-miR-150	425	hsa-miR-545*	712	mmu-miR-346-5p/ rno-miR-346
138	hsa-miR-151-3p	426	hsa-miR-548a-5p	713	mmu-miR-34c/ rno-miR-34c
139	hsa-miR-151-5p/ mmu-miR-151-5p/ rno-miR-151	427	hsa-miR-548b-5p	714	mmu-miR-351/ rno-miR-351
140	hsa-miR-154*/ mmu-miR-154*	428	hsa-miR-548d-5p	715	mmu-miR-362-5p
141	hsa-miR-155	429	hsa-miR-548e	716	mmu-miR-374*
142	hsa-miR-155*	430	hsa-miR-548h	717	mmu-miR-376c*
143	hsa-miR-15a/ mmu-miR-15a	431	hsa-miR-548i	718	mmu-miR-380-3p
144	hsa-miR-15b*/ mmu-miR-15b*	432	hsa-miR-548j	719	mmu-miR-384-5p/ rno-miR-384-5p
145	hsa-miR-15b/ mmu-miR-15b/ rno-miR-15b	433	hsa-miR-548l	720	mmu-miR-429/ rno-miR-429
146	hsa-miR-16-1*	434	hsa-miR-548m	721	mmu-miR-433*
147	hsa-miR-16-2*	435	hsa-miR-548n	722	mmu-miR-434-3p/ rno-miR-434
148	hsa-miR-16/ mmu-miR-16/ rno-miR-16	436	hsa-miR-549	723	mmu-miR-434-5p
149	hsa-miR-17	437	hsa-miR-550	724	mmu-miR-450a-3p
150	hsa-miR-17*/ rno-miR-17-3p	438	hsa-miR-550*	725	mmu-miR-450a-5p/ rno-miR-450a
151	hsa-miR-181a-2*	439	hsa-miR-551a	726	mmu-miR-450b-3p
152	hsa-miR-181a/ mmu-miR-181a/ rno-miR-181a	440	hsa-miR-551b*	727	mmu-miR-450b-5p
153	hsa-miR-181b	441	hsa-miR-551b/ mmu-miR-551b/ rno-miR-551b	728	mmu-miR-453
154	hsa-miR-181c/ mmu-miR-181c/ rno-miR-181c	442	hsa-miR-552	729	mmu-miR-455
155	hsa-miR-182/ mmu-miR-182/ rno-miR-182	443	hsa-miR-553	730	mmu-miR-465a-3p/ mmu-miR-465b-3p/ mmu-miR-465c
156	hsa-miR-1825	444	hsa-miR-554	731	mmu-miR-465a-5p
157	hsa-miR-1826	445	hsa-miR-555	732	mmu-miR-465b-5p
158	hsa-miR-1827	446	hsa-miR-556-3p	733	mmu-miR-465c-5p
159	hsa-miR-183*/ mmu-miR-183*	447	hsa-miR-557	734	mmu-miR-466b-3-3p
160	hsa-miR-183/ mmu-miR-183/ rno-miR-183	448	hsa-miR-558	735	mmu-miR-466d-5p
161	hsa-miR-184/ mmu-miR-184/ rno-miR-184	449	hsa-miR-559	736	mmu-miR-466f
162	hsa-miR-185*	450	hsa-miR-567	737	mmu-miR-466f-3p
163	hsa-miR-185/ mmu-miR-185/ rno-miR-185	451	hsa-miR-573	738	mmu-miR-466g
164	hsa-miR-186/ mmu-miR-186/ rno-miR-186	452	hsa-miR-574-3p	739	mmu-miR-466h
165	hsa-miR-187*	453	hsa-miR-574-5p/ mmu-miR-574-5p	740	mmu-miR-466i
166	hsa-miR-187/ mmu-miR-187/ rno-miR-187	454	hsa-miR-575	741	mmu-miR-466j
167	hsa-miR-188-3p/ mmu-miR-188-3p	455	hsa-miR-576-3p	742	mmu-miR-467b
168	hsa-miR-188-5p/ mmu-miR-188-5p/ rno-miR-188	456	hsa-miR-576-5p	743	mmu-miR-467b*
169	hsa-miR-18a	457	hsa-miR-579	744	mmu-miR-467e
170	hsa-miR-18a*/ mmu-miR-18a*	458	hsa-miR-583	745	mmu-miR-467e*
171	hsa-miR-18b	459	hsa-miR-584	746	mmu-miR-467f
172	hsa-miR-18b*	460	hsa-miR-585	747	mmu-miR-468
173	hsa-miR-1908	461	hsa-miR-588	748	mmu-miR-470
174	hsa-miR-190b/ mmu-miR-190b	462	hsa-miR-589	749	mmu-miR-470*
175	hsa-miR-191*	463	hsa-miR-589*	750	mmu-miR-471/ rno-miR-471
176	hsa-miR-192*	464	hsa-miR-592/ mmu-miR-592	751	mmu-miR-483
177	hsa-miR-193a-5p	465	hsa-miR-593	752	mmu-miR-483*/ rno-miR-483
178	hsa-miR-193b	466	hsa-miR-593*	753	mmu-miR-488*
179	hsa-miR-193b*	467	hsa-miR-595	754	mmu-miR-493
180	hsa-miR-194*	468	hsa-miR-596	755	mmu-miR-501-5p/ rno-miR-501
181	hsa-miR-194/ mmu-miR-194/ rno-miR-194	469	hsa-miR-598	756	mmu-miR-503*
182	hsa-miR-195*	470	hsa-miR-600	757	mmu-miR-503/ rno-miR-503
183	hsa-miR-195/ mmu-miR-195/ rno-miR-195	471	hsa-miR-601	758	mmu-miR-509-3p
184	hsa-miR-196a*/ mmu-miR-196a*/ rno-miR-196a*	472	hsa-miR-602	759	mmu-miR-511
185	hsa-miR-196a/ mmu-miR-196a/ rno-miR-196a	473	hsa-miR-603	760	mmu-miR-540-3p/ rno-miR-540
186	hsa-miR-197/ mmu-miR-197	474	hsa-miR-604	761	mmu-miR-541/ rno-miR-541
187	hsa-miR-198	475	hsa-miR-605	762	mmu-miR-546
188	hsa-miR-199b-5p	476	hsa-miR-608	763	mmu-miR-547
189	hsa-miR-199a/ mmu-miR-199a/ rno-miR-199a	477	hsa-miR-609	764	mmu-miR-547-3p

Rang	Liste des microARNs humains	Rang	Liste des microARNs humains	Rang	Liste des autres microARNs
190	hsa-miR-196/mmu-miR-196/rno-miR-196	478	hsa-miR-610	765	mmu-miR-582-3p
191	hsa-miR-200a*/mmu-miR-200a*	479	hsa-miR-611	766	mmu-miR-665
192	hsa-miR-200a/mmu-miR-200a/rno-miR-200a	480	hsa-miR-615-3p/mmu-miR-615-3p	767	mmu-miR-666-5p
193	hsa-miR-200b*/mmu-miR-200b*	481	hsa-miR-615-5p/mmu-miR-615-5p	768	mmu-miR-667
194	hsa-miR-200b/mmu-miR-200b	482	hsa-miR-616	769	mmu-miR-669a
195	hsa-miR-200c*/mmu-miR-200c*	483	hsa-miR-616*	770	mmu-miR-669e
196	hsa-miR-200c/mmu-miR-200c/rno-miR-200c	484	hsa-miR-617	771	mmu-miR-669f
197	hsa-miR-202	485	hsa-miR-618	772	mmu-miR-669h-3p
198	hsa-miR-202*	486	hsa-miR-620	773	mmu-miR-669h-5p
199	hsa-miR-203/mmu-miR-203/rno-miR-203	487	hsa-miR-622	774	mmu-miR-670
200	hsa-miR-205/mmu-miR-205/rno-miR-205	488	hsa-miR-623	775	mmu-miR-672/rno-miR-672
201	hsa-miR-206/mmu-miR-206/rno-miR-206	489	hsa-miR-625	776	mmu-miR-673-3p
202	hsa-miR-208b/mmu-miR-208b	490	hsa-miR-625*	777	mmu-miR-673-5p
203	hsa-miR-20a	491	hsa-miR-627	778	mmu-miR-674*/rno-miR-674-3p
204	hsa-miR-20a*	492	hsa-miR-628-3p	779	mmu-miR-675-3p
205	hsa-miR-20b*	493	hsa-miR-629	780	mmu-miR-675-5p
206	hsa-miR-20b/mmu-miR-20b/rno-miR-20b-5p	494	hsa-miR-629*	781	mmu-miR-676*
207	hsa-miR-211	495	hsa-miR-630	782	mmu-miR-677
208	hsa-miR-212/mmu-miR-212/rno-miR-212	496	hsa-miR-631	783	mmu-miR-678
209	hsa-miR-214/mmu-miR-214/rno-miR-214	497	hsa-miR-633	784	mmu-miR-679
210	hsa-miR-215	498	hsa-miR-634	785	mmu-miR-681
211	hsa-miR-216a/mmu-miR-216a/rno-miR-216a	499	hsa-miR-635	786	mmu-miR-683
212	hsa-miR-216b/mmu-miR-216b	500	hsa-miR-637	787	mmu-miR-684
213	hsa-miR-217/mmu-miR-217/rno-miR-217	501	hsa-miR-638	788	mmu-miR-685
214	hsa-miR-218-1*	502	hsa-miR-639	789	mmu-miR-686
215	hsa-miR-219-2-3p/rno-miR-219-2-3p	503	hsa-miR-640	790	mmu-miR-687
216	hsa-miR-219-5p/mmu-miR-219/rno-miR-219-5p	504	hsa-miR-641	791	mmu-miR-689
217	hsa-miR-22*/mmu-miR-22*/rno-miR-22*	505	hsa-miR-642	792	mmu-miR-690
218	hsa-miR-22/mmu-miR-22/rno-miR-22	506	hsa-miR-645	793	mmu-miR-691
219	hsa-miR-220a	507	hsa-miR-647	794	mmu-miR-692
220	hsa-miR-220b	508	hsa-miR-650	795	mmu-miR-693-5p
221	hsa-miR-220c	509	hsa-miR-651	796	mmu-miR-695
222	hsa-miR-221*	510	hsa-miR-653/mmu-miR-653	797	mmu-miR-696
223	hsa-miR-221/mmu-miR-221/rno-miR-221	511	hsa-miR-654-3p/mmu-miR-654-3p	798	mmu-miR-697
224	hsa-miR-222/mmu-miR-222/rno-miR-222	512	hsa-miR-654-5p	799	mmu-miR-698
225	hsa-miR-223*	513	hsa-miR-657	800	mmu-miR-700
226	hsa-miR-223/mmu-miR-223/rno-miR-223	514	hsa-miR-658	801	mmu-miR-702
227	hsa-miR-224/rno-miR-224	515	hsa-miR-659	802	mmu-miR-703
228	hsa-miR-23a*/rno-miR-23a*	516	hsa-miR-661	803	mmu-miR-705
229	hsa-miR-23a/mmu-miR-23a/rno-miR-23a	517	hsa-miR-662	804	mmu-miR-706
230	hsa-miR-23c	518	hsa-miR-663	805	mmu-miR-709
231	hsa-miR-24-1*/mmu-miR-24-1*/rno-miR-24-1*	519	hsa-miR-664	806	mmu-miR-710
232	hsa-miR-24-2*/mmu-miR-24-2*/rno-miR-24-2*	520	hsa-miR-665	807	mmu-miR-711
233	hsa-miR-24/mmu-miR-24/rno-miR-24	521	hsa-miR-671-3p/mmu-miR-671-3p/rno-miR-671	808	mmu-miR-712
234	hsa-miR-25*	522	hsa-miR-671-5p/mmu-miR-671-5p	809	mmu-miR-712*
235	hsa-miR-25/mmu-miR-25/rno-miR-25	523	hsa-miR-675	810	mmu-miR-713
236	hsa-miR-26a-1*	524	hsa-miR-675b	811	mmu-miR-714
237	hsa-miR-26a-2*	525	hsa-miR-7-2*	812	mmu-miR-715
238	hsa-miR-26a/mmu-miR-26a/rno-miR-26a	526	hsa-miR-7/mmu-miR-7a/rno-miR-7a	813	mmu-miR-721
239	hsa-miR-26b*/mmu-miR-26b*/rno-miR-26b*	527	hsa-miR-720/mmu-miR-720	814	mmu-miR-741
240	hsa-miR-26b/mmu-miR-26b/rno-miR-26b	528	hsa-miR-744/mmu-miR-744	815	mmu-miR-742
241	hsa-miR-27a*/mmu-miR-27a*/rno-miR-27a*	529	hsa-miR-758/rno-miR-758	816	mmu-miR-743a
242	hsa-miR-27a/mmu-miR-27a/rno-miR-27a	530	hsa-miR-760/mmu-miR-760/rno-miR-760-3p	817	mmu-miR-743b-3p
243	hsa-miR-27b*/mmu-miR-27b*	531	hsa-miR-765	818	mmu-miR-758
244	hsa-miR-28-5p	532	hsa-miR-767-5p	819	mmu-miR-759
245	hsa-miR-29b-3p/mmu-miR-29b-3p/rno-miR-29b	533	hsa-miR-769-3p	820	mmu-miR-761
246	hsa-miR-29b-5p/mmu-miR-29b-5p/rno-miR-29b*	534	hsa-miR-769-5p	821	mmu-miR-762
247	hsa-miR-297/mmu-miR-297a	535	hsa-miR-770-5p	822	mmu-miR-763
248	hsa-miR-298	536	hsa-miR-802/mmu-miR-802	823	mmu-miR-770-3p
249	hsa-miR-299-5p/mmu-miR-299*/rno-miR-299	537	hsa-miR-874/mmu-miR-874/rno-miR-874	824	mmu-miR-804
250	hsa-miR-299*/mmu-miR-299*/rno-miR-299*	538	hsa-miR-875-3p	825	mmu-miR-805
251	hsa-miR-299a/mmu-miR-299a/rno-miR-299a	539	hsa-miR-876-3p	826	mmu-miR-871
252	hsa-miR-299-1*/mmu-miR-299*	540	hsa-miR-877*/mmu-miR-877*	827	mmu-miR-872*/rno-miR-872*
253	hsa-miR-299b/mmu-miR-299b/rno-miR-299b	541	hsa-miR-877/mmu-miR-877/rno-miR-877	828	mmu-miR-875-3p
254	hsa-miR-299c/mmu-miR-299c/rno-miR-299c	542	hsa-miR-885-3p	829	mmu-miR-881
255	hsa-miR-300	543	hsa-miR-885-5p	830	mmu-miR-882
256	hsa-miR-301a/mmu-miR-301a/rno-miR-301a	544	hsa-miR-886-3p	831	mmu-miR-883a-3p
257	hsa-miR-302a	545	hsa-miR-886-5p	832	mmu-miR-883a-5p
258	hsa-miR-302a*	546	hsa-miR-887	833	mmu-miR-883b-5p
259	hsa-miR-302b*	547	hsa-miR-888	834	mmu-miR-9*/rno-miR-9*
260	hsa-miR-302b/mmu-miR-302b	548	hsa-miR-889	835	mmu-miR-92a*
261	hsa-miR-302c	549	hsa-miR-890	836	rno-miR-1
262	hsa-miR-302c/mmu-miR-302c	550	hsa-miR-891a	837	rno-miR-200b
263	hsa-miR-302d*	551	hsa-miR-891b	838	rno-miR-204*
264	hsa-miR-302e	552	hsa-miR-892b	839	rno-miR-25*
265	hsa-miR-30a/mmu-miR-30a/rno-miR-30a	553	hsa-miR-9*	840	rno-miR-327
266	hsa-miR-30b*	554	hsa-miR-9/mmu-miR-9/rno-miR-9	841	rno-miR-336
267	hsa-miR-30b/mmu-miR-30b/rno-miR-30b-5p	555	hsa-miR-920	842	rno-miR-344-3p
268	hsa-miR-30c-1*/mmu-miR-30c-1*/rno-miR-30c-	556	hsa-miR-923	843	rno-miR-344-5p
269	hsa-miR-30c-2*/mmu-miR-30c-2*/rno-miR-30c-	557	hsa-miR-924	844	rno-miR-346
270	hsa-miR-30c/mmu-miR-30c/rno-miR-30c	558	hsa-miR-92a-2*	845	rno-miR-347
271	hsa-miR-30d/mmu-miR-30d/rno-miR-30d	559	hsa-miR-92a/mmu-miR-92a/rno-miR-92a	846	rno-miR-352
272	hsa-miR-30e*/mmu-miR-30e*/rno-miR-30e*	560	hsa-miR-92b*	847	rno-miR-382*
273	hsa-miR-30e/mmu-miR-30e/rno-miR-30e	561	hsa-miR-92b/mmu-miR-92b/rno-miR-92b	848	rno-miR-409-5p
274	hsa-miR-31/mmu-miR-31/rno-miR-31	562	hsa-miR-93*/mmu-miR-93*	849	rno-miR-421
275	hsa-miR-32/mmu-miR-32/rno-miR-32	563	hsa-miR-93/mmu-miR-93/rno-miR-93	850	rno-miR-463
276	hsa-miR-320a/mmu-miR-320/rno-miR-320	564	hsa-miR-934	851	rno-miR-466c
277	hsa-miR-320b	565	hsa-miR-935	852	rno-miR-543
278	hsa-miR-320c	566	hsa-miR-936	853	rno-miR-664
279	hsa-miR-320d	567	hsa-miR-937	854	rno-miR-742
280	hsa-miR-323-3p/mmu-miR-323-3p/rno-miR-323	568	hsa-miR-939	855	rno-miR-743a
281	hsa-miR-324-3p/mmu-miR-324-3p/rno-miR-324-	569	hsa-miR-940	856	rno-miR-743b
282	hsa-miR-325	570	hsa-miR-941	857	rno-miR-871
283	hsa-miR-326/mmu-miR-326/rno-miR-326	571	hsa-miR-942	858	sv40-miR-S1-3p
284	hsa-miR-329	572	hsa-miR-943	859	sv40-miR-S1-5p
285	hsa-miR-330-3p	573	hsa-miR-96/mmu-miR-96/rno-miR-96	860	U6-snRNA-1
286	hsa-miR-330-5p/mmu-miR-330/rno-miR-330	574	hsa-miR-99a*	861	U6-snRNA-2
287	hsa-miR-331-3p/mmu-miR-331-3p/rno-miR-331	575	hsa-miR-99b*/mmu-miR-99b*/rno-miR-99b*	862	U6b-3
288	hsa-miR-331-5p/mmu-miR-331-5p	576	hsa-miR-211U (hsa-miRplus-A104Z)		

Tableau 7: **Liste des microARNs analysés en biopuces.** MicroARNs d'origine humaine (homo sapiens : hsa), de souris (mmu), de rat (rno) et viraux : virus d'Epstein-Barr (ebv), cytomegalovirus humain (hcmv) et

murin (mcmv), virus d'immunodéficience humaine 1 (hiv1), virus Herpes simplex 1 (hsv1), Herpesvirus associé à la maladie de Kaposi (kshv), Herpesvirus murin gamma (mghv), virus simien 40 (sv40).

La première étape a consisté à préparer les échantillons-cibles en réalisant une extraction des ARNs totaux à partir des plasmas. Nous avons réalisé une extraction des ARNs à partir de 10 ml de plasma selon le protocole « Extraction des ARNs pour détection des microARNs plasmatiques » avec le kit miRNeasy de Qiagen (voir matériels et méthodes). Les extraits ont ensuite été traités à la plateforme Biopuces du Génopôle de Toulouse (Génotoul - INSA Toulouse). Une étape de marquage, consistant à une rétrotranscription, a été ensuite réalisée selon le protocole « Marquage et Hybridation des miARNs sur puces LNA™ » (voir Matériels et Méthodes). Cette étape a permis de coupler un traceur fluorescent aux ADNc obtenus. Ici, le fluorochrome utilisé est le Cy3™ donnant une fluorescence verte. L'étape suivante a été une étape d'hybridation suivie de lavages. Elle consiste à la mise en contact des ADNc avec l'ensemble des spots. S'il y a complémentarité, l'ADNc va se fixer au spot. Dans le cas contraire, l'ADNc va être éliminé lors des étapes de lavages. Après cette étape de lavage, seules les cibles marquées hybridés aux spots spécifiques vont être conservées. Deux dépôts par échantillon ont été réalisés. L'étape d'acquisition des images a consisté à obtenir les signaux numériques des lames grâce à un scanner (Axon 4000B). Un laser va exciter les fluorochromes incorporés aux cibles. Le signal lumineux émis est capté par un photomultiplicateur et converti en signal numérique. La dernière étape a consisté à l'analyse des données à l'aide du logiciel d'analyse d'images GenePix Pro (Axon Instruments). Les fichiers images TIFF (Tag Image File Format) et les fichiers de sortie de GenePix avec les intensités (.GPR) ont été analysés. Ce logiciel a permis à partir des images brutes des spots d'obtenir les valeurs numériques caractéristiques des spots : moyenne et médiane des intensités des pixels du spot ainsi que l'intensité de bruit de fond. Les spots non exploitables sont notés avec un drapeau (« flag » en anglais) et non pris en compte lors de l'analyse des données. Deux types de normalisation ont été réalisées une normalisation par la moyenne d'intensité de tous les spots (**All Spots Mean : ASM**) et une normalisation par la **méthode des Quantiles** qui consiste au classement de l'ensemble des spots de chaque puce par ordre d'intensité croissante et à forcer à adopter la même distribution (Bolstad et al. 2003).

Le taux de données exploitables par échantillon a été en moyenne de 43%. Le filtrage des données a été réalisé sur la qualité des spots reposant sur l'hétérogénéité entre la moyenne et la médiane des intensités de fluorescence et sur le paramètre « flag ». Le

tableau suivant reprend le taux de filtrage pour l'ensemble des échantillons (**Tableau 8**). L'échantillon M14 a le taux maximum d'exploitation des spots avec 61% de données exploitables. Les échantillons M5 et M10 ont les taux d'exploitation des spots minimum avec un taux à seulement 29%.

Noms échantillons	M2	M3	M4	M5	M6
Taux de filtrage des données (%)	41	43	34	29	51
Noms échantillons	M12	M13	M14	M15	S1
Taux de filtrage des données (%)	38	56	61	52	48
Noms échantillons	M7	M8	M9	M10	M11
Taux de filtrage des données (%)	35	48	35	29	56
Noms échantillons	S2	S3	S4	S5	
Taux de filtrage des données (%)	34	36	46	47	

Tableau 8 : Taux de données exploitables par échantillon. Ce taux de données exploitables est donné en pourcentage des taux de filtrage des données. Les noms des échantillons des malades sont indiqués par la lettre M suivi d'un numéro de 2 à 15 (soit 14 patients) ceux des sains sont indiqués par la lettre S suivi d'un numéro de 1 à 5 (soit au total 5 sujets sains).

Nous avons analysé l'expression différentielle des miARNs entre les patients et les sujets contrôles. Pour cela, nous avons comparé les intensités de fluorescence entre les deux groupes. Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés aux miARNs qui étaient dérégulés chez les patients par rapport aux sujets contrôles. Certains miARNs étaient surexprimés et d'autres, au contraire, sous-exprimés de manière significative chez les patients par rapport aux sujets sains. Enfin, nous avons étudiés les miARNs retrouvés exclusivement chez les patients.

I – Les microARNs dérégulés chez les patients par rapport aux sujets sains

Pour l'ensemble des miARNs pour lesquels nous avons des valeurs d'intensité de fluorescence pour les patients et les sujets sains, nous avons utilisé deux méthodes de normalisation. Les méthodes de normalisation utilisées sont celle des **All Spots Mean (ASM)** et celle des **Quantiles**. Nous avons étudié les miRs significativement dérégulés (soit surexprimés ou soit sous-exprimés) chez les patients par rapport aux sujets contrôles par

l'une des méthodes ou par les deux. Nous avons arbitrairement choisi les seuils de 1,5 comme seuil de surexpression et 0,666 seuil de sous-expression afin que les observations soient significatives par rapport aux témoins mais sans être trop restrictives.

A – Les microARNs surexprimés chez les patients par rapport aux sujets sains

Les résultats de surexpression ont été pris comme significatifs lorsque le rapport patients/témoin était supérieur à 1,5 pour chacune des deux méthodes de normalisation. Une analyse de l'ensemble des microARNs humains a permis de mettre en évidence la surexpression de 28 miRs par les deux méthodes dont 27 miRs par la méthode des ASM seule et 19 miRs par la méthode des Quantiles. Les résultats sont contenus dans la **figure 23**.

Les microARNs, dont le rapport de surexpression est supérieur à 2 par les deux méthodes de normalisation, sont au nombre de cinq: miR-1290, miR-1246, miR-191, miR-21, miR-33a. Les miRs-1290 et 1246 sont les miRs les plus surexprimés chez les patients par rapport aux contrôles avec une surexpression de miR-1290 de 3,88 (Méthode des Quantiles) et de 4,35 (Méthodes des ASM) et pour le miR-1246 une surexpression de 2,94 (Quantile) et 3,42 (ASM). La **figure 24** revient plus en détails sur les intensités de fluorescence des deux populations.

Nous avons choisi de sélectionner les miRs surexprimés chez les patients d'un facteur supérieur à 2 ainsi que ceux supérieurs à 1,7 et présentant cette surexpression chez au moins la moitié des patients soit au moins 7 patients sur 14. Les miRs sélectionnés sont au nombre de neuf. Les cinq miRs dont les ratio sont supérieurs à 2 : **hsa-miR-1290** (ratio à 3,88 et 4,35), **hsa-miR-1246** (ratio à 2,94 et 3,42), **hsa-miR-191** (ratio à 2,23 et 2,51), **hsa-miR-21** (ratio à 2,03 et 2,33) et **hsa-miR-33a** (ratio à 1,97 et 2,08) ainsi que les quatre miRs dont les ratio sont supérieurs à 1,7 chez la moitié des patients : **hsa-miR-130a** (ratio à 1,66 et 1,82 chez 7 patients), **hsa-miR-143** (ratio à 1,70 et 1,70 chez 8 patients), **hsa-miR-338-3p** (ratio à 1,84 et 1,90 chez 10 patients) et **hsa-miR-425*** (ratio à 1,83 chez 10 patients). Ce sont les miR-1290, miR-1246 et miR-21 qui ont les ratios les plus importants et qui sont retrouvés chez le plus grand nombre de patients.

Noms des microARNs	méthode des Quantiles		méthode All Spot Mean	
	Ratio Malades/Sains	P-value	Ratio Malades/Sains	P-value
	< 0,666		< 0,666	
hsa-miR-933	0.39	0.00917	0.41	0.00968
hsa-miR-494	0.39	0.01440	0.41	0.01446
hsa-miR-1183	0.40	0.00184	0.41	0.00153
hsa-miR-888*	0.44	0.00146	0.51	0.00136
hsa-miR-486-5p	0.45	0.02440	0.47	0.02653
hsa-miR-32	0.46	0.01410		
hsa-miR-1280	0.46	0.01222	0.54	0.03309
hsa-let-7e*	0.49	0.00104	0.47	0.00040
hsa-miR-153	0.50	0.01449	0.53	0.02089
hsa-miR-938	0.51	0.02319	0.52	0.02274
hsa-miR-299-3p	0.52	0.00181	0.61	0.03374
hsa-miR-29c*	0.53	0.02802	0.54	0.02209
hsa-miR-766	0.56	0.00305	0.66	0.04199
hsa-miR-484	0.56	0.04256		
hsa-miR-302c*	0.60	0.02620		
hsa-miR-1274a	0.60	0.04314		
hsa-miR-650	0.60	0.03702		
hsa-miR-1274b	0.63	0.02160		
hsa-miR-1264	0.63	0.02701		
	> 1,5		> 1,5	
hsa-miR-433	1,52	0.03904	1.67	0.02118
hsa-miR-365	1,53	0.04146	1.62	0.02264
hsa-miR-374b*			1.53	0.02755
hsa-miR-219-1-3p			1.54	0.03280
hsa-miR-1307	1,54	0.02439	1.74	0.03059
hsa-miR-148b	1.54	0.00545	1.74	0.00830
hsa-miR-337-5p	1.55	0.01573	1.61	0.01124
hsa-miR-423-3p			1.55	0.04134
hsa-miR-508-5p	1.56	0.02232	1.66	0.04261
hsa-miR-139-5p	1.57	0.01569	1.73	0.01178
hsa-miR-612			1.58	0.04475
hsa-miR-374a	1.59	0.04191		
hsa-miR-130b*			1.62	0.03502
hsa-miR-515-5p	1.63	0.04001	1.67	0.01829
hsa-miR-99b			1.63	0.02155
hsa-miR-130a	1.66	0.02175	1.82	0.00344
hsa-miR-513b			1.68	0.02351
hsa-miR-143	1.70	0.00529	1.70	0.00213
hsa-miR-652			1.73	0.04461
hsa-let-7f	1.77	0.02053	1.96	0.03633
hsa-miR-371-5p	1.82	0.03361	1.85	0.03032
hsa-miR-425*			1.83	0.04881
hsa-miR-338-3p	1.84	0.00164	1.90	0.00124
hsa-miR-33a	1.97	0.01554	2.08	0.03246
hsa-miR-21	2.03	0.03797	2.33	0.04109
hsa-miR-191	2.23	0.02417	2.51	0.03046
hsa-miR-1246	2.94	0.01055	3.42	0.00542
hsa-miR-1290	3.88	0.00656	4.35	0.00362

Figure 23 : Liste des microARNs dérégulés chez les patients par rapport aux sujets sains. Dans la première partie du tableau (en vert) sont indiqués les miRs sous-exprimés significativement ($p < 0,5$) chez les malades par rapport aux sujets contrôles avec des ratios $< 0,666$. La deuxième partie du tableau (en orange) donne le nom des miRs surexprimés significativement ($p < 0,5$) chez les malades par rapport aux sujets sains ainsi que des ratios $> 1,5$ retrouvés par les méthodes des Quantiles et des ASM.

Noms microARNs	nombre de Patients	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10	M11	M12	M13	M14	M15	S1	S2	S3	S4	S5
hsa-miR-7f	5	0	194,5	0	54,5	433	122,5	0	0	49	487	151,5	422	629,5	680,5	119	37	49,5	198,5	157
hsa-miR-1246	11	2681,5	4592	2520,5	10010	40634,5	3608	5542	6378,5	8373,5	37896,5	2004	5069	7370,5	4261	2195,5	1484,5	1363,5	1596,5	2363
hsa-miR-1290	10	3319,5	5574	1904	916,5	57467,5	4180,5	6892,5	11832,5	9986,5	61516,5	3348,5	7630,5	12355,5	5416	2747	1425,5	1248,5	1520,5	2619
hsa-miR-1307	6	0	0	0	77,5	274,5	108,5	24,9	88	299,5	0	334,5	389,5	309,5	39,5	46,5	93,5	0	0	0
hsa-miR-130a	7	0	120,5	0	0	254,5	0	203	0	131,5	234,5	0	189	148	76	40,5	0	32	57	32,5
hsa-miR-130b*	7	0	0	0	84	249,5	0	84	0	0	306	0	142	152	127,5	0	0	49	40,5	55
hsa-miR-130-5p	6	0	65,5	40,5	0	73	0	176	0	0	191,5	0	176,5	189,5	116,5	45	0	0	44	28
hsa-miR-143	8	104,5	0	89,5	0	177,5	22,5	126,5	0	39	172	0	183	136	122	0	0	26,5	57,5	35,5
hsa-miR-148b	6	0	86	0	0	303,5	0	255	0	57,5	358,5	58,5	364	248	223	0	42,5	64,5	61,5	29,5
hsa-miR-191	7	215,5	346,5	0	227	890,5	281	2178	0	483	592	85	977,5	1773	897,5	188	0	193,5	255,5	195,5
hsa-miR-21	10	393	661,5	289,5	601,5	2935,5	666	2122,5	392,5	5992,5	289	1896	1052,5	1525,5	357,5	386,5	322,5	399,5	399,5	385
hsa-miR-210-1-3p	6	0	181,5	94,5	0	181	57,5	137,5	0	401	69	194	0	203,5	58,5	0	30	33,5	68	34
hsa-miR-337-5p	8	0	63	57,5	77	195,5	0	119,5	78	0	233,5	48	295	298	95,5	51	19,5	50,5	42,5	34
hsa-miR-338-3p	10	59,5	128	51,5	0	238	117	80	120,5	0	194,5	0	188	178	125	26,5	0	33,5	37,5	31
hsa-miR-33a	5	41,5	0	112,5	63	121,5	81,5	423	49,5	88	606	0	287	533,5	394	46,5	0	44,5	92	51
hsa-miR-365	4	233	339,5	66,5	279	511	209	277,5	400	146,5	819	271,5	250,5	200,5	286,5	169,5	81,5	64,5	159	192,5
hsa-miR-371-5p	4	40,5	64,5	0	0	0	0	0	0	27	63	0	96	100	49,5	0	0	0	29	35
hsa-miR-374a	6	0	67	45	64	389,5	61,5	485,5	71	32,5	655,5	153	372,5	438,5	397,5	45	41	48	165	164,5
hsa-miR-374b*	4	0	69	0	0	56,5	48	60	30,5	37	129	37,5	156,5	149	169,5	38	33,5	47	19	26
hsa-miR-423-3p	5	428,5	766,5	387	447	1155,5	521	1191,5	563	274	2055,5	429,5	1181,5	1879	749	548	434	479,5	388	418
hsa-miR-425*	10	87	190,5	160,5	22,5	160	75,5	194,5	380,5	32	287	173,5	262	249,5	197	61,5	18,5	0	106	0
hsa-miR-433	5	0	0	0	0	144,5	0	44,5	187	0	259,5	49,5	79,5	168,5	56	38	0	0	33,5	40
hsa-miR-508-5p	3	51	193	103	49,5	186,5	0	120,5	138,5	0	665	39	373	413,5	191,5	100	56,5	48	68,5	145,5
hsa-miR-513b	4	0	0	0	0	0	0	63	0	0	136	0	167,5	175,5	141,5	0	29,5	47	0	28
hsa-miR-515-5p	9	0	114,5	249	100	159	50,5	118,5	117,5	146,5	189,5	55,5	195	183,5	239,5	77,5	44	57	77	41
hsa-miR-612	3	0	140,5	0	118,5	392	90	102,5	194	0	963,5	115	415,5	229,5	187,5	125	76,5	39	118	164,5
hsa-miR-652	5	37	0	0	0	48	0	270,5	0	0	190,5	0	185,5	267,5	178,5	96	64,5	0	114	65
hsa-miR-90b	8	0	0	0	0	158	147,5	202	131	0	264	50,5	203	323	156	53,5	0	0	74	57

Figure 24 : Tableau des intensités de fluorescence pour les microARNs surexprimés chez les patients (nommé M) par rapport aux sujets sains (nommé S). Pour chaque miR est indiqué l'intensité de fluorescence moyenne pour chaque échantillon ainsi que le nombre de patients ayant une surexpression supérieure à 1,5 par rapport à la valeur d'intensité maximale des contrôles.

B – Les microARNs sous-exprimés chez les patients par rapport aux sujets sains

Les résultats de sous-expression ont été pris comme significatifs lorsque le rapport patients/témoin était inférieur à 0,666 pour chacune des deux méthodes de normalisation. L'analyse des miRs humains sous-exprimés a mis en évidence au total 19 miRs dont 12 par la méthode ASM et 19 par la méthode des Quantiles. Les résultats sont contenus dans le tableau de la **Figure 23**. Parmi ces miRs, 9 miRs ont une sous-expression inférieure à 0,5. Il s'agit des miRs : **hsa-miR-933, hsa-miR-494, hsa-miR-1183, hsa-miR-888*, hsa-miR-486-5p, hsa-miR-32, hsa-miR-1280, hsa-miR-153 et let-7e***.

II – Les microARNs retrouvés exclusivement chez les patients

Pour certains microARNs, nous n'avions pas de valeurs d'intensité pour les sujets contrôles. Nous avons obtenu des valeurs d'intensité que pour les patients. 76 miARNs ont été détectés uniquement chez les malades. Les 14 patients ont été testés en duplicats ce qui donne une possibilité d'hybridation maximale de 28. Nous avons regardé plus en détail les miRs qui présentaient au moins 5 hybridations sur les 28 possibles. Le **Tableau 9** contient la liste des 33 microARNs présents uniquement chez les patients et ayant eu au moins 5 hybridations. Les microARNs sont classés de manière croissante en fonction de leur fréquence au sein de la population étudiée. Par exemple, le miR-27b est retrouvé dans 17 cas sur un maximum possible de 28 et chez 10 patients sur 14. Chez 3 patients sur 10, nous avons eu un seul résultat d'intensité dans le duplicat.

Au total, nous avons obtenu 76 microARNs humains hybridés exclusivement chez les patients. Le miR-27b s'est hybridé le plus fréquemment. 33 miRs humains se sont hybridés plus de 5 fois. Parmi ces derniers miRs, nous avons décidé de garder, pour la suite de notre étude, ceux qui s'étaient le plus fréquemment hybridés soit tous ceux qui avaient une hybridation supérieure à 8 sur 28 soit les 10 miRs suivants : **hsa-miR-27b, hsa-miR-146a, hsa-miR-302d, hsa-miR-152, hsa-miR-92a-1*, hsa-miR-95, hsa-miR-599, hsa-miR-520e, hsa-miR-569 et hsa-miR-597**. Nous avons également choisi de conserver certains ayant une hybridation entre 5 et 7 avec des intensités de fluorescence supérieur à 90 et parmi ces derniers ceux ayant les doublets d'intensité de fluorescence les plus importants soit 6 miRs : **hsa-miR-1292, hsa-miR-517c, hsa-miR-668, hsa-miR-2110, hsa-miR-1537 et hsa-miR-518d-3p (Tableau 10)**.

Noms microARNs	Nombre de répliquats chez les malades (2 répliquats par puces testés sur maximum de 28)	Nombre de
		malades sur 14
hsa-miR-27b	17	10
hsa-miR-146a	13	9
hsa-miR-302d	13	9
hsa-miR-152	12	7
hsa-miR-92a-1*	12	8
hsa-miR-95	12	8
hsa-miR-599	10	7
hsa-miR-520e	9	7
hsa-miR-569	9	7
hsa-miR-597	8	6
hsa-miR-1267	7	5
hsa-miR-1292	7	5
hsa-miR-193a-3p	7	6
hsa-miR-21*	7	7
hsa-miR-373	7	6
hsa-miR-517c	7	5
hsa-miR-668	7	5
hsa-miR-876-5p	7	6
hsa-miR-2110	7	4
hsa-miR-19b-2*	6	6
hsa-miR-29b-2*	6	5
hsa-miR-380*	6	5
hsa-miR-485-5p	6	5
hsa-miR-1201	5	4
hsa-miR-1248	5	5
hsa-miR-1537	5	4
hsa-miR-33b*	5	5
hsa-miR-491-5p	5	4
hsa-miR-518d-3p	5	4
hsa-miR-539	5	4
hsa-miR-572	5	5
hsa-miR-660	5	5
hsa-miR-664*	5	5

Tableau 9 : Liste des microARNs présents uniquement chez les patients. Le tableau indique la liste des miARNs s'hybridant au moins cinq fois uniquement chez les malades et non hybridés chez les sujets sains. Il donne combien de fois s'est hybridé chaque miR, sur un total possible de 28 (2 duplicats de 14 patients soit 28). Il est indiqué également le nombre de malades chez lesquels chaque miR s'est hybridé sur un total de 14 patients.

Noms microARNs	Intensités après retrait du background (x/x : lorsque deux réplicats pour un malade)													
	M2	M3	M4	M5	M6	M7	M8	M9	M10	M11	M12	M13	M14	M15
hsa-miR-27b			51	46	180/112		163/170	25		285/265	54/28	214/191	153/93	129/100
hsa-miR-146a	121			142	154	133	309/301			125/143		144/133	167/154	125
hsa-miR-302d	69	106				101	92		37	79/62		128/133	124/67	154/166
hsa-miR-152		82			128		133/100			172/127		221/249	210/151	156/111
hsa-miR-92a-1*			146/171	177	135			89	76	142/62		139/136	156/136	
hsa-miR-95	113		84		52					113/113	107	126/105	92/137	72/55
hsa-miR-599	71				169/156		86/74			59		31	188/138	48
hsa-miR-520e		161/85		104						63/262	122		134	86
hsa-miR-569					93/49	59		43		32	15		34	74/100
hsa-miR-597		84			61/69					58		110	140/113	79

Tableau 10 : Tableau des intensités de fluorescence des principaux microARNs présents uniquement chez les patients. Pour chaque miR et pour chaque échantillon sont indiquées les intensités de fluorescence mesurées auxquels a été retranché le bruit de fond. Chaque échantillon a été réalisé en duplicats donc deux intensités de fluorescence sont indiquées au maximum. Les noms des échantillons malades (M) sont numérotés de 2 à 15. Les résultats des dix miRs ayant une hybridation supérieure à 8 sur 28 sont représentés dans ce tableau.

En résumé dans cette analyse sur biopuces, nous avons étudié 862 miRs dont 576 miRs humains (**Figure 25**). Notre étude comparative a porté sur les plasmas de 14 patients atteints de mélanome métastatique et 5 sujets sains. Nous avons retrouvés 76 miRs détectés uniquement chez les patients parmi lesquels 33 miRs sont retrouvés hybridés au moins 5 fois sur un maximum de 28. Nous avons trouvé 6 miRs présentant une fluorescence uniquement pour les témoins (données non montrées). Nous avons observé 28 miRs surexprimés chez les patients par rapport aux contrôles et 19 miRs sous-exprimés. Nous avons également observé 61 miRs stables entre les malades et les témoins (données non montrées). Parmi les 576 miRs humains étudiés, un total de 190 miRs, soit environ un tiers, ont donné des intensités de fluorescence. Les miRs décrits ne sont pas tous exprimés dans le plasma. Notre objectif étant de sélectionner de futurs potentiels biomarqueurs, nous avons choisi pour l'instant, de nous focaliser sur les miRs exclusivement retrouvés chez les patients et les miRs surexprimés en vue de leur utilisation future comme potentiel biomarqueur. Nous avons décidé de sélectionner les miRs les plus discriminants des deux groupes. Pour les miRs exclusifs sur biopuces, nous avons sélectionné ceux s'hybridant au moins dans 8 cas sur 28 et ceux s'hybridant dans 5 cas mais présentant des doublets d'intensité de fluorescence importants. Nous avons donc sélectionné 16 miRs : **hsa-miR-27b, -146a, -302d, -152, -92a-1*, -95, -599, -520e, -569, -597, -1292, -517c, -668, -2110, -1537 et -518d-3p**. Pour les miRs surexprimés, nous avons sélectionné ceux ayant un rapport de surexpression supérieur à 1,7 et présent au moins la moitié des patients (soit au

moins 7 sur 14). Nous avons obtenu 9 miRs : **hsa-miR-21, -33a, -130a, -143, -191, -338-3p, -425*, -1246 et -1290**. Au total, cette étude sur biopuces a montré 25 miRs ayant un taux significativement plus important chez les patients par rapport aux sujets contrôles (**Tableau 11**). Ces miRs devaient ensuite être validés par une autre méthode de dosage et en particulier par une technique de RT-qPCR.

