



**COLLEGE DOCTORAL**

**École Doctorale  
BIOLOGIE SANTÉ**

**UNIVERSITE DU DROIT ET DE LA SANTE - LILLE II  
THESE DE DOCTORAT D'UNIVERSITE**

Pour l'obtention du titre de  
**DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DU DROIT ET DE LA SANTE - LILLE II**  
**Discipline : Sciences de la Vie et de la Santé**

Présentée par  
**Kelly GAUDELOT**

**Rôle de miR-21 dans la progression tumorale et la chimiorésistance des  
carcinomes rénaux à cellules claires  
Etude de la boucle de régulation entre miR-21 et PPAR $\alpha$**

**Thèse dirigée par Monsieur le Docteur Michaël PERRAIS**

Soutenue le 23 Juin 2017

Devant le jury composé de :

**Monsieur le Docteur Gilles Pagès**

**Monsieur le Docteur Olivier Peyruchaud**

**Madame le Docteur Christelle Cauffiez**

**Monsieur le Docteur Bernard Mari**

**Madame le Docteur Isabelle Van Seuningen**

**Monsieur le Docteur Michaël Perrais**

# Remerciements

Ce travail de Thèse a été effectué au sein de l'équipe :

"Mucines, différenciation et cancérogenèse épithéliales"

Directrice d'équipe : **Madame le Docteur Isabelle Van Seuningen**

Centre de recherche Jean-Pierre Aubert, UMR-S 1172

INSERM - Université de Lille - CHRU de Lille

Sous la direction scientifique de **Monsieur le Docteur Michaël Perrais**

# Remerciements

*Le travail présenté dans ce manuscrit de thèse représente l'aboutissement de quatre années passées au sein de l'équipe "Mucines, différenciation et cancérogenèse épithéliales" dirigée par Madame le Docteur Isabelle Van Seuningen.*

Je tiens à remercier tout particulièrement,

**Monsieur le Docteur Luc Buée**, directeur de l'UMR-S 1172, pour m'avoir accueillie au sein du Centre de Recherche Jean-Pierre Aubert où j'ai pu effectuer ce travail.

**Madame le Docteur Isabelle Van Seuningen** qui m'a accueilli au sein de son équipe, Merci pour vos remarques avisées qui m'ont fait progresser durant ces années. Merci à vous d'avoir bien voulu présider mon jury de thèse.

**Monsieur le Docteur Michaël Perrais**, qui m'a accueillie dans la team « Rein » alors que je n'étais encore qu'une petite M1. Merci à vous de m'avoir permis de mener cette thèse. « Il y a eu des hauts et des bas mais ca y est, on y est ! » Merci à vous pour vos conseils, votre soutien, votre bonne humeur, votre gentillesse.

Les rapporteurs de mon jury de Thèse pour l'honneur qu'ils me font : **Monsieur le Docteur Gilles Pages** et **Monsieur le Docteur Olivier Peyruchaud**. Merci d'avoir accepté de juger ce travail.

**Monsieur le Docteur Bernard Mari** et **Madame la Docteur Christelle Cauffiez** pour avoir accepté de faire partie de ce jury de thèse et pour avoir suivi ce travail durant ces trois années en faisant partie de mon comité de suivi de thèse.

**Monsieur le Docteur Sébastien Aubert** et **Madame le Docteur Viviane Gnemmi**, vos conseils d'anapath m'ont toujours été fort utiles. Merci à vous d'avoir suivi ce travail.

**Brigitte Hémon**, une technicienne hors-pair, un grand merci de m'avoir formée à mes débuts et d'avoir résisté à l'appel de la retraite jusqu'à la fin de cette thèse.

Messieurs MUC1-TLR4 : **Jean-Baptiste Gibier** et **Thomas S...** , ce partage de bureau pendant vos M2 fut un plaisir , surtout ce partage de grandes chansons françaises ! Bon courage à vous pour la suite.

Les docteurs qui sont passés avant moi : **Fatima Lahdaoui, Romain Vasseur, Matthieu Corvaisier** et **Lucie Coppin**. Et voilà je vous rejoins dans le club très select des docteurs. Merci à vous de m'avoir toujours offert votre aide.