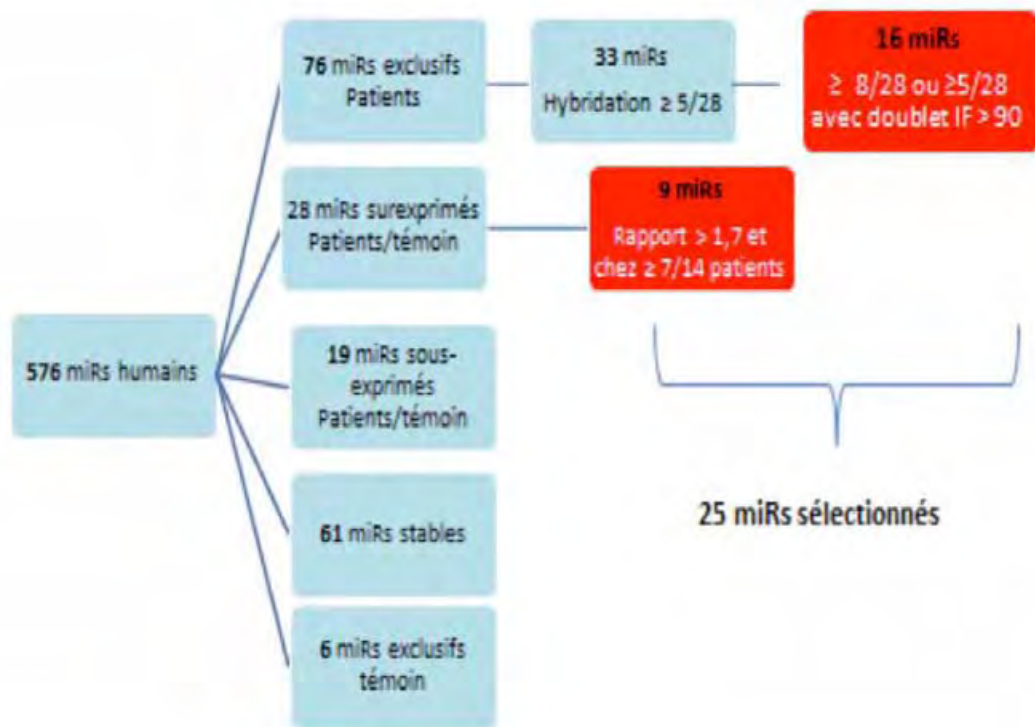


Figure 25. Schéma récapitulatif de sélection des miRs d'intérêt. Notre analyse a étudié 576 miRs humains. Parmi ces miRs, au total 190 soit environ un tiers, ont donné des intensités de fluorescence. 61 ont été retrouvés stables chez les patients et chez les contrôles, 28 étaient surexprimés de manière significative et 19 sous-exprimés chez les malades par rapport aux témoins. Parmi les miRs exclusifs, nous avons retrouvés 76 miRs chez les malades dont 33 donnant au moins 5 hybridations et 6 miRs chez les témoins. Pour la suite de notre étude, nous avons choisi de sélectionner les miRs les plus significatifs parmi les exclusifs malades et les surexprimés (en rouge) soit au total **25 miRs** dont 16 exclusifs et 9 surexprimés.

miRs sélectionnés par étude Biopuces	Expression biopuces
hsa-miR-21	surexpression M/S > 2
hsa-miR-27b	M exclusif
hsa-miR-33a	surexpression M/S > 2
hsa-miR-92a-1*	M exclusif
hsa-miR-95	M exclusif
hsa-miR-130a	surexpression M/S > 1,7
hsa-miR-143	surexpression M/S > 1,7
hsa-miR-146a	M exclusif
hsa-miR-152	M exclusif
hsa-miR-191	surexpression M/S > 2
hsa-miR-302d	M exclusif
hsa-miR-338-3p	surexpression M/S > 1,7
hsa-miR-425*	surexpression M/S > 1,7
hsa-miR-517c	M exclusif
hsa-miR-518d-3p	M exclusif
hsa-miR-520e	M exclusif
hsa-miR-569	M exclusif
hsa-miR-597	M exclusif
hsa-miR-599	M exclusif
hsa-miR-668	M exclusif
hsa-miR-1246	surexpression M/S > 2
hsa-miR-1290	surexpression M/S > 2
hsa-miR-1292	M exclusif
hsa-miR-1537	M exclusif
hsa-miR-2110	M exclusif

M: malades S: sains

Tableau 11 : Liste des microARNs sélectionnés par l'étude Biopuces. Ce tableau indique la liste des miARNs les plus significatifs de notre étude Biopuces et sélectionnés pour la suite de notre étude. La deuxième colonne indique s'ils ont été sélectionnés parce qu'ils étaient surexprimés chez les malades par rapport aux témoins (surexpression M/S) et leur ratios (supérieur à 2 ou supérieur à 1,7) ou parce qu'ils ont été retrouvés exclusivement chez les malades (M exclusif).

2) Recherche d'un profil d'expression de microARNs plasmatiques dans le mélanome métastatique par RT-qPCR

Nous avons voulu vérifier et confirmer les résultats obtenus lors de l'analyse précédente sur biopuces. Pour cela, nous avons choisi une technique de quantification par RT-qPCR. Cette analyse a été réalisée sur l'automate BioMark™ de la société Fluidigm sur la plateforme GeT (Génome et Transcriptome de Toulouse) avec l'aide de Jean-José Maoret et Frédéric Martin. Ce système de RT-qPCR contient des circuits fluidiques intégrés

(IFC) permettant d'une part des réactions de PCR automatisées dans de petits volumes de l'ordre du nanolitre et d'autre part pour le format de plaque 96.96 une analyse simultanée de 96 échantillons et 96 amorces soit au total une analyse de 9216 réactions réalisées en parallèle (voir matériels et méthodes- Analyses des miARNs par RT-qPCR sur le système BioMark™ de la société Fluidigm). Cette étude était la première analyse réalisée par la plateforme GeT combinant l'étude des microARNs circulants et l'automate BioMark™ Fluidigm. Dans un premier temps, nous avons constitué une cohorte d'apprentissage sur laquelle nous avons utilisé cette technique de RT-qPCR.

I – Cohorte d'apprentissage

A – Description de la cohorte d'apprentissage

Nous avons analysé les taux de microARNs plasmatiques sur un groupe de 29 nouveaux patients atteints de mélanome métastatique et de 16 donneurs sains. Les caractéristiques de cette cohorte d'apprentissage sont résumées dans le **Tableau 5** (« Echantillons plasmatiques » - voir matériels et méthodes) et l'ensemble des données recueillies pour chaque individu sont contenues dans l'**Annexe 5**. A l'inclusion, les patients présentaient un âge médian de 61 ans pour un écart interquartile compris entre 54 et 79 ans et un sex-ratio de 0,81. Les sujets sains présentaient un âge médian de 43 ans pour un écart interquartile compris entre 30 et 52 ans et un sex-ratio de 1,29. L'âge des deux groupes était statistiquement différent ($p < 0,05$ avec le test de Mann-Whitney). Par contre, la différence entre les sex-ratios des deux groupes n'était pas significative ($p > 0,05$ avec le test de Fisher). Les deux groupes sont donc appariés en sexe mais pas en âge. Ce biais d'âge sera donc analysé et discuté dans l'étude biostatistique. A l'inclusion, les patients étaient à un stade IIIc avec une atteinte ganglionnaire à distance (31%) ou à un stade IV (69%). Ils peuvent donc être considérés cliniquement comme métastatiques. Au diagnostic, l'indice de Breslow était de 2.5 mm avec présence d'une ulcération dans 20.7% et d'un index mitotique élevé dans 10.3% des cas. 17.2% des patients avaient une mutation BRAF de la tumeur et 13.8% une mutation NRAS. Aucun des patients n'avait de mutation c-Kit. Nous avons dosé sur ces échantillons le taux de LDH, qui est le seul marqueur sanguin à être pris en compte dans la classification AJCC 2009 pour les stades métastatiques (Balch et al 2009). Le taux de LDH médian chez les patients était de 0,78 N (N étant la limite supérieure des normes de référence soit 234 UI/L) et de 0,71 N chez les contrôles. Les valeurs de référence pour cette technique étant inférieures à 234 UI/L, la médiane des patients est dans la norme.

Cependant, le taux de LDH était statistiquement différent chez les patients par rapport aux sujets sains ($p < 0,05$ avec le test de Mann-Whitney).

Dans l'**Annexe 5**, est donné l'ensemble des données cliniques recueillies. A l'inclusion, sont renseignés la date, l'âge, le sexe, la survie après l'inclusion, le stade de la maladie, si un cycle de traitement de chimiothérapie est en cours et le taux de LDH. Les données recueillies au moment du diagnostic du mélanome sont l'âge, l'indice de Breslow, la présence ou non d'une ulcération, la présence ou non d'un index mitotique élevé, le stade de la maladie, la présence d'une mutation BRAF, NRAS ou c-kit et la survie sans métastase.

B – Sélection des microARNs étudiés

Nous avons choisi 51 microARNs pour notre étude selon plusieurs critères. 25 microARNs étaient issus de l'analyse sur biopuces : 16 exclusivement détectables chez les malades et 9 surexprimés chez les malades par rapport aux témoins (voir plus haut). Nous avons rajouté 21 microARNs les plus décrits dérégulés dans la littérature dans le mélanome (essentiellement sur les tissus ou les lignées cellulaires) ainsi que 5 microARNs de référence potentiels. Nous avons également dosé le miARN synthétique (mispik) introduit lors de l'étape d'extraction comme contrôle (**Tableau 12**). Les sources bibliographiques au moment du choix de sélection des amorces (25 Août 2011) étaient les suivantes : **let-7a** (Schultz et al. 2008 ; Müller et al. 2008 ; Ma et al. 2009 ; Stark et al. 2010), **let-7b** (Schultz et al. 2008 ; Stark 2010 ; Jukic 2010) (Fu et al. 2011), **let-7e** (Schultz et al. 2008 ; Ma et al. 2009 ; Stark et al. 2010), **miR-17** (Mueller et al. 2009 ; Levati et al. 2009 ; Chen et al. 2010, Leidinger et al. 2010 ; Greenberg et al. 2011), **miR-18a** (Levati et al. 2009 ; Chen et al. 2010 ; Leidinger et al. 2010), **miR-20a** (Levati et al. 2009 ; Leidinger et al. 2010), **miR-34a** (Lodygin et al. 2008 ; Satzger et al. 2010 ; Greenberg et al. 2011) **miR-125b** (Chen et al. 2010, Glud et al. 2011), (Glud et al. 2010 ; Holst et al. 2011), **miR-137** (Bemis et al. 2008 ; Hafliadottir et al. 2010 ; Chan et al. 2011), **miR-141** (Blower et al. 2007 ; Molnar et al. 2008 ; Chen et al. 2010) **miR-145** (Molnar et al. 2008 ; Segura et al. 2010 ; Leidinger et al. 2010), **miR-155** (Levati et al. 2009 ; Segura et al. 2010 ; Philippidou et al. 2010), (Levati et al. 2011), **miR-182** (Segura et al. 2009), (Huynh et al. 2011), **miR-185** (Stark et al. 2010 ; Chen et al. 2010 ; Greenberg et al. 2011), **miR-200c** (Molnar et al. 2008 ; Chen et al. 2010 ; Philippidou et al. 2010), (Elson-Schwab et al. 2010), **miR-204** (Jukic et al. 2010 ; Chen et al. 2010 ; Greenberg et al. 2011), **miR-205** (Chen et al. 2010 ; Philippidou et al. 2010 ; Dar et al. 2011), **miR-211** (Stark et al. 2010 ; Jukic et al. 2010 ; Chen et al. 2010), (Boyle et al. 2011 ; Levy et al. 2010 ; Mazar et al. 2010 ; Sakurai et al. 2011), **miR-214** (Chen et al. 2010 ; Leidinger et al. 2010 ; Penna et al.

2011, Bar-Eli et al. 2011 ;Chan et al. 2011), **miR-221** (Felicetti et al 2008a et b ;Ozsolak et al. 2008 ;Igoucheva et al. 2009 ;Stark et al. 2010 ;Das et al. 2010 ;Kanemaru et al. 2011) **miR-222** (Felicetti et al. 2008a et b, Ozsolak et al. 2008 ;Mueller et al. 2009 ;Stark et al. 2010) (Mattia et al. 2011). A noter que miR-21 et miR-146a étaient retrouvés sur l'analyse sur puce et également décrit dans la littérature du mélanome (**miR-21** : Stark et al. 2010 ;Chen et al. 2010 ;Yang et al. 2011 et **miR-146a** : Ozsolak et al. 2008 ;Levati et al. 2009 ;Stark et al. 2010 ;Philippidou et al 2010 ;Leidinger et al. 2010), (Grignol et al. 2011).

MicroARNs	Critères de sélection	MicroARNs	Critères de sélection
mispike	contrôle extraction	miR-155	bibliographie
miR-16	référence - bibliographie	miR-182	bibliographie
miR-103	référence - Exiqon	miR-185	bibliographie
miR-423-3p	référence - Exiqon	miR-191	M/S > 2 sur puce
miR-513a-3p	référence - Puce	miR-200c	bibliographie
miR-615-3p	référence - Puce	miR-204	bibliographie
Let-7a	bibliographie	miR-205	bibliographie
Let-7b	bibliographie	miR-211	bibliographie
Let-7e	bibliographie	miR-214	bibliographie
miR-17	bibliographie	miR-221	bibliographie
miR-18a	bibliographie	miR-222	bibliographie
miR-20a	bibliographie	miR-302d	M exclusif sur puce
miR-21	M/S > 2 sur puce	miR-338-3p	M/S > 1,7 sur puce
miR-27b	M exclusif sur puce	miR-425*	M/S > 1,7 sur puce
miR-33a	M/S > 2 sur puce	miR-517c	M exclusif sur puce
miR-34a	bibliographie	miR-518d	M exclusif sur puce
miR-92a-1*	M exclusif sur puce	miR-520e	M exclusif sur puce
miR-95	M exclusif sur puce	miR-569	M exclusif sur puce
miR-125b	bibliographie	miR-597	M exclusif sur puce
miR-130a	M/S > 1,7 sur puce	miR-599	M exclusif sur puce
miR-137	bibliographie	miR-668	M exclusif sur puce
miR-141	bibliographie	miR-1246	M/S > 2 sur puce
miR-143	M/S > 1,7 sur puce	miR-1290	M/S > 2 sur puce
miR-145	bibliographie	miR-1292	M exclusif sur puce
miR-146a	M exclusif sur puce	miR-1537	M exclusif sur puce
miR-152	M exclusif sur puce	miR-2110	M exclusif sur puce

Tableau 12 : Liste complète des microARNs inclus dans l'analyse plasmatique sur le BioMark™ Fluidigm et critères de choix de sélection. Ce tableau reprend la liste des 51 miRs étudiés en RT-qPCR. Nous avons choisi les 25 miRs les plus significatifs de l'étude sur Biopuces (surexpression des malades par rapport aux sains : M/S > à 1,7 ou > à 2 ou expression exclusive chez les malades : M exclusif). Nous avons sélectionné 21 miRs les plus décrits dérégulés dans la bibliographie (noté bibliographie). Nous avons choisi 5 miRs de référence et pris un mispike comme témoin d'extraction.

Cinq miRs ont été choisis comme référence. Les références potentielles ont été prises soit dans la littérature pour le miR-16, soit sur les conseils de la société Exiqon pour

les miR-103 et miR-423-3p. Nous avons choisi également deux microARNs qui s'étaient avérés très stables lors de l'étude sur puce : les miR-513a-3p et miR-615-3p.

C – Analyse des microARNs plasmatiques par RT qPCR sur le BioMark™ Fluidigm

Une première étape d'extraction des ARNs totaux plasmatiques a été réalisée à partir de 200 µL de plasmas (voir Matériels et Méthodes – Extraction des ARNs pour détection des microARNs plasmatiques). Nous avons ensuite réalisé les étapes de transcription inverse pour obtenir les ADNc puis une étape d'amplification par qPCR en deux étapes une pré-amplification de 15 cycles puis une amplification de 30 cycles (voir Matériels et Méthodes – analyse des miARNs plasmatiques par RT-qPCR sur le système BioMark™ Fluidigm avec les réactifs Exiqon). La plaque 96.96 permet une analyse simultanée de 96 échantillons plasmatiques et 96 amorces de microARNs. Nous avons passé tous les échantillons en double. Pour les amorces, 41 microARNs ont été passés en double et 12 microARNs en simple (miRs-92a-1*, -137, -211, -214, -302d, -517c, -518d-3p, -520e, -597, -599, -668, -1537). Nous avons donc obtenu soit 2 soit 4 résultats de Cq par échantillon et par amorce. Les résultats bruts de Cq obtenus sont représentés sous forme de « heatmap » (**Figure 26**). Les microARNs analysés sont listés horizontalement et les échantillons plasmatiques verticalement. Les valeurs de Cq sont représentées sous forme de code couleur d'où le terme anglais de « heatmap » (noir pour une absence de signal, puis des couleurs allant du bleu au violet puis rouge, orange et jaune pour des valeurs de Cq élevés (bleu) vers des valeurs de Cq de plus en plus faibles (jaune). Plus les Cq sont faibles plus la quantité de microARNs est élevée.

Pour chaque miR analysé, les courbes d'amplification et de dissociation ont été vérifiées. La courbe d'amplification permettant de s'assurer que l'amplification s'est faite correctement et la courbe de dissociation de vérifier la spécificité de l'amplification lorsqu'elle présentait un pic unique. La **Figure 27** montre un exemple de courbe d'amplification (figure supérieure) et de dissociation (figure inférieure) obtenues sur l'ensemble des échantillons plasmatiques pour le miR-1246.

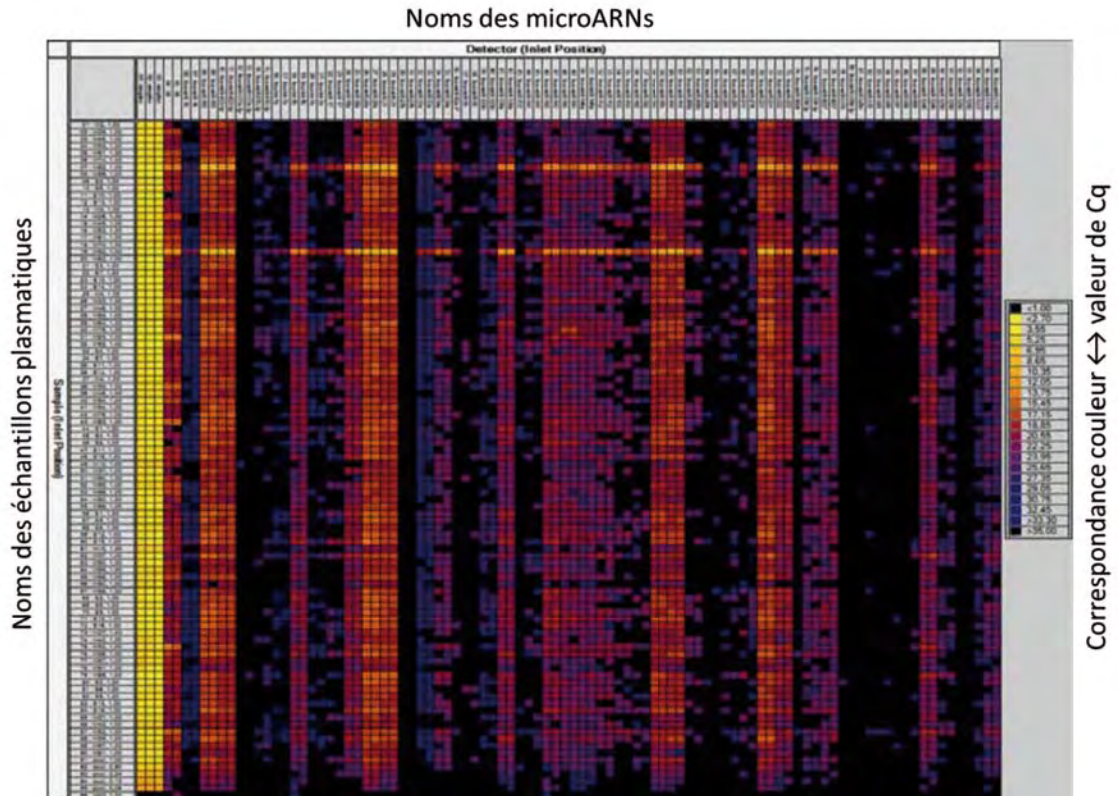


Figure 26 : Représentation sous forme de heatmap des résultats bruts de Cq après analyse sur BioMark™ Fluidigm. La plaque 96.96 nous a permis d’analyser simultanément 96 amorces de microARNs sur 96 échantillons plasmatiques. Les Cq sont représentées sous forme de code couleur.

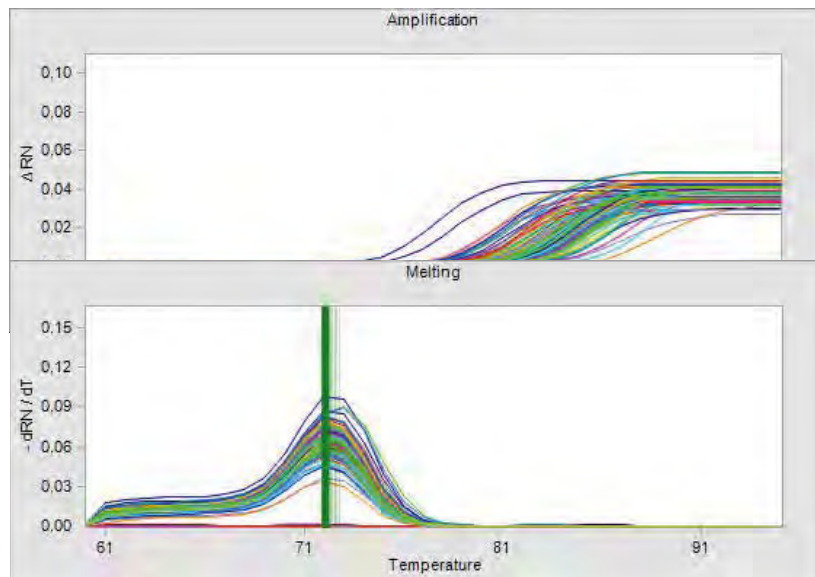


Figure 27 : Exemple de courbes d’amplification (dessus) et de dissociation (dessous) pour le miR-1246.

Les calculs d'efficacité ont été réalisés par le programme LinReg d'analyses des résultats de qPCR. Pour un gène donné, LinReg va considérer chaque valeur de signal obtenu à chaque cycle comme un point qu'il va pouvoir utiliser pour tracer une régression linéaire et déduire la pente et donc l'efficacité de la réaction de PCR pour ce gène. Un échantillon a été choisi : le M82. Les données brutes ont été extraites de tous les miRs à chaque cycle pour cet échantillon. Les valeurs ont été mises dans le programme LinReg. Nous avons obtenu les efficacités pour l'ensemble des miRs montrant des efficacités homogènes avec une moyenne à 1,85 permettant une possibilité d'exploitation correcte des données.

a – Sélection des microARNs dont les résultats étaient exploitables

Pour 8 microARNs, nous n'avons obtenu aucun signal d'amplification. Il s'agit des miRs-27b, miR-302d, miR-513-3p, miR-517c, miR-518d, miR-520e, miR-599 et miR-1292.

Nous avons exclu les microARNs pour lesquels l'amplification était extrêmement tardive : soit une valeur de Cq supérieure à 29 sur les courbes d'amplification et ceux pour lesquels l'amplification n'était pas spécifique : présence de plusieurs pics à des températures différentes sur la courbe de dissociation. Les amorces des miRs-615-3p, -92a-1*, -182, -214, -425*, -569, -597 et -668 ne sont pas spécifiques. Les miRs-16, -33a, -125b, -137, -204, -205, -1537, let-7a et let-7e ont des amplifications tardives.

Le **Tableau 13** résume les résultats des analyses de microARNs exploitables et non exploitables. Pour chaque amorce de microARNs est noté l'aspect des courbes d'amplification et de dissociation. Pour chaque miR est indiqué pour le groupe malade et le groupe témoin le nombre d'échantillons ayant des Cq bons et le nombre d'échantillons ayant une absence de Cq ou un Cq tardifs (supérieur à 29). L'amplification du mispike, ajouté au moment de l'extraction, s'est avérée très précoce et donc non exploitable.

Au final, les résultats de 27 miRs sur 54 ont été considérés comme exploitables sur les courbes de qPCR soit la moitié. Parmi ces 27, les miRs-95 et -211 ont trop peu de résultats de Cq. Le miR-95 n'est retrouvé que pour 9 malades sur 26 et 7 patients sur 16. Le miR-211 n'est présent que chez 10 malades et 2 témoins. Nous les avons donc écartés. Nous n'avons donc conservé pour la suite de l'analyse que **25 miRs**.

miRNAs Exiqon	amplification	plusieurs pics	Cq tardifs >29	Malades n = 29		Sains n = 16	
				Cq bons	nombre sans valeur ou Cq>29	Cq bons	nombre sans valeur ou Cq>29
mispike	OK	-	-	29	0	16	0
miR-16		-	oui	28	1	16	0
miR-103	OK	-	-	29	0	16	0
miR-423-3p	OK	-	-	29	0	16	0
miR-513a-3p				0	29	0	16
miR-615-3p		oui	oui	20	8/1	10	4/2
miR-let7a		-	oui	2	11/16	0	3/13
miR-let7b	OK	-	-	29	0	16	0
miR-let7e		-	oui	6	9/14	3	1/12
miR-17	OK	-	-	13	12/4	10	2/4
miR-18a	OK	-	-	29	0	16	0
miR-20a	OK	-	-	29	0	16	0
miR-21	OK	-	-	29	0	16	0
miR-27b				0	29	0	16
miR-33a		-	oui	7	0/22	12	0/4
miR-34a	OK	-	-	28	1/0	15	0/1
miR-92a-1*		oui	-	7	22/0	2	14/0
miR-95	OK	-	-	9	20/0	7	9/0
miR-125b		-	oui	22	6/1	14	0/2
miR-130a	OK	-	-	29	0	16	0
miR-137		-	oui	3	22/4	3	12/1
miR-141	OK	-	-	21	8/0	9	7/0
miR-143	OK	-	-	29	0	16	0
miR-145	OK	-	-	29	0	16	0
miR-146a	OK	-	-	29	0	16	0
miR-152	OK	-	-	28	0/1	16	0
miR-155	OK	-	-	22	7/0	13	3/0
miR-182		oui	-	18	10/1	12	2/2
miR-185	OK	-	-	29	0	16	0
miR-191	OK	-	-	29	0	16	0
miR-200c	OK	-	-	15	14/0	13	1/2
miR-204		-	oui	3	25/1	4	11/1
miR-205		-	oui	15	9/5	11	2/3
miR-211	OK	-	-	10	18/1	2	14/0
miR-214		oui	-	15	10/4	14	2/0
miR-221	OK	-	-	29	0	16	0
miR-222	OK	-	-	29	0	16	0
miR-302d				0	29	0	16
miR-338-3p	OK	-	-	29	0	16	0
miR-425*		oui	-	29	0	16	0
miR-517c				0	29	0	16
miR-518d				0	29	0	16
miR-520e				0	29	0	16
miR-569		oui	-	1	24/4	1	13/2
miR-597		oui	-	3	26/0	1	14/1
miR-599				0	29	0	16
miR-668		oui	-	8	21/0	1	14/1
miR-1246	OK	-	-	29	0	16	0
miR-1290	OK	-	-	27	2/0	13	3/0
miR-1292				0	29	0	16
miR-1537		-	oui	18	10/1	15	1/0
miR-2110	OK	-	-	29	0	16	0

	amplification bonne
	mauvaise amplification
	absence d'amplification

Tableau 13 : Caractéristiques d'amplification des amorces de microARNs pour les échantillons plasmatiques. Ce tableau résume pour chaque amorce si l'amplification a été correcte et dans le cas contraire la cause soit due à une amplification non spécifique (présence de plusieurs pics sur la courbe de fusion) soit à une amplification tardive (Cq supérieur à 29). Pour chaque miARN est indiqué également le détail des amplifications pour les malades et les témoins : nombre d'amplification correcte (Cq bons) et non correctes (par absence de signal ou un Cq tardif).

b – Choix de miRs servant de référence

Plusieurs méthodes de normalisation des résultats de qPCR des microARNs sont décrites dans la littérature (voir introduction bibliographique- miARNs circulants-normalisation des dosages des miARNs par RT-qPCR). Il n'existe pas à l'heure actuelle de consensus pour cette normalisation. La méthode de normalisation la plus fréquente est la comparaison à des miRs endogènes de référence stables.

Etant donné l'absence de consensus, nous avons choisi de tester plusieurs miARNs endogènes de référence. Le RNU6 est utilisé comme référence cellulaire et tissulaire largement décrit dans la littérature. Le miR-16 a été initialement utilisé comme miR de référence mais s'est montré extrêmement variable depuis suivant la pathologie étudiée. Les miR-103 et 423-3p nous ont été proposés par le fournisseur Exiqon. Les miRs-513-3p et 615-3p ont été sélectionnés pour leur stabilité lors de notre analyse sur puce. Sur les 5 miRs de référence potentiels, trois ont eu des résultats non exploitables (miR-16, miR-513-3p et miR-615-3p). La stabilité inter-échantillons des microARNs potentiels a été comparée grâce à l'algorithme GeNorm (Vandesompele et al. 2002). Le logiciel a sélectionné les miRs-103 et -423-3p comme étant stables avec un facteur M identique de 0,610 (données non montrées) ainsi que le miR-191. Comme nous l'avons vu dans le chapitre « Normalisation des dosages des miARNs par RT-qPCR » de l'introduction bibliographique (partie des microARNs circulants) les données actuelles préconisent la quantification par plusieurs miRs de référence pour ne pas être dépendant d'une variation individuelle d'un seul miR. Nous avons donc retenu trois miRs de référence : miR-103, miR-423-3p et miR-191.

c – Calcul des expressions de chaque miR par quantification relative par la méthode des delta-Cq.

L'expression de chaque microARN a été calculée grâce à la méthode des delta-Cq (ΔCq) ou celle des delta-delta-Cq ($\Delta\Delta Cq$). Nous avons vérifié au préalable que les efficacités des réactions de qPCR étaient équivalentes. Une première normalisation des valeurs de Cq pour chaque microARN d'intérêt est réalisée par soustraction des valeurs de Cq des miR de référence à la valeur de Cq du miR d'intérêt pour chaque échantillon.

$$\Delta Cq = Cq \text{ miR d'intérêt} - Cq \text{ miRs de référence.}$$

Cette valeur peut être ensuite soustraite par le ΔCq du ou des échantillons contrôles. $\Delta\Delta Cq = \Delta Cq \text{ échantillon} - \Delta Cq \text{ (moyenne des témoins)}$.

La quantité des microARNs est ensuite exprimée sous forme d'expression relative par la formule : $2^{-\Delta\Delta Cq}$ ou $2^{-\Delta Cq}$.

Nous avons d'abord calculé les expressions relatives des témoins par la formule d'expression suivante $2^{-\Delta\Delta Cq}$. Les taux des microARNs plasmatiques de chaque sujet sain ont été comparés à la moyenne de tous les sujets sains. La moyenne d'expression chez les sujets sains est par définition prise à 1. Par exemple pour le témoin S1, nous avons calculé le ΔCq S1 = Cq S1 du miR d'intérêt – Cq S1 miR de référence puis nous avons calculé le $\Delta\Delta Cq$ S1 = ΔCq S1 - ΔCq moyen des témoins et enfin calculer l'expression relative QR S1 = $2^{-\Delta\Delta Cq S1}$. La moyenne de l'ensemble des témoins est à 1.

Nous avons ensuite calculé les expressions relatives des malades par la formule d'expression suivante $2^{-\Delta Cq}$. Par exemple pour le malade M4 nous avons calculé ΔCq M4 = Cq M4 du miR d'intérêt – Cq M4 moyenne des miRs de référence et QR M4 = $2^{-\Delta Cq M4}$.

d – Le taux de microARNs était constant chez les sujets sains.

Chez les sujets sains, après calcul des expressions relatives, nous avons observé peu de variabilité pour la majorité des microARNs comme cela est décrit dans la littérature avec des valeurs autour de 1 et en général inférieure à 2 (**Figure 28**).

Cependant, pour les miR-17, miR-141 et miR-200c, la dispersion des valeurs obtenues est assez importante. On peut remarquer que, pour ces mêmes miRs, nous n'avons pas obtenu de Cq pour tous les individus témoins soit parce que nous n'avons obtenu aucun signal d'amplification soit que les Cq obtenus étaient trop tardifs. Nous avons obtenu des résultats de Cq pour 10, 9 et 13 témoins sur 16 pour respectivement les miR-17, miR-141 et miR-200c (**Tableau 13**). Au vu de la dispersion importante pour les sujets témoins, il semble peu adéquat d'utiliser la moyenne d'expression des témoins comme taux physiologique de référence pour la comparaison aux malades. Nous avons donc décidé d'exclure ces miRs de l'analyse biostatistique. L'absence d'un nombre important de Cq peut être expliquée soit par un taux faible de ces miRs chez certains sujets soit à un problème d'hybridation de sonde. Des tests supplémentaires en changeant de sondes sont donc nécessaires pour expliquer ces résultats.

Les miRs-34a, -155 et -1290 présentent quelques valeurs manquantes respectivement pour 1, 3 et 3 sujets sains sur 16 (**Tableau 13**). De plus, les expressions relatives présentent une légère variabilité. Nous avons décidé de ne pas les garder pour l'analyse biostatistique car ils leur manquent également des valeurs de Cq pour les patients.

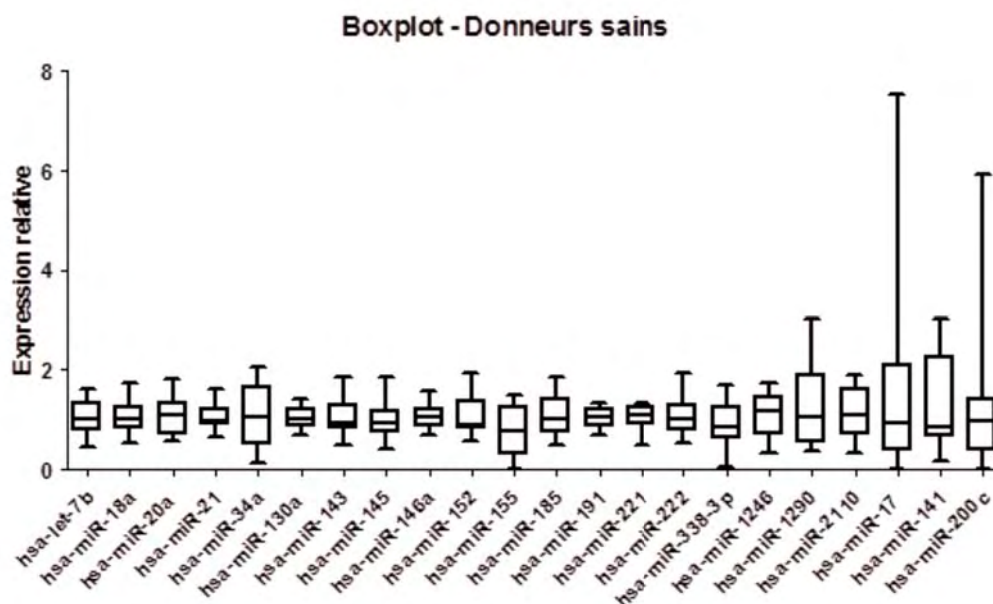


Figure 28 : Expressions relatives des miRs plasmatiques étudiés chez les sujets sains sous forme de boxplots. Les valeurs de Cq ont été normalisées par rapport au miR de référence : miR-103 et par rapport à la moyenne du groupe sain. Pour chaque miR sont représentés la moyenne et l'écart-type à la moyenne.

e – Etude biostatistique de la discriminance entre population malade et témoin.

Notre objectif a été d'étudier la discriminance entre les populations malades et témoins. Pour cela, deux approches ont été utilisées : une **étude univariée** de chaque miR permettant d'étudier la capacité de chaque miR à discriminer les deux populations et une **étude multivariée** permettant de connaître la capacité de l'ensemble des miRs à discriminer les données. Pour chaque malade et témoin, nous avons calculé les expressions relatives de chaque miR en $2^{-\Delta Cq}$. Ces expressions relatives ont été réalisées par rapport aux trois miRs de référence : miR-103, miR-423-3p et miR-191. Les données d'un patient sur les 29 n'ont pu être analysées en raison de données de Cq manquantes.

1 – Analyse univariée

Pour chaque miR étudié, nous avons comparé les taux d'expression moyens malades et témoins grâce au test statistique de Wilcoxon au seuil 5% pour tester

l'homogénéité des populations malades et témoins (**Tableau 14**). Les résultats sont représentés sous formes de boxplots (**Figure 29**). Nous avons construit les courbes ROC (Receiver Operating Characteristics) pour avoir une idée du pouvoir discriminant des miRs (**Figure 29**). Elles permettent de déterminer les performances de ces miRs en termes de sensibilité et de spécificité à l'aide de l'évaluation des aires sous la courbe (AUC) (**Tableau 14**).

Cette analyse a mise en évidence 5 miRs discriminants au seuil 5% pour les tests de Wilcoxon (**Tableau 14**). 3 miRs sont surexprimés chez les malades au stade métastatique par rapport aux témoins. Il s'agit de **let-7b**, **miR-338-3p**, **miR-1246**. 2 miRs sont sous-exprimés chez les malades par rapport aux témoins : **miR-20a**, **miR-185**.

Parmi ces miRs, ceux qui sont surexprimés proviennent pour 2 d'entre eux de l'étude sur biopuces (miR-338-3p, miR-1246) et un de la littérature (let-7b). Ceux qui sont sous-exprimés (miR-20a, miR-185) proviennent de la littérature puisque nous avons pris les miRs décrits dans le mélanome qu'ils soient surexprimés ou sous-exprimés au vue des résultats bibliographiques très variées. Les miR-338-3p et miR-1246 étaient surexprimés dans l'étude sur biopuces chez les malades par rapport aux témoins. Dans cette cohorte d'apprentissage, nous les retrouvons également surexprimés. Le **miR-1246** a une expression relative moyenne de 4,56 fois celle des témoins ($p < 0,001$). Le **miR-338-3p** présentait une moyenne d'expression chez les malades à 2,78 ($p < 0,001$). Let-7b est retrouvé surexprimé avec un ratio de 1,48. Les miRs -185 et -20a sont sous-exprimés chez les malades avec des ratios respectivement de 0,62 et 0,75. Les courbes ROC de ces miRs ont toute une AUC calculée supérieure à 0,70. Le miR-1246 a la meilleure AUC, elle est à 0,95. MiR-1246 paraît avoir un fort pouvoir discriminant entre population malade et témoin avec des taux très performants en sensibilité et spécificité. Nous remarquons que miR-221, premier miR circulant décrit surexprimé dans le mélanome (Kanemaru et al 2011 ;(Friedman et al. 2012), n'est pas retrouvé dérégulé chez les malades dans notre étude. Nous observons également que le miR-21, largement décrit surexprimé dans la littérature d'oncologie au niveau tissulaire et cellulaire, n'est pas significativement augmenté chez les malades par rapport aux témoins.

Ensuite, nous avons évalué la valeur diagnostique de chaque miR. Pour cela nous avons calculé la capacité de chaque miR à bien classer chaque population (**Tableau 15**). L'utilisation d'un miR ne permet une classification correcte des patients que dans 79% pour miR-185. L'utilisation du seul miR-1246 ne permet une distinction suffisante c'est pourquoi

nous avons fait ensuite une analyse multivariée afin de chercher un profil de miARNs ayant des meilleures performances.

	Apprentissage				
	Contrôle	Cancer	ratio	<i>p</i>	AUC
hsa-miR-185	0,978	0,6045	0,62	1,98E-03	0,73
hsa-miR-20a	3,0143	2,2537	0,75	1,51E-02	0,72
hsa-let-7b	0,0739	0,1094	1,48	1,21E-02	0,73
hsa-miR-338-3p	0,0152	0,0423	2,78	9,68E-03	0,78
hsa-miR-1246	0,0512	0,2333	4,56	2,14E-08	0,95

Tableau 14 : Analyse univariée de l'expression des miARNs par rapport aux miRs de référence (miR-103, miR-423-3p et miR-191). Pour chaque miR est donné l'expression moyenne exprimée en $2^{-\Delta C_q}$ pour les sujets contrôles et pour les patients, les ratios patient/contrôle, les résultats des tests statistiques de Wilcoxon (p-values) et les valeurs des AUC des courbes ROC.

	Mélanome	Normal	% bonne classification
Cohorte d'apprentissage			
miR-185			
Mélanome	22	6	0.79
Normal	6	10	0.63
miR-20a			
Mélanome	20	8	0.71
Normal	6	10	0.63
let-7b			
Mélanome	12	16	0.43
Normal	3	13	0.81
miR-338-3p			
Mélanome	7	21	0.25
Normal	0	16	1
miR-1246			
Mélanome	18	10	0.64
Normal	0	16	1
miR.1246/miR-185			
Mélanome	28	0	1
Normal	0	16	1

Tableau 15. Analyse du score de risque pour les patients métastatiques et les donneurs sains.

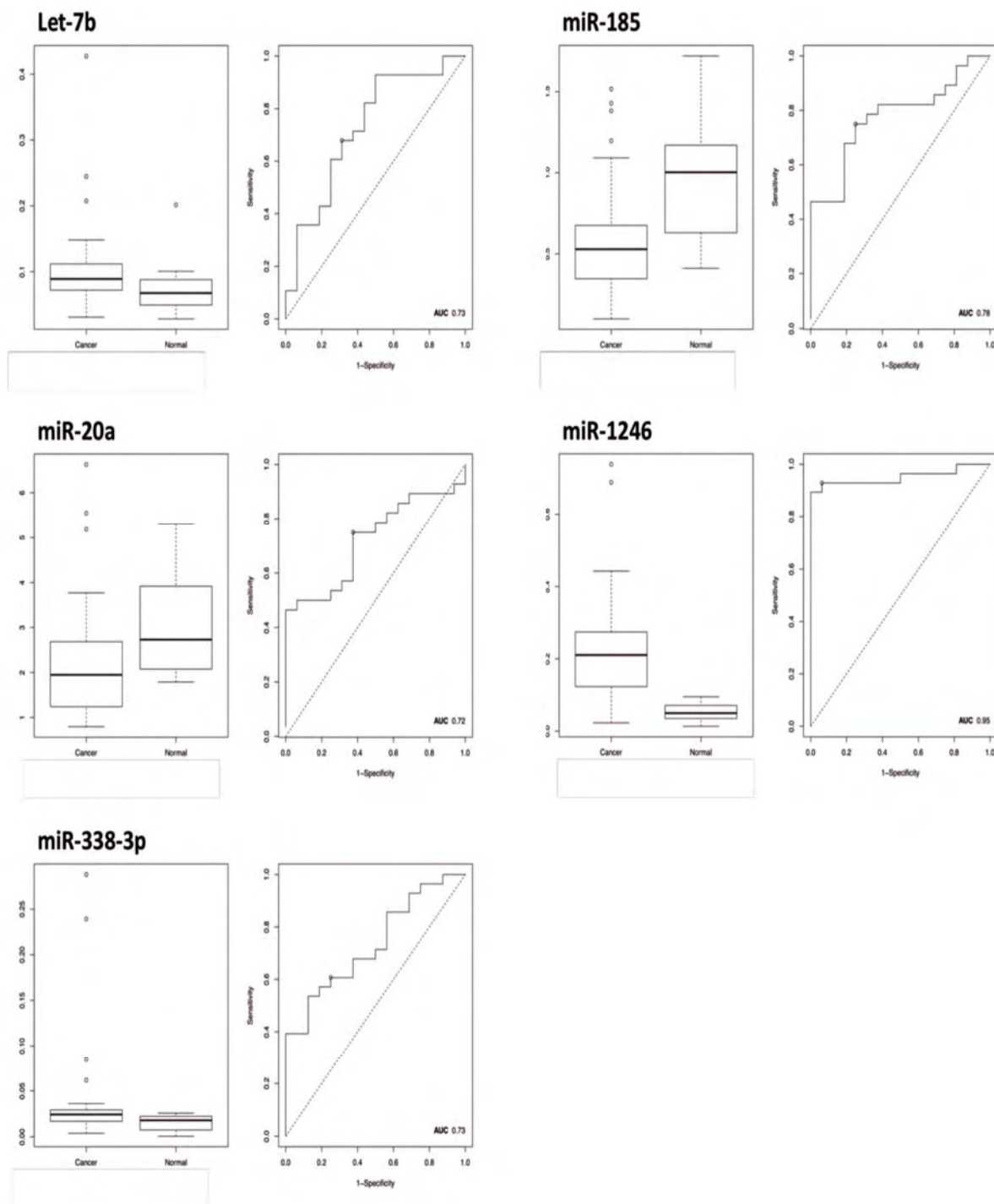


Figure 29: Représentations des expressions relatives des 5 miRs dérégulés sous forme de boxplots et leurs courbes ROC de la cohorte d'apprentissage.

2 – Analyse multivariée

Dans la littérature sont décrits des profils de microARNs permettant de discriminer de manière plus performante les populations malades et témoins par rapport à un seul microARN. De plus, un miR ne présentant pas de pouvoir discriminant en analyse univariée peut s'avérer très informatif combiné à d'autres miRs. L'analyse multivariée a pris en compte tous les miRs d'intérêt pour lequel nous possédions l'ensemble des valeurs.

Nous avons donc réalisé une analyse multivariée pour voir si un profil de plusieurs microARNs pouvait avoir de meilleures performances pour discriminer les populations malades des témoins que certains microARNs utilisés seuls. Quatre méthodes statistiques de prédiction ont été utilisées avec différentes sélections de variables associées : SVM (Support Vector Machine), réseaux de neurones, régression logistique et forêts aléatoires. Les performances de chaque méthode ont été estimées par Cross Validation.

La méthode permettant d'obtenir le meilleur compromis entre sensibilité et spécificité est la **méthode des forêts aléatoires** avec comme sélection de variables le critère de Gini. Ce modèle contenant deux miARNs : **miR-185 et miR-1246** présente une haute sensibilité à 91% et une bonne spécificité à 80% pour classer les individus en population mélanome métastatique et témoins. Ce profil permet de discriminer les malades des témoins avec de bonnes performances. Tous les patients et témoins sont bien classés dans leur groupe respectif en utilisant ce profil (**Tableau 15**).

D – Conclusions des analyses par RT qPCR de notre cohorte d'apprentissage

Nous avons mis en évidence 5 miARNs dérégulés chez les patients atteints de mélanome métastatique par rapport aux sujets sains. 3 miARNs étaient surexprimés (**let-7b, miR-338-3p et miR-1246**) et 2 miARNs étaient sous-exprimés (**miR-20a et miR-185**) chez les malades par rapport aux contrôles. 3 miARNs provenaient de l'étude de screening par biopuces et ont donc été confirmés par méthode de RT qPCR. 2 miARNs provenaient de l'étude bibliographique. Les analyses multivariées testées nous ont permis de mettre en évidence un modèle avec de bonnes performances en termes de sensibilité et spécificité. Le meilleur modèle de prédiction est obtenu en utilisant la méthode des forêts aléatoires, il est composé d'un profil de deux miARNs : **miR-1246 et miR-185**. Les performances de ce modèle estimées par Cross Validation sont de 91% en sensibilité et 80% en spécificité. L'effectif de cette cohorte étant faible, il paraît nécessaire de valider ce modèle sur de nouvelles données indépendantes. Nous avons constitué une cohorte de validation.

II – Cohorte de validation

Nous avons voulu confirmer les résultats de la cohorte d'apprentissage sur une deuxième cohorte indépendante servant de cohorte de validation. Nous avons dosé les miARNs par la même technique de RT-qPCR sur l'automate BioMark™ Fluidigm.

A – Description de la cohorte de validation

Nous avons dosé les taux de miARNs plasmatiques sur un groupe de 31 patients atteints de mélanome métastatique et de 43 donneurs sains. Les caractéristiques de cette cohorte 2 sont résumées dans le **Tableau 5** du Matériels et Méthodes et l'ensemble des données recueillies pour chaque individu sont contenues dans l'**Annexe 6**.

A l'inclusion, les patients présentaient un âge médian de 60 ans pour un écart interquartile compris entre 44 et 69 ans et un sex-ratio de 1,21. Les sujets sains présentaient un âge médian de 43 ans pour un écart interquartile compris entre 34 et 53 ans et un sex-ratio de 1,26. L'âge des deux groupes était statistiquement différent ($p < 0,05$ avec le test de Mann-Whitney). Par contre, la différence entre les sex-ratios des deux groupes n'était pas significative ($p > 0,05$ avec le test de Fisher). Les deux groupes sont donc appariés en sexe mais pas en âge. Tout comme pour la cohorte 1, ce biais d'âge sera donc analysé et discuté dans l'étude biostatistique. A l'inclusion, les patients métastatiques étaient classés en stade IIIc avec une atteinte ganglionnaire à distance (10%) ou en stade IV (90%). Au diagnostic, la médiane de l'indice de Breslow était de 2.2 mm. Une ulcération était présente dans 25.8% des cas et un index mitotique élevé était présent dans 32% des cas. Une mutation de BRAF était présente dans 67.7% des cas et 6.5% une mutation NRAS. Aucun des patients n'a de mutation c-Kit. Le taux de LDH médian était de 251 UI/L soit 1,07 fois la valeur maximale des normes pour cette technique. Chez les sujets contrôles la médiane est à 0,7 fois la valeur maximale de la normale. Le taux de LDH était statistiquement différent chez les patients par rapport aux sujets sains ($p < 0,001$ avec le test de Mann-Whitney).

Dans l'**Annexe 6**, est donné l'ensemble des données cliniques recueillies. A l'inclusion, sont renseignés la date, l'âge, le sexe, la survie après l'inclusion, le stade de la maladie, si un cycle de traitement de chimiothérapie est en cours et le taux de LDH. Les données recueillies au moment du diagnostic du mélanome sont l'âge, l'indice de Breslow, la présence ou non d'une ulcération, la présence ou non d'un index mitotique élevé, le stade de la maladie, la présence d'une mutation BRAF, NRAS ou c-kit et la survie sans métastase.

B – Analyse des microARNs plasmatiques par RT-qPCR sur BioMark™ Fluidigm

Nous avons réalisé l'analyse de ces échantillons par RT-qPCR sur l'automate BioMark™ Fluidigm dans les mêmes conditions que pour la cohorte 1. Sur la plaque 96.96, les échantillons plasmatiques ont été passés en simple et les amorces ont été passées en

double. Nous avons donc obtenu 2 résultats de Cq pour chaque couple échantillon/amorce.

a – Le choix des amorces utilisés pour les miARNs cibles et les références.

Nous avons décidé de doser l'ensemble des miARNs pour lesquels les résultats étaient exploitables pour la cohorte 1. Nous avons donc utilisé l'ensemble des amorces pour lesquelles les courbes d'amplification et de dissociation étaient bonnes pour la cohorte d'apprentissage. Nous avons donc choisi de doser 25 miARNs. Sur cette cohorte 2, ces miRs ont également donné des courbes d'amplification et de dissociation correctes.

Nous avons ajouté un miARN synthétique (mispiké) lors de l'étape d'extraction comme pour la cohorte 1. Par contre, comme les résultats de ce mispiké étaient trop précoces pour la cohorte 1. Nous n'avons pas réalisé l'étape de préamplification de 15 cycles pour le dosage de ce mispiké. Nous avons donc réalisé qu'une amplification de 30 cycles.

Nous avons donc calculé les expressions relatives pour chaque patient par rapport aux trois gènes de référence (miR-103, miR-423-3p et miR-191) et pour chaque témoin.

Nous avons dosé sur cette plaque des échantillons de la première cohorte afin qu'ils nous permettent de normaliser nos résultats de la première et de la deuxième cohorte. Nous avons analysé 7 échantillons de la cohorte 1. Nous avons ensuite translaté les résultats de la cohorte 2.

b – Les miARNs dérégulés chez les patients par rapport aux témoins.

Nous avons analysé les résultats obtenus par une approche univariée et une approche multivariée afin d'étudier la capacité de chaque miR et de groupe de miRs à discriminer les populations malades et témoins.

1 – L'analyse univariée

Pour chaque miR étudié, nous avons calculé les taux d'expression des malades et des témoins exprimés en $2^{-\Delta Cq}$ par rapport aux trois miRs de référence (**Tableau 16**). Nous avons comparé les taux d'expression moyens malades et témoins grâce au test statistique de Wilcoxon au seuil 5% pour tester l'homogénéité des populations malades et témoins. Les résultats sont représentés sous formes de boxplots (**Figure 30**). Nous avons construit des

courbes ROC (Receiver Operating Characteristics) pour avoir une idée du pouvoir discriminant des miRs (**Figure 30**) et calculé les aires sous la courbe (AUC) (**Tableau 16**). Cette analyse de la cohorte de validation met en évidence 10 miRs discriminants avec les tests de Wilcoxon. 4 miRs sont surexprimés chez les malades par rapport aux témoins. Il s'agit de : **miR-130a**, **miR-146a**, **miR-338-3p** et **miR-1246**. 6 miRs sont sous-exprimés chez les malades : **let-7b**, **miR-18a**, **miR-20a**, **miR-185**, **miR-221** et **miR-2110**. Les 4 autres miRs n'ont pas de différence significative (miR-21, miR-143, miR-145, miR-152). Les miR-17, miR-34a, miR-141, miR-155, miR-200c, miR-211 et miR-1290 n'ont pas été analysés du fait de valeurs manquantes.

Les miR-20a, miR-185, miR-338-3p et miR-1246 présentent des résultats similaires à la cohorte d'apprentissage et apparaissent les plus discriminants en analyse univariée. Sur les 5 miRs discriminants de la cohorte d'apprentissage, seul le let-7b est discordant. Let-7b était surexprimé dans la première cohorte et sous-exprimés dans la deuxième cohorte. L'étude des boxplots et des courbes ROC confirme la bonne discriminance de certains miRs entre population malade et témoin. Quatre miRs possèdent des AUC supérieure à 0,73. Seul le miR-1246 ne présente pas de bonnes performances.

	Validation				
	Control	Cancer	ratio	<i>p</i>	AUC
hsa-miR-185	0,9581	0,5711	0,6	5,72E-04	0,74
hsa-miR-20a	3,5944	2,1068	0,59	5,40E-05	0,77
hsa-let-7b	0,1032	0,0535	0,52	1,07E-05	0,8
hsa-miR-338-3p	0,0265	0,0476	1,79	6,26E-04	0,73
hsa-miR-1246	0,0558	0,1563	2,8	4,58E-01	0,55

Tableau 16 : Analyses des miRs d'intérêt de la cohorte de validation par rapport aux trois miRs de référence. Pour chaque miR est donné l'expression moyenne exprimée en $2^{-\Delta C_q}$ pour les sujets contrôles et pour les patients, les ratios patient/contrôle, les résultats des tests statistiques de Wilcoxon (*p*-values) et les valeurs des AUC des courbes ROC.

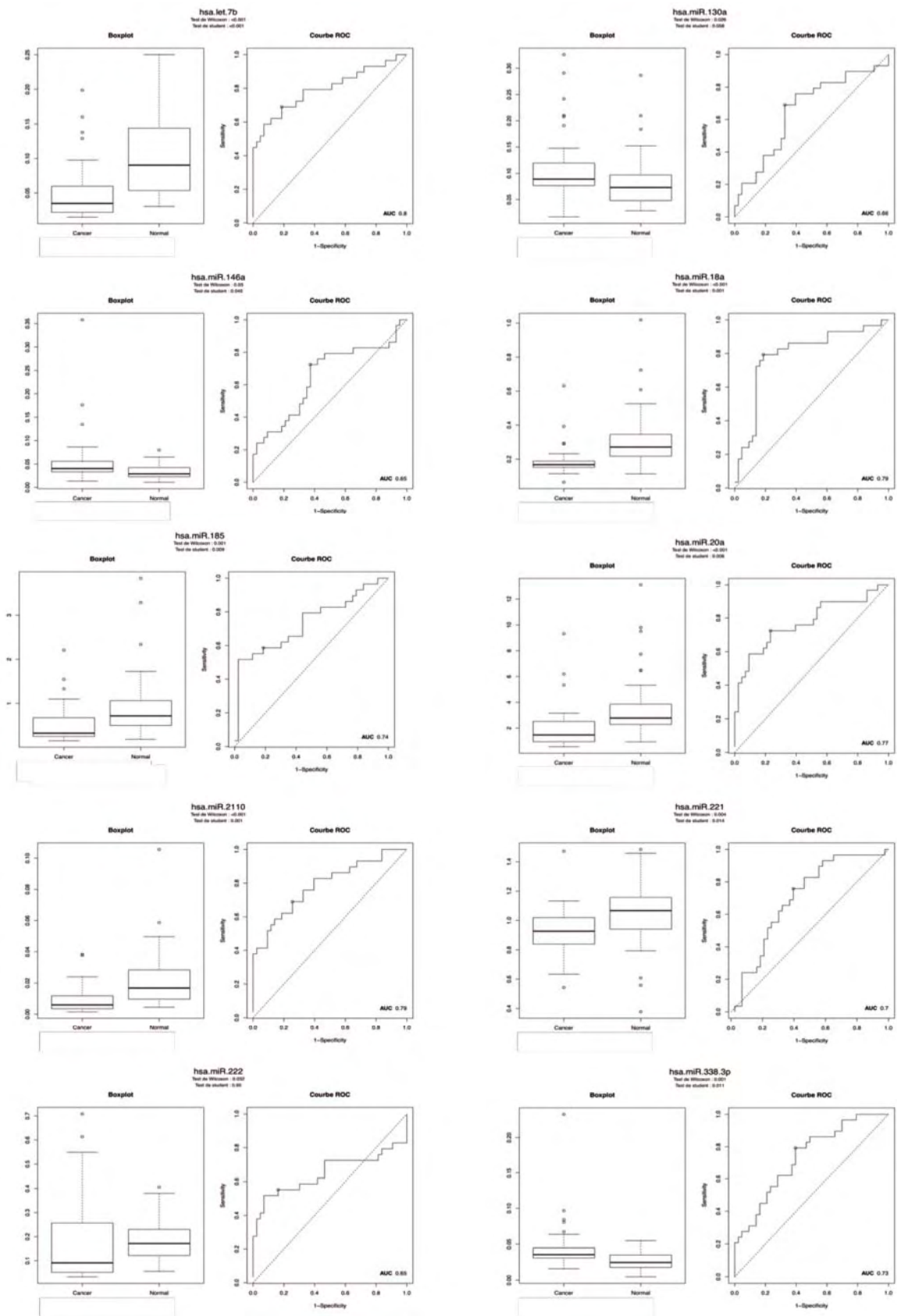


Figure 30 : Boxplots et courbes ROC des 10 miRs dérégulés par rapport aux trois gènes de référence pour la cohorte de validation.

2 – L'analyse multivariée

Nous avons réalisé ensuite une analyse multivariée de l'ensemble de nos résultats afin de trouver le profil de miR ayant les meilleures performances en termes de sensibilité et de spécificité. Les résultats de validation croisée donnent comme meilleure performance un profil de deux miRs : **miR-1246** et **miR-185** par la méthode des forêts aléatoires. Le modèle de la cohorte d'apprentissage appliqué à la cohorte de validation donne une sensibilité de 93,1% et une spécificité de 83,7%.

III – Analyse des deux cohortes réunies

Afin de pouvoir réaliser une synthèse l'ensemble de nos résultats de RT-qPCR sur BioMark™ Fluidigm nous avons réuni la cohorte d'apprentissage (cohorte 1) et la cohorte de validation (cohorte 2). Nos objectifs ont été d'étudier le pouvoir discriminant d'un ou plusieurs miRs entre les populations malades et témoins et surtout d'étudier leurs valeurs pronostic sur la survie.

A – Analyse de discriminance entre population malade et témoin.

Notre premier objectif a été d'analyser les résultats obtenus sur les deux cohortes réunies par une approche univariée et une approche multivariée afin d'étudier la capacité de discriminance de chaque miR et de groupe de miRs sur l'ensemble des échantillons.

1 – L'analyse univariée des cohortes 1 et 2 réunies

Les ratios de l'expression moyenne des patients et des témoins sont notés dans le **Tableau 17**. Ces ratios ont été comparés grâce au test statistique de Wilcoxon. Les expressions relatives de chaque miR pour chaque échantillon sont représentées sous forme de boxplots (**Figure 31**). Nous avons construit les courbes ROC pour chaque miR (**Figure 31**). Cette analyse réunissant les cohortes 1 et 2, met en évidence 8 miRs discriminants avec les tests de Wilcoxon. 4 miRs sont surexprimés chez les malades par rapport aux témoins. Il s'agit de : **miR-146a**, **miR-152**, **miR-338-3p** et **miR-1246**. 4 miRs sont sous-exprimés chez les malades : **let-7b**, **miR-18a**, **miR-20a** et **miR-185**. Les 4 miRs surexprimés avaient été également retrouvés significatifs lors de l'analyse sur puces. Les 4 miRs sous-exprimés proviennent initialement des données bibliographiques. Ces huit miRs confirment leur

dérégulation dans le mélanome. L'étude des boxplots et des courbes ROC confirme la bonne discriminance de certains miRs entre population malade et témoin. Les miRs : miR20a, miR-185, miR-338-3p et miR-1246 présentent les meilleures performances en termes de sensibilité et spécificité avec une AUC respectivement de 0,77; 0,74 ; 0,73 et 0,74.

	Cohortes combinées				
	Control	Cancer	ratio	<i>p</i>	AUC
hsa-miR-185	0,9635	0,5875	0,61	1,13E-05	0,74
hsa-miR-20a	3,4371	2,179	0,63	4,69E-06	0,77
hsa-let-7b	0,0953	0,081	0,85	4,16E-02	0,61
hsa-miR-338-3p	0,0235	0,045	1,92	2,26E-03	0,73
hsa-miR-1246	0,0545	0,1941	3,56	8,33E-06	0,74

Tableau 17 : Analyses des miRs des deux cohortes réunies par rapport à trois miRs de référence. Pour chaque miR est donné l'expression moyenne exprimée en $2^{-\Delta Cq}$ pour les sujets contrôles et pour les patients, les ratios patient/contrôle, les résultats des tests statistiques de Wilcoxon (*p*-values) et les valeurs des AUC des courbes ROC.

2 – L'analyse multivariée des cohortes 1 et 2 réunies

Nous avons réalisé ensuite une analyse multivariée sur l'ensemble de nos résultats des deux cohortes réunies. Les résultats de validation croisée donnent comme meilleure performance un profil de deux miRs : **miR-1246 et miR-185** par la méthode des forêts aléatoires. Ce modèle donne de très bonnes performances puisque la sensibilité est de 90,5% et la spécificité est de 89,1% (**Figure 32**). La figure récapitule les performances du profil sur la cohorte 1, l'application sur la cohorte 2 et des deux cohortes réunies. La courbe ROC de ce modèle est illustrée sur la **Figure 33** ainsi que celle de la LDH seul biomarqueur utilisé dans les mélanomes métastatiques.

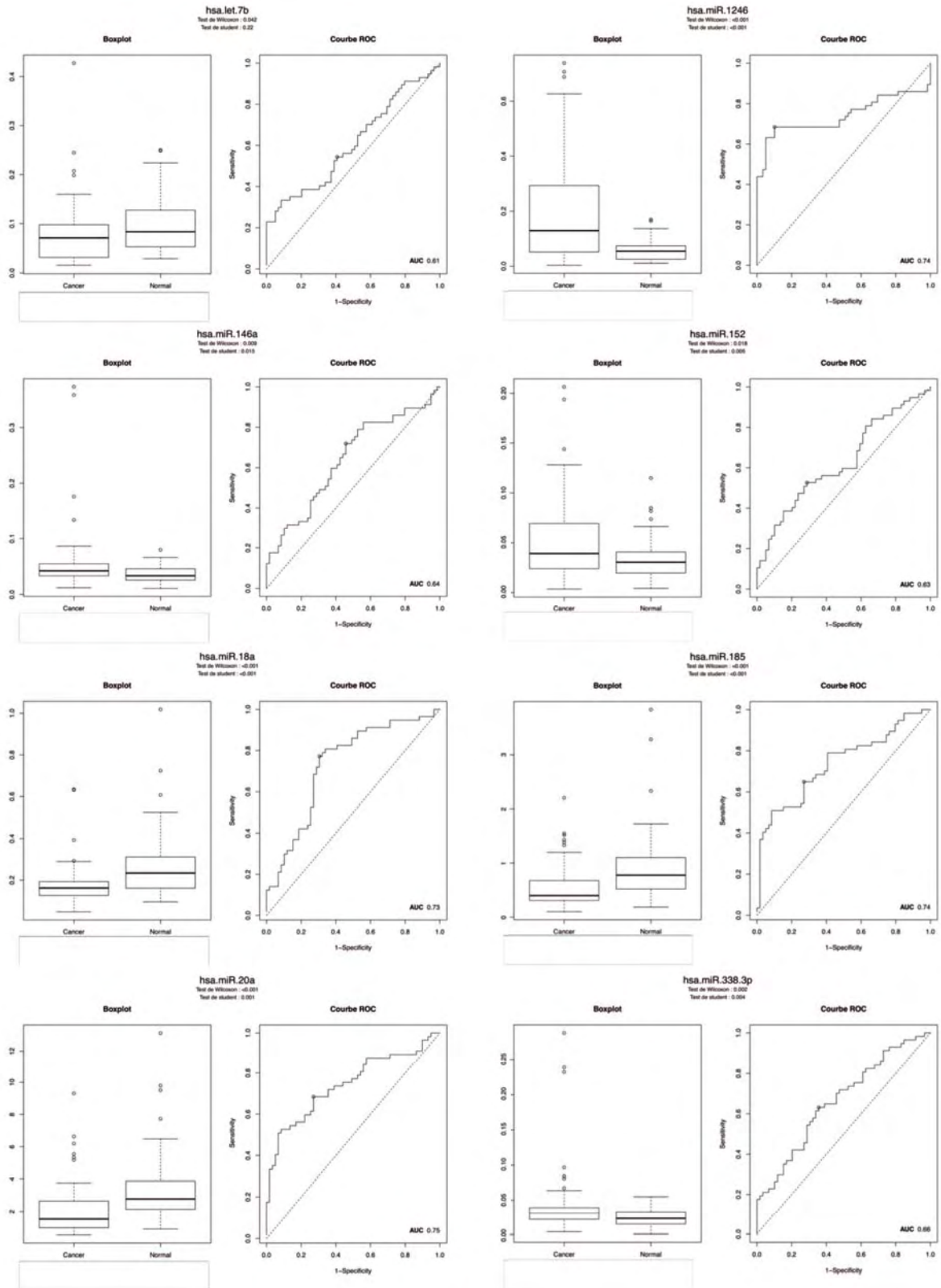


Figure 31 : Boxplots et courbes ROC des huit miRNAs dérégulés par rapport aux trois gènes de référence pour l'ensemble des deux cohortes réunies.

	Sensibilité	Spécificité
Resubstitution cohorte 1	96,4%	87,5%
Validation croisée cohorte 1 *	91%	80%
Application sur la cohorte 2	93,1%	83,7%
Validation croisée* (cohortes 1+2 réunies)	90,5%	89,1%

*validation croisée en 10 blocs avec 30 répétitions

Figure 32. Performance du profil (miR-1246 et miR-185) par le modèle des forêts aléatoires.

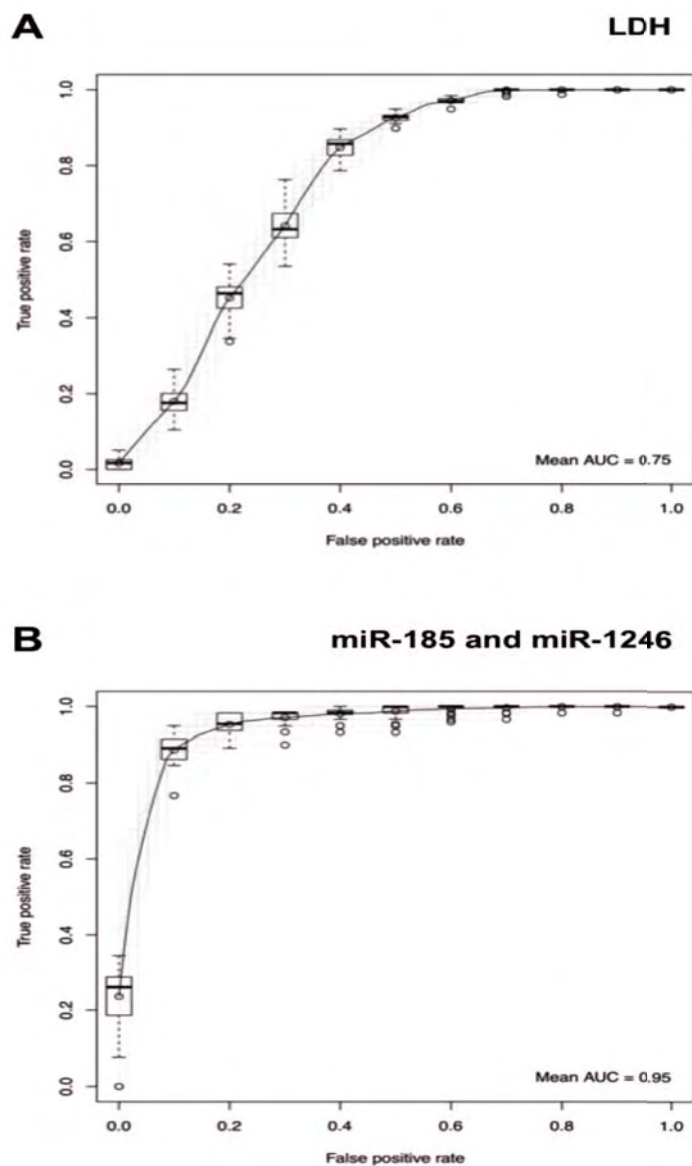


Figure 33 : Courbes ROC de la LDH et du profil de 2 miRs (miR-185 et miR-1246) sur les deux cohortes réunies.

3 – Corrélation entre l'âge et les taux de miARNs

L'âge des deux populations malades et saines était statistiquement différente ($p < 0,001$ avec le test de Mann-Whitney). La différence sex-ratio des deux populations n'était pas significative ($p > 0,5$ avec le test de Fisher). Nos populations sont appariées au niveau du sexe mais pas au niveau de l'âge. Cette différence en âge entre les populations malades et contrôles peut être un biais important pour l'interprétation des résultats de notre étude. Nous avons réalisé une étude de corrélation entre l'âge et les taux de miARNs pour voir si nos analyses peuvent être interprétables avec ce biais. Pour cette étude de corrélation nous avons étudié le coefficient de corrélation de Spearman entre l'âge et les valeurs des miARNs au sein des cohortes. L'ensemble des coefficients de corrélation sont faibles (inférieur à 0,5). De plus, en segmentant les deux populations en population appariées en âge nous confirmons l'absence de liens avec l'âge. L'ensemble de ces études de corrélation permet de montrer l'absence de lien avec l'âge et donc permet une interprétation de nos résultats.

B – Analyse de survie

Notre deuxième objectif a été d'étudier les données biocliniques que nous avons recueillies pour les patients. Nous avons recherché si les miRs dérégulés présentaient une valeur pronostique. L'impact sur la survie après inclusion du taux de chaque miR et des variables cliniques ont été analysés en analyses univariées et multivariées. Nous avons fait ces études sur l'ensemble des deux cohortes réunies pour avoir un nombre adéquat d'individus. La survie prise en compte a été le délai entre la date de prélèvement et la date de décès ou des dernières nouvelles. L'analyse univariée de survie a été réalisée par la méthode de Kaplan-Meier suivie d'une analyse multivariée par un modèle de Cox. Nous avons fait une estimation des courbes de survie par la méthode de Kaplan-Meier et comparé ces courbes de survie par le test du log-rank. Nous avons étudié l'impact sur la survie du taux de chaque miR ainsi que des variables cliniques dont nous disposions assez de données : taux de LDH, stade, traitement, âge, sexe, délai entre le diagnostic et le prélèvement, délai entre le prélèvement et la première métastase. Des tendances ont été détectées sur les courbes de survie : quatre miRs (**miR-185, miR-20a, miR-152 et miR-2110**) présentaient un effet protecteur ($p < 0,001$ pour miR-20a et miR-2110, $p < 0,05$ pour miR-152 et $p < 0,5$ pour miR-185 avec le test du log-rank). Des valeurs élevées de ces miRs plasmatiques étaient associées à une survie plus longue (**Figure 35**). Le miR-20a et miR-185 sont significativement sous-exprimés chez les patients, le miR-152 est surexprimé et le miR-2110

n'a pas de différence significative entre patients et contrôles. Au sujet des miRs du profil (miR-185 et miR-1246), seul miR-185 a un effet sur la survie mais pas miR-1246. Le taux de LDH ainsi que le stade (IIIc M1a et IV) ont un impact négatif sur la survie. Ceci confirme les données déjà connues sur le taux de LDH (qui est le seul marqueur sanguin présent dans la classification du mélanome et utilisé uniquement dans les stades métastatiques) ainsi que la localisation des métastases. Ce sont les deux critères utilisés pour les stades métastatiques.

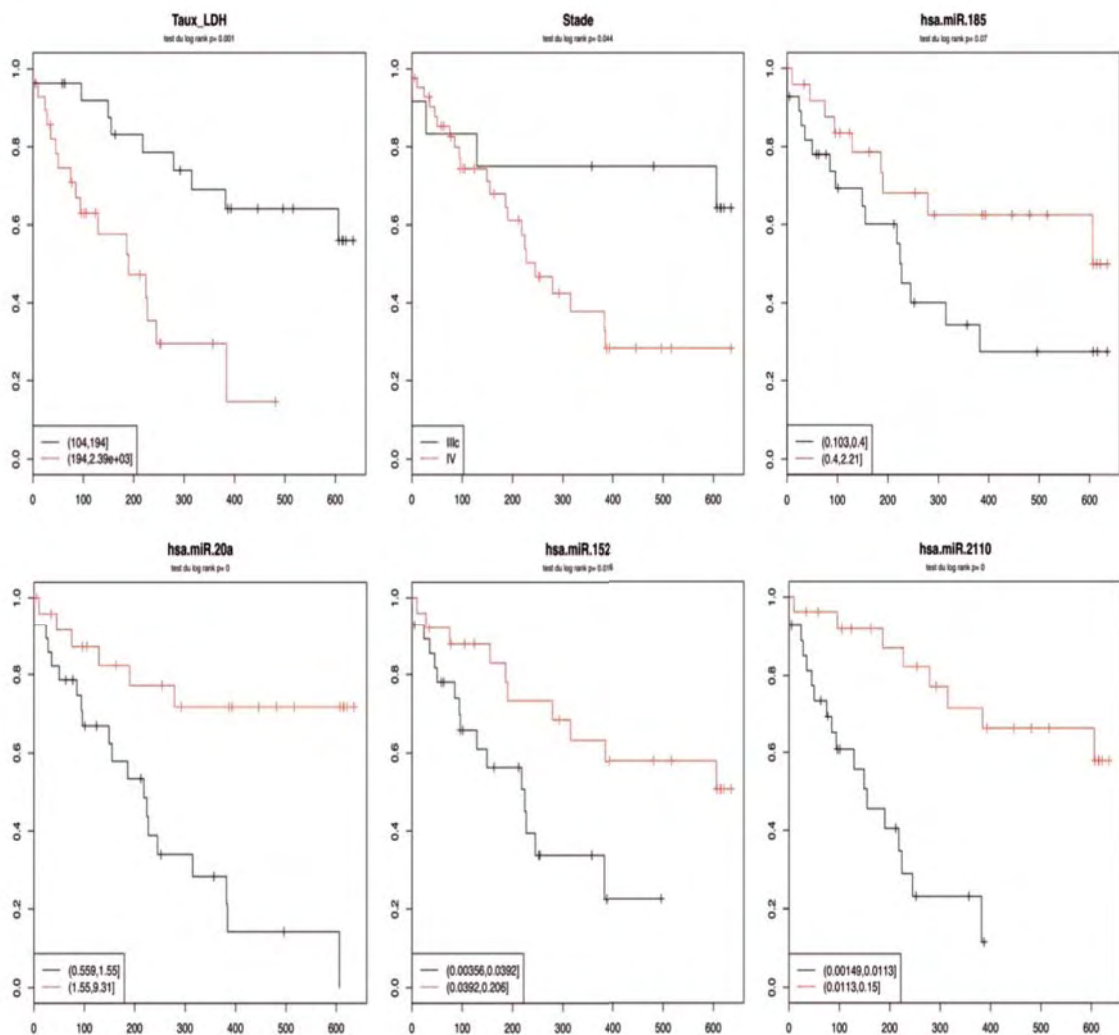


Figure 34 : Etudes de survie sur les deux cohortes réunies.

Après l'analyse univariée de chaque variable sur la survie, un modèle de Cox a été réalisé afin de croiser l'ensemble des variables et d'évaluer le risque supplémentaire apporté par chaque variable sur la durée de la survie. L'input data a été l'expression du profil, l'output data était la survie. Les facteurs confondants étudiés ont été l'âge, l'indice de Breslow, l'ulcération, la présence de mutation BRAF, le stade AJCC, l'OMS, le taux LDH. Le modèle de Cox n'a conservé que les variables suivantes comme ayant des effets

significatifs : un OMS à 1 (HR : 14 avec un intervalle de confiance à 95% de 4,49-45 avec $p < 0,001$), un taux de LDH augmenté (HR : 0,10 avec IC95% de 0,03-0,30 avec $p < 0,001$), un âge supérieur à 65 ans (HR : 0,23 avec IC95% de 0,07-0,76 avec $p = 0,016$). L'effet protecteur de miR-185 n'est pas resté significative après analyse multivariée avec un Hazard Ratio ajusté de 0,45 (IC95% : 0,13-1,58 et $p = 0,21$).

IV – Conclusions des analyses des dosages plasmatiques des miARNs par RT-qPCR.

Cette étude sur les miRs plasmatiques par RT-qPCR nous a permis de mettre en évidence 8 miRs pour discriminer significativement la population de patients atteints de mélanome métastatique de sujets sains. Les **miR-146a**, **miR-152**, **miR-338-3p** et **miR-1246** sont surexprimés chez les patients tandis que **let-7b**, **miR-18a**, **miR-20a** et **miR-185** sont sous-exprimés. Les miRs surexprimés étaient initialement issus de l'analyse sur Biopuce tandis que les miRs sous-exprimés étaient issus des données de la littérature. Les quatre miRs identifiés (**miR-1246**, **miR-185**, **miR-338-3p** et **miR-20a**) dans la cohorte d'apprentissage possèdent les meilleures performances en analyse univariée. Nous avons également déterminé un modèle de deux miRs : les **miR-185** et **miR-1246** ayant de très bonnes performances pour discriminer les deux populations (sensibilité : 90,5%, spécificité : 89,1%). De plus, l'étude de survie a montré que quatre miRs avaient un effet protecteur (**miR-185**, **miR-20a**, **miR-152** et **miR-2110**). Il apparaît nécessaire d'étudier plus précisément l'origine et l'impact fonctionnel de ces miRs dans le mélanome.

Deuxième partie : Origine des microARNs d'intérêt

Nous avons mis en évidence des miARNs plasmatiques dérégulés chez les patients atteints de mélanome métastatique par rapport à des sujets sains. Nous nous sommes interrogés sur leur origine. Les données de la littérature indiquent que certains miARNs surexprimés plasmatiques peuvent être synthétisés et sécrétés soit par les cellules tumorales soit par les cellules du microenvironnement tumoral. Les miARNs sous-exprimés dans le plasma seraient probablement dus à une régulation complexe entre la tumeur et son microenvironnement. Nous nous sommes donc intéressés à l'expression de ces miARNs au niveau de tissus tumoraux et de lignées cellulaires tumorales afin de voir s'ils ont une origine tumorale.

1) Etude de l'expression tissulaire des miARNs

Nous avons décidé d'étudier les miARNs, que nous avons trouvés les plus discriminants dans notre étude plasmatique, sur les tissus de ces mêmes patients. Nous avons récupéré les biopsies auprès du service d'anatomopathologie du CHU de Purpan (Toulouse) dont les dates étaient concomitantes avec la date de l'inclusion. Au sein de la cohorte d'apprentissage, nous avons récupéré 5 biopsies sur les 29 patients. Au sein de la cohorte de validation, nous avons également analysé les biopsies de 5 patients. L'ensemble des biopsies était fixé par le formol et inclus en paraffine. Sur les biopsies, nous avons réalisé des coupes de 10 μ m et un anatomopathologiste a séparé le tissu tumoral du tissu sain. Nous avons ensuite réalisé une étape d'extraction des miARNs (voir matériels et méthodes - Extraction des ARNs pour détection des miARNs tissulaires), nous avons rétro-transcrit en ADNc puis nous avons réalisé une qPCR sur les extraits obtenus sur un thermocycleur

CFX96™ (Bio-Rad). Nous avons testé des amorces Exiqon et des amorces Qiagen en suivant les recommandations de chacun des fournisseurs (voir matériels et méthodes – Analyse des miARNs par RT-PCR sur l'automate CFX96™ avec les amorces Exiqon et Qiagen). Nous avons calculé l'expression de chaque miARN par la méthode des ΔCq en utilisant comme miARN de référence, le RNU6, et comme tissu témoin le tissu sain péri-tumoral pour chaque patient.

Les miARNs discriminants choisis sont ceux ayant les résultats les plus significatifs sur les deux cohortes réunies. Nous avons testé les huit miRs dérégulés dans l'analyse plasmatique. La **Figure 35** montre les résultats des quatre miRs les plus significatifs : les deux miARNs significativement surexprimés (**miR-1246, miR-338-3p**) et les deux miARNs sous-exprimés les plus significatifs (**miR-20a et miR-185**) (**Figure 35**). Nous avons fait les dosages avec des amorces Exiqon et Qiagen. Les amorces Qiagen ont donné de meilleures performances en terme de stabilité du miR de référence (RNU6). Cependant, les résultats étaient comparables entre Exiqon et Qiagen. Au niveau de ces analyses tissulaires, miR-1246 ne présente pas de variation significative entre tissu tumoral et tissu péri-tumoral. Les miRs -20a et -185 présentent une tendance à une expression supérieure dans le tissu tumoral par rapport au tissu péri-tumoral mais sans seuil significatif. Seul le miR-338-3p présente une augmentation significative ($p=0,05$) de son expression au niveau tumoral par rapport à la zone péri-tumorale. Le miR-338-3p plasmatique était surexprimé chez 8 patients sur les 10 étudiés. Au niveau tissulaire, nous retrouvons le même résultat avec une surexpression tumorale chez ces mêmes patients. En effet, 8 patients surexpriment ce miR au niveau tumoral et les deux ne surexprimant pas ce miR au niveau de la tumeur. Le miR-18a est surexprimé de manière significative au niveau tissulaire, le miR-146 a une tendance à la surexpression et les miR-152 et let-7b a la sous-expression (données non montrées).

Cette étude préliminaire montre que le miR-1246 ne semble pas avoir une origine tumorale tandis que le miR-338-3p semblerait être exprimé au sein de la tumeur et sécrété dans la circulation sanguine. Néanmoins, une analyse avec un effectif plus large de tissus est nécessaire pour pouvoir confirmer ces premiers résultats.

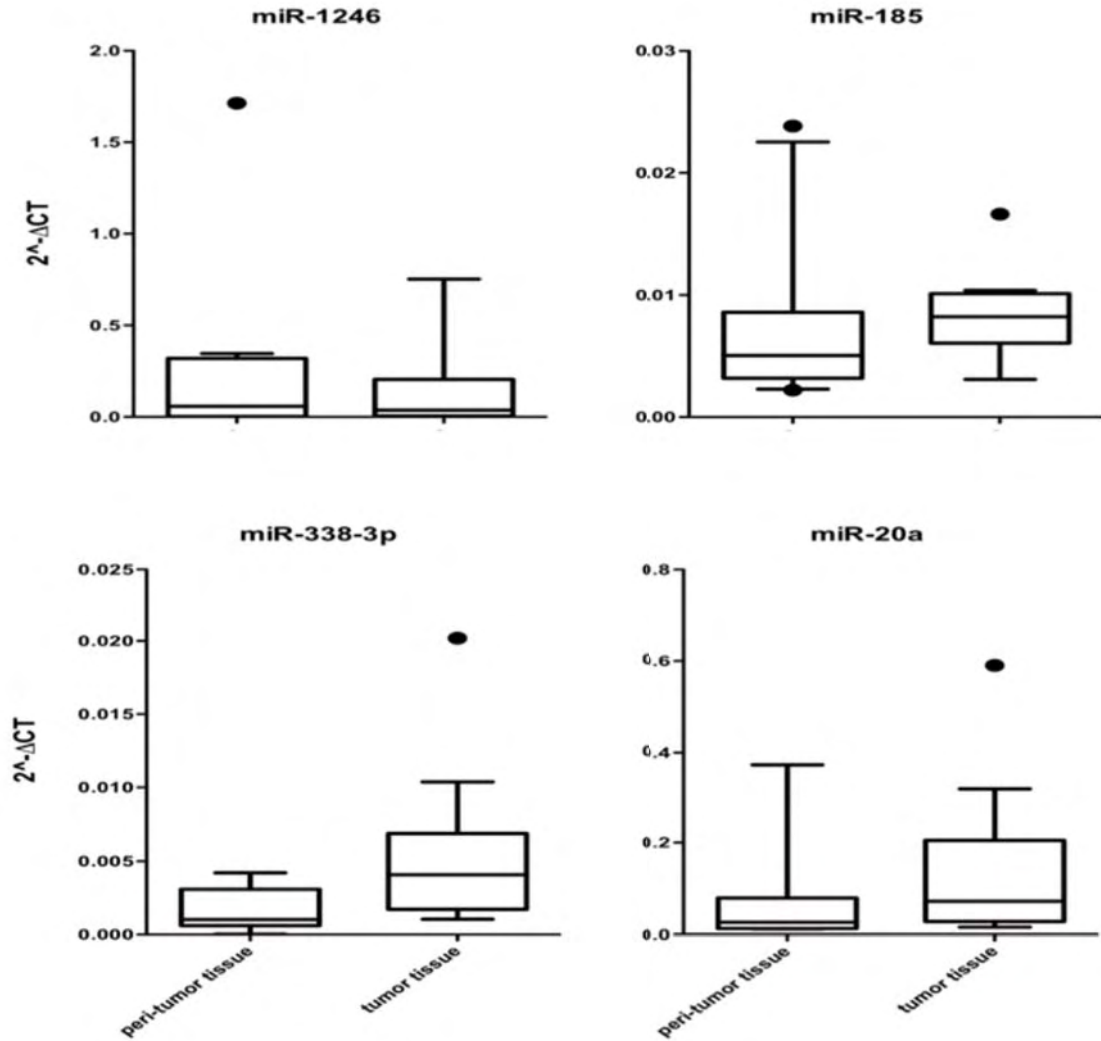


Figure 35 : Expression relative ($2^{-\Delta Cq}$) des miRs 1246, miR-185, miR-338-3p et miR-20a avec amorces Qiagen. Sur l'axe des ordonnées est représentée l'expression relative des miARNs par rapport au RNU6 et sur l'axe des abscisses sont représentées les tissus tumoraux et les tissus sains péri-tumoraux.

2) Etude de l'expression des miARNs dans des lignées cellulaires de mélanome

Nous avons réalisé l'analyse, de l'ensemble des miARNs testés dans le plasma, sur un large panel de lignées cellulaires de mélanome. L'expression de ces miARNs a été déterminée par RT-qPCR sur l'automate BioMark™ Fluidigm comme pour l'analyse plasmatique. Nous avons utilisé les mêmes amorces de la société Exiqon. Nous avons réalisé nos analyses sur 10 lignées cellulaires isolées à partir de tumeurs de patients au stade métastatique. Afin d'avoir une vision plus globale de l'expression de ces miARNs dans le mélanome nous avons pris également cinq lignées non métastatiques : deux lignées à croissance radiale (RGP) et 3 lignées à croissance verticale (VGP). Nous avons comparé

l'ensemble de ces lignées à des mélanocytes primaires (NHEM). Nous avons également étudié 8 lignées cellulaires issues d'autres tumeurs que le mélanome afin de voir la spécificité des miARNs dans le mélanome. Nous avons pris des lignées de glioblastomes, de cancers pulmonaires, mammaires et ovariens. Le microARN de référence choisi pour les lignées cellulaires est celui décrit dans la littérature : le RNU6. Nous avons vérifié sa stabilité par l'algorithme geNorm. Les caractéristiques de chaque lignée cellulaire sont décrites dans le matériels et méthodes (section matériels et méthodes – culture cellulaire).

I – Sélection des amorces de miARNs exploitables sur les lignées cellulaires

Nous avons choisi d'étudier au total 47 miARNs afin de tester nos amorces sur une autre matrice que le plasma. Nous avons utilisé les mêmes amorces de la société Exiqon que pour les dosages plasmatiques. Par rapport à l'analyse plasmatique, nous n'avons pas analysé les trois miRs de référence qui n'avait pas fonctionné (miR-16, miR-513a-3p, miR-615-3p), le mispike (puisque nous n'avons pas mis de contrôle d'extraction), et les miRs-137 et -204. Nous avons mis en culture les 23 lignées cellulaires (matériel et méthodes – culture cellulaire). Nous avons extrait les ARNs cellulaires (matériel et méthodes – extraction des ARNs pour détection des microARNs cellulaires). Nous avons analysé par RT-qPCR sur l'automate BioMark™ Fluidigm en plaque 96.96. Nous avons dosé chaque miR en double. Nous avons deux ou trois passages différents de chaque lignée cellulaire. Nous avons analysé les courbes d'amplification et de dissociation de chaque amorce. Les amorces, ayant des amplifications trop tardives (c'est-à-dire une valeur de Cq supérieur à 29) ou non spécifiques, ont été écartées de l'analyse. Le **Tableau 18** résume les caractéristiques des courbes d'amplification et de dissociation de chaque amorce. Les amorces (miR-27b, miR-302d, miR-517c, miR-518d, miR-569, miR-599, miR-1292) ne donnent pas d'amplification. Les amorces (miR-95 et miR-205) ne donnent aucune amplification avec les lignées de mélanome. Les amorces (let-7a, let-7e, miR-33a, -597 et -1537) ne donnent pas d'amplification efficace. Les miRs (-143, -214, -520e, -668, -1290) ne sont pas spécifiques. Un problème spécifique aux amorces est retenu pour celles ne marchant ni sur les plasmas ni sur les cellules. Un problème lié à la matrice peut expliquer les discordances entre les résultats exploitables des analyses plasmatiques et cellulaires. Les amorces (miR-143 et -1290) ne sont interprétables qu'au niveau plasmatique à l'inverse les amorces (miR-92a-1*, -125b, 182, 425*) le sont uniquement pour les analyses cellulaires.

miRNA Exiqon	amplification	plusieurs pics	Ct tardifs (>29)
U6	OK	-	-
103	OK	-	-
423-5p	OK	-	-
let7a		-	oui
let7b	OK	-	-
let7e		-	oui
17	OK	-	-
18a	OK	-	-
20a	OK	-	-
21	OK	-	-
27b			
33a		-	oui
34a	OK	-	-
92a-1*	OK	-	-
95			
125b	OK	-	-
130a	OK	-	-
141	OK	-	-
143		oui	-
145	OK	-	-
146a	OK	-	-
152	OK	-	-
155	OK	-	-
182	OK	-	-
185	OK	-	-
191	OK	-	-
200c	OK	-	-
205			
211	OK	-	-
214		oui	-
221	OK	-	-
222	OK	-	-
302d			
338-3p	OK	-	-
425*	OK	-	-
517c			
518d			
520e		oui	-
569			
597		-	oui
599			
668		oui	-
1246	OK	-	-
1290		oui	-
1292			
1537		-	oui
2110	OK		-

amplification bonne
amplification mauvaise
absence d'amplification

Tableau 18 : Caractéristiques d'amplification des amorces de microARNs pour les échantillons cellulaires. Ce tableau résume pour chaque amorce si l'amplification a été correcte et dans le cas contraire la cause soit due à une amplification non spécifique (présence de plusieurs pics sur la courbe de fusion) soit à une amplification tardive (Cq supérieur à 29). Les amorces exploitables sont en jaune.

28 miRs ont eu des amplifications correctes et spécifiques. Il s'agit : RNU6, let-7b, miR-103, -423-3p, -17, -18a, -20a, -21, -34a, -92a-1*, -125b, -130a, -141, -145, -146a, -152, -155, -182, -185, -191, -200c, -211, -221, -222, -338-3p, -425*, -1246, -2110. Nous avons calculé les expressions relatives pour chaque lignée cellulaire par rapport à RNU6 et par rapport aux mélanocytes primaires par la méthode des delta-delta Cq ($2^{-\Delta\Delta Cq}$). L'ensemble des résultats est contenu dans l'**Annexe 7**. Nous avons dans un premier temps analysé l'expression cellulaire des miRs plasmatiques dérégulés puis nous avons ensuite analysé les expressions cellulaires des autres miRs dosés.

II – Analyse de l'expression cellulaire des miRs dérégulés

Nous avons analysé les expressions cellulaires des miRs dérégulés sur nos analyses de RT-qPCR sur l'automate BioMark™ Fluidigm. Les miRs : **146a, 152, 338-3p et 1246** étaient surexprimés tandis que les miRs : **18a, 20a, 185 et let-7b** étaient sous-exprimés au niveau plasmatique chez les patients métastatiques par rapport aux sujets sains.

Nous avons analysé les résultats sur les 10 lignées métastatiques (**Figure 36**). Les miRs : 146a, 152 et 1246 ont une expression cellulaire globalement diminuée par rapport aux mélanocytes ($p < 0,05$ pour miR-152 et miR-1246, $p < 0,001$ pour miR-146a). L'expression du mir-146a est diminuée significativement chez 9 lignées sur 10 et non significative pour la dernière lignée. Les miR-152 et miR-1246 ont respectivement 6 lignées et 4 lignées sous-exprimés significativement. Les autres lignées n'ont pas d'expression dérégulée pour ces deux miRs. La sous-expression au niveau cellulaire de miR-146a a déjà été décrite dans le mélanome (Levati et al. 2009 ;Philippidou et al. 2010). Les miR-152 et miR-1246 ne sont pas à ce jour documentés dans le mélanome.

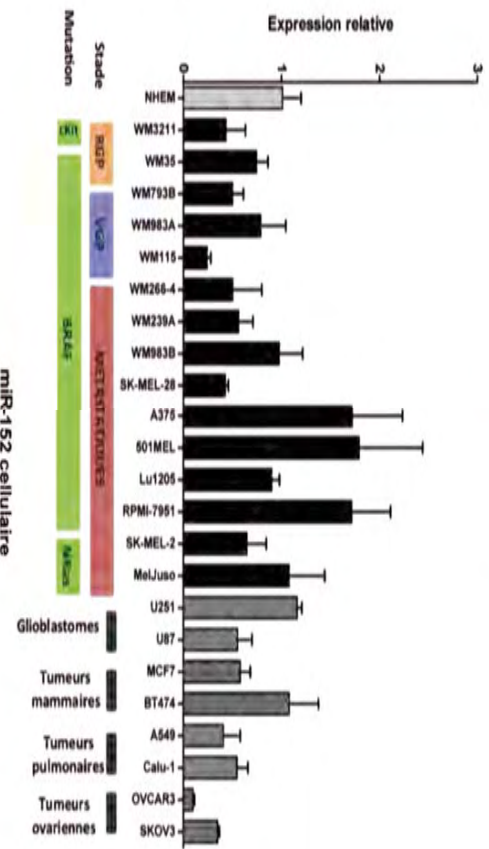
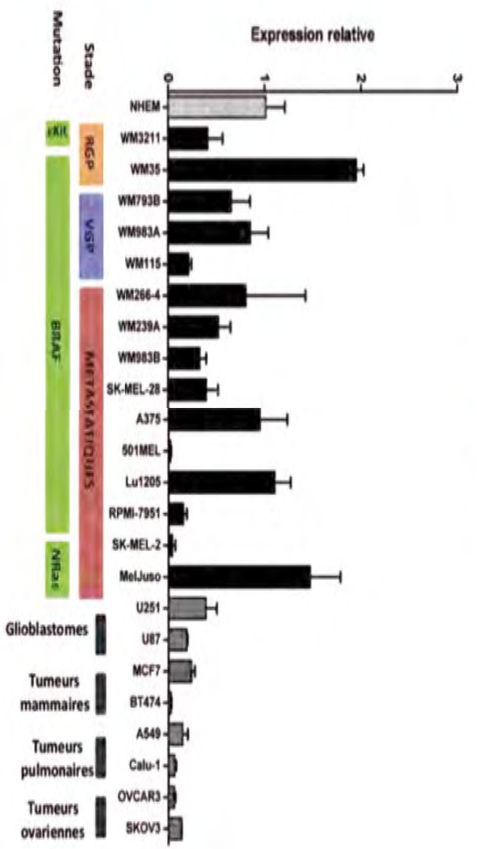
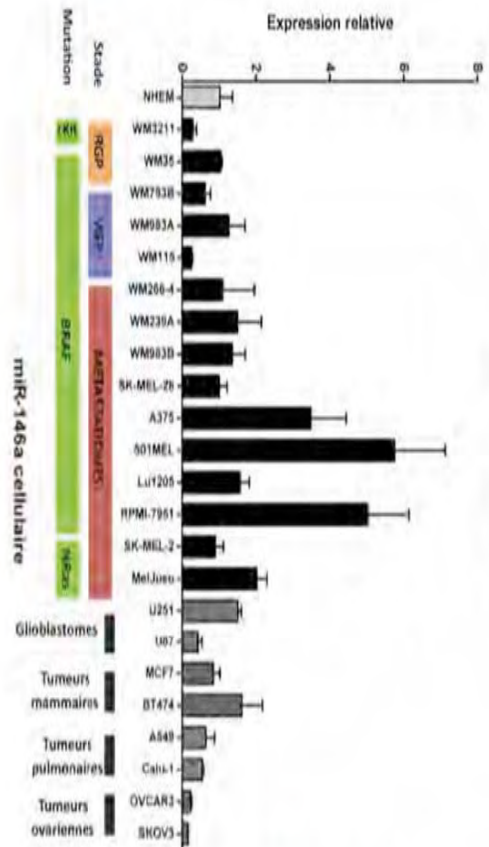
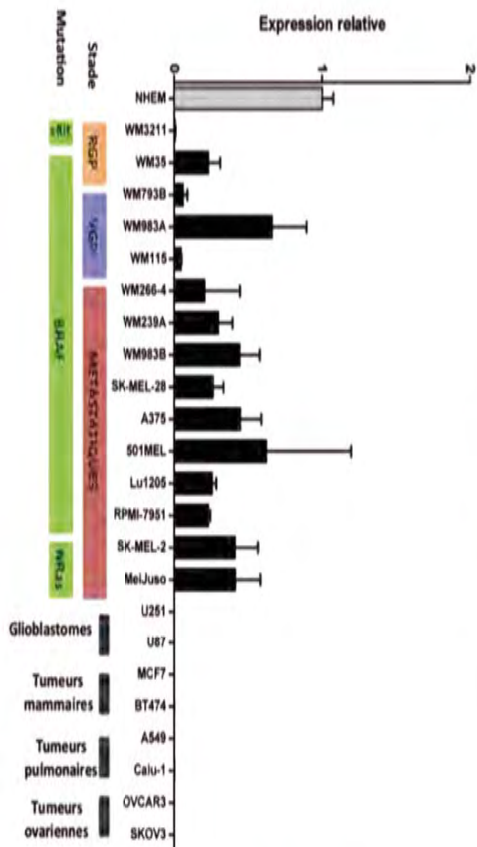
Le miR-338-3p a une expression plus hétérogène entre les lignées puisque 3 lignées le surexpriment (WM983B, A375 et SK-MEL-2) et 5 lignées le sous-expriment avec une tendance globale à la surexpression. Le miR-338 a été décrit surexprimé dans le mélanome (Igoucheva et al. 2009) et un faible taux est décrit dans des lignées de mélanome muté associé à d'autres miRs (Caramuta et al. 2010).

Le miR-185 a une tendance à être sous-exprimé puisque 5 lignées ont une expression diminuée, une seule est surexprimée. Le miR-18a est globalement surexprimé ($p < 0,05$), il est surexprimé dans 4 lignées, les autres n'ayant pas de différence significative. Les miR-20a et let-7b ne sont pas dérégulés au niveau cellulaire dans notre étude. Chacun a 8 lignées n'ayant pas d'expression différentielle. Dans la littérature du mélanome, les miRs-18a et -

20a ont été décrits comme augmentés (miR-18a : Levati et al. 2009 ;Chen 2010 ; miR-20a : Levati et al. 2009) et les miR-185 (Greenberg et al. 2011) et let-7b (Schultz et al. 2008, Fu et al. 2011) diminués.

Nous avons ensuite comparé les différents stades de lignées de mélanome : RGP, VGP et métastatique. Nous avons observé une augmentation de l'expression des miR-1246 et miR-18a avec l'agressivité et le caractère invasif des lignées. Nous avons comparé les groupes RGP et métastatique, VGP et métastatique ($p < 0,05$). Nous n'avons pas observé de différence significative pour les autres miRs. Nous avons analysé l'expression de chaque miR entre mélanome et les autres lignées tumorales (glioblastomes, tumeurs mammaires, pulmonaires et ovariennes). L'expression de certains miRs est significativement augmentée dans le mélanome par rapport aux autres lignées. Il s'agit de 6 des 8 miRs dérégulés : miRs-18a, -146a, -152, -185, -338-3p, -1246. Ce n'est pas le cas pour le miR-20a et let-7b. Enfin, nous n'avons pas eu de corrélation entre le taux de miRs et le statut mutationnel des lignées de mélanome mais nous n'avions qu'une seule lignée c-kit et deux lignées NRAS, nous ne pouvons pas conclure sur ces derniers résultats.

En conclusion, les miRs-152 et -1246 sont surexprimés dans le plasma et sont sous-exprimés ou non dérégulés au niveau cellulaire. Ces miRs apparaissent non produits et non sécrétés par les cellules tumorales. Ils proviennent peut-être du microenvironnement tumoral. Le miR-338-3p est surexprimé au niveau plasmatique et a une expression variable selon les lignées mais une tendance globale à la surexpression et il est surexprimé dans les tissus tumoraux. Il pourrait provenir des cellules tumorales. Des études complémentaires sont nécessaires pour conclure. Le miR-146a est surexprimé au niveau tissulaire et sous-exprimé au niveau cellulaire. Cette discordance a été déjà relevée dans la littérature (Levati et al 2009 ;Philippidou et al. 2010). Le miR-185 est sous-exprimé au niveau plasmatique et a une tendance à la sous-expression au niveau cellulaire et surexpression tissulaire. Cette discordance a été également décrits. Les miR-20a et let-7b sont sous-exprimés au niveau plasmatique et globalement non dérégulés au niveau cellulaire dans notre étude. Le miR-18a est sous-exprimé au niveau plasmatique et surexprimé au niveau cellulaire. 6 de ces 8 miRs ont une dérégulation significative dans les lignées de mélanome par rapport aux autres lignées tumorales et semblent être particulièrement associés au mélanome. Les miR-20a et let-7b ne sont pas dérégulés au niveau cellulaire et non pas de différence avec les autres lignées tumorales. Ils semblent associés au processus tumoral mais pas spécifique du mélanome.



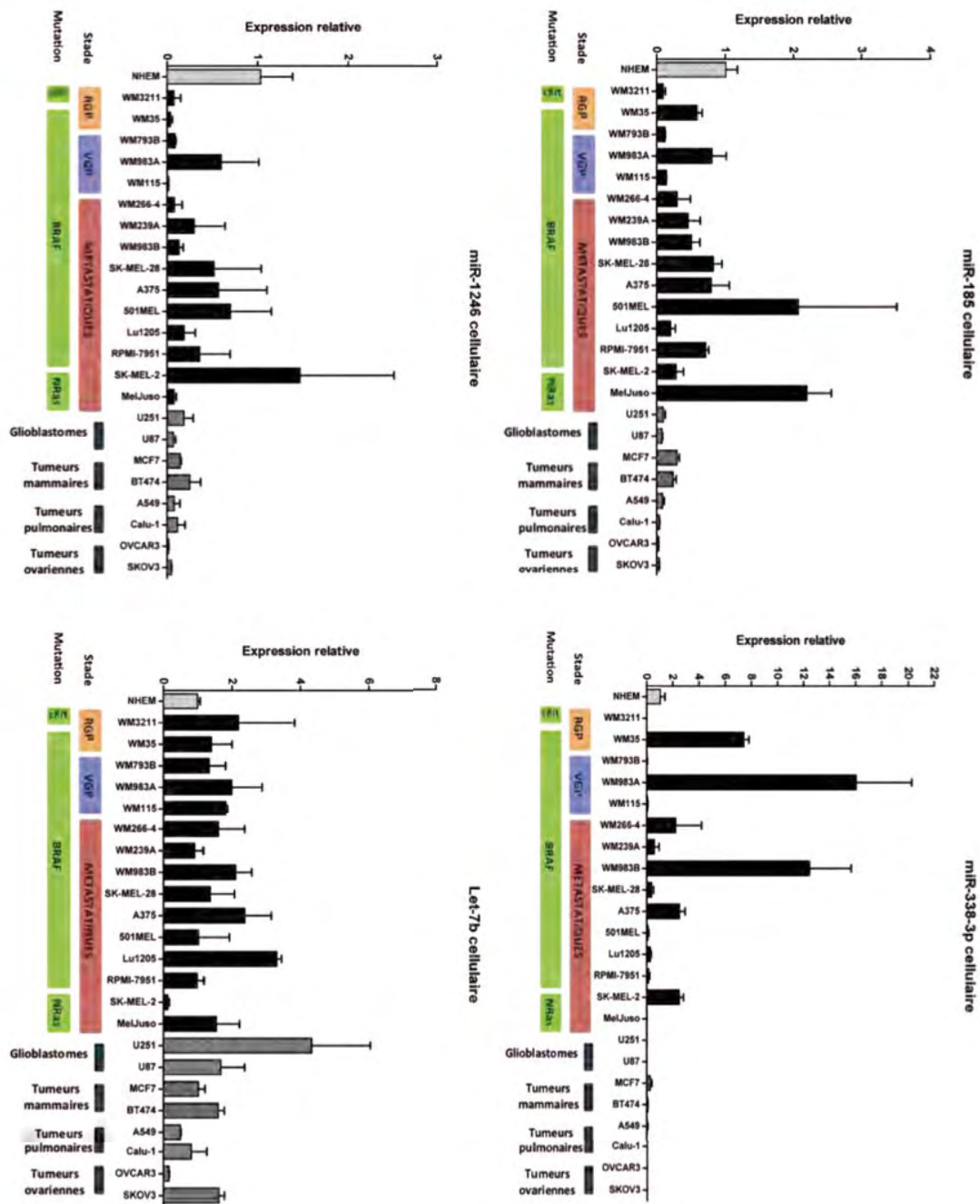


Figure 36 : Expression cellulaire des différents miRs plasmatiques dérégulés. Les expressions relatives de chaque lignée tumorale sont calculées par rapport au RNU6 et par rapport aux mélanocytes primaires (NHEM). Les NHEM ont donc une expression à 1 (premier segment). Les lignées tumorales de mélanome sont en histogramme noir et les lignées tumorales d'autres cancers (glioblastomes, sein, poumon et ovaire) sont en histogramme gris. Pour chaque lignée de mélanome est noté le statut invasif (RGP, VGP ou métastatiques) et le statut mutationnel (mutation c-kit, BRAF ou NRAS). Les écarts-types de chaque expérience sont également notés pour chaque lignée.

III – Analyse de l'expression cellulaire des miRs non dérégulés dans l'analyse plasmatique

Nous avons également analysé 15 autres miRs: ceux étudiés lors de l'analyse plasmatique de RT-qPCR mais n'ayant pas été retrouvé dérégulés. Nous avons analysé les expressions relatives de ces miRs dans les lignées métastatiques. Les miRs cellulaires que nous avons retrouvés significativement augmentés par rapport aux mélanocytes sont les miRs-92a-1*, -145, -182 et 200c ($p < 0,001$ sauf pour miR-145 qui a une p-value $< 0,01$). Ceux que nous avons retrouvés diminués sont les miRs-21, -34a, -155 et -221 ($p < 0,01$). Les autres miRs n'ont pas été globalement dérégulés sur l'ensemble des lignées métastatiques (miR-17, -125b, -130a, -141, -222, -425*, -2110). Certains miRs ont une très forte expression au niveau des autres lignées tumorales et décrit dans la littérature dans ces pathologies. Il s'agit du miR-21 pour les tumeurs mammaires et les miRs-141, -182 et -200c pour les tumeurs mammaires et ovariennes.

Nos résultats sont conformes à ceux déjà décrits dans la littérature du mélanome en ce qui concerne les miRs-92a (Levati et al. 2009 ; Stark et al. 2010), miR-145 (Molnar et al. 2008 ; Segura et al. 2010), miR-182 (Segura et al. 2009 ; Huynh 2011), miR-200c (Molnar et al. 2008 ; Elson-Schwab 2010), miR-34a (Lodygin et al. 2008 ; Satzger 2010 ; Greenberg et al. 2011) et miR-155 (Philippidou et al. 2010 ; Levati et al. 2009). Par contre les miR-21 et miR-221/222 sont décrits comme surexprimés dans le mélanome (miR-21 : Chen et al. 2010, Grignol et al. 2011, Yang 2011 ; miR-221/222 : Felicetti et al. 2008a, Felicetti et al. 2008b, Igoucheva et al. 2009, Mattia et al. 2011). Des expériences complémentaires sont nécessaires pour pouvoir expliquer ces résultats contradictoires.

Troisième partie : Article soumis

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

Dans un premier temps, nous avons étudié l'expression d'un large panel de miARNs plasmatiques chez des patients atteints de mélanome au stade métastatique. Nous avons utilisé deux techniques différentes : une analyse par Biopuces puis une analyse par RT-qPCR. Cette étude a été réalisée sur un total de 74 patients. Notre étude a permis de mettre en évidence 8 miARNs dérégulés permettant de discriminer significativement ces patients de sujets sains. Parmi ces miARNs, quatre étaient surexprimés (miR-146a, miR-152, miR-338-3p et miR-1246) et quatre sous-exprimés (let-7b, miR-18a, miR-20a et miR-185). Quatre miRs (miR-1246, -185, -338-3p et -20a) paraissent particulièrement importants. Nous avons également mis en évidence un profil de deux miRs, miR-1246 et miR-185, permettant une bonne distinction des deux populations avec de bonnes performances en sensibilité et en spécificité. Certains miARNs ont montré une tendance à être corrélés à la survie et pourraient avoir une valeur pronostique. Six de ces miRs ont été déjà décrits comme étant dérégulés dans le mélanome (let-7b, miR-18a, miR-20a, miR-146a, miR-185 et miR-338) dans des études tissulaires ou cellulaires. Les miR-152 et miR-1246 n'ont pour l'instant pas été décrits dans le mélanome. Par contre, aucun de ces miRs n'a été décrit comme dérégulé dans le mélanome sous leur forme circulante (sérique ou plasmatique).

Dans un deuxième temps, nous nous sommes intéressés également à l'origine de ces miRs en les étudiant sur des biopsies de mélanome ou sur un panel de lignées cellulaires tumorales. Nous avons observé que les profils d'expression de ces miRs au niveau tissulaire et cellulaire étaient différents des profils plasmatiques. Seul le miR-338-3p est globalement dérégulé significativement de manière comparable dans les lignées et les plasmas même si leurs expressions sont très hétérogènes au niveau cellulaire. Ce miR pourrait avoir une dérégulation liée aux cellules tumorales. Les miRs-18a, -146a, -152, -185 et -1246 ont des dérégulations inverses entre le plasma et les cellules. En effet, les miRs-146a, -152 et -1246 sont surexprimés au niveau plasmatique et sont sous-exprimés au niveau cellulaire. Les miRs -18a et -185 sont sous-exprimés au niveau plasmatique et surexprimés au niveau tissulaire. Ces miRs pourraient avoir leur régulation dépendante du microenvironnement tumoral. Let-7b et miR-20a n'ont pas donné de résultat significatif au niveau cellulaire dans

notre étude. Let-7b est décrit comme sous-exprimé au niveau cellulaire et pourrait se comporter comme miR-185. Le miR-20a a été décrit comme surexprimé dans des lignées de mélanome et pourraient être comme miR-18a.

Nos analyses ont été réalisées par deux techniques différentes : d'une part par biopuces, d'autre part par RT-qPCR. L'analyse biopuces a permis d'étudier, lors de la phase d'identification, un grand nombre de miARNs dans la pathologie du mélanome où aucun miR plasmatique n'avait été décrit lors de l'initiation de cette étude. La technique par RT-qPCR a permis une analyse quantitative et simultanée d'un nombre plus restreint de miARNs, mais cependant important, par un système en microfluidique. Ces deux techniques sont complémentaires. La technique de RT-qPCR permet une confirmation d'une analyse biopuces et d'éliminer les faux positifs. Les miARNs retrouvés significativement à la fois par les deux techniques paraissent présenter une dérégulation d'autant plus robuste comme par exemple le miR-1246. Cependant la mise en évidence de miRs dérégulés de manière différente dans les deux techniques provient des avantages et des limites de chacune d'elles. Par exemple, les miR-27b ou -1290 semblent très intéressants sur les puces par contre les amorces de PCR étudiés au niveau plasmatique ne sont pas assez performantes. Les miRs retrouvés de manière exclusive chez les patients par les puces et qui ont pu être analysables en RT-qPCR ont tous été retrouvés à la fois chez les patients et les sujets contrôles. Aucun miR exclusif n'a été confirmé exclusif par RT-qPCR pouvant être expliqué par une meilleure sensibilité d'une technique d'amplification telle que la PCR par rapport aux puces.

Les populations de patients et de sujets sains sur l'ensemble de l'étude ont des effectifs équilibrés. Les effectifs ne sont pas très importants en comparaison à d'autres pathologies mais cependant assez conséquents pour une pathologie qui est relativement rare telle que le mélanome métastatique.

Pour le choix de la matrice, nous nous sommes appuyés sur des études réalisées préalablement dans notre équipe. Les travaux préliminaires ont mis en évidence une meilleure extraction sur le plasma par rapport au sérum. Les analyses présentent dans la littérature des miRs circulants les étudient soit dans le plasma soit dans le sérum. Certaines études montrent des résultats similaires sur ces deux matrices et d'autres des résultats ayant certaines différences.

La collection des échantillons plasmatiques a été strictement identique avec une centrifugation effectuée moins de 2 heures après le prélèvement puis les plasmas ont été rapidement décantés et congelés à -80°C. Les plasmas analysés avaient un aspect normal, aucun plasma n'était hémolysé. Les patients ayant des plasmas hémolysés étaient exclus d'emblée. Ces conditions préanalytiques sont capitales et doivent donc être maîtrisées pour tous les biomarqueurs sanguins car elles conditionnent les résultats analytiques entraînant de possibles biais.

Pour la RT-qPCR, notre choix de normalisation par trois miARNs de référence permet d'avoir une certaine robustesse des résultats. Ces miRs ont été montrés comme stables par l'algorithme GeNorm et l'utilisation de trois plutôt qu'un seul miR de référence permet d'éviter une variation dépendante d'un miR. Beaucoup d'études n'utilisent qu'un seul miR comme référence alors que malgré l'absence de standardisation le consensus actuel est d'utiliser plusieurs miRs de référence. Notre étude reste novatrice dans le domaine par l'absence de résultats à l'initiation de nos travaux et peu d'études comparables dans ce domaine. Elle permet de mettre en évidence un profil de deux miRs de manière sensible et spécifique discriminant les patients des sujets sains.

Cependant, un certain nombre de points critiques sont à souligner. La première est relative au mode de sélection des patients. Les échantillons sont issus d'une collection biologique constituée sur une cohorte de soins courants. Notre critère de sélection était la présence d'une métastase lors du prélèvement. Les patients, bien que tous métastatiques, étaient donc à des moments différents dans l'évolution de leur pathologie. Ceci est un biais dans les cas où le taux de miRs évoluent au cours de l'évolution de la maladie et donc du stade métastatique. Il apparaît nécessaire d'affiner, sur une nouvelle cohorte, le mode de constitution des cohortes en sélectionnant des patients au moment du diagnostic de la première métastase afin d'avoir une cohorte patients homogènes et de pouvoir réaliser une étude de survie sans biais. L'objectif principal de l'étude était de trouver un profil discriminant les patients des sujets sains. L'analyse de survie a été réalisée en exploitant la différence entre les dates d'inclusion et les dates des dernières nouvelles en fonction de l'état des dernières nouvelles. Notre étude est juste préliminaire et donne une indication de tendance. Elle ne permet pas de tirer de véritable conclusion et une véritable analyse pronostic est un véritable objectif futur. En ce qui concerne le statut des patients par rapport aux traitements de chimiothérapie relatif à leur pathologie. Certains étaient naïfs de tout traitement et d'autres étaient en cours de traitement mais avec la dernière prise datant

de plus de trois semaines. Afin d'homogénéiser la population, il aurait fallu que l'ensemble de patients soit dans des conditions identiques. Les populations malades et témoins ont une différence significative concernant l'âge. Nous avons fait une étude statistique afin de voir si les miRs étudiés étaient corrélés à l'âge ceux qui nous auraient invalidé l'ensemble des résultats. Les analyses n'ont montré aucune corrélation relative à l'âge. Des limites peuvent être émises sur les effectifs des puces (patients n=14, sains n=5) pouvant expliquer certaines discordances entre puces et RTqPCR. Pour certains patients (n=10), nous avons simultanément le plasma et la biopsie de la métastase. Ceci nous a permis de faire une analyse préliminaire sur les tissus tumoraux afin de rechercher si les miRs d'intérêts avaient une origine tumorale ou provenaient du microenvironnement. Les effectifs sont faibles et permet seulement d'émettre des hypothèses et doivent être réalisés sur des effectifs plus larges. Enfin, notre approche a été descriptive et nous n'avons fait, pour l'instant, aucune analyse fonctionnelle qui aurait permis de mieux appréhender l'intérêt des miRs significatif.

Au vu de l'ensemble des biais décrits, il apparaît nécessaire de confirmer les résultats sur une large cohorte indépendante de patients. Cette constitution nécessitera une inclusion multi-centre car du fait du petit nombre de patients atteints de mélanome métastatique le seul recrutement toulousain serait trop long. Les critères de sélection doivent être précis et plus stricts afin de limiter les biais d'interprétation tels que par exemple des patients pris au diagnostic du stade métastatique, des patients naïfs de tout traitement de chimiothérapie relatif à la pathologie. Une comparaison réalisée avec des sujets contrôles qui soient appariés en âge afin d'avoir une analyse indiscutable au niveau méthodologique.

Quand nous avons débuté notre étude, de nombreuses publications étaient sorties sur les miARNs dans le mélanome aux niveaux tissulaire et cellulaire par contre aucune publication n'avait été réalisée sur les miARNs circulants dans le mélanome. Depuis six analyses de miARNs circulants dans le mélanome ont été publiées à ce jour (**Tableau 19**). Une première étude a été publiée en 2011 comparant l'expression de miARNs extraits du sang total de patients atteints de mélanome par rapport à des sujets sains (Leidinger et al. 2011). L'analyse a été réalisée par microarray (Geniom Biochip miRNA) puis confirmée par RT-qPCR (TaqMan[®] microRNA assays, Applied Biosystems). Cette étude a analysé 55 échantillons dont 20 sujets sains et 35 patients atteints de mélanome à différents stades (31 stades I et II, 1 stade IIIB et 3 stades IV). Elle a porté sur 866 miARNs, 51 miARNs sont

apparus dérégulés : 21 sous-exprimés et 30 surexprimés. Le contrôle endogène utilisé est le RNU48. Ils ont montré qu'un groupe de 16 miRs permettait de distinguer les patients des sujets sains. Parmi les miARNs dérégulés, trois sont communs avec notre étude et leur dérégulation est comparable à la nôtre : les miR-18a, 20a sont sous-exprimés et le miR-146a est surexprimé. Cependant la comparaison est difficile du fait de la source différente des miARNs analysés entre le plasma et le sang total.

L'équipe de Kanemaru en 2011 a réalisé une analyse ciblant le miR-221 sérique (Kanemaru et al. 2011) connu comme augmenté au niveau tumoral dans le mélanome. Elle a porté sur 90 patients et 20 sujets sains. Ces patients présentaient des mélanomes à différents stades : du mélanome *in situ* au mélanome métastatique. La normalisation a été réalisée par rapport au cel miR-54. Ils ont montré que miR-221 sérique était augmenté chez les patients par rapport à des sujets sains et également chez des patients ayant des mélanomes invasifs mais pas dans les mélanomes *in situ* et que son taux était corrélé à l'indice de Breslow ainsi qu'à la récurrence post-opératoire. C'est la première étude proposant un miR comme marqueur sérique de diagnostic, pronostic et de récurrence dans le mélanome. Cette même équipe a montré ensuite qu'un profil de six miRs (miR-9, -145, -150, -155, -203 et -205) permettait de détecter la présence de métastases dans le mélanome (Shiiyama et al. 2013). Cette étude a été réalisée sur 27 patients : 16 mélanomes primaires et 11 mélanomes métastatiques, la normalisation été réalisée par le cel-miR-39. Une autre étude ciblant principalement le miR-21 a été réalisé en 2013 (Saldanha et al. 2013). Le miR-21 était largement décrit comme surexprimé dans les cancers dont le mélanome. Sa forme circulante était décrite augmentée dans différents cancers mais c'est la première étude de la forme circulante de miR-21 dans le mélanome. Cette étude montre que le taux du miR-21 est corrélé entre tissu tumoral et plasma et que son taux plasmatique est corrélé à la masse tumorale. Cette étude a été réalisée sur 30 patients présentant un mélanome à des stades différents et normalisée par le miR-191. L'équipe de Friedman a fait une analyse sur un large panel de miARNs comme biomarqueurs de pronostic et de récurrence post-opératoire dans le mélanome (Friedman et al. 2012). Dans cette étude, les auteurs ont montré qu'un groupe de cinq miRs (miR-15b, -33a, -150, -199a-5p et -424) a un potentiel pronostique sur le risque de récurrence. Ils ont également mis en évidence que quatre miRs (miR-103, -221, -222 et -423-5p) permettaient de détecter la récurrence post-opératoire. Pour le premier groupe de miRs, ils ont utilisé les mêmes types d'amorces LNA™ d'Exiqon que nous, par contre pour l'analyse sur le second groupe ils ont utilisé des amorces miARNs Taqman® (Applied Biosystem). Il faut noter qu'ils retrouvent une

variation du miR-103 avec des amorces Taqman® alors que dans notre étude le miR-103 est stable et est un des trois miRs nous servant de normalisation. Ce miR-103 nous avait été conseillé par la société Exiqon comme miR plasmatique de référence.

	Leidinger et al. 2010	Kanemaru et al. 2011	Friedman et al. 2012
sources échantillons nombre témoins sains nombre patients stades patients techniques nombre de miRs étudiés	sang total 20 35 35 (I, II), 1 (III), 3 (IV) microarray, RT-qPCR 866 miRNeasy (Qiagen) RNu48	sérum 20 90 48 (I, II), 17 (III), 12 (IV), 13 muqueux RT-qPCR 1 miRNeasy (Qiagen) cel-miR54	sérum 0 140 (80+50+10) 140 (I-II) RT-qPCR 355 miRNeasy (Qiagen)/miRvana isolation (Ambion)
extraction normalisation RT-qPCR appareil de RT-qPCR	Taqman miRNA assay (Applied)	Takara thermal cycler Dice (TP800) Takara Bio Inc	miRNA LNA (Exiqon)/Taqman miRNA (Applied) LightCycler 480 (Roche)/MPO Single Color (Biorad)
conclusions	51 miARNs dérégulés (21 ↓, 30 ↑) 16 miRs discriminant malade et sain: 186, 18a*, 145, 99a, 664, 501-5p, 378*, 295*, 1280, 365, 1248, 328, 422a, 304, 17*, 1e17d*	diagnostique (malades/sains, in situ/-IV) prognostic (corrélation Breslow, et récurrence post-opératoire) miR-221	prognostic (miR-15b, 33a, 150, 199a-5p, 42a) récurrence post-opératoire (miR-103, 221, 222, 423-5p)
	Saldanha et al. 2013	Shiyama et al. 2013	Greenberg et al. 2013
sources échantillons nombre témoins sains nombre patients stades patients techniques nombre de miRs étudiés	plasma 11 30 16 (0-II), 10 (III), 4 (IV) RT-qPCR	sérum 14 27 11 (IV), 16 (0-II) RT-qPCR 6	sérum 20 35 35 (IV) RT-qPCR 742
extraction normalisation RT-qPCR appareil de RT-qPCR	miRNeasy (Qiagen)/miRvana isolation (Ambion) miR-191 Taqman StepOne Plus (Applied)	miRNeasy (Qiagen) cel-miR-39 Takara Bio Inc	miRNeasy (Qiagen) miR-320a Exiqon
conclusions	miR-21 (corrélation tissu/plasma, masse tumorale), miR-211	miR-9, 145, 150, 155, 203, 205 détection métastase	comparaison sains et métastatiques perte 29c, 32a-3p

Tableau 19: Etudes publiées sur les miARNs circulants dans le mélanome.

Dans notre étude plasmatique nous n'avons pas eu de différence significative pour les miR-21, miR-145, miR-221, miR-222. Le miR-155 avait une amplification correcte mais il n'a pas pu être exploité car il y avait trop de données manquantes. Cependant, sur l'analyse des données que nous possédions nous avons observé une surexpression de ce

miR comme l'équipe de Shiyama (Shiyama et al. 2013). Les miRs-33a et -205 ont donné des amplifications tardives ne permettant pas une exploitation des analyses.

Une étude-pilote récente, publiée en juillet 2013, a comparé les profils sériques des sujets atteints de mélanome métastatique à des sujets sains (Greenberg et al. 2013). Ils ont observé une perte des miRs-29c et 324-3p chez les patients.

Pour notre analyse cellulaire, nous avons majoritairement retrouvé les résultats décrits dans la littérature pour les miRs connus. Seuls trois miRs n'ont pas été retrouvés significativement surexprimés comme décrit dans la bibliographie. Il s'agit des miRs-21, -221 et -222. Des analyses supplémentaires sont nécessaires.

L'ensemble de ces analyses sur les miARNs montrent la grande hétérogénéité des résultats qu'il est possible de rencontrer en parcourant la littérature. Les études, portant sur les miRs circulants dans le mélanome, ont toutes utilisé une technique de RT-qPCR. Elles ont soit réalisé une étude sur un large panel de miRs soit une étude ciblant directement un ou plusieurs miRs. Par contre, un certain nombre de paramètres est variable. Premièrement, la source des échantillons est soit du sang total soit du sérum ou soit du plasma. Deuxièmement, la taille et la composition des cohortes sont variables. Les cohortes d'études vont de 27 à 140 patients et de 11 à 20 sujets sains. Les stades des patients sont également variables allant du mélanome *in situ* au mélanome métastatique. Les protocoles d'analyse et les automates de RT-qPCR sont également différents. Les amorces utilisées proviennent de sociétés différentes : Applied Biosystem, Exiqon ou Takara Bio Company. Pour rappel, les miARNs sont de petites tailles et les séquences sont très proches, surtout pour ceux d'une même famille. Les amorces doivent donc être spécifiques du miARN mature et ne doivent pas s'hybrider sur les précurseurs ou des miARNs dont les séquences sont proches. Les moyens de normalisation sont différents : RNU48, des miR de *C. elegans* (cel miR-54 ou cel miR-39), miR-191. L'ensemble de ces divergences ne permet pas une comparaison directe des résultats et explique les différences observées. Ceci démontre à quel point une standardisation de la quantification des miARNs est nécessaire. A l'heure actuelle, il n'existe pas de consensus sur le dosage des miARNs. Notre étude a porté sur un groupe conséquent d'individus à la fois pour les patients (n=74) et les contrôles sains (n=64). La population malade était relativement homogène puisque tous étaient des stades métastatiques. Elle a étudié un large panel de miARNs par deux techniques différentes (microarray et RT-qPCR). Notre normalisation a été réalisée par trois miRs de référence permettant de s'affranchir de variation individuelle.

Cependant, nous avons des données discordantes avec la littérature concernant les miR-21, -221 et -222. Nous n'avons pas eu de variations significatives dans l'étude plasmatique et dans l'étude cellulaire pour ces miRs. Comme les discordances sont à la fois sur les données plasmatiques et cellulaires, il ne doit pas s'agir d'un problème de matrice. Des études complémentaires sont nécessaires afin d'étudier nos échantillons sur des amorces d'autres fabricants qu'Exiqon et voir si ces discordances viennent des amorces ou des échantillons utilisés. Nous avons réalisé une première étude avec des amorces différentes sur les mêmes échantillons. Nous avons observé une augmentation significative de miR-21 mais pas des miR-221 et -222.

Nous remarquons qu'un nombre important de miARNs dosés par RT-qPCR n'a pu être analysé. Les amplifications ont été bonnes et spécifiques pour 27 des 52 miARNs sur l'analyse plasmatique et 28 sur 47 pour l'analyse cellulaire. La moitié des amorces n'ont pu être exploitées soit parce qu'il n'y a pas eu d'amplification soit parce que les amplifications étaient tardives ou non spécifiques. La majorité des amorces ayant eu des problèmes d'amplifications est commune aux analyses plasmatiques et cellulaires. Les amorces n'ayant pas eu d'amplification semble être dû à un échec d'hybridation des amorces sur les ADNc cibles. Certains des miRs ont eu plusieurs pics sur les courbes de fusion indiquant l'amplification du miR mature mais également d'autres miRs ou précurseurs. L'amplification n'étant pas spécifique les résultats n'ont pas été exploités. De plus, certains miRs ont eu des résultats exploitables que pour les analyses plasmatiques (miR-143 et miR-1290) d'autres que sur les analyses cellulaires (miR-95, 125b, 182, 425*) pour la majorité, les résultats étaient non spécifiques peut-être dû à un problème de matrice. 15 miARNs provenaient de l'analyse sur puce. Nous les avons testées avec un protocole classique de RT-qPCR adapté pour le thermocycleur CFX96™ (Bio-Rad). Nous n'avons pas obtenu de meilleure amplification laissant supposer un problème d'amorce ou de matrice (données non montrées).

Pour les miRs les plus prometteurs au niveau de l'analyse BioPuces ou de la littérature, nous avons en projet de les tester avec d'autres amorces. Nous avons commencé l'analyse des miRs-27b et 95 ayant eu des résultats intéressants sur Puces avec des réactifs Qiagen sur l'automate de qPCR CFX96™ (Bio-Rad). Les résultats sont apparus significativement augmentés pour le miR-27b plasmatique ($p=0,05$ avec le test de Wilcoxon) par contre il n'y a pas eu d'amplification efficace pour le miR-95 (données non montrées). Le dosage du miR-95 plasmatique et cellulaire n'a pas donné lieu à une

amplification par contre il faut noter que les lignées cellulaires tumorales autre que le mélanome ont eu des amplifications. Le miR-95 n'est peut-être pas exprimé dans le mélanome. De plus, certains miRs plasmatiques ont eu une bonne amplification mais avaient trop de résultats manquants à la fois pour les patients et les sujets sains. Ils n'ont pas pu être inclus dans nos études biostatistiques. Il s'agit des miRs-34a, -155, -17, -141, -200c, -1290. Des analyses complémentaires sont nécessaires car certains présentaient des résultats encourageants.

L'objectif de ce travail était d'étudier l'expression des miARNs plasmatiques dans le mélanome au stade métastatique. Nous avons fait le choix de nous intéresser dans un premier temps qu'au stade métastatique afin de filtrer des miRs ayant un potentiel invasif. Nous aurions pu réaliser une autre approche visant à faire un screening sur les stades précoces et faire ensuite une comparaison avec les stades métastatiques. Cette stratégie n'a pas été choisie car elle nous aurait contraints à travailler sur un plus grand nombre de miRs et à filtrer des miRs invasifs. Nous avons réussi à mettre en évidence huit miRs dérégulés, un profil de deux miARNs permettant une discriminance intéressante ainsi que des miRs ayant une valeur pronostique. Nous nous sommes focalisés sur les miRs surexprimés dans l'analyse de BioPuces et mis de côté volontairement les sous-exprimés car notre objectif final est l'obtention du dosage plasmatique de biomarqueur. Le dosage de miRs sous-exprimés posant un problème de seuil de détection de la technique et de faux négatifs. Il est plus facile de doser une augmentation de biomarqueur qu'une diminution en pratique courante. Actuellement, pour les marqueurs tumoraux sériques utilisés en pratique courante, l'augmentation du marqueur signe une évolution de la maladie. Nous avons volontairement gardé les miRs décrits sous-exprimés dans la littérature pour notre analyse. En effet, les données bibliographiques d'une part ont été réalisées majoritairement sur des tissus et des cellules tumorales et d'autre part du fait de l'hétérogénéité des résultats du fait de la non standardisation des dosages.

Ces miARNs dérégulés permettent de discriminer les patients atteints de mélanome métastatique de sujets sains. Ces résultats ne permettent pas de connaître s'ils signent la pathologie du mélanome ou la métastase. Nous avons donc inclus des patients à des stades plus précoces (I, II, III) afin de comparer leurs expressions des miARNs plasmatiques à celles des stades métastatiques. Notre objectif sera également de confronter le profil des stades précoces à l'évolution clinique de ces patients notamment au passage ou non à un

stade métastatique. Les miRs signant le mélanome apparaissent avec la pathologie et pourraient être utiles au dépistage des sujets à risque. Les miRs signant la métastase ou le caractère invasif de la tumeur seraient également très utiles. Notamment, un miR apparaissant plus précocement que la métastase et prédictif du passage au stade invasif serait un atout majeur pour le clinicien. En effet, la détection très rapide des patients susceptibles d'évoluer vers un stade invasif permettrait un traitement précoce des patients avant le passage au stade métastatique où le pronostic est très sombre. Par contre, un miR d'apparition tardive après l'apparition de métastase serait peu utile du fait du faible arsenal thérapeutique efficace actuel. Les échantillons plasmatiques ont été collectés et doivent être analysés. Lorsque nous aurons identifié des miRs d'intérêt, nous ferons une étude sur un grand panel d'échantillons. Les études de survie ont pour l'instant été réalisées en comparant les taux des miRs à la survie après l'inclusion. Nous pourrions réaliser sur l'étude à grande échelle une analyse complète de survie et ainsi étudier le pouvoir pronostique de ces miRs.

Nous avons analysé l'expression cellulaire de nos miRs d'intérêt. L'objectif était double d'une part connaître l'origine de nos miRs et d'autre part faire des analyses fonctionnelles. Les données de la littérature indiquent que les miARNs circulants proviennent soit des cellules tumorales soit des cellules du microenvironnement tumoral (Ma et al. 2012). Nos analyses cellulaires des miARNs d'intérêt ont mis en évidence des miRs dont les expressions plasmatiques et cellulaires étaient discordantes laissant supposer qu'ils sont produits par le microenvironnement tumoral. Deux miRs ont des expressions assez concordantes entre analyse plasmatique et la moyenne des lignées cellulaires métastatiques laissant éventuellement penser à une origine tumorale. Des analyses sur ces miRs et les cellules du microenvironnement tumoral (fibroblastes, cellules endothéliales, cellules immunitaires) seront donc réalisées afin de tester ses hypothèses. En parallèle, nous avons également réalisé une étude préliminaire sur des biopsies tumorales sur les patients dont nous avons dosé les miRs plasmatiques. Nous avons cherché à voir si nos miRs étaient exprimés dans les tumeurs afin de tester également s'ils proviennent des cellules tumorales ou du microenvironnement. Notre étude a porté sur un faible nombre de tissus. Sur ces premiers résultats, le miR-338-3p apparaîtrait comme ayant une origine probablement tumorale ce qui ne serait pas le cas pour le miR-1246. Des analyses sur un plus grand nombre de tissus seront nécessaires pour pouvoir conclure qu'en à l'origine de ces miRs. Nous décrivons pour la première fois la dérégulation du miR-1246 dans le mélanome. Des taux sériques élevés ont été décrits dans les carcinomes oesophagiens

permettant de discriminer les individus malades par rapport à des sujets sains (Takeshita et al. 2013). Cette étude n'a pas retrouvé de surexpression tumorale de miR-1246. Les auteurs ont émis l'hypothèse que ce miR était libéré de manière sélective dans le sang indépendamment de son abondance tumorale. MiR-1246 pourrait également provenir du microenvironnement tumoral. Il a été retrouvé exprimé lors de l'activation des cellules immunitaire Natural Killer (Liu et al. 2012b). Contrairement à miR-1246, miR-185 est sous-exprimé dans les plasmas de mélanome métastatique et son expression est corrélée à une survie élevée, ce qui suggère qu'il peut avoir un effet protecteur. Greenberg et coll. ont décrit que miR-185 inhibait la prolifération de cellules de mélanome et l'invasion et avait un effet inhibiteur sur la croissance tumorale (Greenberg et al. 2011). miR-185 a également été décrit, dans d'autres cancers tels que le poumon non à petites cellules, de l'ovaire et du sein, inhibant la prolifération et la croissance des tumeurs (Imam et al. 2010; Takahashi et al. 2009).

Nous allons également étudier le rôle fonctionnel des miRs d'intérêt. Nous pourrions utiliser pour cela des miRs mimics ou des antagomirs et faire des analyses fonctionnelles afin de connaître leur rôle dans le mélanome. La connaissance et la compréhension de l'origine et du rôle des miRs d'intérêt permettront leur utilisation meilleure et adéquate en tant que biomarqueurs dans le mélanome.

CONCLUSIONS

L'amélioration de la prise en charge thérapeutique du mélanome est un objectif important du fait de son incidence et du mauvais pronostic des formes métastatiques. Elle passe notamment par la recherche de biomarqueurs prédictifs de l'évolution de la pathologie et de récurrence. Les microARNs circulants ont montré des résultats prometteurs en tant que biomarqueur. Cependant, il reste encore à mieux connaître et comprendre leur origine et leur rôle fonctionnel. Cela passe également par une standardisation de leur dosage indispensable pour leur utilisation en pratique courante.

Notre travail a testé un large panel de microARNs plasmatiques dans le mélanome. Notre étude a utilisé deux techniques différentes : les Biopuces et la RT-qPCR. Ce travail a porté sur 74 patients et 64 sujets sains. Il a mis en évidence des microARNs dérégulés dans le mélanome métastatique et notamment certains n'ayant jamais été décrits dans le mélanome. Un profil de deux miRs (miR-1246 et miR-185) a de bonnes performances pour discriminer les patients des sujets sains. Certains miRs apparaissent avoir un intérêt pronostique. Des analyses complémentaires sont nécessaires pour connaître si ces microARNs sont spécifiques de la pathologie ou du stade. Une meilleure connaissance de l'origine et du rôle fonctionnel de ces miARNs dans le mélanome est indispensable pour une meilleure utilisation en tant que biomarqueur.

L'ensemble de nos résultats montre que la détection du profil des deux miARNs dans le plasma pourrait devenir un biomarqueur diagnostique non invasif, sensible, reproductible et prédictif dans le mélanome métastatique, et doit être étudié sur des stades plus précoces afin de savoir s'il pourrait être utilisé à terme pour permettre l'identification précoce de patients à haut risque de récurrence.

ANNEXES

**Annexe 1 : Protocole d'extraction des ARNs plasmatiques pour analyse par
Biopuces (Trizol® + kit miRNeasy Qiagen)**

A partir de 10 ml de plasma

- ajouter 10 ml de **Trizol®**
- incuber 5 minutes à T° ambiante
- ajouter 2 ml de **chloroforme**
- agiter vigoureusement 15 secondes
- incuber 3 minutes à T° ambiante
- centrifuger 15 minutes à 12 000g à 4°C
- récupérer la phase aqueuse
- *ajouter un volume d'acide-phénol/Chloroforme
- mélanger par inversion, laisser reposer 2-3 minutes
- centrifuger 10 minutes à 12 000g à 4°C
- récupérer la phase aqueuse supérieure
- renouveler l'opération 2 fois à partir de *
- ajouter 1.5 volume d'Ethanol 100%, vortexer
- déposer 700 µl sur 16 colonnes miRNeasy QIAGEN
- centrifuger 15 secondes à 8 000g à température ambiante
- jeter les filtrats
- recommencer le dépôt sur colonne jusqu'à épuisement
- déposer 700 µl de tampon RWT par colonne
- centrifuger 15 secondes à 8 000g à température ambiante
- jeter le filtrat
- déposer 500 µl de tampon RPE par colonne
- centrifuger 15 secondes à 8 000g à température ambiante
- jeter le filtrat
- déposer 500 µl de tampon RPE par colonne
- centrifuger 2 minutes à 8 000g à température ambiante
- jeter le filtrat
- centrifuger 1 minute à 8 000g à température ambiante
- transférer les colonnes sur des tubes d'élution propres
- déposer 50 µl d'eau Rnase free par colonne
- centrifuger 1 minute à 8 000g à température ambiante
- pooler les 16 filtrats (16x50µl soit 800 µl) et mélanger
- ajouter 400 µl d'acétate de sodium 3M pH 5,2 (0,3 M final) + 2,8 ml d'Ethanol 100% froid (70% Ethanol final) + 8 µl d'Acrylamide linéaire (à 5 mg/ml – concentration finale à 10 µg/ml) – précipitation toute la nuit à 4°C dans la glace
- centrifuger 15 minutes à 12 000g à 4°C
- reprendre le culot par 1 ml d'Ethanol 70% et transvaser dans un eppendorf
- centrifuger 10 minutes à 12 000g à 4°C
- reprendre le culot par 1 ml d'Ethanol 70% (2^{ème} lavage)
- sécher au maximum le culot (en laissant ouvert le tube 15 minutes sur la paillasse après avoir enlevé le maximum d'éthanol)
- reprendre le culot par **12 µl** d'eau Rnase free.

**Annexe 2 : Protocole d'extraction des ARNs plasmatiques et cellulaires pour
analyse par RT-qPCR (Qiazol® + kit miRNeasy Qiagen)**

0.2 ml de plasma ou 1 boîte Pétri 100 mm avec 5 millions cellules

- ajouter **1ml** de **QIAzol®** et vortexer ou 700 µL de QIAzol® dans la boîte Pétri et récupérer le mélange (QIAzol® et cellules) dans un tube eppendorf.
- laisser incuber 5 minutes à température ambiante
- ajouter **2 µl de miSpike (IDT) à 150 nM**
- ajouter **0.2 ml de chloroforme** ou 140 µL chloroforme
- agiter vigoureusement 15 secondes
- incuber 3 minutes à température ambiante
- centrifuger 15 minutes à 12 000g à 4°C
- récupérer la phase aqueuse
- ajouter 1.5 volume d'Ethanol 100% et vortexer
- Déposer 700 µl sur la colonne miRNeasy QIAGEN
- Centrifuger 15 secondes à 8 000g à température ambiante
- Jeter le filtrat
- Recommencer le dépôt sur colonne jusqu'à épuisement
- Déposer 700 µl de tampon RWT sur la colonne
- Centrifuger 15 secondes à 8 000g à température ambiante
- Jeter le filtrat
- Déposer 500 µl de tampon RPE sur la colonne
- Centrifuger 15 secondes à 8 000g à température ambiante
- Jeter le filtrat
- Déposer 500 µl de tampon RPE sur la colonne
- Centrifuger 2 minutes à 8 000g à température ambiante
- Jeter le filtrat, changer de tube de collection
- Centrifuger 1 minute à 8 000g à température ambiante
- Transférer la colonne sur un tube d'élution propre
- Déposer **30 µl** d'eau Rnase free sur la colonne **à faire 2 fois (que pour cellules)**
- Centrifuger 1 minute à 8 000g à température ambiante
- Congélation -80°C

Annexe 3 : Protocole d'extraction des ARNs tissulaires inclus dans des blocs de paraffine pour analyse par RT-qPCR (kit miRNeasy FFPE Qiagen)

- Couper les blocs de paraffine: 4 coupes de 10 µm et les mettre dans un tube de 1.5 ml.
 - Ajouter 1 ml de xylène, vortexer vigoureusement pendant 10 secondes, centrifuger à vitesse maximale pendant 2 minutes et enlever le surnageant par pipettage.
 - Ajouter 1 ml d'éthanol (100%) au culot, vortexer et centrifuger à vitesse maximale pendant 2 minutes (le faire 2 fois)
 - Enlever le surnageant par pipettage.
 - Laisser le capuchon ouvert et laisser incuber à température ambiante pendant 10 minutes.
 - Ajouter 150 µl de buffer PKD et vortexer
 - Ajouter 10 µl protéinase K, mélanger doucement avec la pipette.
 - Incuber à 56°C pendant 15 minutes puis à 80°C pendant 15 minutes.
 - Mettre dans la glace pendant 3 minutes puis centrifuger pendant 15 minutes à 20 000g.
 - Transférer le surnageant dans un tube
- Ajouter 16 µl de Dnase booster Buffer et 10 µl de Dnase I Stock solution. Mélanger en retournant le tube. Centrifuger brièvement pour récupérer les résidus de liquide.

Incuber à température ambiante pendant 15 minutes.

- Ajouter 320 µl Buffer RBC et mélanger bien le lysat.
- Ajouter 1120 µl d'éthanol 100% et mélanger bien par pipettage. Ne pas centrifuger.
- Déposer 700 µl d'échantillons sur une colonne RNeasy MinElute spin. Centrifuger pendant 15 secondes à 8000g. Jeter le filtrat. Recommencer le dépôt sur colonne jusqu'à épuisement.
- Ajouter 500 µl Buffer RPE sur la colonne, centrifuger 15 secondes à 8000 g. Jeter le filtrat.
- Ajouter 500 µl Buffer RPE sur la colonne, centrifuger 2 minutes à 8000 g. Jeter le filtrat
- Changer le tube de collection, centrifuger à vitesse maximale pendant 5 minutes. Jeter le tube de collection.
- Transférer la colonne sur un tube d'élution propre
- Ajouter **25 µl** d'eau Rnase-free sur la colonne
- Centrifuger à vitesse maximale pendant 1 minute.

**Annexe 4 : Protocole Marquage et Hybridation et marquage des miARNs
plasmatiques sur puces LNA™.**

Pour **3 µg d'ARN total** dans un volume final de 10 µL.

-Préparation du Master Mix :

3,1 µl d'eau RNase free; 3,2 µl de tampon 10X; 10 µl de PEG à 50% ; 2 µl de RNA-linker-Cy3-dye à 100 µM (fluorochrome vert); 0,5 µL de RNase inhibiteur à 40 U/µl; 0,2 µl d'ATP à 0,2 M; 3 µl de T4 ARN ligase à 5U/µl (Ambion®).

-Ajouter les 10 µl d'ARN à 20 µl de Master Mix. Vortexer doucement et centrifugation rapide.

-Incuber à 4°C sur la nuit

-Dénaturer les ARNs marqués 5 minutes à 95°C

-Ajouter 70 µl de Mix Précipitation :

62 µl d'eau Rnase free; 10,3 µl de sodium acétate (3M, pH 5.5); 1 µl d'acrylamide linéaire à 5 µg/µl.

-Ajouter 400 µl d'éthanol 100% et incuber au moins 1 heure à -80°C

-Centrifuger à vitesse maximale (> 12000 rpm) pendant 30 minutes à 4°C

-Enlever le surnageant et ajouter 1 ml d'éthanol à 75%, vortexer et centrifuger 5 minutes (12000 rpm) à température ambiante.

-Enlever le surnageant et sécher le culot rapidement à 37°C

-Ajouter 150 µl d'eau et 300 µl de tampon d'hybridation (1.5X final)

Tampon d'hybridation 2X : 10x SCC, 0,2% SDS, 50% formamide, 200 µg/ml d'ADN de sperme de saumon.

-Dénaturer pendant 7 minutes à 95°C

-Centrifuger à vitesse maximale (> 12000 rpm) pendant 5 minutes à température ambiante

-Mettre les 450 µl d'ARN marqués dans une chambre d'hybridation contenant les lames à miARNs et hybrider sur la nuit à 54°C (Couvrir avec une lamelle).

-A la fin de l'hybridation, sortir les lames de la chambre d'hybridation et séparer lame et lamelle.

-Laver dans la solution de lavage 1 (2X SSC, 0,1% SDS) pendant 10 minutes à température ambiante puis laver dans la solution de lavage 2 (0,2X SSC) pendant 10 minutes à température ambiante puis laver dans la solution de lavage 3 (0,1X SSC) pendant 10 minutes à température ambiante

-Rincer très rapidement dans de l'eau double distillée et enlever l'eau restante en centrifugeant les lames 1 minute à 1500 rpm. Scanner les lames (Axon 4000B)

Annexe 5 : Tableau des données cliniques cohorte d'apprentissage

N°	sexe	age *(ans)	stade *	Breslow (mm) *	ulcération *	index mitotique > 1 mm ²	mutations *	date **	age ** (an)	stade **	traitement **	taux de LDH (UI/L)	Survie sans récidive (mois)	Survie après inclusion (I)	état aux dernières nouvelles
M2	0	54	IBs	1,8	0	NR	BRaF	04/05/2011	57	IV	0	179	40,7	516,00	0
M4	1	42	1a	0,65	ND	NR	BRaF	15/03/2011	44	IV	0	225	21,3	186,00	1
M10	1	60	IBs	ND	ND	NR	0	02/03/2011	61	IV	0	303	11,8	384,00	1
M27	0	59	IBs	1,35	1	NR	0	02/02/2011	62	IIIc	0	148	29,0	607,00	0
M29	0	56	IIIa	0,56	0	NR	0	25/01/2011	57	IIIc	0	168	7,1	615,00	0
M33	0	54	IIIa	2,5	0	NR	ND	11/05/2011	55	IV	0	181	12,0	96,00	0
M37	1	35	IIIc	4,5	1	NR	BRaF	06/03/2011	36	IV	1	194	14,7	315,00	1
M42	1	47	IBs	0,75	0	1	0	05/01/2011	48	IV	1	132	11,6	635,00	0
M45	0	79	IBs	1,75	0	1	ND	05/01/2011	80	IV	1	233	1,5	10,00	1
M46	0	74	IBs	1,55	0	NR	NRAS	18/01/2011	79	IIIc	0	139	37,0	606,00	1
M50	1	77	IBs	5,9	0	NR	0	02/02/2011	81	IIIc	0	168	25,8	607,00	0
M52	1	83	IBs	4,5	0	NR	0	08/06/2011	84	IIIc	1	226	9,6	481,00	0
M53	0	38	IBs	1,5	0	NR	0	05/01/2011	40	IIIc	1	130	19,6	635,00	0
M54	1	54	IIIc	5	1	1	NRAS	29/03/2011	55	IV	0	145	12,8	149,00	1
M55	1	64	IIIa	3,4	0	NR	0	19/01/2011	66	IIIc	0	130	10,7	621,00	0
M59	1	54	arcom	ND	ND	NR	0	14/01/2011	54	IV	1	205	0,0	24,00	1
M61	0	54	arcom	ND	ND	NR	ND	09/02/2011	59	IV	0	170	2,3	56,00	0
M64	1	76	IIIc	7	0	NR	0	16/02/2011	77	IIIc	0	791	7,4	28,00	1
M66	0	23	IIIa	3	0	NR	0	27/04/2011	27	IV	1	141	26,9	155,00	1
M67	0	77	arcom	ND	ND	NR	0	26/01/2011	79	IIIc	0	190	24,8	614,00	0
M74	0	44	IBs	2	0	NR	BRaF	29/06/2011	51	IV	0	167	78,5	382,00	1
M76	0	67	IBs	1,8	0	NR	0	30/06/2011	70	IV	1	409	31,2	227,00	1
M80	0	81	IIIc	5	0	NR	0	12/07/2011	85	IV	0	104	12,7	366,00	0
M81	0	77	arcom	ND	ND	NR	0	13/07/2011	79	IV	0	190	24,8	446,00	0
M82	1	63	IIIc	ND	ND	NR	0	17/08/2011	64	IV	1	382	1,9	28,00	1
M83	0	48	IIIc	10	0	NR	BRaF	17/08/2011	49	IV	1	162	9,9	218,00	1
M88	0	64	IIIa	0,6	0	NR	NRAS	31/08/2011	82	IV	1	369	219,5	45,00	1
M89	1	60	IIIa	3	0	NR	0	31/08/2011	65	IV	1	370	60,3	190,00	1
M92	1	56	IBs	3,1	1	NR	NRAS	04/09/2011	60	IV	0	183	42,2	393,00	0
médiante	0	59	-	2,5	-	NR	-	-	61	-	-	181	14,7	366,00	-
S1	0	-	-	-	-	-	-	-	40	-	-	179	-	-	-
S2	0	-	-	-	-	-	-	-	27	-	-	176	-	-	-
S3	0	-	-	-	-	-	-	-	25	-	-	173	-	-	-
S4	1	-	-	-	-	-	-	-	52	-	-	132	-	-	-
S5	1	-	-	-	-	-	-	-	41	-	-	119	-	-	-
S6	1	-	-	-	-	-	-	-	30	-	-	126	-	-	-
S7	0	-	-	-	-	-	-	-	29	-	-	167	-	-	-
S8	0	-	-	-	-	-	-	-	33	-	-	172	-	-	-
S9	1	-	-	-	-	-	-	-	44	-	-	140	-	-	-
S10	0	-	-	-	-	-	-	-	53	-	-	179	-	-	-
S11	1	-	-	-	-	-	-	-	38	-	-	177	-	-	-
S12	1	-	-	-	-	-	-	-	52	-	-	169	-	-	-
S13	0	-	-	-	-	-	-	-	46	-	-	168	-	-	-
S14	1	-	-	-	-	-	-	-	52	-	-	149	-	-	-
S15	1	-	-	-	-	-	-	-	51	-	-	153	-	-	-
S16	1	-	-	-	-	-	-	-	58	-	-	144	-	-	-

1 homme * diagnostic
0 femme ** antévision
M Malades
S Sams

1 présence
0 absence
ND non renseigné

médiante

1 oui
0 non

166

1 décès
0 en vie

Annexe 6 : Tableau des données cliniques cohorte de validation

N°	sexe	âge *	stade*	Breslow (mm)*	ulcération*	mutations*	index mitotique > 2 mm*	date **	âge**	Stade AJCC **	traitement **	taux de LDH (U/L)**	Survie sans métastase (mois)	Survie après inclusion (I)	état patient aux dernières nouvelles
M109	0	36	II	2		BRAF	NR	25/11/2012	44	IV	0	255	91,2	96	0
M110	1	46	I	1	0	BRAF	NR	23/11/2012	48	IV	0	331	16,0	292	0
M111	0	69	IV	>4		BRAF	NR	21/12/2012	71	IV	0	282	0,0	34	0
M112	0	58	IIIb	3,4	0	ND	NR	13/06/2012	61	IV	0	198	12,2	455	0
M113	0	69	IV	ND	ND	BRAF	NR	22/08/2012	69	IV	1	252	0,0	212	0
M114	0	70	IIa	1,8	0	BRAF	1	30/11/2011	75	IV	1	163	54,8	651	0
M115	0	39	IV	ND	ND	BRAF	NR	31/10/2012	39	IV	1	540	0,0	35	1
M116	1	70	II	2		BRAF	NR	06/06/2012	78	IV	1	740	76,1	101	1
M117	1	48	IIa	1,85	0	BRAF	NR	08/10/2011	62	IV	0	437	163,3	162	1
M118	0	59	IIIa	2,11	0	BRAF	1	14/03/2012	60	IIIc	0	223	6,9	546	0
M119	1	61	IV	ND	ND	0	NR	21/11/2012	61	IV	0	188	0,0	285	1
M121	1	39	IIIa	2,9	0	BRAF	NR	05/09/2012	41	IV	1	326	19,5	94	1
M122	0	26	IIIb	2,8	1	BRAF	1	10/10/2012	27	IV	0	152	16,3	336	0
M123	0	58	IIa	1,2	0	NRAS	NR	27/06/2012	60	IV	0	323	29,2	50	1
M124	1	60	IV	6	0	NRAS	1	21/11/2012	60	IV	1	502	0,0	124	0
M125	1	30	IIIa	3,2	1	BRAF	NR	25/07/2012	55	IV	1	919	299,3	413	1
M126	1	67	IIIa	5,9	0	BRAF	1	30/05/2012	69	IV	1	159	14,0	469	1
M127	1	69	IIIc	4,2	1	BRAF	1	06/06/2012	71	IV	1	188	11,3	462	0
M128	0	61	IIIb	2,2	1	BRAF	1	20/06/2012	63	IIIc	0	251	17,7	129	1
M129	1	25	II	1,8		BRAF	NR	26/10/2011	44	IV	0	171	176,5	496	0
M130	0	45	III	3,6		BRAF	NR	09/11/2011	45	IV	0	330	6,4	75	1
M131	1	66	IIa	1,1	0	BRAF	NR	27/06/2012	67	IV	1	421	1,3	349	0
M132	1	57	IIIc	6	1	BRAF	1	18/07/2012	59	IV	1	955	17,8	334	1
M133	1	54	IIb	1,9	1	0	NR	06/06/2012	60	IIIc	0	218	48,7	462	1
M134	0	85	IV	2,6		BRAF	NR	03/12/2012	86	IV	0	236	0,0	101	0
M135	1	66	IIIc	15	1	0	1	09/01/2013	67	IV	0	2389	11,2	190	0
M136	1	60	IV	ND	ND	0	NR	04/02/2013	60	IV	0	171	0,0	58	0
M137	0	77	IV	ND	ND	0	NR	07/02/2013	85	IV	0	203	0,0	20	0
M138	1	56	IV	ND	ND	BRAF	NR	23/01/2013	56	IV	0	186	0,0	231	0
M139	0	38	Ia	0,63	0	BRAF	NR	13/02/2013	43	IV	0	184	68,0	210	0
M140	1	72	IIb	1,2	1	0	1	23/01/2013	72	IV	0	170	7,4	5	0
médiane		69							60			251	12,2		
S17	1	-	-	-	-	-	-	07/10/2011	60	-	-	176		-	-
S18	1	-	-	-	-	-	-	07/10/2011	56	-	-	155		-	-
S19	1	-	-	-	-	-	-	07/10/2011	57	-	-	171		-	-
S20	1	-	-	-	-	-	-	07/10/2011	42	-	-	189		-	-
S21	0	-	-	-	-	-	-	12/11/2012	26	-	-	164		-	-
S22	1	-	-	-	-	-	-	12/11/2012	58	-	-	189		-	-
S23	1	-	-	-	-	-	-	12/11/2012	34	-	-	119		-	-
S24	1	-	-	-	-	-	-	12/11/2012	43	-	-	181		-	-
S25	0	-	-	-	-	-	-	12/11/2012	59	-	-	173		-	-
S26	1	-	-	-	-	-	-	12/11/2012	53	-	-	182		-	-
S27	1	-	-	-	-	-	-	12/11/2012	54	-	-	147		-	-
S28	1	-	-	-	-	-	-	12/11/2012	50	-	-	188		-	-
S29	0	-	-	-	-	-	-	12/11/2012	68	-	-	174		-	-
S30	1	-	-	-	-	-	-	12/11/2012	46	-	-	80		-	-
S31	1	-	-	-	-	-	-	14/11/2012	39	-	-	131		-	-
S32	1	-	-	-	-	-	-	14/11/2012	38	-	-	125		-	-
S34	0	-	-	-	-	-	-	14/11/2012	43	-	-	176		-	-
S36	1	-	-	-	-	-	-	14/11/2012	32	-	-	146		-	-
S38	1	-	-	-	-	-	-	14/11/2012	52	-	-	172		-	-
S39	0	-	-	-	-	-	-	14/11/2012	55	-	-	165		-	-
S40	1	-	-	-	-	-	-	14/11/2012	34	-	-	231		-	-
S41	1	-	-	-	-	-	-	15/11/2012	53	-	-	154		-	-
S42	1	-	-	-	-	-	-	15/11/2012	52	-	-	182		-	-
S43	1	-	-	-	-	-	-	15/11/2012	54	-	-	211		-	-
S44	1	-	-	-	-	-	-	15/11/2012	49	-	-	161		-	-
S45	1	-	-	-	-	-	-	15/11/2012	38	-	-	199		-	-
S46	1	-	-	-	-	-	-	15/11/2012	46	-	-	168		-	-
S47	0	-	-	-	-	-	-	15/11/2012	29	-	-	143		-	-
S48	1	-	-	-	-	-	-	15/11/2012	26	-	-	155		-	-
S49	0	-	-	-	-	-	-	15/11/2012	42	-	-	170		-	-
S50	1	-	-	-	-	-	-	15/11/2012	35	-	-	143		-	-
S52	0	-	-	-	-	-	-	30/11/2012	47	-	-	137		-	-
S53	0	-	-	-	-	-	-	30/11/2012	23	-	-	142		-	-
S54	0	-	-	-	-	-	-	30/11/2012	24	-	-	142		-	-
S55	0	-	-	-	-	-	-	30/11/2012	23	-	-	169		-	-
S56	0	-	-	-	-	-	-	18/01/2013	49	-	-	155		-	-
S57	0	-	-	-	-	-	-	18/01/2013	65	-	-	245		-	-
S58	0	-	-	-	-	-	-	18/01/2013	31	-	-	144		-	-
S59	0	-	-	-	-	-	-	01/02/2013	36	-	-	150		-	-
S60	0	-	-	-	-	-	-	01/02/2013	53	-	-	158		-	-
S61	0	-	-	-	-	-	-	01/02/2013	35	-	-	175		-	-
S62	0	-	-	-	-	-	-	01/02/2013	23	-	-	150		-	-
S63	0	-	-	-	-	-	-	01/02/2013	25	-	-	168		-	-
M: patients mélanome métastatique	1 = homme		* diagnost/c	NR non renseigné	1 = oui	1: présent			49	0 = non		165			1 = décès
S: Donneurs sains	0 = femme		**Inclusion		0 = non	0: absent				1 = oui (cycle en cours)					0 = en vie

Annexe 7 : Tableau récapitulatif des expressions relatives des miRs cellulaires par rapport à RNU6 sur l'automate BioMark™ Fluidigm

miR	NHEM	Mélanomes RGP		Mélanomes mélanostatiques							Glablastomes		Sein		Poumon		Ovaire										
		miR-181c	miR-181d	miR-181e	miR-181f	miR-181g	miR-181h	miR-181i	miR-181j	miR-181k	miR-181l	miR-181m	miR-181n	miR-181o	miR-181p	miR-181q	miR-181r	miR-181s									
miR-17	1.00	2.18	1.39	1.32	1.99	1.81	1.60	0.92	2.10	1.36	2.37	1.02	3.30	0.99	0.12	1.53	4.33	1.66	1.02	1.59	0.49	0.82	0.16	0.94	1.62		
miR-17	1.00	0.15	0.51	0.23	1.39	0.09	1.06	0.78	0.41	0.44	2.49	1.18	0.80	1.14	0.74	0.57	0.60	0.21	0.21	0.87	0.87	0.17	0.37	0.04	0.17	0.10	
miR-18a	1.00	0.29	1.05	0.62	1.27	0.26	1.10	1.51	1.36	1.01	3.49	5.75	1.58	5.03	0.90	2.02	1.52	0.43	0.85	1.63	0.64	0.55	0.23	0.86	0.16	0.35	
miR-20a	1.00	0.43	0.74	0.50	0.79	0.24	0.51	0.56	0.97	0.43	1.72	1.79	0.90	1.71	0.64	1.08	1.16	0.55	0.58	1.08	0.40	0.55	0.10	0.56	0.35	0.35	
miR-21	1.00	0.42	1.11	0.54	0.60	0.91	0.40	0.27	0.78	0.42	0.59	0.22	1.67	0.17	0.58	1.19	2.33	0.86	7.00	3.09	1.05	0.56	0.03	0.35	0.48	0.48	
miR-34a	1.00	0.08	1.09	0.60	0.05	0.40	0.93	0.79	0.05	0.95	0.34	0.01	1.16	0.21	0.02	0.58	0.00	0.79	0.70	1.03	0.41	0.01	0.10	0.19	0.00	0.00	
miR-92a-1*	1.00	0.52	1.18	1.49	1.83	0.44	0.80	1.11	1.56	0.59	4.85	4.93	2.15	4.48	1.38	1.84	4.86	2.54	0.88	2.60	1.23	1.12	0.20	1.08	0.86	0.78	
miR-125b	1.00	4.19	0.37	2.12	0.42	3.67	0.76	0.44	0.35	0.28	1.82	0.62	8.11	0.51	1.10	1.10	8.32	5.08	0.07	0.36	0.37	1.92	0.34	0.00	0.00	0.78	
miR-30a	1.00	0.54	0.40	0.33	0.36	0.21	0.40	0.45	0.34	0.28	0.00	0.00	0.71	0.41	0.55	0.53	0.04	0.09	0.00	0.01	0.44	0.61	0.21	0.00	0.51	0.51	
miR-141	1.00	0.06	0.54	0.42	1.03	0.98	0.45	0.29	0.38	0.71	2.61	0.75	2.41	0.41	0.74	0.50	0.35	0.24	2203.99	2164.28	1.28	1.44	197.68	100.02	0.09	0.09	
miR-145	1.00	1.38	0.00	5.86	0.15	0.56	2.51	0.09	1.76	0.00	98.70	1.00	2.19	104.82	22.93	220.14	4.48	8.79	0.41	0.08	0.21	0.53	0.93	0.32	0.00	0.00	
miR-146a	1.00	0.01	0.23	0.06	0.66	0.05	0.20	0.30	0.44	0.26	0.45	0.62	0.25	0.23	0.41	0.41	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00
miR-152	1.00	0.40	1.95	0.65	0.85	0.21	0.81	0.52	0.32	0.39	0.95	0.02	1.10	0.15	0.04	1.47	0.39	0.19	0.24	0.03	0.15	0.06	0.06	0.01	0.14	0.14	
miR-155	1.00	0.00	0.00	0.86	0.00	0.35	0.30	0.35	0.00	0.00	0.00	0.00	1.01	0.00	0.00	0.00	0.86	0.23	0.01	0.00	0.01	0.38	0.01	0.00	0.33	0.33	
miR-182	1.00	1.67	24.65	46.41	5.47	16.71	0.22	1.11	1.82	61.84	43.95	31.38	32.39	13.10	23.86	39.42	168.25	7.02	548.63	882.10	92.34	58.72	67.61	53.45	31.14	31.14	
miR-185	1.00	0.10	0.59	0.13	0.80	0.14	0.30	0.46	0.51	0.82	0.79	2.07	0.21	0.71	0.29	2.19	0.10	0.08	0.30	0.24	0.09	0.04	0.03	0.08	0.04	0.04	
miR-200c	1.00	0.59	8.70	1.81	3.02	5.17	2.15	0.92	0.54	1.33	18.73	9.22	13.57	2.77	4.96	5.91	2.75	1.04	7347.96	7335.81	7.45	6.64	700.60	495.51	0.96	0.96	
miR-214	1.00	0.01	0.02	210.58	0.23	30.46	0.48	0.04	0.18	0.01	0.14	0.06	137.22	0.21	0.31	0.11	1.96	0.13	0.56	0.12	0.06	0.05	0.19	0.16	0.00	0.00	
miR-221	1.00	0.18	0.11	0.57	0.06	0.38	0.45	0.34	0.07	0.14	0.37	0.28	1.05	0.16	0.45	0.73	0.69	0.48	0.01	0.00	0.20	1.01	0.07	0.17	0.35	0.35	
miR-222	1.00	0.57	2.22	1.53	0.97	2.73	0.60	0.38	0.71	1.94	1.40	1.13	2.97	0.36	0.88	3.80	1.18	0.73	0.05	0.00	0.45	1.60	0.17	0.57	0.57	0.57	
miR-338-3p	1.00	0.00	7.41	0.03	16.03	0.06	2.22	0.58	12.46	0.37	2.51	0.09	0.29	0.14	2.49	0.01	0.01	0.01	0.27	0.08	0.04	0.00	0.01	0.11	0.00	0.00	
miR-423*	1.00	0.40	0.82	1.10	0.33	0.39	0.64	0.77	0.25	0.26	1.79	1.04	0.59	0.61	1.74	1.03	0.53	0.21	2.59	2.38	0.35	0.27	0.33	0.40	0.29	0.29	
miR-1246	1.00	0.07	0.04	0.09	0.59	0.02	0.08	0.30	0.13	0.51	0.56	0.70	0.19	0.36	1.47	0.07	0.18	0.07	0.14	0.25	0.08	0.11	0.02	0.01	0.05	0.05	
miR-2110	1.00	0.24	0.57	0.18	0.42	0.10	0.66	0.39	0.47	0.89	0.95	1.54	0.71	0.87	0.40	0.72	0.46	0.31	1.66	0.46	0.35	0.22	0.20	0.48	0.17	0.17	

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

References

- Agarwala, S.S., Keilholz, U., Gilles, E., Bedikian, A.Y., Wu, J., Kay, R., Stein, C.A., Itri, L.M., Suci, S., & Eggermont, A.M. 2009. LDH correlation with survival in advanced melanoma from two large, randomised trials (Oblimersen GM301 and EORTC 18951). *Eur J Cancer*, 45, (10) 1807-1814 available from: PM:19419855
- Ai, J., Zhang, R., Li, Y., Pu, J., Lu, Y., Jiao, J., Li, K., Yu, B., Li, Z., Wang, R., Wang, L., Li, Q., Wang, N., Shan, H., Li, Z., & Yang, B. 2010. Circulating microRNA-1 as a potential novel biomarker for acute myocardial infarction. *Biochem.Biophys.Res Commun.*, 391, (1) 73-77 available from: PM:19896465
- Ambros, V. 2004. The functions of animal microRNAs. *Nature*, 431, (7006) 350-355 available from: PM:15372042
- Ambros, V., Lee, R.C., Lavanway, A., Williams, P.T., & Jewell, D. 2003. MicroRNAs and other tiny endogenous RNAs in *C. elegans*. *Curr.Biol*, 13, (10) 807-818 available from: PM:12747828
- Andersen, C.L., Jensen, J.L., & Orntoft, T.F. 2004. Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Res.*, 64, (15) 5245-5250 available from: PM:15289330
- Antonescu, C.R., Busam, K.J., Francone, T.D., Wong, G.C., Guo, T., Agaram, N.P., Besmer, P., Jungbluth, A., Gimbel, M., Chen, C.T., Veach, D., Clarkson, B.D., Paty, P.B., & Weiser, M.R. 2007. L576P KIT mutation in anal melanomas correlates with KIT protein expression and is sensitive to specific kinase inhibition. *Int J Cancer*, 121, (2) 257-264 available from: PM:17372901
- Appaiah, H.N., Goswami, C.P., Mina, L.A., Badve, S., Sledge, G.W., Jr., Liu, Y., & Nakshatri, H. 2011. Persistent upregulation of U6:SNORD44 small RNA ratio in the serum of breast cancer patients. *Breast Cancer Res*, 13, (5) R86 available from: PM:21914171
- Aravin, A.A., Lagos-Quintana, M., Yalcin, A., Zavolan, M., Marks, D., Snyder, B., Gaasterland, T., Meyer, J., & Tuschl, T. 2003. The small RNA profile during *Drosophila melanogaster* development. *Dev.Cell*, 5, (2) 337-350 available from: PM:12919683
- 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., & Tewari, M. 2011. Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. *Proc Natl Acad Sci U.S.A*, 108, (12) 5003-5008 available from: PM:21383194

- Asaga, S., Kuo, C., Nguyen, T., Terpenning, M., Giuliano, A.E., & Hoon, D.S. 2011. Direct serum assay for microRNA-21 concentrations in early and advanced breast cancer. *Clin Chem.*, 57, (1) 84-91 available from: PM:21036945
- Asangani, I.A., Rasheed, S.A., Nikolova, D.A., Leupold, J.H., Colburn, N.H., Post, S., & Allgayer, H. 2008. MicroRNA-21 (miR-21) post-transcriptionally downregulates tumor suppressor Pcd4 and stimulates invasion, intravasation and metastasis in colorectal cancer. *Oncogene*, 27, (15) 2128-2136 available from: PM:17968323
- Balch, C.M., Buzaid, A.C., Soong, S.J., Atkins, M.B., Cascinelli, N., Coit, D.G., Fleming, I.D., Gershenwald, J.E., Houghton, A., Jr., Kirkwood, J.M., McMasters, K.M., Mihm, M.F., Morton, D.L., Reintgen, D.S., Ross, M.I., Sober, A., Thompson, J.A., & Thompson, J.F. 2001. Final version of the American Joint Committee on Cancer staging system for cutaneous melanoma. *J.Clin.Oncol.*, 19, (16) 3635-3648 available from: PM:11504745
- Balch, C.M., Gershenwald, J.E., Soong, S.J., Thompson, J.F., Atkins, M.B., Byrd, D.R., Buzaid, A.C., Cochran, A.J., Coit, D.G., Ding, S., Eggermont, A.M., Flaherty, K.T., Gimotty, P.A., Kirkwood, J.M., McMasters, K.M., Mihm, M.C., Jr., Morton, D.L., Ross, M.I., Sober, A.J., & Sondak, V.K. 2009. Final version of 2009 AJCC melanoma staging and classification. *J Clin Oncol*, 27, (36) 6199-6206 available from: PM:19917835
- Bar-Eli, M. 2011. Searching for the 'melano-miRs': miR-214 drives melanoma metastasis. *EMBO J*, 30, (10) 1880-1881 available from: PM:21593728
- Barh, D., Malhotra, R., Ravi, B., & Sindhurani, P. 2010. MicroRNA let-7: an emerging next-generation cancer therapeutic. *Curr.Oncol*, 17, (1) 70-80 available from: PM:20179807
- Bartel, D.P. 2004. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell*, 116, (2) 281-297 available from: PM:14744438
- Bartel, D.P. 2009. MicroRNAs: target recognition and regulatory functions. *Cell*, 136, (2) 215-233 available from: PM:19167326
- Baskerville, S. & Bartel, D.P. 2005. Microarray profiling of microRNAs reveals frequent coexpression with neighboring miRNAs and host genes. *RNA*, 11, (3) 241-247 available from: PM:15701730
- Belot, A., Grosclaude, P., Bossard, N., Jouglu, E., Benhamou, E., Delafosse, P., Guizard, A.V., Molinie, F., Danzon, A., Bara, S., Bouvier, A.M., Tretarre, B., Binder-Foucard, F., Colonna, M., Daubisse, L., Hedelin, G., Launoy, G., Le, S.N., Maynadie, M., Monnerieu, A., Troussard, X., Faivre, J., Collignon, A., Janoray, I., Arveux, P., Buemi, A., Raverdy, N., Schwartz, C., Bovet, M., Cherie-Challine, L., Esteve, J., Remontet, L., & Velten, M. 2008. Cancer incidence and mortality in France over the period 1980-2005. *Rev Epidemiol Sante Publique*, 56, (3) 159-175 available from: PM:18547762
- Bemis, L.T., Chen, R., Amato, C.M., Classen, E.H., Robinson, S.E., Coffey, D.G., Erickson, P.F., Shellman, Y.G., & Robinson, W.A. 2008. MicroRNA-137 targets microphthalmia-associated transcription factor in melanoma cell lines. *Cancer Res*, 68, (5) 1362-1368 available from: PM:18316599
- Benoit-Corven, C. 2003. *Evolution de l'incidence du mélanome en Seine-Maritime sur une période de dix ans.* thèse de médecine Faculté mixte de médecine et de pharmacie de Rouen.

Bertolotto, C., Lesueur, F., Giuliano, S., Strub, T., de, L.M., Bille, K., Dessen, P., d'Hayer, B., Mohamdi, H., Remenieras, A., Maubec, E., de la Fouchardiere, A., Molinie, V., Vabres, P., Dalle, S., Poulalhon, N., Martin-Denavit, T., Thomas, L., Andry-Benzaquen, P., Dupin, N., Boitier, F., Rossi, A., Perrot, J.L., Labeille, B., Robert, C., Escudier, B., Caron, O., Brugieres, L., Saule, S., Gardie, B., Gad, S., Richard, S., Couturier, J., Teh, B.T., Ghiorzo, P., Pastorino, L., Puig, S., Badenas, C., Olsson, H., Ingvar, C., Rouleau, E., Lidereau, R., Bahadoran, P., Vielh, P., Corda, E., Blanche, H., Zelenika, D., Galan, P., Aubin, F., Bachollet, B., Becuwe, C., Berthet, P., Bignon, Y.J., Bonadona, V., Bonafe, J.L., Bonnet-Dupeyron, M.N., Cambazard, F., Chevrant-Breton, J., Coupier, I., Dalac, S., Demange, L., d'Incan, M., Dugast, C., Faivre, L., Vincent-Fetita, L., Gauthier-Villars, M., Gilbert, B., Grange, F., Grob, J.J., Humbert, P., Janin, N., Joly, P., Kerob, D., Lasset, C., Leroux, D., Levang, J., Limacher, J.M., Livideanu, C., Longy, M., Lortholary, A., Stoppa-Lyonnet, D., Mansard, S., Mansuy, L., Marrou, K., Mateus, C., Maugard, C., Meyer, N., Nogues, C., Souteyrand, P., Venat-Bouvet, L., Zattara, H., Chaudru, V., Lenoir, G.M., Lathrop, M., Davidson, I., Avril, M.F., Demenais, F., Ballotti, R., & Bressac-de, P.B. 2011. A SUMOylation-defective MITF germline mutation predisposes to melanoma and renal carcinoma. *Nature*, 480, (7375) 94-98 available from: PM:22012259

Besset, B. 2000. *Le fichier du mélanome en Auvergne*. thèse de médecine Université de Clermont-Ferrand - Faculté de médecine.

Bhattacharyya, S.N., Habermacher, R., Martine, U., Closs, E.I., & Filipowicz, W. 2006. Stress-induced reversal of microRNA repression and mRNA P-body localization in human cells. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.*, 71, 513-521 available from: PM:17381334

Bianchi, F., Nicassio, F., Marzi, M., Belloni, E., Dall'olio, V., Bernard, L., Pelosi, G., Maisonneuve, P., Veronesi, G., & Di Fiore, P.P. 2011. A serum circulating miRNA diagnostic test to identify asymptomatic high-risk individuals with early stage lung cancer. *EMBO Mol Med*, 3, (8) 495-503 available from: PM:21744498

Blower, P.E., Verducci, J.S., Lin, S., Zhou, J., Chung, J.H., Dai, Z., Liu, C.G., Reinhold, W., Lorenzi, P.L., Kaldjian, E.P., Croce, C.M., Weinstein, J.N., & Sadee, W. 2007. MicroRNA expression profiles for the NCI-60 cancer cell panel. *Mol Cancer Ther*, 6, (5) 1483-1491 available from: PM:17483436

Boeri, M., Verri, C., Conte, D., Roz, L., Modena, P., Facchinetti, F., Calabro, E., Croce, C.M., Pastorino, U., & Sozzi, G. 2011. MicroRNA signatures in tissues and plasma predict development and prognosis of computed tomography detected lung cancer. *Proc Natl Acad Sci U.S.A*, 108, (9) 3713-3718 available from: PM:21300873

Bohnsack, M.T., Czaplinski, K., & Gorlich, D. 2004. Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. *RNA*, 10, (2) 185-191 available from: PM:14730017

Bolstad, B.M., Irizarry, R.A., Astrand, M., & Speed, T.P. 2003. A comparison of normalization methods for high density oligonucleotide array data based on variance and bias. *Bioinformatics*, 19, (2) 185-193 available from: PM:12538238

Bommer, G.T., Gerin, I., Feng, Y., Kaczorowski, A.J., Kuick, R., Love, R.E., Zhai, Y., Giordano, T.J., Qin, Z.S., Moore, B.B., MacDougald, O.A., Cho, K.R., & Fearon, E.R. 2007. p53-mediated activation of miRNA34 candidate tumor-suppressor genes. *Curr. Biol*, 17, (15) 1298-1307 available from: PM:17656095

- Boniol, M., Autier, P., Boyle, P., & Gandini, S. 2012. Cutaneous melanoma attributable to sunbed use: systematic review and meta-analysis. *BMJ*, 345, e4757 available from: PM:22833605
- Bortolin-Cavaille, M.L., Dance, M., Weber, M., & Cavaille, J. 2009. C19MC microRNAs are processed from introns of large Pol-II, non-protein-coding transcripts. *Nucleic Acids Res*, 37, (10) 3464-3473 available from: PM:19339516
- Boyle, G.M., Woods, S.L., Bonazzi, V.F., Stark, M.S., Hacker, E., Aoude, L.G., Dutton-Regester, K., Cook, A.L., Sturm, R.A., & Hayward, N.K. 2011. Melanoma cell invasiveness is regulated by miR-211 suppression of the BRN2 transcription factor. *Pigment Cell Melanoma Res*, 24, (3) 525-537 available from: PM:21435193
- Braig, S., Mueller, D.W., Rothhammer, T., & Bosserhoff, A.K. 2010. MicroRNA miR-196a is a central regulator of HOX-B7 and BMP4 expression in malignant melanoma. *Cell Mol Life Sci*, 67, (20) 3535-3548 available from: PM:20480203
- Brase, J.C., Johannes, M., Schlomm, T., Falth, M., Haese, A., Steuber, T., Beissbarth, T., Kuner, R., & Sultmann, H. 2011. Circulating miRNAs are correlated with tumor progression in prostate cancer. *Int J Cancer*, 128, (3) 608-616 available from: PM:20473869
- Brase, J.C., Wuttig, D., Kuner, R., & Sultmann, H. 2010. Serum microRNAs as non-invasive biomarkers for cancer. *Mol Cancer*, 9, 306 available from: PM:21110877
- Brennecke, J., Stark, A., Russell, R.B., & Cohen, S.M. 2005. Principles of microRNA-target recognition. *PLoS.Biol*, 3, (3) e85 available from: PM:15723116
- Brodersen, P. & Voinnet, O. 2009. Revisiting the principles of microRNA target recognition and mode of action. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 10, (2) 141-148 available from: PM:19145236
- Bronisz, A., Godlewski, J., Wallace, J.A., Merchant, A.S., Nowicki, M.O., Mathsyaraja, H., Srinivasan, R., Trimboli, A.J., Martin, C.K., Li, F., Yu, L., Fernandez, S.A., Pecot, T., Rosol, T.J., Cory, S., Hallett, M., Park, M., Piper, M.G., Marsh, C.B., Yee, L.D., Jimenez, R.E., Nuovo, G., Lawler, S.E., Chiocca, E.A., Leone, G., & Ostrowski, M.C. 2012. Reprogramming of the tumour microenvironment by stromal PTEN-regulated miR-320. *Nat.Cell Biol.*, 14, (2) 159-167 available from: PM:22179046
- Brueckner, B., Stresemann, C., Kuner, R., Mund, C., Musch, T., Meister, M., Sultmann, H., & Lyko, F. 2007. The human let-7a-3 locus contains an epigenetically regulated microRNA gene with oncogenic function. *Cancer Res*, 67, (4) 1419-1423 available from: PM:17308078
- Bryant, R.J., Pawlowski, T., Catto, J.W., Marsden, G., Vessella, R.L., Rhee, B., Kuslich, C., Visakorpi, T., & Hamdy, F.C. 2012. Changes in circulating microRNA levels associated with prostate cancer. *Br J Cancer*, 106, (4) 768-774 available from: PM:22240788
- Buffa, F.M., Camps, C., Winchester, L., Snell, C.E., Gee, H.E., Sheldon, H., Taylor, M., Harris, A.L., & Ragoussis, J. 2011. microRNA-associated progression pathways and potential therapeutic targets identified by integrated mRNA and microRNA expression profiling in breast cancer. *Cancer Res*, 71, (17) 5635-5645 available from: PM:21737487

- Cai, X., Hagedorn, C.H., & Cullen, B.R. 2004. Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA*, 10, (12) 1957-1966 available from: PM:15525708
- Calin, G.A., Dumitru, C.D., Shimizu, M., Bichi, R., Zupo, S., Noch, E., Aldler, H., Rattan, S., Keating, M., Rai, K., Rassenti, L., Kipps, T., Negrini, M., Bullrich, F., & Croce, C.M. 2002. Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc.Natl Acad Sci U.S.A*, 99, (24) 15524-15529 available from: PM:12434020
- Calin, G.A., Ferracin, M., Cimmino, A., Di, L.G., Shimizu, M., Wojcik, S.E., Iorio, M.V., Visone, R., Sever, N.I., Fabbri, M., Iuliano, R., Palumbo, T., Pichiorri, F., Roldo, C., Garzon, R., Sevignani, C., Rassenti, L., Alder, H., Volinia, S., Liu, C.G., Kipps, T.J., Negrini, M., & Croce, C.M. 2005. A MicroRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*, 353, (17) 1793-1801 available from: PM:16251535
- Calin, G.A., Liu, C.G., Sevignani, C., Ferracin, M., Felli, N., Dumitru, C.D., Shimizu, M., Cimmino, A., Zupo, S., Dono, M., Dell'Aquila, M.L., Alder, H., Rassenti, L., Kipps, T.J., Bullrich, F., Negrini, M., & Croce, C.M. 2004a. MicroRNA profiling reveals distinct signatures in B cell chronic lymphocytic leukemias. *Proc.Natl Acad Sci U.S.A*, 101, (32) 11755-11760 available from: PM:15284443
- Calin, G.A., Sevignani, C., Dumitru, C.D., Hyslop, T., Noch, E., Yendamuri, S., Shimizu, M., Rattan, S., Bullrich, F., Negrini, M., & Croce, C.M. 2004b. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc.Natl Acad Sci U.S.A*, 101, (9) 2999-3004 available from: PM:14973191
- Camps, C., Buffa, F.M., Colella, S., Moore, J., Sotiriou, C., Sheldon, H., Harris, A.L., Gleadle, J.M., & Ragoussis, J. 2008. hsa-miR-210 Is induced by hypoxia and is an independent prognostic factor in breast cancer. *Clin.Cancer Res.*, 14, (5) 1340-1348 available from: PM:18316553
- Caramuta, S., Egyhazi, S., Rodolfo, M., Witten, D., Hansson, J., Larsson, C., & Lui, W.O. 2010. MicroRNA expression profiles associated with mutational status and survival in malignant melanoma. *J Invest Dermatol*, 130, (8) 2062-2070 available from: PM:20357817
- Chan, E., Patel, R., Nallur, S., Ratner, E., Bacchiocchi, A., Hoyt, K., Szpakowski, S., Godshalk, S., Ariyan, S., Sznol, M., Halaban, R., Krauthammer, M., Tuck, D., Slack, F.J., & Weidhaas, J.B. 2011. MicroRNA signatures differentiate melanoma subtypes. *Cell Cycle*, 10, (11) 1845-1852 available from: PM:21543894
- Chan, J.A., Krichevsky, A.M., & Kosik, K.S. 2005. MicroRNA-21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells. *Cancer Res*, 65, (14) 6029-6033 available from: PM:16024602
- Chang, T.C., Wentzel, E.A., Kent, O.A., Ramachandran, K., Mullendore, M., Lee, K.H., Feldmann, G., Yamakuchi, M., Ferlito, M., Lowenstein, C.J., Arking, D.E., Beer, M.A., Maitra, A., & Mendell, J.T. 2007. Transactivation of miR-34a by p53 broadly influences gene expression and promotes apoptosis. *Mol Cell*, 26, (5) 745-752 available from: PM:17540599

- Chapman, P.B., Hauschild, A., Robert, C., Haanen, J.B., Ascierto, P., Larkin, J., Dummer, R., Garbe, C., Testori, A., Maio, M., Hogg, D., Lorigan, P., Lebbe, C., Jouary, T., Schadendorf, D., Ribas, A., O'Day, S.J., Sosman, J.A., Kirkwood, J.M., Eggermont, A.M., Dreno, B., Nolop, K., Li, J., Nelson, B., Hou, J., Lee, R.J., Flaherty, K.T., & McArthur, G.A. 2011. Improved survival with vemurafenib in melanoma with BRAF V600E mutation. *N Engl J Med*, 364, (26) 2507-2516 available from: PM:21639808
- Chen, J., Feilolter, H.E., Pare, G.C., Zhang, X., Pemberton, J.G., Garady, C., Lai, D., Yang, X., & Tron, V.A. 2010. MicroRNA-193b represses cell proliferation and regulates cyclin D1 in melanoma. *Am J Pathol*, 176, (5) 2520-2529 available from: PM:20304954
- Chen, X., Ba, Y., Ma, L., Cai, X., Yin, Y., Wang, K., Guo, J., Zhang, Y., Chen, J., Guo, X., Li, Q., Li, X., Wang, W., Zhang, Y., Wang, J., Jiang, X., Xiang, Y., Xu, C., Zheng, P., Zhang, J., Li, R., Zhang, H., Shang, X., Gong, T., Ning, G., Wang, J., Zen, K., Zhang, J., & Zhang, C.Y. 2008a. Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Res*, 18, (10) 997-1006 available from: PM:18766170
- Chen, Y., Liu, W., Chao, T., Zhang, Y., Yan, X., Gong, Y., Qiang, B., Yuan, J., Sun, M., & Peng, X. 2008b. MicroRNA-21 down-regulates the expression of tumor suppressor PDCD4 in human glioblastoma cell T98G. *Cancer Lett.*, 272, (2) 197-205 available from: PM:19013014
- Chendrimada, T.P., Finn, K.J., Ji, X., Baillat, D., Gregory, R.I., Liebhaber, S.A., Pasquinelli, A.E., & Shiekhattar, R. 2007. MicroRNA silencing through RISC recruitment of eIF6. *Nature*, 447, (7146) 823-828 available from: PM:17507929
- Chendrimada, T.P., Gregory, R.I., Kumaraswamy, E., Norman, J., Cooch, N., Nishikura, K., & Shiekhattar, R. 2005. TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature*, 436, (7051) 740-744 available from: PM:15973356
- Cheng, H., Zhang, L., Cogdell, D.E., Zheng, H., Schetter, A.J., Nykter, M., Harris, C.C., Chen, K., Hamilton, S.R., & Zhang, W. 2011. Circulating plasma MiR-141 is a novel biomarker for metastatic colon cancer and predicts poor prognosis. *PLoS.One.*, 6, (3) e17745 available from: PM:21445232
- Chim, S.S., Shing, T.K., Hung, E.C., Leung, T.Y., Lau, T.K., Chiu, R.W., & Lo, Y.M. 2008. Detection and characterization of placental microRNAs in maternal plasma. *Clin Chem.*, 54, (3) 482-490 available from: PM:18218722
- Ciafre, S.A., Galardi, S., Mangiola, A., Ferracin, M., Liu, C.G., Sabatino, G., Negrini, M., Maira, G., Croce, C.M., & Farace, M.G. 2005. Extensive modulation of a set of microRNAs in primary glioblastoma. *Biochem.Biophys.Res Commun.*, 334, (4) 1351-1358 available from: PM:16039986
- Cimmino, A., Calin, G.A., Fabbri, M., Iorio, M.V., Ferracin, M., Shimizu, M., Wojcik, S.E., Aqeilan, R.I., Zupo, S., Dono, M., Rassenti, L., Alder, H., Volinia, S., Liu, C.G., Kipps, T.J., Negrini, M., & Croce, C.M. 2005. miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc.Natl Acad Sci U.S.A.*, 102, (39) 13944-13949 available from: PM:16166262

- Clark, W.H., Jr., Elder, D.E., Guerry, D., Epstein, M.N., Greene, M.H., & Van, H.M. 1984. A study of tumor progression: the precursor lesions of superficial spreading and nodular melanoma. *Hum.Pathol*, 15, (12) 1147-1165 available from: PM:6500548
- Collino, F., Deregibus, M.C., Bruno, S., Sterpone, L., Aghemo, G., Viltono, L., Tetta, C., & Camussi, G. 2010. Microvesicles derived from adult human bone marrow and tissue specific mesenchymal stem cells shuttle selected pattern of miRNAs. *PLoS.One.*, 5, (7) e11803 available from: PM:20668554
- Connolly, E.C., Van, D.K., Rogler, L.E., & Rogler, C.E. 2010. Overexpression of miR-21 promotes an in vitro metastatic phenotype by targeting the tumor suppressor RHOB. *Mol.Cancer Res.*, 8, (5) 691-700 available from: PM:20460403
- Corney, D.C., Flesken-Nikitin, A., Godwin, A.K., Wang, W., & Nikitin, A.Y. 2007. MicroRNA-34b and MicroRNA-34c are targets of p53 and cooperate in control of cell proliferation and adhesion-independent growth. *Cancer Res*, 67, (18) 8433-8438 available from: PM:17823410
- Corsten, M.F., Dennert, R., Jochems, S., Kuznetsova, T., Devaux, Y., Hofstra, L., Wagner, D.R., Staessen, J.A., Heymans, S., & Schroen, B. 2010. Circulating MicroRNA-208b and MicroRNA-499 reflect myocardial damage in cardiovascular disease. *Circ.Cardiovasc.Genet*, 3, (6) 499-506 available from: PM:20921333
- Costa, F.F., Seftor, E.A., Bischof, J.M., Kirschmann, D.A., Strizzi, L., Arndt, K., Bonaldo, M.F., Soares, M.B., & Hendrix, M.J. 2009. Epigenetically reprogramming metastatic tumor cells with an embryonic microenvironment. *Epigenomics.*, 1, (2) 387-398 available from: PM:20495621
- Cummins, J.M., He, Y., Leary, R.J., Pagliarini, R., Diaz, L.A., Jr., Sjoblom, T., Barad, O., Bentwich, Z., Szafranska, A.E., Labourier, E., Raymond, C.K., Roberts, B.S., Juhl, H., Kinzler, K.W., Vogelstein, B., & Velculescu, V.E. 2006. The colorectal microRNAome. *Proc.Natl Acad Sci U.S.A*, 103, (10) 3687-3692 available from: PM:16505370
- Dai, B., Meng, J., Peyton, M., Girard, L., Bornmann, W.G., Ji, L., Minna, J.D., Fang, B., & Roth, J.A. 2011. STAT3 mediates resistance to MEK inhibitor through microRNA miR-17. *Cancer Res.*, 71, (10) 3658-3668 available from: PM:21444672
- Dar, A.A., Majid, S., de, S.D., Nosrati, M., Bezrookove, V., & Kashani-Sabet, M. 2011. miRNA-205 suppresses melanoma cell proliferation and induces senescence via regulation of E2F1 protein. *J Biol Chem.*, 286, (19) 16606-16614 available from: PM:21454583
- Das, S.K., Sokhi, U.K., Bhutia, S.K., Azab, B., Su, Z.Z., Sarkar, D., & Fisher, P.B. 2010. Human polynucleotide phosphorylase selectively and preferentially degrades microRNA-221 in human melanoma cells. *Proc Natl Acad Sci U.S.A*, 107, (26) 11948-11953 available from: PM:20547861
- Davies, H., Bignell, G.R., Cox, C., Stephens, P., Edkins, S., Clegg, S., Teague, J., Woffendin, H., Garnett, M.J., Bottomley, W., Davis, N., Dicks, E., Ewing, R., Floyd, Y., Gray, K., Hall, S., Hawes, R., Hughes, J., Kosmidou, V., Menzies, A., Mould, C., Parker, A., Stevens, C., Watt, S., Hooper, S., Wilson, R., Jayatilake, H., Gusterson, B.A., Cooper, C., Shipley, J., Hargrave, D., Pritchard-Jones, K., Maitland, N., Chenevix-Trench, G., Riggins, G.J., Bigner, D.D., Palmieri, G., Cossu, A., Flanagan, A., Nicholson, A., Ho, J.W., Leung,

- S.Y., Yuen, S.T., Weber, B.L., Seigler, H.F., Darrow, T.L., Paterson, H., Marais, R., Marshall, C.J., Wooster, R., Stratton, M.R., & Futreal, P.A. 2002. Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature*, 417, (6892) 949-954 available from: PM:12068308
- Davies, M.A. & Samuels, Y. 2010. Analysis of the genome to personalize therapy for melanoma. *Oncogene*, 29, (41) 5545-5555 available from: PM:20697348
- Deichmann, M., Benner, A., Bock, M., Jackel, A., Uhl, K., Waldmann, V., & Naher, H. 1999. S100-Beta, melanoma-inhibiting activity, and lactate dehydrogenase discriminate progressive from nonprogressive American Joint Committee on Cancer stage IV melanoma. *J Clin Oncol*, 17, (6) 1891-1896 available from: PM:10561230
- Deng, Y., Deng, H., Bi, F., Liu, J., Bemis, L.T., Norris, D., Wang, X.J., & Zhang, Q. 2011. MicroRNA-137 targets carboxyl-terminal binding protein 1 in melanoma cell lines. *Int J Biol Sci*, 7, (1) 133-137 available from: PM:21278922
- Denli, A.M., Tops, B.B., Plasterk, R.H., Ketting, R.F., & Hannon, G.J. 2004. Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature*, 432, (7014) 231-235 available from: PM:15531879
- Dews, M., Homayouni, A., Yu, D., Murphy, D., Sevignani, C., Wentzel, E., Furth, E.E., Lee, W.M., Enders, G.H., Mendell, J.T., & Thomas-Tikhonenko, A. 2006. Augmentation of tumor angiogenesis by a Myc-activated microRNA cluster. *Nat Genet*, 38, (9) 1060-1065 available from: PM:16878133
- Diebel, K.W., Smith, A.L., & van Dyk, L.F. 2010. Mature and functional viral miRNAs transcribed from novel RNA polymerase III promoters. *RNA*, 16, (1) 170-185 available from: PM:19948768
- Dong, F. & Lou, D. 2012. MicroRNA-34b/c suppresses uveal melanoma cell proliferation and migration through multiple targets. *Mol Vis*, 18, 537-546 available from: PM:22419847
- Dong, J.T., Boyd, J.C., & Frierson, H.F., Jr. 2001. Loss of heterozygosity at 13q14 and 13q21 in high grade, high stage prostate cancer. *Prostate*, 49, (3) 166-171 available from: PM:11746261
- Donker, R.B., Mouillet, J.F., Nelson, D.M., & Sadovsky, Y. 2007. The expression of Argonaute2 and related microRNA biogenesis proteins in normal and hypoxic trophoblasts. *Mol.Hum.Reprod.*, 13, (4) 273-279 available from: PM:17327266
- Dostie, J., Mourelatos, Z., Yang, M., Sharma, A., & Dreyfuss, G. 2003. Numerous microRNPs in neuronal cells containing novel microRNAs. *RNA*, 9, (2) 180-186 available from: PM:12554860
- Duursma, A.M., Kedde, M., Schrier, M., le, S.C., & Agami, R. 2008. miR-148 targets human DNMT3b protein coding region. *RNA*, 14, (5) 872-877 available from: PM:18367714
- Eis, P.S., Tam, W., Sun, L., Chadburn, A., Li, Z., Gomez, M.F., Lund, E., & Dahlberg, J.E. 2005. Accumulation of miR-155 and BIC RNA in human B cell lymphomas. *Proc.Natl Acad Sci U.S.A*, 102, (10) 3627-3632 available from: PM:15738415

- Elson-Schwab, I., Lorentzen, A., & Marshall, C.J. 2010. MicroRNA-200 family members differentially regulate morphological plasticity and mode of melanoma cell invasion. *PLoS.One.*, 5, (10) available from: PM:20957176
- Esquela-Kerscher, A. & Slack, F.J. 2006. Oncomirs - microRNAs with a role in cancer. *Nat.Rev.Cancer*, 6, (4) 259-269 available from: PM:16557279
- Esquela-Kerscher, A., Trang, P., Wiggins, J.F., Patrawala, L., Cheng, A., Ford, L., Weidhaas, J.B., Brown, D., Bader, A.G., & Slack, F.J. 2008. The let-7 microRNA reduces tumor growth in mouse models of lung cancer. *Cell Cycle*, 7, (6) 759-764 available from: PM:18344688
- Etude PETRI (Prévention et Epidémiologie des tumeurs en région Ile-de-France) 2004, *Survie à 5 ans des cancers incidents en Ile-de-France, cohorte 1994-1999.*
- Eulalio, A., Behm-Ansmant, I., Schweizer, D., & Izaurralde, E. 2007. P-body formation is a consequence, not the cause, of RNA-mediated gene silencing. *Mol Cell Biol*, 27, (11) 3970-3981 available from: PM:17403906
- Fabbri, M., Garzon, R., Cimmino, A., Liu, Z., Zanesi, N., Callegari, E., Liu, S., Alder, H., Costinean, S., Fernandez-Cymering, C., Volinia, S., Guler, G., Morrison, C.D., Chan, K.K., Marcucci, G., Calin, G.A., Huebner, K., & Croce, C.M. 2007. MicroRNA-29 family reverts aberrant methylation in lung cancer by targeting DNA methyltransferases 3A and 3B. *Proc.Natl Acad Sci U.S.A*, 104, (40) 15805-15810 available from: PM:17890317
- Fargnoli, M.C., Argenziano, G., Zalaudek, I., & Peris, K. 2006. High- and low-penetrance cutaneous melanoma susceptibility genes. *Expert Rev Anticancer Ther*, 6, (5) 657-670 available from: PM:16759158
- Fargnoli, M.C., Gandini, S., Peris, K., Maisonneuve, P., & Raimondi, S. 2010. MC1R variants increase melanoma risk in families with CDKN2A mutations: a meta-analysis. *Eur J Cancer*, 46, (8) 1413-1420 available from: PM:20189796
- Fasanaro, P., D'Alessandra, Y., Di, S., V, Melchionna, R., Romani, S., Pompilio, G., Capogrossi, M.C., & Martelli, F. 2008. MicroRNA-210 modulates endothelial cell response to hypoxia and inhibits the receptor tyrosine kinase ligand Ephrin-A3. *J.Biol.Chem.*, 283, (23) 15878-15883 available from: PM:18417479
- Fecher, L.A., Amaravadi, R.K., & Flaherty, K.T. 2008. The MAPK pathway in melanoma. *Curr.Opin.Oncol*, 20, (2) 183-189 available from: PM:18300768
- Felicetti, F., Errico, M.C., Bottero, L., Segnalini, P., Stoppacciaro, A., Biffoni, M., Felli, N., Mattia, G., Petrini, M., Colombo, M.P., Peschle, C., & Care, A. 2008a. The promyelocytic leukemia zinc finger-microRNA-221/-222 pathway controls melanoma progression through multiple oncogenic mechanisms. *Cancer Res*, 68, (8) 2745-2754 available from: PM:18417445
- Felicetti, F., Errico, M.C., Segnalini, P., Mattia, G., & Care, A. 2008b. MicroRNA-221 and -222 pathway controls melanoma progression. *Expert Rev Anticancer Ther*, 8, (11) 1759-1765 available from: PM:18983236

- Ferlay, J., Shin, H.R., Bray, F., Forman, D., Mathers, C., & Parkin, D.M. 2010. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer*, 127, (12) 2893-2917 available from: PM:21351269
- Filipowicz, W., Bhattacharyya, S.N., & Sonenberg, N. 2008. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat Rev Genet*, 9, (2) 102-114 available from: PM:18197166
- Flaherty, K.T., Robert, C., Hersey, P., Nathan, P., Garbe, C., Milhem, M., Demidov, L.V., Hassel, J.C., Rutkowski, P., Mohr, P., Dummer, R., Trefzer, U., Larkin, J.M., Utikal, J., Dreno, B., Nyakas, M., Middleton, M.R., Becker, J.C., Casey, M., Sherman, L.J., Wu, F.S., Ouellet, D., Martin, A.M., Patel, K., & Schadendorf, D. 2012. Improved survival with MEK inhibition in BRAF-mutated melanoma. *N.Engl.J.Med.*, 367, (2) 107-114 available from: PM:22663011
- Forman, J.J., Legesse-Miller, A., & Collier, H.A. 2008. A search for conserved sequences in coding regions reveals that the let-7 microRNA targets Dicer within its coding sequence. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.*, 105, (39) 14879-14884 available from: PM:18812516
- Foss, K.M., Sima, C., Ugolini, D., Neri, M., Allen, K.E., & Weiss, G.J. 2011. miR-1254 and miR-574-5p: serum-based microRNA biomarkers for early-stage non-small cell lung cancer. *J Thorac Oncol*, 6, (3) 482-488 available from: PM:21258252
- Friedman, E.B., Shang, S., de Miera, E.V., Fog, J.U., Teilum, M.W., Ma, M.W., Berman, R.S., Shapiro, R.L., Pavlick, A.C., Hernando, E., Baker, A., Shao, Y., & Osman, I. 2012. Serum microRNAs as biomarkers for recurrence in melanoma. *J.Transl.Med.*, 10, 155 available from: PM:22857597
- Friedman, R.C., Farh, K.K., Burge, C.B., & Bartel, D.P. 2009. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res*, 19, (1) 92-105 available from: PM:18955434
- Friedman, R.J., Rigel, D.S., & Kopf, A.W. 1985. Early detection of malignant melanoma: the role of physician examination and self-examination of the skin. *CA Cancer J.Clin.*, 35, (3) 130-151 available from: PM:3921200
- Fu, G., Brkic, J., Hayder, H., & Peng, C. 2013. MicroRNAs in Human Placental Development and Pregnancy Complications. *Int J Mol Sci*, 14, (3) 5519-5544 available from: PM:23528856
- Fu, T.Y., Chang, C.C., Lin, C.T., Lai, C.H., Peng, S.Y., Ko, Y.J., & Tang, P.C. 2011. Let-7b-mediated suppression of basigin expression and metastasis in mouse melanoma cells. *Exp Cell Res*, 317, (4) 445-451 available from: PM:21087605
- Fukuda, T., Yamagata, K., Fujiyama, S., Matsumoto, T., Koshida, I., Yoshimura, K., Mihara, M., Naitou, M., Endoh, H., Nakamura, T., Akimoto, C., Yamamoto, Y., Katagiri, T., Foulds, C., Takezawa, S., Kitagawa, H., Takeyama, K., O'Malley, B.W., & Kato, S. 2007. DEAD-box RNA helicase subunits of the Drosha complex are required for processing of rRNA and a subset of microRNAs. *Nat Cell Biol*, 9, (5) 604-611 available from: PM:17435748
- Fulci, V., Chiaretti, S., Goldoni, M., Azzalin, G., Carucci, N., Tavolaro, S., Castellano, L., Magrelli, A., Citarella, F., Messina, M., Maggio, R., Peragine, N., Santangelo, S., Mauro,

- F.R., Landgraf, P., Tuschl, T., Weir, D.B., Chien, M., Russo, J.J., Ju, J., Sheridan, R., Sander, C., Zavolan, M., Guarini, A., Foa, R., & Macino, G. 2007. Quantitative technologies establish a novel microRNA profile of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 109, (11) 4944-4951 available from: PM:17327404
- Gabriely, G., Wurdinger, T., Kesari, S., Esau, C.C., Burchard, J., Linsley, P.S., & Krichevsky, A.M. 2008. MicroRNA 21 promotes glioma invasion by targeting matrix metalloproteinase regulators. *Mol Cell Biol*, 28, (17) 5369-5380 available from: PM:18591254
- Gaggioli, C. & Sahai, E. 2007. Melanoma invasion - current knowledge and future directions. *Pigment Cell Res*, 20, (3) 161-172 available from: PM:17516924
- Gallo, A., Tandon, M., Alevizos, I., & Illei, G.G. 2012. The majority of microRNAs detectable in serum and saliva is concentrated in exosomes. *PLoS.One.*, 7, (3) e30679 available from: PM:22427800
- Gandini, S., Sera, F., Cattaruzza, M.S., Pasquini, P., Abeni, D., Boyle, P., & Melchi, C.F. 2005a. Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: I. Common and atypical naevi. *Eur J Cancer*, 41, (1) 28-44 available from: PM:15617989
- Gandini, S., Sera, F., Cattaruzza, M.S., Pasquini, P., Picconi, O., Boyle, P., & Melchi, C.F. 2005b. Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: II. Sun exposure. *Eur J Cancer*, 41, (1) 45-60 available from: PM:15617990
- Gandini, S., Sera, F., Cattaruzza, M.S., Pasquini, P., Zanetti, R., Masini, C., Boyle, P., & Melchi, C.F. 2005c. Meta-analysis of risk factors for cutaneous melanoma: III. Family history, actinic damage and phenotypic factors. *Eur J Cancer*, 41, (14) 2040-2059 available from: PM:16125929
- Gao, W., Shen, H., Liu, L., Xu, J., Xu, J., & Shu, Y. 2011. MiR-21 overexpression in human primary squamous cell lung carcinoma is associated with poor patient prognosis. *J Cancer Res Clin Oncol*, 137, (4) 557-566 available from: PM:20508945
- Garofalo, M., Di, L.G., Romano, G., Nuovo, G., Suh, S.S., Ngankeu, A., Taccioli, C., Pichiorri, F., Alder, H., Secchiero, P., Gasparini, P., Gonelli, A., Costinean, S., Acunzo, M., Condorelli, G., & Croce, C.M. 2009. miR-221&222 regulate TRAIL resistance and enhance tumorigenicity through PTEN and TIMP3 downregulation. *Cancer Cell*, 16, (6) 498-509 available from: PM:19962668
- Garzon, R., Heaphy, C.E., Havelange, V., Fabbri, M., Volinia, S., Tsao, T., Zanesi, N., Kornblau, S.M., Marcucci, G., Calin, G.A., Andreeff, M., & Croce, C.M. 2009. MicroRNA 29b functions in acute myeloid leukemia. *Blood*, 114, (26) 5331-5341 available from: PM:19850741
- Gaur, A., Jewell, D.A., Liang, Y., Ridzon, D., Moore, J.H., Chen, C., Ambros, V.R., & Israel, M.A. 2007. Characterization of microRNA expression levels and their biological correlates in human cancer cell lines. *Cancer Res*, 67, (6) 2456-2468 available from: PM:17363563
- Gaziel-Sovran, A., Segura, M.F., Di, M.R., Collins, M.K., Hanniford, D., Vega-Saenz de, M.E., Rakus, J.F., Dankert, J.F., Shang, S., Kerbel, R.S., Bhardwaj, N., Shao, Y., Darvishian, F., Zavadil, J., Erlebacher, A., Mahal, L.K., Osman, I., & Hernando, E. 2011. miR-30b/30d

regulation of GalNAc transferases enhances invasion and immunosuppression during metastasis. *Cancer Cell*, 20, (1) 104-118 available from: PM:21741600

Giannakakis, A., Sandaltzopoulos, R., Greshock, J., Liang, S., Huang, J., Hasegawa, K., Li, C., O'Brien-Jenkins, A., Katsaros, D., Weber, B.L., Simon, C., Coukos, G., & Zhang, L. 2008. miR-210 links hypoxia with cell cycle regulation and is deleted in human epithelial ovarian cancer. *Cancer Biol. Ther.*, 7, (2) 255-264 available from: PM:18059191

Gibbins, D.J., Ciaudo, C., Erhardt, M., & Voinnet, O. 2009. Multivesicular bodies associate with components of miRNA effector complexes and modulate miRNA activity. *Nat Cell Biol*, 11, (9) 1143-1149 available from: PM:19684575

Gilad, S., Meiri, E., Yogev, Y., Benjamin, S., Lebanony, D., Yerushalmi, N., Benjamin, H., Kushnir, M., Cholkh, H., Melamed, N., Bentwich, Z., Hod, M., Goren, Y., & Chajut, A. 2008. Serum microRNAs are promising novel biomarkers. *PLoS. One.*, 3, (9) e3148 available from: PM:18773077

Giraldez, A.J., Mishima, Y., Rihel, J., Grocock, R.J., Van, D.S., Inoue, K., Enright, A.J., & Schier, A.F. 2006. Zebrafish MiR-430 promotes deadenylation and clearance of maternal mRNAs. *Science*, 312, (5770) 75-79 available from: PM:16484454

Glud, M. & Gniadecki, R. 2013. MicroRNAs in the pathogenesis of malignant melanoma. *J Eur Acad Dermatol Venereol.*, 27, (2) 142-150 available from: PM:22621697

Glud, M., Manfe, V., Biskup, E., Holst, L., Dirksen, A.M., Hastrup, N., Nielsen, F.C., Drzewiecki, K.T., & Gniadecki, R. 2011. MicroRNA miR-125b induces senescence in human melanoma cells. *Melanoma Res*, 21, (3) 253-256 available from: PM:21460750

Glud, M., Rossing, M., Hother, C., Holst, L., Hastrup, N., Nielsen, F.C., Gniadecki, R., & Drzewiecki, K.T. 2010. Downregulation of miR-125b in metastatic cutaneous malignant melanoma. *Melanoma Res*, 20, (6) 479-484 available from: PM:20827223

Goel, V.K., Lazar, A.J., Warneke, C.L., Redston, M.S., & Haluska, F.G. 2006. Examination of mutations in BRAF, NRAS, and PTEN in primary cutaneous melanoma. *J Invest Dermatol*, 126, (1) 154-160 available from: PM:16417231

Gonzales, J.C., Fink, L.M., Goodman, O.B., Jr., Symanowski, J.T., Vogelzang, N.J., & Ward, D.C. 2011. Comparison of circulating MicroRNA 141 to circulating tumor cells, lactate dehydrogenase, and prostate-specific antigen for determining treatment response in patients with metastatic prostate cancer. *Clin Genitourin. Cancer*, 9, (1) 39-45 available from: PM:21723797

Greenberg, E., Besser, M.J., Ben-Ami, E., Shapira-Frommer, R., Itzhaki, O., Zikich, D., Levy, D., Kubi, A., Eyal, E., Onn, A., Cohen, Y., Barshack, I., Schachter, J., & Markel, G. 2013. A comparative analysis of total serum miRNA profiles identifies novel signature that is highly indicative of metastatic melanoma: a pilot study. *Biomarkers*, 18, (6) 502-508 available from: PM:23902289

Greenberg, E., Hershkovitz, L., Itzhaki, O., Hajdu, S., Nemlich, Y., Ortenberg, R., Gefen, N., Edry, L., Modai, S., Keisari, Y., Besser, M.J., Schachter, J., Shomron, N., & Markel, G. 2011. Regulation of cancer aggressive features in melanoma cells by microRNAs. *PLoS. One.*, 6, (4) e18936 available from: PM:21541354

- Gregory, R.I. & Shiekhattar, R. 2005. MicroRNA biogenesis and cancer. *Cancer Res*, 65, (9) 3509-3512 available from: PM:15867338
- Gregory, R.I., Yan, K.P., Amuthan, G., Chendrimada, T., Doratotaj, B., Cooch, N., & Shiekhattar, R. 2004. The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature*, 432, (7014) 235-240 available from: PM:15531877
- Greither, T., Grochola, L.F., Udelnow, A., Lautenschlager, C., Wurl, P., & Taubert, H. 2010. Elevated expression of microRNAs 155, 203, 210 and 222 in pancreatic tumors is associated with poorer survival. *Int J Cancer*, 126, (1) 73-80 available from: PM:19551852
- Griffiths-Jones, S. 2004. The microRNA Registry. *Nucleic Acids Res*, 32, (Database issue) D109-D111 available from: PM:14681370
- Grignol, V., Fairchild, E.T., Zimmerer, J.M., Lesinski, G.B., Walker, M.J., Magro, C.M., Kacher, J.E., Karpa, V.I., Clark, J., Nuovo, G., Lehman, A., Volinia, S., Agnese, D.M., Croce, C.M., & Carson, W.E., III 2011. miR-21 and miR-155 are associated with mitotic activity and lesion depth of borderline melanocytic lesions. *Br J Cancer*, 105, (7) 1023-1029 available from: PM:21863027
- Grimson, A., Farh, K.K., Johnston, W.K., Garrett-Engele, P., Lim, L.P., & Bartel, D.P. 2007. MicroRNA targeting specificity in mammals: determinants beyond seed pairing. *Mol Cell*, 27, (1) 91-105 available from: PM:17612493
- Haflidottir, B.S., Bergsteinsdottir, K., Praetorius, C., & Steingrimsdottir, E. 2010. miR-148 regulates Mitf in melanoma cells. *PLoS.One.*, 5, (7) e11574 available from: PM:20644734
- Halna, J.M., Grandadam, M., & Buemi, A. 2000. Etude épidémiologique des cancers cutanés basée sur la population d'un département français de 1988 à 1996. *Nouv Dermatol*, 19, (1) 48-55
- Haluska, F.G., Tsao, H., Wu, H., Haluska, F.S., Lazar, A., & Goel, V. 2006. Genetic alterations in signaling pathways in melanoma. *Clin Cancer Res*, 12, (7 Pt 2) 2301s-2307s available from: PM:16609049
- Hamid, O., Robert, C., Daud, A., Hodi, F.S., Hwu, W.J., Kefford, R., Wolchok, J.D., Hersey, P., Joseph, R.W., Weber, J.S., Dronca, R., Gangadhar, T.C., Patnaik, A., Zarour, H., Joshua, A.M., Gergich, K., Elassaiss-Schaap, J., Algazi, A., Mateus, C., Boasberg, P., Tumei, P.C., Chmielowski, B., Ebbinghaus, S.W., Li, X.N., Kang, S.P., & Ribas, A. 2013. Safety and tumor responses with lambrolizumab (anti-PD-1) in melanoma. *N.Engl.J.Med.*, 369, (2) 134-144 available from: PM:23724846
- Han, J., Lee, Y., Yeom, K.H., Kim, Y.K., Jin, H., & Kim, V.N. 2004. The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes Dev.*, 18, (24) 3016-3027 available from: PM:15574589
- Han, J., Lee, Y., Yeom, K.H., Nam, J.W., Heo, I., Rhee, J.K., Sohn, S.Y., Cho, Y., Zhang, B.T., & Kim, V.N. 2006. Molecular basis for the recognition of primary microRNAs by the Drosha-DGCR8 complex. *Cell*, 125, (5) 887-901 available from: PM:16751099
- Han, J., Pedersen, J.S., Kwon, S.C., Belair, C.D., Kim, Y.K., Yeom, K.H., Yang, W.Y., Haussler, D., Blelloch, R., & Kim, V.N. 2009. Posttranscriptional crossregulation between Drosha and DGCR8. *Cell*, 136, (1) 75-84 available from: PM:19135890

Handolias, D., Salemi, R., Murray, W., Tan, A., Liu, W., Viros, A., Dobrovic, A., Kelly, J., & McArthur, G.A. 2010. Mutations in KIT occur at low frequency in melanomas arising from anatomical sites associated with chronic and intermittent sun exposure. *Pigment Cell Melanoma Res*, 23, (2) 210-215 available from: PM:20088873

Hanke, M., Hoefig, K., Merz, H., Feller, A.C., Kausch, I., Jocham, D., Warnecke, J.M., & Sczakiel, G. 2010. A robust methodology to study urine microRNA as tumor marker: microRNA-126 and microRNA-182 are related to urinary bladder cancer. *Urol.Oncol*, 28, (6) 655-661 available from: PM:19375957

HAS 2012 mélanome. HAS- ALD N°30 - Guide médecin sur le mélanome cutané. 1-2-0012.

Ref Type: Online Source

Hauschild, A., Grob, J.J., Demidov, L.V., Jouary, T., Gutzmer, R., Millward, M., Rutkowski, P., Blank, C.U., Miller, W.H., Jr., Kaempgen, E., Martin-Algarra, S., Karaszewska, B., Mauch, C., Chiarion-Sileni, V., Martin, A.M., Swann, S., Haney, P., Mirakhur, B., Guckert, M.E., Goodman, V., & Chapman, P.B. 2012. Dabrafenib in BRAF-mutated metastatic melanoma: a multicentre, open-label, phase 3 randomised controlled trial. *Lancet*, 380, (9839) 358-365 available from: PM:22735384

Hayashita, Y., Osada, H., Tatematsu, Y., Yamada, H., Yanagisawa, K., Tomida, S., Yatabe, Y., Kawahara, K., Sekido, Y., & Takahashi, T. 2005. A polycistronic microRNA cluster, miR-17-92, is overexpressed in human lung cancers and enhances cell proliferation. *Cancer Res*, 65, (21) 9628-9632 available from: PM:16266980

He, H., Jazdzewski, K., Li, W., Liyanarachchi, S., Nagy, R., Volinia, S., Calin, G.A., Liu, C.G., Franssila, K., Suster, S., Kloos, R.T., Croce, C.M., & de la Chapelle, A. 2005a. The role of microRNA genes in papillary thyroid carcinoma. *Proc.Natl Acad Sci U.S.A*, 102, (52) 19075-19080 available from: PM:16365291

He, L., He, X., Lim, L.P., de, S.E., Xuan, Z., Liang, Y., Xue, W., Zender, L., Magnus, J., Ridzon, D., Jackson, A.L., Linsley, P.S., Chen, C., Lowe, S.W., Cleary, M.A., & Hannon, G.J. 2007. A microRNA component of the p53 tumour suppressor network. *Nature*, 447, (7148) 1130-1134 available from: PM:17554337

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., & Hammond, S.M. 2005b. A microRNA polycistron as a potential human oncogene. *Nature*, 435, (7043) 828-833 available from: PM:15944707

Heegaard, N.H., Schetter, A.J., Welsh, J.A., Yoneda, M., Bowman, E.D., & Harris, C.C. 2012. Circulating micro-RNA expression profiles in early stage nonsmall cell lung cancer. *Int J Cancer*, 130, (6) 1378-1386 available from: PM:21544802

Heinemann, A., Zhao, F., Pechlivanis, S., Eberle, J., Steinle, A., Diederichs, S., Schadendorf, D., & Paschen, A. 2012. Tumor suppressive microRNAs miR-34a/c control cancer cell expression of ULBP2, a stress-induced ligand of the natural killer cell receptor NKG2D. *Cancer Res*, 72, (2) 460-471 available from: PM:22102694

- Heneghan, H.M., Miller, N., & Kerin, M.J. 2010a. Circulating miRNA signatures: promising prognostic tools for cancer. *J Clin Oncol*, 28, (29) e573-e574 available from: PM:20697097
- Heneghan, H.M., Miller, N., Lowery, A.J., Sweeney, K.J., & Kerin, M.J. 2009. MicroRNAs as Novel Biomarkers for Breast Cancer. *J Oncol*, 2009, 950201 available from: PM:19639033
- Heneghan, H.M., Miller, N., Lowery, A.J., Sweeney, K.J., Newell, J., & Kerin, M.J. 2010b. Circulating microRNAs as novel minimally invasive biomarkers for breast cancer. *Ann Surg*, 251, (3) 499-505 available from: PM:20134314
- Henke, J.I., Goergen, D., Zheng, J., Song, Y., Schuttler, C.G., Fehr, C., Junemann, C., & Niepmann, M. 2008. microRNA-122 stimulates translation of hepatitis C virus RNA. *EMBO J*, 27, (24) 3300-3310 available from: PM:19020517
- Hennessey, P.T., Sanford, T., Choudhary, A., Mydlarz, W.W., Brown, D., Adai, A.T., Ochs, M.F., Ahrendt, S.A., Mambo, E., & Califano, J.A. 2012. Serum microRNA biomarkers for detection of non-small cell lung cancer. *PLoS.One.*, 7, (2) e32307 available from: PM:22389695
- Hergenreider, E., Heydt, S., Treguer, K., Boettger, T., Horrevoets, A.J., Zeiher, A.M., Scheffer, M.P., Frangakis, A.S., Yin, X., Mayr, M., Braun, T., Urbich, C., Boon, R.A., & Dimmeler, S. 2012. Atheroprotective communication between endothelial cells and smooth muscle cells through miRNAs. *Nat Cell Biol*, 14, (3) 249-256 available from: PM:22327366
- Heywood, S.M., Kennedy, D.S., & Bester, A.J. 1974. 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, (6) 2428-2431 available from: PM:4526305
- Ho, A.S., Huang, X., Cao, H., Christman-Skieller, C., Bennewith, K., Le, Q.T., & Koong, A.C. 2010. Circulating miR-210 as a Novel Hypoxia Marker in Pancreatic Cancer. *Transl.Oncol*, 3, (2) 109-113 available from: PM:20360935
- Hocker, T. & Tsao, H. 2007. Ultraviolet radiation and melanoma: a systematic review and analysis of reported sequence variants. *Hum.Mutat.*, 28, (6) 578-588 available from: PM:17295241
- Hodi, F.S., O'Day, S.J., McDermott, D.F., Weber, R.W., Sosman, J.A., Haanen, J.B., Gonzalez, R., Robert, C., Schadendorf, D., Hassel, J.C., Akerley, W., van den Eertwegh, A.J., Lutzky, J., Lorigan, P., Vaubel, J.M., Linette, G.P., Hogg, D., Ottensmeier, C.H., Lebbe, C., Peschel, C., Quirt, I., Clark, J.I., Wolchok, J.D., Weber, J.S., Tian, J., Yellin, M.J., Nichol, G.M., Hoos, A., & Urba, W.J. 2010. Improved survival with ipilimumab in patients with metastatic melanoma. *N.Engl.J.Med.*, 363, (8) 711-723 available from: PM:20525992
- Holst, L.M., Kaczkowski, B., Glud, M., Futoma-Kazmierczak, E., Hansen, L.F., & Gniadecki, R. 2011. The microRNA molecular signature of atypic and common acquired melanocytic nevi: differential expression of miR-125b and let-7c. *Exp Dermatol*, 20, (3) 278-280 available from: PM:21166724
- Horner, M., Ries, L., Krapcho, M., Neyman, N., minou, R., & owlader, N. SEER. 2009. Ref Type: Online Source

- Hossain, A., Kuo, M.T., & Saunders, G.F. 2006. Mir-17-5p regulates breast cancer cell proliferation by inhibiting translation of AIB1 mRNA. *Mol Cell Biol*, 26, (21) 8191-8201 available from: PM:16940181
- Houbaviy, H.B., Murray, M.F., & Sharp, P.A. 2003. Embryonic stem cell-specific MicroRNAs. *Dev.Cell*, 5, (2) 351-358 available from: PM:12919684
- Hu, Z., Chen, J., Tian, T., Zhou, X., Gu, H., Xu, L., Zeng, Y., Miao, R., Jin, G., Ma, H., Chen, Y., & Shen, H. 2008. Genetic variants of miRNA sequences and non-small cell lung cancer survival. *J Clin Invest*, 118, (7) 2600-2608 available from: PM:18521189
- Hu, Z., Chen, X., Zhao, Y., Tian, T., Jin, G., Shu, Y., Chen, Y., Xu, L., Zen, K., Zhang, C., & Shen, H. 2010. Serum microRNA signatures identified in a genome-wide serum microRNA expression profiling predict survival of non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol*, 28, (10) 1721-1726 available from: PM:20194856
- Hu, Z., Dong, J., Wang, L.E., Ma, H., Liu, J., Zhao, Y., Tang, J., Chen, X., Dai, J., Wei, Q., Zhang, C., & Shen, H. 2012. Serum microRNA profiling and breast cancer risk: the use of miR-484/191 as endogenous controls. *Carcinogenesis*, 33, (4) 828-834 available from: PM:22298638
- Huang, Z., Huang, D., Ni, S., Peng, Z., Sheng, W., & Du, X. 2010. Plasma microRNAs are promising novel biomarkers for early detection of colorectal cancer. *Int J Cancer*, 127, (1) 118-126 available from: PM:19876917
- Hummel, R., Hussey, D.J., & Haier, J. 2010. MicroRNAs: predictors and modifiers of chemo- and radiotherapy in different tumour types. *Eur J Cancer*, 46, (2) 298-311 available from: PM:19948396
- Humphreys, D.T., Westman, B.J., Martin, D.I., & Preiss, T. 2005. MicroRNAs control translation initiation by inhibiting eukaryotic initiation factor 4E/cap and poly(A) tail function. *Proc Natl Acad Sci U.S.A*, 102, (47) 16961-16966 available from: PM:16287976
- Hunter, M.P., Ismail, N., Zhang, X., Aguda, B.D., Lee, E.J., Yu, L., Xiao, T., Schafer, J., Lee, M.L., Schmittgen, T.D., Nana-Sinkam, S.P., Jarjoura, D., & Marsh, C.B. 2008. Detection of microRNA expression in human peripheral blood microvesicles. *PLoS.One.*, 3, (11) e3694 available from: PM:19002258
- Hutvagner, G., McLachlan, J., Pasquinelli, A.E., Balint, E., Tuschl, T., & Zamore, P.D. 2001. A cellular function for the RNA-interference enzyme Dicer in the maturation of the let-7 small temporal RNA. *Science*, 293, (5531) 834-838 available from: PM:11452083
- Huynh, C., Segura, M.F., Gaziel-Sovran, A., Menendez, S., Darvishian, F., Chiriboga, L., Levin, B., Meruelo, D., Osman, I., Zavadil, J., Marcusson, E.G., & Hernando, E. 2011. Efficient in vivo microRNA targeting of liver metastasis. *Oncogene*, 30, (12) 1481-1488 available from: PM:21102518
- Hwang, H.W. & Mendell, J.T. 2006. MicroRNAs in cell proliferation, cell death, and tumorigenesis. *Br J Cancer*, 94, (6) 776-780 available from: PM:16495913
- Igoucheva, O. & Alexeev, V. 2009. MicroRNA-dependent regulation of cKit in cutaneous melanoma. *Biochem.Biophys.Res Commun.*, 379, (3) 790-794 available from: PM:19126397

Imam, J.S., Buddavarapu, K., Lee-Chang, J.S., Ganapathy, S., Camosy, C., Chen, Y., & Rao, M.K. 2010. MicroRNA-185 suppresses tumor growth and progression by targeting the Six1 oncogene in human cancers. *Oncogene*, 29, (35) 4971-4979 available from: PM:20603620

InfoCancer. InfoCancer. 4-1-0014.

Ref Type: Online Source

Institut National du Cancer. Recommandation mélanome cutané métastatique- Septembre 2013. 4-1-0014.

Ref Type: Online Source

Institut National du Cancer. La situation du cancer en France en 2012. 20-12-2013.

Ref Type: Online Source

Iorio, M.V., Casalini, P., Tagliabue, E., Menard, S., & Croce, C.M. 2008. MicroRNA profiling as a tool to understand prognosis, therapy response and resistance in breast cancer. *Eur.J.Cancer*, 44, (18) 2753-2759 available from: PM:19022662

Iorio, M.V. & Croce, C.M. 2009. MicroRNAs in cancer: small molecules with a huge impact. *J.Clin.Oncol.*, 27, (34) 5848-5856 available from: PM:19884536

Iorio, M.V., Ferracin, M., Liu, C.G., Veronese, A., Spizzo, R., Sabbioni, S., Magri, E., Pedriali, M., Fabbri, M., Campiglio, M., Menard, S., Palazzo, J.P., Rosenberg, A., Musiani, P., Volinia, S., Nenci, I., Calin, G.A., Querzoli, P., Negrini, M., & Croce, C.M. 2005. MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. *Cancer Res*, 65, (16) 7065-7070 available from: PM:16103053

Iorio, M.V., Visone, R., Di, L.G., Donati, V., Petrocca, F., Casalini, P., Taccioli, C., Volinia, S., Liu, C.G., Alder, H., Calin, G.A., Menard, S., & Croce, C.M. 2007. MicroRNA signatures in human ovarian cancer. *Cancer Res*, 67, (18) 8699-8707 available from: PM:17875710

Jakob, J.A., Bassett, R.L., Jr., Ng, C.S., Curry, J.L., Joseph, R.W., Alvarado, G.C., Rohlf, M.L., Richard, J., Gershenwald, J.E., Kim, K.B., Lazar, A.J., Hwu, P., & Davies, M.A. 2012. NRAS mutation status is an independent prognostic factor in metastatic melanoma. *Cancer*, 118, (16) 4014-4023 available from: PM:22180178

Jiang, S., Zhang, H.W., Lu, M.H., He, X.H., Li, Y., Gu, H., Liu, M.F., & Wang, E.D. 2010. MicroRNA-155 functions as an OncomiR in breast cancer by targeting the suppressor of cytokine signaling 1 gene. *Cancer Res*, 70, (8) 3119-3127 available from: PM:20354188

Johnson, C.D., Esquela-Kerscher, A., Stefani, G., Byrom, M., Kelnar, K., Ovcharenko, D., Wilson, M., Wang, X., Shelton, J., Shingara, J., Chin, L., Brown, D., & Slack, F.J. 2007. The let-7 microRNA represses cell proliferation pathways in human cells. *Cancer Res*, 67, (16) 7713-7722 available from: PM:17699775

Johnson, S.M., Grosshans, H., Shingara, J., Byrom, M., Jarvis, R., Cheng, A., Labourier, E., Reinert, K.L., Brown, D., & Slack, F.J. 2005. RAS is regulated by the let-7 microRNA family. *Cell*, 120, (5) 635-647 available from: PM:15766527

Jukic, D.M., Rao, U.N., Kelly, L., Skaf, J.S., Drogowski, L.M., Kirkwood, J.M., & Panelli, M.C. 2010. MicroRNA profiling analysis of differences between the melanoma of young adults and older adults. *J Transl.Med*, 8, 27 available from: PM:20302635

- Kaduthanam, S., Gade, S., Meister, M., Brase, J.C., Johannes, M., Dienemann, H., Warth, A., Schnabel, P.A., Herth, F.J., Sultmann, H., Muley, T., & Kuner, R. 2013. Serum miR-142-3p is associated with early relapse in operable lung adenocarcinoma patients. *Lung Cancer* available from: PM:23410826
- Kan, C.W., Hahn, M.A., Gard, G.B., Maidens, J., Huh, J.Y., Marsh, D.J., & Howell, V.M. 2012. Elevated levels of circulating microRNA-200 family members correlate with serous epithelial ovarian cancer. *BMC Cancer*, 12, 627 available from: PM:23272653
- Kanemaru, H., Fukushima, S., Yamashita, J., Honda, N., Oyama, R., Kakimoto, A., Masuguchi, S., Ishihara, T., Inoue, Y., Jinnin, M., & Ihn, H. 2011. The circulating microRNA-221 level in patients with malignant melanoma as a new tumor marker. *J Dermatol Sci*, 61, (3) 187-193 available from: PM:21273047
- Karreth, F.A., Tay, Y., Perna, D., Ala, U., Tan, S.M., Rust, A.G., DeNicola, G., Webster, K.A., Weiss, D., Perez-Mancera, P.A., Krauthammer, M., Halaban, R., Provero, P., Adams, D.J., Tuveson, D.A., & Pandolfi, P.P. 2011. In vivo identification of tumor-suppressive PTEN ceRNAs in an oncogenic BRAF-induced mouse model of melanoma. *Cell*, 147, (2) 382-395 available from: PM:22000016
- Karube, Y., Tanaka, H., Osada, H., Tomida, S., Tatematsu, Y., Yanagisawa, K., Yatabe, Y., Takamizawa, J., Miyoshi, S., Mitsudomi, T., & Takahashi, T. 2005. Reduced expression of Dicer associated with poor prognosis in lung cancer patients. *Cancer Sci*, 96, (2) 111-115 available from: PM:15723655
- Kertesz, M., Iovino, N., Unnerstall, U., Gaul, U., & Segal, E. 2007. The role of site accessibility in microRNA target recognition. *Nat Genet*, 39, (10) 1278-1284 available from: PM:17893677
- Kim, V.N. 2005. MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 6, (5) 376-385 available from: PM:15852042
- Kim, V.N., Han, J., & Siomi, M.C. 2009. Biogenesis of small RNAs in animals. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 10, (2) 126-139 available from: PM:19165215
- Kiriakidou, M., Tan, G.S., Lamprinaki, S., De Planell-Saguer, M., Nelson, P.T., & Mourelatos, Z. 2007. An mRNA m7G cap binding-like motif within human Ago2 represses translation. *Cell*, 129, (6) 1141-1151 available from: PM:17524464
- Kitago, M., Martinez, S.R., Nakamura, T., Sim, M.S., & Hoon, D.S. 2009. Regulation of RUNX3 tumor suppressor gene expression in cutaneous melanoma. *Clin Cancer Res*, 15, (9) 2988-2994 available from: PM:19336521
- Kogure, T., Lin, W.L., Yan, I.K., Braconi, C., & Patel, T. 2011. Intercellular nanovesicle-mediated microRNA transfer: a mechanism of environmental modulation of hepatocellular cancer cell growth. *Hepatology*, 54, (4) 1237-1248 available from: PM:21721029
- Kong, W., Yang, H., He, L., Zhao, J.J., Coppola, D., Dalton, W.S., & Cheng, J.Q. 2008. MicroRNA-155 is regulated by the transforming growth factor beta/Smad pathway and contributes to epithelial cell plasticity by targeting RhoA. *Mol Cell Biol*, 28, (22) 6773-6784 available from: PM:18794355

- Kosaka, N., Iguchi, H., Hagiwara, K., Yoshioka, Y., Takeshita, F., & Ochiya, T. 2013. Neutral Sphingomyelinase 2 (nSMase2)-dependent Exosomal Transfer of Angiogenic MicroRNAs Regulate Cancer Cell Metastasis. *J Biol Chem.*, 288, (15) 10849-10859 available from: PM:23439645
- Kosaka, N., Iguchi, H., & Ochiya, T. 2010a. Circulating microRNA in body fluid: a new potential biomarker for cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Sci*, 101, (10) 2087-2092 available from: PM:20624164
- Kosaka, N., Iguchi, H., Yoshioka, Y., Hagiwara, K., Takeshita, F., & Ochiya, T. 2012. Competitive interactions of cancer cells and normal cells via secretory microRNAs. *J Biol Chem.*, 287, (2) 1397-1405 available from: PM:22123823
- Kosaka, N., Iguchi, H., Yoshioka, Y., Takeshita, F., Matsuki, Y., & Ochiya, T. 2010b. Secretory mechanisms and intercellular transfer of microRNAs in living cells. *J Biol Chem.*, 285, (23) 17442-17452 available from: PM:20353945
- Kosaka, N. & Ochiya, T. 2011. Unraveling the Mystery of Cancer by Secretory microRNA: Horizontal microRNA Transfer between Living Cells. *Front Genet*, 2, 97 available from: PM:22303391
- Kovalchuk, O., Filkowski, J., Meservy, J., Ilnytskyy, Y., Tryndyak, V.P., Chekhun, V.F., & Pogribny, I.P. 2008. Involvement of microRNA-451 in resistance of the MCF-7 breast cancer cells to chemotherapeutic drug doxorubicin. *Mol Cancer Ther*, 7, (7) 2152-2159 available from: PM:18645025
- Kulshreshtha, R., Ferracin, M., Wojcik, S.E., Garzon, R., Alder, H., Agosto-Perez, F.J., Davuluri, R., Liu, C.G., Croce, C.M., Negrini, M., Calin, G.A., & Ivan, M. 2007. A microRNA signature of hypoxia. *Mol.Cell Biol.*, 27, (5) 1859-1867 available from: PM:17194750
- Kundu, S.T., Nallur, S., Paranjape, T., Boeke, M., Weidhaas, J.B., & Slack, F.J. 2012. KRAS alleles: the LCS6 3'UTR variant and KRAS coding sequence mutations in the NCI-60 panel. *Cell Cycle*, 11, (2) 361-366 available from: PM:22189714
- Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Lendeckel, W., & Tuschl, T. 2001. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science*, 294, (5543) 853-858 available from: PM:11679670
- Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Meyer, J., Borkhardt, A., & Tuschl, T. 2003. New microRNAs from mouse and human. *RNA*, 9, (2) 175-179 available from: PM:12554859
- Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Yalcin, A., Meyer, J., Lendeckel, W., & Tuschl, T. 2002. Identification of tissue-specific microRNAs from mouse. *Curr.Biol*, 12, (9) 735-739 available from: PM:12007417
- Landthaler, M., Yalcin, A., & Tuschl, T. 2004. The human DiGeorge syndrome critical region gene 8 and Its D. melanogaster homolog are required for miRNA biogenesis. *Curr.Biol*, 14, (23) 2162-2167 available from: PM:15589161
- Lau, N.C., Lim, L.P., Weinstein, E.G., & Bartel, D.P. 2001. An abundant class of tiny RNAs with probable regulatory roles in *Caenorhabditis elegans*. *Science*, 294, (5543) 858-862 available from: PM:11679671

- Lawrie, C.H., Gal, S., Dunlop, H.M., Pushkaran, B., Liggins, A.P., Pulford, K., Banham, A.H., Pezzella, F., Boulwood, J., Wainscoat, J.S., Hatton, C.S., & Harris, A.L. 2008. Detection of elevated levels of tumour-associated microRNAs in serum of patients with diffuse large B-cell lymphoma. *Br J Haematol*, 141, (5) 672-675 available from: PM:18318758
- Lawrie, C.H., Soneji, S., Marafioti, T., Cooper, C.D., Palazzo, S., Paterson, J.C., Cattan, H., Enver, T., Mager, R., Boulwood, J., Wainscoat, J.S., & Hatton, C.S. 2007. MicroRNA expression distinguishes between germinal center B cell-like and activated B cell-like subtypes of diffuse large B cell lymphoma. *Int J Cancer*, 121, (5) 1156-1161 available from: PM:17487835
- Lee, R.C. & Ambros, V. 2001. An extensive class of small RNAs in *Caenorhabditis elegans*. *Science*, 294, (5543) 862-864 available from: PM:11679672
- Lee, R.C., Feinbaum, R.L., & Ambros, V. 1993. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, 75, (5) 843-854 available from: PM:8252621
- Lee, Y., Ahn, C., Han, J., Choi, H., Kim, J., Yim, J., Lee, J., Provost, P., Radmark, O., Kim, S., & Kim, V.N. 2003. The nuclear RNase III Droscha initiates microRNA processing. *Nature*, 425, (6956) 415-419 available from: PM:14508493
- Lee, Y., Hur, I., Park, S.Y., Kim, Y.K., Suh, M.R., & Kim, V.N. 2006. The role of PACT in the RNA silencing pathway. *EMBO J*, 25, (3) 522-532 available from: PM:16424907
- Lee, Y., Kim, M., Han, J., Yeom, K.H., Lee, S., Baek, S.H., & Kim, V.N. 2004. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J*, 23, (20) 4051-4060 available from: PM:15372072
- Lehmann, U., Hasemeier, B., Christgen, M., Muller, M., Romermann, D., Langer, F., & Kreipe, H. 2008. Epigenetic inactivation of microRNA gene *hsa-mir-9-1* in human breast cancer. *J Pathol*, 214, (1) 17-24 available from: PM:17948228
- Leidinger, P., Keller, A., Borries, A., Reichrath, J., Rass, K., Jager, S.U., Lenhof, H.P., & Meese, E. 2010. High-throughput miRNA profiling of human melanoma blood samples. *BMC Cancer*, 10, 262 available from: PM:20529253
- Leidner, R.S., Li, L., & Thompson, C.L. 2013. Dampening Enthusiasm for Circulating MicroRNA in Breast Cancer. *PLoS.One.*, 8, (3) e57841 available from: PM:23472110
- Levati, L., Alvino, E., Pagani, E., Arcelli, D., Caporaso, P., Bondanza, S., Di, L.G., Ferracin, M., Volinia, S., Bonmassar, E., Croce, C.M., & D'Atri, S. 2009. Altered expression of selected microRNAs in melanoma: antiproliferative and proapoptotic activity of miRNA-155. *Int J Oncol*, 35, (2) 393-400 available from: PM:19578755
- Levati, L., Pagani, E., Romani, S., Castiglia, D., Piccinni, E., Covaciu, C., Caporaso, P., Bondanza, S., Antonetti, F.R., Bonmassar, E., Martelli, F., Alvino, E., & D'Atri, S. 2011. MicroRNA-155 targets the SKI gene in human melanoma cell lines. *Pigment Cell Melanoma Res*, 24, (3) 538-550 available from: PM:21466664
- Levy, C., Khaled, M., Iliopoulos, D., Janas, M.M., Schubert, S., Pinner, S., Chen, P.H., Li, S., Fletcher, A.L., Yokoyama, S., Scott, K.L., Garraway, L.A., Song, J.S., Granter, S.R.,

- Turley, S.J., Fisher, D.E., & Novina, C.D. 2010. Intronic miR-211 assumes the tumor suppressive function of its host gene in melanoma. *Mol Cell*, 40, (5) 841-849 available from: PM:21109473
- Lewis, B.P., Burge, C.B., & Bartel, D.P. 2005. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell*, 120, (1) 15-20 available from: PM:15652477
- Li, J., Huang, H., Sun, L., Yang, M., Pan, C., Chen, W., Wu, D., Lin, Z., Zeng, C., Yao, Y., Zhang, P., & Song, E. 2009. MiR-21 indicates poor prognosis in tongue squamous cell carcinomas as an apoptosis inhibitor. *Clin Cancer Res*, 15, (12) 3998-4008 available from: PM:19509158
- Li, Y. & Kowdley, K.V. 2012. Method for microRNA isolation from clinical serum samples. *Anal.Biochem.*, 431, (1) 69-75 available from: PM:22982505
- Lim, L.P., Lau, N.C., Garrett-Engele, P., Grimson, A., Schelter, J.M., Castle, J., Bartel, D.P., Linsley, P.S., & Johnson, J.M. 2005. Microarray analysis shows that some microRNAs downregulate large numbers of target mRNAs. *Nature*, 433, (7027) 769-773 available from: PM:15685193
- Lin, S.C., Liu, C.J., Lin, J.A., Chiang, W.F., Hung, P.S., & Chang, K.W. 2010. miR-24 up-regulation in oral carcinoma: positive association from clinical and in vitro analysis. *Oral Oncol*, 46, (3) 204-208 available from: PM:20138800
- Liu, C.J., Kao, S.Y., Tu, H.F., Tsai, M.M., Chang, K.W., & Lin, S.C. 2010. Increase of microRNA miR-31 level in plasma could be a potential marker of oral cancer. *Oral Dis.*, 16, (4) 360-364 available from: PM:20233326
- Liu, C.J., Lin, S.C., Yang, C.C., Cheng, H.W., & Chang, K.W. 2012a. Exploiting salivary miR-31 as a clinical biomarker of oral squamous cell carcinoma. *Head Neck*, 34, (2) 219-224 available from: PM:22083872
- Liu, M., Tang, Q., Qiu, M., Lang, N., Li, M., Zheng, Y., & Bi, F. 2011. miR-21 targets the tumor suppressor RhoB and regulates proliferation, invasion and apoptosis in colorectal cancer cells. *FEBS Lett.*, 585, (19) 2998-3005 available from: PM:21872591
- Liu, X., Wang, Y., Sun, Q., Yan, J., Huang, J., Zhu, S., & Yu, J. 2012b. Identification of microRNA transcriptome involved in human natural killer cell activation. *Immunol.Lett.*, 143, (2) 208-217 available from: PM:22701882
- Lodes, M.J., Caraballo, M., Suci, D., Munro, S., Kumar, A., & Anderson, B. 2009. Detection of cancer with serum miRNAs on an oligonucleotide microarray. *PLoS.One.*, 4, (7) e6229 available from: PM:19597549
- Lodygin, D., Tarasov, V., Epanchintsev, A., Berking, C., Knyazeva, T., Korner, H., Knyazev, P., Diebold, J., & Hermeking, H. 2008. Inactivation of miR-34a by aberrant CpG methylation in multiple types of cancer. *Cell Cycle*, 7, (16) 2591-2600 available from: PM:18719384
- 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., & Golub,

- T.R. 2005. MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature*, 435, (7043) 834-838 available from: PM:15944708
- Lu, Y., Govindan, R., Wang, L., Liu, P.Y., Goodgame, B., Wen, W., Sezhiyan, A., Pfeifer, J., Li, Y.F., Hua, X., Wang, Y., Yang, P., & You, M. 2012. MicroRNA profiling and prediction of recurrence/relapse-free survival in stage I lung cancer. *Carcinogenesis*, 33, (5) 1046-1054 available from: PM:22331473
- Lu, Z., Liu, M., Stribinskis, V., Klinge, C.M., Ramos, K.S., Colburn, N.H., & Li, Y. 2008. MicroRNA-21 promotes cell transformation by targeting the programmed cell death 4 gene. *Oncogene*, 27, (31) 4373-4379 available from: PM:18372920
- Lujambio, A., Calin, G.A., Villanueva, A., Ropero, S., Sanchez-Cespedes, M., Blanco, D., Montuenga, L.M., Rossi, S., Nicoloso, M.S., Faller, W.J., Gallagher, W.M., Eccles, S.A., Croce, C.M., & Esteller, M. 2008. A microRNA DNA methylation signature for human cancer metastasis. *Proc.Natl Acad Sci U.S.A*, 105, (36) 13556-13561 available from: PM:18768788
- Lujambio, A. & Esteller, M. 2007. CpG island hypermethylation of tumor suppressor microRNAs in human cancer. *Cell Cycle*, 6, (12) 1455-1459 available from: PM:17581274
- Lujambio, A., Ropero, S., Ballestar, E., Fraga, M.F., Cerrato, C., Setien, F., Casado, S., Suarez-Gauthier, A., Sanchez-Cespedes, M., Git, A., Spiteri, I., Das, P.P., Caldas, C., Miska, E., & Esteller, M. 2007. Genetic unmasking of an epigenetically silenced microRNA in human cancer cells. *Cancer Res*, 67, (4) 1424-1429 available from: PM:17308079
- Lund, E., Guttinger, S., Calado, A., Dahlberg, J.E., & Kutay, U. 2004. Nuclear export of microRNA precursors. *Science*, 303, (5654) 95-98 available from: PM:14631048
- 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., & Takizawa, T. 2009. Human villous trophoblasts express and secrete placenta-specific microRNAs into maternal circulation via exosomes. *Biol Reprod.*, 81, (4) 717-729 available from: PM:19494253
- Ma, L., Teruya-Feldstein, J., & Weinberg, R.A. 2007. Tumour invasion and metastasis initiated by microRNA-10b in breast cancer. *Nature*, 449, (7163) 682-688 available from: PM:17898713
- Ma, R., Jiang, T., & Kang, X. 2012. Circulating microRNAs in cancer: origin, function and application. *J Exp Clin Cancer Res*, 31, 38 available from: PM:22546315
- Ma, Z., Lui, W.O., Fire, A., & Dadras, S.S. 2009. Profiling and discovery of novel miRNAs from formalin-fixed, paraffin-embedded melanoma and nodal specimens. *J Mol Diagn.*, 11, (5) 420-429 available from: PM:19710399
- Mackie RM. 1989, *Malignant melanoma: a guide to early diagnosis*. Glasgow (UK): University of Glasgow.
- Markou, A., Tsaroucha, E.G., Kaklamanis, L., Fotinou, M., Georgoulas, V., & Lianidou, E.S. 2008. Prognostic value of mature microRNA-21 and microRNA-205 overexpression in non-small cell lung cancer by quantitative real-time RT-PCR. *Clin Chem.*, 54, (10) 1696-1704 available from: PM:18719201

- Marks, R., Dorevitch, A.P., & Mason, G. 1990. Do all melanomas come from "moles"? A study of the histological association between melanocytic naevi and melanoma. *Australas.J Dermatol*, 31, (2) 77-80 available from: PM:2095738
- Mathonnet, G., Fabian, M.R., Svitkin, Y.V., Parsyan, A., Huck, L., Murata, T., Biffo, S., Merrick, W.C., Darzynkiewicz, E., Pillai, R.S., Filipowicz, W., Duchaine, T.F., & Sonenberg, N. 2007. MicroRNA inhibition of translation initiation in vitro by targeting the cap-binding complex eIF4F. *Science*, 317, (5845) 1764-1767 available from: PM:17656684
- Mattia, G., Errico, M.C., Felicetti, F., Petrini, M., Bottero, L., Tomasello, L., Romania, P., Boe, A., Segnalini, P., Di, V.A., Colombo, M.P., & Care, A. 2011. Constitutive activation of the ETS-1-miR-222 circuitry in metastatic melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res*, 24, (5) 953-965 available from: PM:21711453
- Mazar, J., DeBlasio, D., Govindarajan, S.S., Zhang, S., & Perera, R.J. 2011a. Epigenetic regulation of microRNA-375 and its role in melanoma development in humans. *FEBS Lett.*, 585, (15) 2467-2476 available from: PM:21723283
- Mazar, J., DeYoung, K., Khaitan, D., Meister, E., Almodovar, A., Goydos, J., Ray, A., & Perera, R.J. 2010. The regulation of miRNA-211 expression and its role in melanoma cell invasiveness. *PLoS.One.*, 5, (11) e13779 available from: PM:21072171
- Mazar, J., Khaitan, D., DeBlasio, D., Zhong, C., Govindarajan, S.S., Kopanathi, S., Zhang, S., Ray, A., & Perera, R.J. 2011b. Epigenetic regulation of microRNA genes and the role of miR-34b in cell invasion and motility in human melanoma. *PLoS.One.*, 6, (9) e24922 available from: PM:21949788
- Meister, G., Landthaler, M., Patkaniowska, A., Dorsett, Y., Teng, G., & Tuschl, T. 2004. Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs. *Mol Cell*, 15, (2) 185-197 available from: PM:15260970
- Melnikova, V.O. & Bar-Eli, M. 2008. Transcriptional control of the melanoma malignant phenotype. *Cancer Biol Ther*, 7, (7) 997-1003 available from: PM:18698165
- Meng, F., Henson, R., Wehbe-Janek, H., Ghoshal, K., Jacob, S.T., & Patel, T. 2007. MicroRNA-21 regulates expression of the PTEN tumor suppressor gene in human hepatocellular cancer. *Gastroenterology*, 133, (2) 647-658 available from: PM:17681183
- Merkerova, M., Belickova, M., & Bruchova, H. 2008. Differential expression of microRNAs in hematopoietic cell lineages. *Eur J Haematol.*, 81, (4) 304-310 available from: PM:18573170
- Mi, S., Lu, J., Sun, M., Li, Z., Zhang, H., Neilly, M.B., Wang, Y., Qian, Z., Jin, J., Zhang, Y., Bohlander, S.K., Le Beau, M.M., Larson, R.A., Golub, T.R., Rowley, J.D., & Chen, J. 2007. MicroRNA expression signatures accurately discriminate acute lymphoblastic leukemia from acute myeloid leukemia. *Proc Natl Acad Sci U.S.A*, 104, (50) 19971-19976 available from: PM:18056805
- Michael, M.Z., O' Connor, S.M., van Holst Pellekaan, N.G., Young, G.P., & James, R.J. 2003. Reduced accumulation of specific microRNAs in colorectal neoplasia. *Mol Cancer Res*, 1, (12) 882-891 available from: PM:14573789

- Migliore, C., Petrelli, A., Ghiso, E., Corso, S., Capparuccia, L., Eramo, A., Comoglio, P.M., & Giordano, S. 2008. MicroRNAs impair MET-mediated invasive growth. *Cancer Res*, 68, (24) 10128-10136 available from: PM:19074879
- Miller, A.J. & Mihm, M.C., Jr. 2006. Melanoma. *N Engl J Med*, 355, (1) 51-65 available from: PM:16822996
- Miska, E.A. 2005. How microRNAs control cell division, differentiation and death. *Curr.Opin.Genet Dev.*, 15, (5) 563-568 available from: PM:16099643
- Mitchell, P.S., Parkin, R.K., Kroh, E.M., Fritz, B.R., Wyman, S.K., Pogosova-Agadjanyan, E.L., Peterson, A., Noteboom, J., O'Briant, K.C., Allen, A., Lin, D.W., Urban, N., Drescher, C.W., Knudsen, B.S., Stirewalt, D.L., Gentleman, R., Vessella, R.L., Nelson, P.S., Martin, D.B., & Tewari, M. 2008. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci U.S.A*, 105, (30) 10513-10518 available from: PM:18663219
- Mittelbrunn, M., Gutierrez-Vazquez, C., Villarroya-Beltri, C., Gonzalez, S., Sanchez-Cabo, F., Gonzalez, M.A., Bernad, A., & Sanchez-Madrid, F. 2011. Unidirectional transfer of microRNA-loaded exosomes from T cells to antigen-presenting cells. *Nat Commun.*, 2, 282 available from: PM:21505438
- Molnar, V., Tamasi, V., Bakos, B., Wiener, Z., & Falus, A. 2008. Changes in miRNA expression in solid tumors: an miRNA profiling in melanomas. *Semin Cancer Biol*, 18, (2) 111-122 available from: PM:18296065
- Monteys, A.M., Spengler, R.M., Wan, J., Tecedor, L., Lennox, K.A., Xing, Y., & Davidson, B.L. 2010. Structure and activity of putative intronic miRNA promoters. *RNA*, 16, (3) 495-505 available from: PM:20075166
- Morales Prieto, D.M. & Markert, U.R. 2011. MicroRNAs in pregnancy. *J Reprod.Immunol.*, 88, (2) 106-111 available from: PM:21353310
- Morton, D.L., Thompson, J.F., Cochran, A.J., Mozzillo, N., Elashoff, R., Essner, R., Nieweg, O.E., Roses, D.F., Hoekstra, H.J., Karakousis, C.P., Reintgen, D.S., Coventry, B.J., Glass, E.C., & Wang, H.J. 2006. Sentinel-node biopsy or nodal observation in melanoma. *N.Engl.J.Med.*, 355, (13) 1307-1317 available from: PM:17005948
- Moss, E.G., Lee, R.C., & Ambros, V. 1997. The cold shock domain protein LIN-28 controls developmental timing in *C. elegans* and is regulated by the *lin-4* RNA. *Cell*, 88, (5) 637-646 available from: PM:9054503
- Mourelatos, Z., Dostie, J., Paushkin, S., Sharma, A., Charroux, B., Abel, L., Rappsilber, J., Mann, M., & Dreyfuss, G. 2002. miRNPs: a novel class of ribonucleoproteins containing numerous microRNAs. *Genes Dev.*, 16, (6) 720-728 available from: PM:11914277
- Mraz, M., Malinova, K., Kotaskova, J., Pavlova, S., Tichy, B., Malcikova, J., Stano, K.K., Smardova, J., Brychtova, Y., Doubek, M., Trbusek, M., Mayer, J., & Pospisilova, S. 2009. miR-34a, miR-29c and miR-17-5p are downregulated in CLL patients with TP53 abnormalities. *Leukemia*, 23, (6) 1159-1163 available from: PM:19158830
- Mueller, D.W. & Bosserhoff, A.K. 2009. Role of miRNAs in the progression of malignant melanoma. *Br J Cancer*, 101, (4) 551-556 available from: PM:19638982

- Mueller, D.W. & Bosserhoff, A.K. 2010. The evolving concept of 'melano-miRs'-microRNAs in melanomagenesis. *Pigment Cell Melanoma Res*, 23, (5) 620-626 available from: PM:20557479
- Mueller, D.W. & Bosserhoff, A.K. 2011. MicroRNA miR-196a controls melanoma-associated genes by regulating HOX-C8 expression. *Int J Cancer*, 129, (5) 1064-1074 available from: PM:21077158
- Mueller, D.W., Rehli, M., & Bosserhoff, A.K. 2009. miRNA expression profiling in melanocytes and melanoma cell lines reveals miRNAs associated with formation and progression of malignant melanoma. *J Invest Dermatol*, 129, (7) 1740-1751 available from: PM:19212343
- Muller, D.W. & Bosserhoff, A.K. 2008. Integrin beta 3 expression is regulated by let-7a miRNA in malignant melanoma. *Oncogene*, 27, (52) 6698-6706 available from: PM:18679415
- Nagel, R., le, S.C., Diosdado, B., van der Waal, M., Oude Vrielink, J.A., Bolijn, A., Meijer, G.A., & Agami, R. 2008. Regulation of the adenomatous polyposis coli gene by the miR-135 family in colorectal cancer. *Cancer Res.*, 68, (14) 5795-5802 available from: PM:18632633
- Nakajima, G., Hayashi, K., Xi, Y., Kudo, K., Uchida, K., Takasaki, K., Yamamoto, M., & Ju, J. 2006. Non-coding MicroRNAs hsa-let-7g and hsa-miR-181b are Associated with Chemoresponse to S-1 in Colon Cancer. *Cancer Genomics Proteomics.*, 3, (5) 317-324 available from: PM:18172508
- Nakamura, T., Canaani, E., & Croce, C.M. 2007. Oncogenic All1 fusion proteins target Drosha-mediated microRNA processing. *Proc.Natl Acad Sci U.S.A*, 104, (26) 10980-10985 available from: PM:17581865
- Nam, S., Kim, B., Shin, S., & Lee, S. 2008. miRGator: an integrated system for functional annotation of microRNAs. *Nucleic Acids Res*, 36, (Database issue) D159-D164 available from: PM:17942429
- Newman, M.A., Thomson, J.M., & Hammond, S.M. 2008. Lin-28 interaction with the Let-7 precursor loop mediates regulated microRNA processing. *RNA.*, 14, (8) 1539-1549 available from: PM:18566191
- Ng, E.K., Chong, W.W., Jin, H., Lam, E.K., Shin, V.Y., Yu, J., Poon, T.C., Ng, S.S., & Sung, J.J. 2009. Differential expression of microRNAs in plasma of patients with colorectal cancer: a potential marker for colorectal cancer screening. *Gut*, 58, (10) 1375-1381 available from: PM:19201770
- Nguyen, T., Kuo, C., Nicholl, M.B., Sim, M.S., Turner, R.R., Morton, D.L., & Hoon, D.S. 2011. Downregulation of microRNA-29c is associated with hypermethylation of tumor-related genes and disease outcome in cutaneous melanoma. *Epigenetics.*, 6, (3) 388-394 available from: PM:21081840
- Nikiforova, M.N., Tseng, G.C., Steward, D., Diorio, D., & Nikiforov, Y.E. 2008. MicroRNA expression profiling of thyroid tumors: biological significance and diagnostic utility. *J Clin Endocrinol Metab*, 93, (5) 1600-1608 available from: PM:18270258

- Noguchi, S., Mori, T., Hoshino, Y., Yamada, N., Nakagawa, T., Sasaki, N., Akao, Y., & Maruo, K. 2012a. Comparative study of anti-oncogenic microRNA-145 in canine and human malignant melanoma. *J Vet.Med Sci*, 74, (1) 1-8 available from: PM:21836381
- Noguchi, S., Mori, T., Otsuka, Y., Yamada, N., Yasui, Y., Iwasaki, J., Kumazaki, M., Maruo, K., & Akao, Y. 2012b. Anti-oncogenic microRNA-203 induces senescence by targeting E2F3 protein in human melanoma cells. *J Biol Chem.*, 287, (15) 11769-11777 available from: PM:22354972
- Nottrott, S., Simard, M.J., & Richter, J.D. 2006. Human let-7a miRNA blocks protein production on actively translating polyribosomes. *Nat Struct.Mol Biol*, 13, (12) 1108-1114 available from: PM:17128272
- O'Donnell, K.A., Wentzel, E.A., Zeller, K.I., Dang, C.V., & Mendell, J.T. 2005. c-Myc-regulated microRNAs modulate E2F1 expression. *Nature*, 435, (7043) 839-843 available from: PM:15944709
- Ohshima, K., Inoue, K., Fujiwara, A., Hatakeyama, K., Kanto, K., Watanabe, Y., Muramatsu, K., Fukuda, Y., Ogura, S., Yamaguchi, K., & 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 available from: PM:20949044
- Okada, H., Kohanbash, G., & Lotze, M.T. 2010. MicroRNAs in immune regulation--opportunities for cancer immunotherapy. *Int J Biochem.Cell Biol*, 42, (8) 1256-1261 available from: PM:20144731
- Okada, H., Kohanbash, G., Zhu, X., Kasthuber, E.R., Hoji, A., Ueda, R., & Fujita, M. 2009. Immunotherapeutic approaches for glioma. *Crit Rev Immunol.*, 29, (1) 1-42 available from: PM:19348609
- Okamura, K., Hagen, J.W., Duan, H., Tyler, D.M., & Lai, E.C. 2007. The mirtron pathway generates microRNA-class regulatory RNAs in Drosophila. *Cell*, 130, (1) 89-100 available from: PM:17599402
- Olsen, P.H. & Ambros, V. 1999. The lin-4 regulatory RNA controls developmental timing in *Caenorhabditis elegans* by blocking LIN-14 protein synthesis after the initiation of translation. *Dev.Biol*, 216, (2) 671-680 available from: PM:10642801
- Orom, U.A., Nielsen, F.C., & Lund, A.H. 2008. MicroRNA-10a binds the 5'UTR of ribosomal protein mRNAs and enhances their translation. *Mol Cell*, 30, (4) 460-471 available from: PM:18498749
- Ota, A., Tagawa, H., Karnan, S., Tsuzuki, S., Karpas, A., Kira, S., Yoshida, Y., & Seto, M. 2004. Identification and characterization of a novel gene, C13orf25, as a target for 13q31-q32 amplification in malignant lymphoma. *Cancer Res*, 64, (9) 3087-3095 available from: PM:15126345
- Ozsolak, F., Poling, L.L., Wang, Z., Liu, H., Liu, X.S., Roeder, R.G., Zhang, X., Song, J.S., & Fisher, D.E. 2008. Chromatin structure analyses identify miRNA promoters. *Genes Dev.*, 22, (22) 3172-3183 available from: PM:19056895

- Palmieri, G., Capone, M., Ascierto, M.L., Gentilcore, G., Stroncek, D.F., Casula, M., Sini, M.C., Palla, M., Mozzillo, N., & Ascierto, P.A. 2009. Main roads to melanoma. *J Transl.Med*, 7, 86 available from: PM:19828018
- Park, J.K., Lee, E.J., Esau, C., & Schmittgen, T.D. 2009a. Antisense inhibition of microRNA-21 or -221 arrests cell cycle, induces apoptosis, and sensitizes the effects of gemcitabine in pancreatic adenocarcinoma. *Pancreas*, 38, (7) e190-e199 available from: PM:19730150
- Park, N.J., Zhou, H., Elashoff, D., Henson, B.S., Kastratovic, D.A., Abemayor, E., & Wong, D.T. 2009b. Salivary microRNA: discovery, characterization, and clinical utility for oral cancer detection. *Clin Cancer Res*, 15, (17) 5473-5477 available from: PM:19706812
- Pasquinelli, A.E., Reinhart, B.J., Slack, F., Martindale, M.Q., Kuroda, M.I., Maller, B., Hayward, D.C., Ball, E.E., Degnan, B., Muller, P., Spring, J., Srinivasan, A., Fishman, M., Finnerty, J., Corbo, J., Levine, M., Leahy, P., Davidson, E., & Ruvkun, G. 2000. Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA. *Nature*, 408, (6808) 86-89 available from: PM:11081512
- Pegtel, D.M., Cosmopoulos, K., Thorley-Lawson, D.A., van Eijndhoven, M.A., Hopmans, E.S., Lindenberg, J.L., de Gruijl, T.D., Wurdinger, T., & Middeldorp, J.M. 2010. Functional delivery of viral miRNAs via exosomes. *Proc Natl Acad Sci U.S.A*, 107, (14) 6328-6333 available from: PM:20304794
- Pekarsky, Y., Santanam, U., Cimmino, A., Palamarchuk, A., Efanov, A., Maximov, V., Volinia, S., Alder, H., Liu, C.G., Rassenti, L., Calin, G.A., Hagan, J.P., Kipps, T., & Croce, C.M. 2006. Tcl1 expression in chronic lymphocytic leukemia is regulated by miR-29 and miR-181. *Cancer Res.*, 66, (24) 11590-11593 available from: PM:17178851
- Peng, Y., Laser, J., Shi, G., Mittal, K., Melamed, J., Lee, P., & Wei, J.J. 2008. Antiproliferative effects by Let-7 repression of high-mobility group A2 in uterine leiomyoma. *Mol.Cancer Res.*, 6, (4) 663-673 available from: PM:18403645
- Penna, E., Orso, F., Cimino, D., Tenaglia, E., Lembo, A., Quagliano, E., Poliseno, L., Haimovic, A., Osella-Abate, S., De, P.C., Pinatel, E., Stadler, M.B., Provero, P., Bernengo, M.G., Osman, I., & Taverna, D. 2011. microRNA-214 contributes to melanoma tumour progression through suppression of TFAP2C. *EMBO J*, 30, (10) 1990-2007 available from: PM:21468029
- Petersen, C.P., Bordeleau, M.E., Pelletier, J., & Sharp, P.A. 2006. Short RNAs repress translation after initiation in mammalian cells. *Mol Cell*, 21, (4) 533-542 available from: PM:16483934
- Philippidou, D., Schmitt, M., Moser, D., Margue, C., Nazarov, P.V., Muller, A., Vallar, L., Nashan, D., Behrmann, I., & Kreis, S. 2010. Signatures of microRNAs and selected microRNA target genes in human melanoma. *Cancer Res*, 70, (10) 4163-4173 available from: PM:20442294
- Pichiorri, F., Suh, S.S., Ladetto, M., Kuehl, M., Palumbo, T., Drandi, D., Taccioli, C., Zanesi, N., Alder, H., Hagan, J.P., Munker, R., Volinia, S., Boccadoro, M., Garzon, R., Palumbo, A., Aqeilan, R.I., & Croce, C.M. 2008. MicroRNAs regulate critical genes

- associated with multiple myeloma pathogenesis. *Proc.Natl Acad Sci U.S.A*, 105, (35) 12885-12890 available from: PM:18728182
- Pigati, L., Yaddanapudi, S.C., Iyengar, R., Kim, D.J., Hearn, S.A., Danforth, D., Hastings, M.L., & Duelli, D.M. 2010. Selective release of microRNA species from normal and malignant mammary epithelial cells. *PLoS.One.*, 5, (10) e13515 available from: PM:20976003
- Pillai, R.S., Bhattacharyya, S.N., Artus, C.G., Zoller, T., Cougot, N., Basyuk, E., Bertrand, E., & Filipowicz, W. 2005. Inhibition of translational initiation by Let-7 MicroRNA in human cells. *Science*, 309, (5740) 1573-1576 available from: PM:16081698
- Platz, A., Egyhazi, S., Ringborg, U., & Hansson, J. 2008. Human cutaneous melanoma; a review of NRAS and BRAF mutation frequencies in relation to histogenetic subclass and body site. *Mol Oncol*, 1, (4) 395-405 available from: PM:19383313
- Pollock, P.M., Harper, U.L., Hansen, K.S., Yudt, L.M., Stark, M., Robbins, C.M., Moses, T.Y., Hostetter, G., Wagner, U., Kakareka, J., Salem, G., Pohida, T., Heenan, P., Duray, P., Kallioniemi, O., Hayward, N.K., Trent, J.M., & Meltzer, P.S. 2003. High frequency of BRAF mutations in nevi. *Nat Genet*, 33, (1) 19-20 available from: PM:12447372
- Porkka, K.P., Pfeiffer, M.J., Waltering, K.K., Vessella, R.L., Tammela, T.L., & Visakorpi, T. 2007. MicroRNA expression profiling in prostate cancer. *Cancer Res.*, 67, (13) 6130-6135 available from: PM:17616669
- Pritchard, C.C., Kroh, E., Wood, B., Arroyo, J.D., Dougherty, K.J., Miyaji, M.M., Tait, J.F., & Tewari, M. 2012. Blood cell origin of circulating microRNAs: a cautionary note for cancer biomarker studies. *Cancer Prev.Res (Phila)*, 5, (3) 492-497 available from: PM:22158052
- Pu, X.X., Huang, G.L., Guo, H.Q., Guo, C.C., Li, H., Ye, S., Ling, S., Jiang, L., Tian, Y., & Lin, T.Y. 2010. Circulating miR-221 directly amplified from plasma is a potential diagnostic and prognostic marker of colorectal cancer and is correlated with p53 expression. *J Gastroenterol.Hepatol.*, 25, (10) 1674-1680 available from: PM:20880178
- Pulkkinen, K., Malm, T., Turunen, M., Koistinaho, J., & Yla-Herttuala, S. 2008. Hypoxia induces microRNA miR-210 in vitro and in vivo ephrin-A3 and neuronal pentraxin 1 are potentially regulated by miR-210. *FEBS Lett.*, 582, (16) 2397-2401 available from: PM:18539147
- Rabinowits, G., Gercel-Taylor, C., Day, J.M., Taylor, D.D., & Kloecker, G.H. 2009. Exosomal microRNA: a diagnostic marker for lung cancer. *Clin Lung Cancer*, 10, (1) 42-46 available from: PM:19289371
- Raver-Shapira, N., Marciano, E., Meiri, E., Spector, Y., Rosenfeld, N., Moskovits, N., Bentwich, Z., & Oren, M. 2007. Transcriptional activation of miR-34a contributes to p53-mediated apoptosis. *Mol Cell*, 26, (5) 731-743 available from: PM:17540598
- Reid, G., Kirschner, M.B., & van, Z.N. 2011. Circulating microRNAs: Association with disease and potential use as biomarkers. *Crit Rev Oncol Hematol.*, 80, (2) 193-208 available from: PM:21145252

- Reinhart, B.J., Slack, F.J., Basson, M., Pasquinelli, A.E., Bettinger, J.C., Rougvie, A.E., Horvitz, H.R., & Ruvkun, G. 2000. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, 403, (6772) 901-906 available from: PM:10706289
- Resnick, K.E., Alder, H., Hagan, J.P., Richardson, D.L., Croce, C.M., & Cohn, D.E. 2009. The detection of differentially expressed microRNAs from the serum of ovarian cancer patients using a novel real-time PCR platform. *Gynecol.Oncol*, 112, (1) 55-59 available from: PM:18954897
- Ro, S., Park, C., Young, D., Sanders, K.M., & Yan, W. 2007. Tissue-dependent paired expression of miRNAs. *Nucleic Acids Res*, 35, (17) 5944-5953 available from: PM:17726050
- Robb, G.B. & Rana, T.M. 2007. RNA helicase A interacts with RISC in human cells and functions in RISC loading. *Mol Cell*, 26, (4) 523-537 available from: PM:17531811
- Roldo, C., Missiaglia, E., Hagan, J.P., Falconi, M., Capelli, P., Bersani, S., Calin, G.A., Volinia, S., Liu, C.G., Scarpa, A., & Croce, C.M. 2006. MicroRNA expression abnormalities in pancreatic endocrine and acinar tumors are associated with distinctive pathologic features and clinical behavior. *J Clin Oncol*, 24, (29) 4677-4684 available from: PM:16966691
- Rossi, S., Shimizu, M., Barbarotto, E., Nicoloso, M.S., Dimitri, F., Sampath, D., Fabbri, M., Lerner, S., Barron, L.L., Rassenti, L.Z., Jiang, L., Xiao, L., Hu, J., Secchiero, P., Zauli, G., Volinia, S., Negrini, M., Wierda, W., Kipps, T.J., Plunkett, W., Coombes, K.R., Abruzzo, L.V., Keating, M.J., & Calin, G.A. 2010. microRNA fingerprinting of CLL patients with chromosome 17p deletion identify a miR-21 score that stratifies early survival. *Blood*, 116, (6) 945-952 available from: PM:20393129
- Roth, C., Rack, B., Muller, V., Janni, W., Pantel, K., & Schwarzenbach, H. 2010. Circulating microRNAs as blood-based markers for patients with primary and metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res*, 12, (6) R90 available from: PM:21047409
- Ruby, J.G., Jan, C.H., & Bartel, D.P. 2007. Intronic microRNA precursors that bypass Drosha processing. *Nature*, 448, (7149) 83-86 available from: PM:17589500
- Safaei, A.G., Jafarnejad, S.M., Tan, L., Saeedi, A., & Li, G. 2012. The prognostic value of BRAF mutation in colorectal cancer and melanoma: a systematic review and meta-analysis. *PLoS.One.*, 7, (10) e47054 available from: PM:23056577
- Saini, H.K., Enright, A.J., & Griffiths-Jones, S. 2008. Annotation of mammalian primary microRNAs. *BMC Genomics*, 9, 564 available from: PM:19038026
- Saini, H.K., Griffiths-Jones, S., & Enright, A.J. 2007. Genomic analysis of human microRNA transcripts. *Proc Natl Acad Sci U.S.A*, 104, (45) 17719-17724 available from: PM:17965236
- Saito, M., Schetter, A.J., Mollerup, S., Kohno, T., Skaug, V., Bowman, E.D., Mathe, E.A., Takenoshita, S., Yokota, J., Haugen, A., & Harris, C.C. 2011. The association of microRNA expression with prognosis and progression in early-stage, non-small cell lung adenocarcinoma: a retrospective analysis of three cohorts. *Clin.Cancer Res.*, 17, (7) 1875-1882 available from: PM:21350005
- Saito, Y., Liang, G., Egger, G., Friedman, J.M., Chuang, J.C., Coetzee, G.A., & Jones, P.A. 2006. Specific activation of microRNA-127 with downregulation of the proto-oncogene

BCL6 by chromatin-modifying drugs in human cancer cells. *Cancer Cell*, 9, (6) 435-443 available from: PM:16766263

Sakurai, E., Maesawa, C., Shibasaki, M., Yasuhira, S., Oikawa, H., Sato, M., Tsunoda, K., Ishikawa, Y., Watanabe, A., Takahashi, K., Akasaka, T., & Masuda, T. 2011. Downregulation of microRNA-211 is involved in expression of preferentially expressed antigen of melanoma in melanoma cells. *Int J Oncol*, 39, (3) 665-672 available from: PM:21687938

Saldanha, G., Potter, L., Shendge, P., Osborne, J., Nicholson, S., Yui, N., Varma, S., Aslam, M.I., Elshaw, S., Papadogeorgakis, E., & Pringle, J.H. 2013. Plasma microRNA-21 is associated with tumor burden in cutaneous melanoma. *J.Invest Dermatol.*, 133, (5) 1381-1384 available from: PM:23303460

Salzman, D.W., Shubert-Coleman, J., & Furneaux, H. 2007. P68 RNA helicase unwinds the human let-7 microRNA precursor duplex and is required for let-7-directed silencing of gene expression. *J Biol Chem.*, 282, (45) 32773-32779 available from: PM:17724023

Sampson, V.B., Rong, N.H., Han, J., Yang, Q., Aris, V., Soteropoulos, P., Petrelli, N.J., Dunn, S.P., & Krueger, L.J. 2007. MicroRNA let-7a down-regulates MYC and reverts MYC-induced growth in Burkitt lymphoma cells. *Cancer Res.*, 67, (20) 9762-9770 available from: PM:17942906

Satzger, I., Mattern, A., Kuettler, U., Weinspach, D., Voelker, B., Kapp, A., & Gutzmer, R. 2010. MicroRNA-15b represents an independent prognostic parameter and is correlated with tumor cell proliferation and apoptosis in malignant melanoma. *Int J Cancer*, 126, (11) 2553-2562 available from: PM:19830692

Schaefer, A., Jung, M., Mollenkopf, H.J., Wagner, I., Stephan, C., Jentzmik, F., Miller, K., Lein, M., Kristiansen, G., & Jung, K. 2010. Diagnostic and prognostic implications of microRNA profiling in prostate carcinoma. *Int.J.Cancer*, 126, (5) 1166-1176 available from: PM:19676045

Schetter, A.J., Leung, S.Y., Sohn, J.J., Zanetti, K.A., Bowman, E.D., Yanaihara, N., Yuen, S.T., Chan, T.L., Kwong, D.L., Au, G.K., Liu, C.G., Calin, G.A., Croce, C.M., & Harris, C.C. 2008. MicroRNA expression profiles associated with prognosis and therapeutic outcome in colon adenocarcinoma. *JAMA*, 299, (4) 425-436 available from: PM:18230780

Schneider, M.R. 2012. MicroRNAs as novel players in skin development, homeostasis and disease. *Br J Dermatol*, 166, (1) 22-28 available from: PM:21824129

Schrauder, M.G., Strick, R., Schulz-Wendtland, R., Strissel, P.L., Kahmann, L., Loehberg, C.R., Lux, M.P., Jud, S.M., Hartmann, A., Hein, A., Bayer, C.M., Bani, M.R., Richter, S., Adamietz, B.R., Wenkel, E., Rauh, C., Beckmann, M.W., & Fasching, P.A. 2012. Circulating micro-RNAs as potential blood-based markers for early stage breast cancer detection. *PLoS.One.*, 7, (1) e29770 available from: PM:22242178

Schultz, J., Lorenz, P., Gross, G., Ibrahim, S., & Kunz, M. 2008. MicroRNA let-7b targets important cell cycle molecules in malignant melanoma cells and interferes with anchorage-independent growth. *Cell Res*, 18, (5) 549-557 available from: PM:18379589

- Schwarz, D.S., Hutvagner, G., Du, T., Xu, Z., Aronin, N., & Zamore, P.D. 2003. Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell*, 115, (2) 199-208 available from: PM:14567917
- Schwarzenbach, H., Milde-Langosch, K., Steinbach, B., Muller, V., & Pantel, K. 2012. Diagnostic potential of PTEN-targeting miR-214 in the blood of breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat.*, 134, (3) 933-941 available from: PM:22350790
- Scott, G.K., Goga, A., Bhaumik, D., Berger, C.E., Sullivan, C.S., & Benz, C.C. 2007. Coordinate suppression of ERBB2 and ERBB3 by enforced expression of micro-RNA miR-125a or miR-125b. *J.Biol.Chem.*, 282, (2) 1479-1486 available from: PM:17110380
- Scott, G.K., Mattie, M.D., Berger, C.E., Benz, S.C., & Benz, C.C. 2006. Rapid alteration of microRNA levels by histone deacetylase inhibition. *Cancer Res*, 66, (3) 1277-1281 available from: PM:16452179
- Seggerson, K., Tang, L., & Moss, E.G. 2002. Two genetic circuits repress the *Caenorhabditis elegans* heterochronic gene *lin-28* after translation initiation. *Dev.Biol*, 243, (2) 215-225 available from: PM:11884032
- Segura, M.F., Belitskaya-Levy, I., Rose, A.E., Zakrzewski, J., Gaziel, A., Hanniford, D., Darvishian, F., Berman, R.S., Shapiro, R.L., Pavlick, A.C., Osman, I., & Hernando, E. 2010. Melanoma MicroRNA signature predicts post-recurrence survival. *Clin Cancer Res*, 16, (5) 1577-1586 available from: PM:20179230
- Segura, M.F., Greenwald, H.S., Hanniford, D., Osman, I., & Hernando, E. 2012. MicroRNA and cutaneous melanoma: from discovery to prognosis and therapy. *Carcinogenesis*, 33, (10) 1823-1832 available from: PM:22693259
- Segura, M.F., Hanniford, D., Menendez, S., Reavie, L., Zou, X., Alvarez-Diaz, S., Zakrzewski, J., Blochin, E., Rose, A., Bogunovic, D., Polsky, D., Wei, J., Lee, P., Belitskaya-Levy, I., Bhardwaj, N., Osman, I., & Hernando, E. 2009. Aberrant miR-182 expression promotes melanoma metastasis by repressing FOXO3 and microphthalmia-associated transcription factor. *Proc.Natl Acad Sci U.S.A*, 106, (6) 1814-1819 available from: PM:19188590
- Selbach, M., Schwanhausser, B., Thierfelder, N., Fang, Z., Khanin, R., & Rajewsky, N. 2008. Widespread changes in protein synthesis induced by microRNAs. *Nature*, 455, (7209) 58-63 available from: PM:18668040
- Selth, L.A., Townley, S., Gillis, J.L., Ochnik, A.M., Murti, K., Macfarlane, R.J., Chi, K.N., Marshall, V.R., Tilley, W.D., & Butler, L.M. 2012. Discovery of circulating microRNAs associated with human prostate cancer using a mouse model of disease. *Int J Cancer*, 131, (3) 652-661 available from: PM:22052531
- Sheedy, F.J., Palsson-McDermott, E., Hennessy, E.J., Martin, C., O'Leary, J.J., Ruan, Q., Johnson, D.S., Chen, Y., & O'Neill, L.A. 2010. Negative regulation of TLR4 via targeting of the proinflammatory tumor suppressor PDCD4 by the microRNA miR-21. *Nat.Immunol.*, 11, (2) 141-147 available from: PM:19946272
- Shen, J., Liu, Z., Todd, N.W., Zhang, H., Liao, J., Yu, L., Guarnera, M.A., Li, R., Cai, L., Zhan, M., & Jiang, F. 2011. Diagnosis of lung cancer in individuals with solitary pulmonary

- nodules by plasma microRNA biomarkers. *BMC Cancer*, 11, 374 available from: PM:21864403
- Shen, J., Stass, S.A., & Jiang, F. 2013. MicroRNAs as potential biomarkers in human solid tumors. *Cancer Lett.*, 329, (2) 125-136 available from: PM:23196059
- Shiyyama, R., Fukushima, S., Jinnin, M., Yamashita, J., Miyashita, A., Nakahara, S., Kogi, A., Aoi, J., Masuguchi, S., Inoue, Y., & Ihn, H. 2013. Sensitive detection of melanoma metastasis using circulating microRNA expression profiles. *Melanoma Res.* available from: PM:23863473
- Si, M.L., Zhu, S., Wu, H., Lu, Z., Wu, F., & Mo, Y.Y. 2007. miR-21-mediated tumor growth. *Oncogene*, 26, (19) 2799-2803 available from: PM:17072344
- Sieuwert, A.M., Mostert, B., Bolt-de, V.J., Peeters, D., de Jongh, F.E., Stouthard, J.M., Dirix, L.Y., van Dam, P.A., Van, G.A., de, W., V, Kraan, J., van der Spoel, P., Ramirez-Moreno, R., van Deurzen, C.H., Smid, M., Yu, J.X., Jiang, J., Wang, Y., Gratama, J.W., Sleijfer, S., Foekens, J.A., & Martens, J.W. 2011. mRNA and microRNA expression profiles in circulating tumor cells and primary tumors of metastatic breast cancer patients. *Clin Cancer Res*, 17, (11) 3600-3618 available from: PM:21505063
- Skog, J., Wurdinger, T., van, R.S., Meijer, D.H., Gainche, L., Sena-Esteves, M., Curry, W.T., Jr., Carter, B.S., Krichevsky, A.M., & Breakefield, X.O. 2008. Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nat Cell Biol*, 10, (12) 1470-1476 available from: PM:19011622
- Slack, F.J., Basson, M., Liu, Z., Ambros, V., Horvitz, H.R., & Ruvkun, G. 2000. The lin-41 RBCC gene acts in the *C. elegans* heterochronic pathway between the let-7 regulatory RNA and the LIN-29 transcription factor. *Mol Cell*, 5, (4) 659-669 available from: PM:10882102
- Smolle, J., Kaddu, S., & Kerl, H. 1999. Non-random spatial association of melanoma and naevi--a morphometric analysis. *Melanoma Res*, 9, (4) 407-412 available from: PM:10504061
- Sourvinou, I.S., Markou, A., & Lianidou, E.S. 2013. Quantification of circulating miRNAs in plasma: effect of preanalytical and analytical parameters on their isolation and stability. *J.Mol.Diagn.*, 15, (6) 827-834 available from: PM:23988620
- 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., & Hayward, N.K. 2010. Characterization of the Melanoma miRNAome by Deep Sequencing. *PLoS.One.*, 5, (3) e9685 available from: PM:20300190
- Tagawa, H., Karube, K., Tsuzuki, S., Ohshima, K., & Seto, M. 2007. Synergistic action of the microRNA-17 polycistron and Myc in aggressive cancer development. *Cancer Sci*, 98, (9) 1482-1490 available from: PM:17608773
- Takahashi, Y., Forrest, A.R., Maeno, E., Hashimoto, T., Daub, C.O., & Yasuda, J. 2009. MiR-107 and MiR-185 can induce cell cycle arrest in human non small cell lung cancer cell lines. *PLoS.One.*, 4, (8) e6677 available from: PM:19688090
- Takamizawa, J., Konishi, H., Yanagisawa, K., Tomida, S., Osada, H., Endoh, H., Harano, T., Yatabe, Y., Nagino, M., Nimura, Y., Mitsudomi, T., & Takahashi, T. 2004. Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival. *Cancer Res*, 64, (11) 3753-3756 available from: PM:15172979

- Takeshita, N., Hoshino, I., Mori, M., Akutsu, Y., Hanari, N., Yoneyama, Y., Ikeda, N., Isozaki, Y., Maruyama, T., Akanuma, N., Komatsu, A., Jitsukawa, M., & Matsubara, H. 2013. Serum microRNA expression profile: miR-1246 as a novel diagnostic and prognostic biomarker for oesophageal squamous cell carcinoma. *Br.J.Cancer*, 108, (3) 644-652 available from: PM:23361059
- Tanaka, M., Oikawa, K., Takanashi, M., Kudo, M., Ohyashiki, J., Ohyashiki, K., & Kuroda, M. 2009. Down-regulation of miR-92 in human plasma is a novel marker for acute leukemia patients. *PLoS.One.*, 4, (5) e5532 available from: PM:19440243
- Tarasov, V., Jung, P., Verdoodt, B., Lodygin, D., Epanchintsev, A., Menssen, A., Meister, G., & Hermeking, H. 2007. 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, (13) 1586-1593 available from: PM:17554199
- Taylor, D.D. & Gercel-Taylor, C. 2008. MicroRNA signatures of tumor-derived exosomes as diagnostic biomarkers of ovarian cancer. *Gynecol.Oncol*, 110, (1) 13-21 available from: PM:18589210
- Tazawa, H., Tsuchiya, N., Izumiya, M., & Nakagama, H. 2007. Tumor-suppressive miR-34a induces senescence-like growth arrest through modulation of the E2F pathway in human colon cancer cells. *Proc.Natl Acad Sci U.S.A*, 104, (39) 15472-15477 available from: PM:17875987
- They, C., Ostrowski, M., & Segura, E. 2009. Membrane vesicles as conveyors of immune responses. *Nat Rev Immunol.*, 9, (8) 581-593 available from: PM:19498381
- Thomas, L., Tranchand, P., Berard, F., Secchi, T., Colin, C., & Moulin, G. 1998. Semiological value of ABCDE criteria in the diagnosis of cutaneous pigmented tumors. *Dermatology*, 197, (1) 11-17 available from: PM:9693179
- Thomson, J.M., Newman, M., Parker, J.S., Morin-Kensicki, E.M., Wright, T., & Hammond, S.M. 2006. Extensive post-transcriptional regulation of microRNAs and its implications for cancer. *Genes Dev.*, 20, (16) 2202-2207 available from: PM:16882971
- Toyota, M., Suzuki, H., Sasaki, Y., Maruyama, R., Imai, K., Shinomura, Y., & Tokino, T. 2008. Epigenetic silencing of microRNA-34b/c and B-cell translocation gene 4 is associated with CpG island methylation in colorectal cancer. *Cancer Res*, 68, (11) 4123-4132 available from: PM:18519671
- Tsai, N.P., Lin, Y.L., & Wei, L.N. 2009. MicroRNA mir-346 targets the 5'-untranslated region of receptor-interacting protein 140 (RIP140) mRNA and up-regulates its protein expression. *Biochem.J*, 424, (3) 411-418 available from: PM:19780716
- Tsujiura, M., Ichikawa, D., Komatsu, S., Shiozaki, A., Takeshita, H., Kosuga, T., Konishi, H., Morimura, R., Deguchi, K., Fujiwara, H., Okamoto, K., & Otsuji, E. 2010. Circulating microRNAs in plasma of patients with gastric cancers. *Br J Cancer*, 102, (7) 1174-1179 available from: PM:20234369
- Turchinovich, A., Weiz, L., & Burwinkel, B. 2012. Extracellular miRNAs: the mystery of their origin and function. *Trends Biochem.Sci*, 37, (11) 460-465 available from: PM:22944280

- Turchinovich, A., Weiz, L., Langheinz, A., & Burwinkel, B. 2011. Characterization of extracellular circulating microRNA. *Nucleic Acids Res*, 39, (16) 7223-7233 available from: PM:21609964
- Valadi, H., Ekstrom, K., Bossios, A., Sjostrand, M., Lee, J.J., & Lotvall, J.O. 2007. Exosome-mediated transfer of mRNAs and microRNAs is a novel mechanism of genetic exchange between cells. *Nat Cell Biol*, 9, (6) 654-659 available from: PM:17486113
- Valenti, R., Huber, V., Filipazzi, P., Pilla, L., Sovena, G., Villa, A., Corbelli, A., Fais, S., Parmiani, G., & Rivoltini, L. 2006. Human tumor-released microvesicles promote the differentiation of myeloid cells with transforming growth factor-beta-mediated suppressive activity on T lymphocytes. *Cancer Res*, 66, (18) 9290-9298 available from: PM:16982774
- van, S.E., Wouters, M.C., Van, d.A., I, Peeters, D.J., Wildiers, H., van Dam, P.A., Vergote, I., Vermeulen, P.B., Dirix, L.Y., & Van Laere, S.J. 2012. Expression profiling of cancerous and normal breast tissues identifies microRNAs that are differentially expressed in serum from patients with (metastatic) breast cancer and healthy volunteers. *Breast Cancer Res*, 14, (1) R34 available from: PM:22353773
- Vandesompele, J., De, P.K., Pattyn, F., Poppe, B., Van, R.N., De, P.A., & Speleman, F. 2002. Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol*, 3, (7) RESEARCH0034 available from: PM:12184808
- Vasudevan, S., Tong, Y., & Steitz, J.A. 2007. Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation. *Science*, 318, (5858) 1931-1934 available from: PM:18048652
- Vickers, K.C., Palmisano, B.T., Shoucri, B.M., Shamburek, R.D., & Remaley, A.T. 2011. MicroRNAs are transported in plasma and delivered to recipient cells by high-density lipoproteins. *Nat Cell Biol*, 13, (4) 423-433 available from: PM:21423178
- Viswanathan, S.R., Daley, G.Q., & Gregory, R.I. 2008. Selective blockade of microRNA processing by Lin28. *Science*, 320, (5872) 97-100 available from: PM:18292307
- Volinia, S., Calin, G.A., Liu, C.G., Ambs, S., Cimmino, A., Petrocca, F., Visone, R., Iorio, M., Roldo, C., Ferracin, M., Prueitt, R.L., Yanaihara, N., Lanza, G., Scarpa, A., Vecchione, A., Negrini, M., Harris, C.C., & Croce, C.M. 2006. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc.Natl Acad Sci U.S.A*, 103, (7) 2257-2261 available from: PM:16461460
- Voller, D., Ott, C., & Bosserhoff, A. 2013. MicroRNAs in malignant melanoma. *Clin Biochem*, 46, (10-11) 909-917 available from: PM:23360785
- Voortman, J., Goto, A., Mendiboure, J., Sohn, J.J., Schetter, A.J., Saito, M., Dunant, A., Pham, T.C., Petrini, I., Lee, A., Khan, M.A., Hainaut, P., Pignon, J.P., Brambilla, E., Popper, H.H., Filipits, M., Harris, C.C., & Giaccone, G. 2010. MicroRNA expression and clinical outcomes in patients treated with adjuvant chemotherapy after complete resection of non-small cell lung carcinoma. *Cancer Res*, 70, (21) 8288-8298 available from: PM:20978195

- Wang, F., Zheng, Z., Guo, J., & Ding, X. 2010a. Correlation and quantitation of microRNA aberrant expression in tissues and sera from patients with breast tumor. *Gynecol.Oncol*, 119, (3) 586-593 available from: PM:20801493
- Wang, J., Chen, J., Chang, P., LeBlanc, A., Li, D., Abbruzzesse, J.L., Frazier, M.L., Killary, A.M., & Sen, S. 2009. MicroRNAs in plasma of pancreatic ductal adenocarcinoma patients as novel blood-based biomarkers of disease. *Cancer Prev.Res (Phila)*, 2, (9) 807-813 available from: PM:19723895
- Wang, K., Zhang, S., Weber, J., Baxter, D., & Galas, D.J. 2010b. Export of microRNAs and microRNA-protective protein by mammalian cells. *Nucleic Acids Res*, 38, (20) 7248-7259 available from: PM:20615901
- Wang, Q., Huang, Z., Ni, S., Xiao, X., Xu, Q., Wang, L., Huang, D., Tan, C., Sheng, W., & Du, X. 2012. Plasma miR-601 and miR-760 are novel biomarkers for the early detection of colorectal cancer. *PLoS.One.*, 7, (9) e44398 available from: PM:22970209
- Weber, B., Stresemann, C., Brueckner, B., & Lyko, F. 2007. Methylation of human microRNA genes in normal and neoplastic cells. *Cell Cycle*, 6, (9) 1001-1005 available from: PM:17457051
- Wei, J., Gao, W., Zhu, C.J., Liu, Y.Q., Mei, Z., Cheng, T., & Shu, Y.Q. 2011. Identification of plasma microRNA-21 as a biomarker for early detection and chemosensitivity of non-small cell lung cancer. *Chin J Cancer*, 30, (6) 407-414 available from: PM:21627863
- Weiss, G.J., Bemis, L.T., Nakajima, E., Sugita, M., Birks, D.K., Robinson, W.A., Varella-Garcia, M., Bunn, P.A., Jr., Haney, J., Helfrich, B.A., Kato, H., Hirsch, F.R., & Franklin, W.A. 2008. EGFR regulation by microRNA in lung cancer: correlation with clinical response and survival to gefitinib and EGFR expression in cell lines. *Ann Oncol*, 19, (6) 1053-1059 available from: PM:18304967
- Welch, C., Chen, Y., & Stallings, R.L. 2007. MicroRNA-34a functions as a potential tumor suppressor by inducing apoptosis in neuroblastoma cells. *Oncogene*, 26, (34) 5017-5022 available from: PM:17297439
- Wiesner, T., Obenauf, A.C., Murali, R., Fried, I., Griewank, K.G., Ulz, P., Windpassinger, C., Wackernagel, W., Loy, S., Wolf, I., Viale, A., Lash, A.E., Pirun, M., Socci, N.D., Rutten, A., Palmedo, G., Abramson, D., Offit, K., Ott, A., Becker, J.C., Cerroni, L., Kutzner, H., Bastian, B.C., & Speicher, M.R. 2011. Germline mutations in BAP1 predispose to melanocytic tumors. *Nat Genet*, 43, (10) 1018-1021 available from: PM:21874003
- Wightman, B., Ha, I., & Ruvkun, G. 1993. Posttranscriptional regulation of the heterochronic gene lin-14 by lin-4 mediates temporal pattern formation in *C. elegans*. *Cell*, 75, (5) 855-862 available from: PM:8252622
- Winter, J., Jung, S., Keller, S., Gregory, R.I., & Diederichs, S. 2009. Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nat Cell Biol*, 11, (3) 228-234 available from: PM:19255566
- Wong, T.S., Liu, X.B., Wong, B.Y., Ng, R.W., Yuen, A.P., & Wei, W.I. 2008. Mature miR-184 as Potential Oncogenic microRNA of Squamous Cell Carcinoma of Tongue. *Clin Cancer Res*, 14, (9) 2588-2592 available from: PM:18451220

Wu, Q., Lu, Z., Li, H., Lu, J., Guo, L., & Ge, Q. 2011. Next-generation sequencing of microRNAs for breast cancer detection. *J Biomed Biotechnol.*, 2011, 597145 available from: PM:21716661

Wu, Q., Wang, C., Lu, Z., Guo, L., & Ge, Q. 2012. Analysis of serum genome-wide microRNAs for breast cancer detection. *Clin Chim.Acta*, 413, (13-14) 1058-1065 available from: PM:22387599

www.exiqon.com. www.exiqon.com. 4-1-2014.
Ref Type: Online Source

www.fluidigm.com/biomark-hd-system.html. <http://www.fluidigm.com/biomark-hd-system.html>. 4-1-2014.
Ref Type: Online Source

www.mmmp.org/MMMP/public/glossary.
<http://www.mmmp.org/MMMP/public/glossary>. 4-1-0014.
Ref Type: Online Source

Yamamoto, Y., Kosaka, N., Tanaka, M., Koizumi, F., Kanai, Y., Mizutani, T., Murakami, Y., Kuroda, M., Miyajima, A., Kato, T., & Ochiya, T. 2009. MicroRNA-500 as a potential diagnostic marker for hepatocellular carcinoma. *Biomarkers*, 14, (7) 529-538 available from: PM:19863192

Yaman, A.F., Kovancilar, M., Dizdar, Y., Darendeliler, E., Holdenrieder, S., Dalay, N., & Gezer, U. 2011. Investigation of miR-21, miR-141, and miR-221 in blood circulation of patients with prostate cancer. *Tumour.Biol*, 32, (3) 583-588 available from: PM:21274675

Yamazaki, H., Chijiwa, T., Inoue, Y., Abe, Y., Suemizu, H., Kawai, K., Wakui, M., Furukawa, D., Mukai, M., Kuwao, S., Saegusa, M., & Nakamura, M. 2012. Overexpression of the miR-34 family suppresses invasive growth of malignant melanoma with the wild-type p53 gene. *Exp Ther Med*, 3, (5) 793-796 available from: PM:22969970

Yan, L.X., Huang, X.F., Shao, Q., Huang, M.Y., Deng, L., Wu, Q.L., Zeng, Y.X., & Shao, J.Y. 2008. MicroRNA miR-21 overexpression in human breast cancer is associated with advanced clinical stage, lymph node metastasis and patient poor prognosis. *RNA.*, 14, (11) 2348-2360 available from: PM:18812439

Yanaihara, N., Caplen, N., Bowman, E., Seike, M., Kumamoto, K., Yi, M., Stephens, R.M., Okamoto, A., Yokota, J., Tanaka, T., Calin, G.A., Liu, C.G., Croce, C.M., & Harris, C.C. 2006. Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Cell*, 9, (3) 189-198 available from: PM:16530703

Yang, C.H., Yue, J., Pfeffer, S.R., Handorf, C.R., & Pfeffer, L.M. 2011. MicroRNA miR-21 regulates the metastatic behavior of B16 melanoma cells. *J Biol Chem.*, 286, (45) 39172-39178 available from: PM:21940630

Yang, H., Kong, W., He, L., Zhao, J.J., O'Donnell, J.D., Wang, J., Wenham, R.M., Coppola, D., Kruk, P.A., Nicosia, S.V., & Cheng, J.Q. 2008. MicroRNA expression profiling in human ovarian cancer: miR-214 induces cell survival and cisplatin resistance by targeting PTEN. *Cancer Res*, 68, (2) 425-433 available from: PM:18199536

- Yao, Q., Xu, H., Zhang, Q.Q., Zhou, H., & Qu, L.H. 2009. MicroRNA-21 promotes cell proliferation and down-regulates the expression of programmed cell death 4 (PDCD4) in HeLa cervical carcinoma cells. *Biochem.Biophys.Res Commun.*, 388, (3) 539-542 available from: PM:19682430
- Yekta, S., Shih, I.H., & Bartel, D.P. 2004. MicroRNA-directed cleavage of HOXB8 mRNA. *Science*, 304, (5670) 594-596 available from: PM:15105502
- Yeom, K.H., Lee, Y., Han, J., Suh, M.R., & Kim, V.N. 2006. Characterization of DGCR8/Pasha, the essential cofactor for Drosha in primary miRNA processing. *Nucleic Acids Res*, 34, (16) 4622-4629 available from: PM:16963499
- Yi, R., Qin, Y., Macara, I.G., & Cullen, B.R. 2003. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev.*, 17, (24) 3011-3016 available from: PM:14681208
- Yokoyama, S., Woods, S.L., Boyle, G.M., Aoude, L.G., MacGregor, S., Zismann, V., Gartside, M., Cust, A.E., Haq, R., Harland, M., Taylor, J.C., Duffy, D.L., Holohan, K., Dutton-Regester, K., Palmer, J.M., Bonazzi, V., Stark, M.S., Symmons, J., Law, M.H., Schmidt, C., Lanagan, C., O'Connor, L., Holland, E.A., Schmid, H., Maskiell, J.A., Jetann, J., Ferguson, M., Jenkins, M.A., Kefford, R.F., Giles, G.G., Armstrong, B.K., Aitken, J.F., Hopper, J.L., Whiteman, D.C., Pharoah, P.D., Easton, D.F., Dunning, A.M., Newton-Bishop, J.A., Montgomery, G.W., Martin, N.G., Mann, G.J., Bishop, D.T., Tsao, H., Trent, J.M., Fisher, D.E., Hayward, N.K., & Brown, K.M. 2011. A novel recurrent mutation in MITF predisposes to familial and sporadic melanoma. *Nature*, 480, (7375) 99-103 available from: PM:22080950
- Yu, S.L., Chen, H.Y., Chang, G.C., Chen, C.Y., Chen, H.W., Singh, S., Cheng, C.L., Yu, C.J., Lee, Y.C., Chen, H.S., Su, T.J., Chiang, C.C., Li, H.N., Hong, Q.S., Su, H.Y., Chen, C.C., Chen, W.J., Liu, C.C., Chan, W.K., Chen, W.J., Li, K.C., Chen, J.J., & Yang, P.C. 2008. MicroRNA signature predicts survival and relapse in lung cancer. *Cancer Cell*, 13, (1) 48-57 available from: PM:18167339
- Zaidi, M.R., Day, C.P., & Merlino, G. 2008. From UVs to metastases: modeling melanoma initiation and progression in the mouse. *J Invest Dermatol*, 128, (10) 2381-2391 available from: PM:18787547
- Zeng, Y. & Cullen, B.R. 2004. Structural requirements for pre-microRNA binding and nuclear export by Exportin 5. *Nucleic Acids Res*, 32, (16) 4776-4785 available from: PM:15356295
- Zenz, T., Mohr, J., Eldering, E., Kater, A.P., Buhler, A., Kienle, D., Winkler, D., Durig, J., van Oers, M.H., Mertens, D., Dohner, H., & Stilgenbauer, S. 2009. miR-34a as part of the resistance network in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*, 113, (16) 3801-3808 available from: PM:18941118
- Zernecke, A., Bidzhekov, K., Noels, H., Shagdarsuren, E., Gan, L., Denecke, B., Hristov, M., Koppel, T., Jahantigh, M.N., Lutgens, E., Wang, S., Olson, E.N., Schober, A., & Weber, C. 2009. Delivery of microRNA-126 by apoptotic bodies induces CXCL12-dependent vascular protection. *Sci Signal*, 2, (100) ra81 available from: PM:19996457

- Zhang, H., Li, Y., & Lai, M. 2010a. The microRNA network and tumor metastasis. *Oncogene*, 29, (7) 937-948 available from: PM:19935707
- Zhang, H.L., Yang, L.F., Zhu, Y., Yao, X.D., Zhang, S.L., Dai, B., Zhu, Y.P., Shen, Y.J., Shi, G.H., & Ye, D.W. 2011. Serum miRNA-21: elevated levels in patients with metastatic hormone-refractory prostate cancer and potential predictive factor for the efficacy of docetaxel-based chemotherapy. *Prostate*, 71, (3) 326-331 available from: PM:20842666
- Zhang, J.G., Wang, J.J., Zhao, F., Liu, Q., Jiang, K., & Yang, G.H. 2010b. MicroRNA-21 (miR-21) represses tumor suppressor PTEN and promotes growth and invasion in non-small cell lung cancer (NSCLC). *Clin Chim. Acta*, 411, (11-12) 846-852 available from: PM:20223231
- Zhang, L., Huang, J., Yang, N., Greshock, J., Megraw, M.S., Giannakakis, A., Liang, S., Naylor, T.L., Barchetti, A., Ward, M.R., Yao, G., Medina, A., O'brien-Jenkins, A., Katsaros, D., Hatzigeorgiou, A., Gimotty, P.A., Weber, B.L., & Coukos, G. 2006. microRNAs exhibit high frequency genomic alterations in human cancer. *Proc.Natl Acad Sci U.S.A*, 103, (24) 9136-9141 available from: PM:16754881
- Zhang, Y., Jia, Y., Zheng, R., Guo, Y., Wang, Y., Guo, H., Fei, M., & Sun, S. 2010c. Plasma microRNA-122 as a biomarker for viral-, alcohol-, and chemical-related hepatic diseases. *Clin Chem.*, 56, (12) 1830-1838 available from: PM:20930130
- Zhang, Z., Li, Z., Gao, C., Chen, P., Chen, J., Liu, W., Xiao, S., & Lu, H. 2008. miR-21 plays a pivotal role in gastric cancer pathogenesis and progression. *Lab Invest*, 88, (12) 1358-1366 available from: PM:18794849
- Zhang, Z., Sun, H., Dai, H., Walsh, R.M., Imakura, M., Schelter, J., Burchard, J., Dai, X., Chang, A.N., Diaz, R.L., Marszalek, J.R., Bartz, S.R., Carleton, M., Cleary, M.A., Linsley, P.S., & Grandori, C. 2009. MicroRNA miR-210 modulates cellular response to hypoxia through the MYC antagonist MNT. *Cell Cycle*, 8, (17) 2756-2768 available from: PM:19652553
- Zhao, H., Shen, J., Medico, L., Wang, D., Ambrosone, C.B., & Liu, S. 2010. A pilot study of circulating miRNAs as potential biomarkers of early stage breast cancer. *PLoS.One.*, 5, (10) e13735 available from: PM:21060830
- Zheng, D., Haddadin, S., Wang, Y., Gu, L.Q., Perry, M.C., Freter, C.E., & Wang, M.X. 2011. Plasma microRNAs as novel biomarkers for early detection of lung cancer. *Int J Clin Exp Pathol*, 4, (6) 575-586 available from: PM:21904633
- Zhu, S., Wu, H., Wu, F., Nie, D., Sheng, S., & Mo, Y.Y. 2008. MicroRNA-21 targets tumor suppressor genes in invasion and metastasis. *Cell Res*, 18, (3) 350-359 available from: PM:18270520

AUTEUR : ARMAND-LABIT Virginie

TITRE : Identification d'un profil de microARNs plasmatiques comme biomarqueur potentiel dans le mélanome métastatique

DIRECTEUR DE THESE : Pr FAVRE Gilles

RESUME : Le mélanome métastatique est une pathologie de mauvais pronostic. A ce jour, aucun biomarqueur prédictif de son évolution n'existe, la classification anatomopathologique conventionnelle reste pour le moment le meilleur facteur pronostic. Les microARNs (miARN), petits ARNs non codants, régulent l'expression génique, sont fortement impliqués dans l'oncogénèse et la progression tumorale et sont souvent dérégulés dans les tumeurs, dont le mélanome. Leurs formes circulantes sont depuis peu étudiées comme potentiel biomarqueur diagnostique et pronostique de nombreux cancers.

Nous avons identifié, à l'aide de biopuces, des miARNs plasmatiques dérégulés chez des patients atteints de mélanome métastatique. Nous avons dosé ensuite ces miARNs par RT-qPCR sur une cohorte d'apprentissage et de validation. Nous avons également étudié l'expression des miARNs d'intérêt au niveau tissulaire et cellulaire. Cette étude, sur 74 patients, a mis en évidence 8 miARNs plasmatiques discriminant de façon significative les malades et les sujets sains. Nous avons de plus identifié un profil de deux miARNs permettant de discriminer les deux populations avec d'excellentes performances. Quatre miARNs sont apparus associés à la survie. La majorité des miARNs plasmatiques dérégulés ne paraît pas avoir une origine tumorale et serait probablement lié au microenvironnement. L'ensemble de nos résultats montre que la détection du profil des deux miARNs dans le plasma pourrait devenir un biomarqueur diagnostique non invasif, sensible, reproductible et prédictif dans le mélanome métastatique, et pourrait être utilisé à terme pour permettre l'identification précoce de patients à haut risque de récurrence.

SUMMARY: Metastatic melanoma is a disease of very poor prognosis. To date, no predictive biomarker evolution exist, conventional histological classification is currently the best prognostic factor. MicroRNAs (miRNAs), small non-coding RNAs, regulate gene expression, are strongly implicated in oncogenesis and tumor progression and are often deregulated in tumors, including melanoma. Their circulating forms have recently been studied as a potential diagnostic and prognostic biomarker of many cancers.

We studied, by microarray, plasma miRNAs deregulated in patients with metastatic melanoma. Then, we assayed these miRNAs by RT-qPCR in a training and validation cohort. We also investigated the expression of miRNAs of interest in tumoral tissue and cell lines.

This study of 74 patients showed eight miRNAs plasma significantly discriminating patients and healthy subjects. We have also identified a profile of two miRNAs to discriminate between the two populations with excellent performance. Four appeared miRNAs associated with survival. The majority of plasma miRNAs deregulated does not seem to have a tumor origin and is probably related to the microenvironment. All of our results show that the detection of the profile of the two miRNAs in the plasma may become a sensitive and reproducible non-invasive diagnostic biomarker in metastatic melanoma and could be used eventually to allow early identification of patients high risk of recurrence.

MOTS CLES: mélanome – miARNs – plasma

DISCIPLINE : Cancérologie

LABORATOIRE : CRCT Equipe 3, Institut Claudius Regaud, 20-22 rue du Pont Saint Pierre, 31300 Toulouse