La super-team de mes M2 préférées : **Marjolaine Bauzone, Marie Vandepoutte, Marguerite Messier, Nihad Boukrout, Sumeyye Cavdarli**. Merci pour cette super année passée ensemble à manger et manger et que ça continue encore longtemps. Ce fut une très belle rencontre. Marjolaine et Sumeyye, « Vous aussi vous êtes des doctorantes maintenant », je vous souhaite le meilleur pour votre thèse. Vous êtes des gagnantes. Nihad, « J'espère que tu seras une future doctorante car tu le mérites amplement avec tout le travail que tu fournis ». Docteur Marguerite, « Je te souhaite une belle et grande carrière de chirurgien (bisous à ta mini-pâquerette, Jeanne) ». Marie, « Que la force soit avec toi pour continuer dans le monde de la recherche, les organoïdes comptent sur toi ».

Merci aux chercheurs de l'équipe : **Monsieur le Docteur Nicolas Jonckere, Madame le Docteur Audrey Vincent** et **Madame le Docteur Bernadette Neve**.

Et sans oublier Monsieur Crispr-Cas9 : **Mouloud Souidi**, merci pour tes conseils et pour tes multiples demandes en mariage mais c'est toujours non.

Merci à tous les membres de l'équipe que je n'ai pas pu citer.

Merci à tous les membres du Centre de Recherche Jean-Pierre Aubert qui ont croisé ma route, en particulier, **Salim Dekioug**, le roi des western blot, merci pour ta bonne humeur et tes blagues foireuses.

Sur un plan plus personnel,

Un grand merci à ma famille qui m'a soutenue et a cru en moi durant toute ces années d'études. **Ma petite maman chérie, ma grande sœur adorée Lindsay, ma petite sœur Wendy d'amour**, les 3 femmes de ma vie, cette thèse je vous la dédie.

Merci à ma super bande d'amis, grâce à qui je ne suis pas devenue folle (ou presque). Merci pour tous ces moments où vous m'avez permis de décompresser et de penser à autre chose. La liste est tellement longue : mes deux cousines préférées, **Amandine & Elodie, Pauline, Marie, Thomas & Vincent** ...

Et merci à **Snow** de me tenir compagnie depuis toutes ces longues années.

# Remerciements

Je remercie

Le Centre Hospitalier Régional Universitaire de Lille

La Région Haut de France

La Ligue Nationale Contre le Cancer

Pour leur soutien financier qui a permis la réalisation de ces travaux

# Sommaire

Sommaire .....	1
Résumé .....	3
Abstract .....	4
Liste des abréviations .....	5
Objectifs de thèse .....	8
Introduction .....	9
I Le cancer du rein .....	10
A Anatomie et fonction du rein .....	10
B Les cancers du rein .....	11
C Données épidémiologiques .....	13
D Facteurs de risques .....	14
E Diagnostic .....	15
F Pronostic .....	17
G Voies moléculaires impliquées .....	20
H Traitement .....	24
II Les microARNs .....	27
A Les petits ARNs régulateurs .....	27
B Découverte de l'interférence .....	28
C Découverte des microARNs .....	28
D Organisation génomique .....	29
E Biogenèse des microARNs .....	29
F Nomenclature des microARN .....	31
G Mode d'action .....	32
H Intérêt clinique dans le cadre du cancer du rein .....	37
I miR-21 .....	43
III PPAR $\alpha$ .....	49
A Généralités .....	49
B Mode d'action des récepteurs PPAR $\alpha$ .....	50
C Rôle dans le métabolisme lipidique .....	51
D Rôle en cancérogenèse .....	52
E PPAR $\alpha$ et miR-21 .....	52
Résultats .....	54
Partie I : Rôle de miR-21 dans la progression tumorale et la chimiorésistance des carcinomes rénaux à cellules claires .....	55
A miR-21 est surexprimé dans le cRCC .....	56

B miR-21 augmente les propriétés d'invasion et de migration des cellules tumorales rénales.....	58
C Rôle de miR-21 dans la signalisation intracellulaire .....	59
D miR-21 augmente la chimiorésistance des cRCC .....	60
Partie II : Etude de la boucle de régulation entre miR-21 et PPAR $\alpha$ .....	63
A L'expression de PPAR $\alpha$ est perdue dans les cRCC .....	64
B Régulation de miR-21 par PPAR $\alpha$ .....	65
C Régulation de l'activité de PPAR $\alpha$ par miR-21 .....	69
Discussion.....	72
I miR-21 et cRCC .....	73
II miR-21 et PPAR $\alpha$ .....	77
Perspectives.....	79
I miR-21 et cRCC .....	80
II miR-21 et PPAR $\alpha$ .....	81
Appendice technique.....	83
I Culture cellulaire .....	84
A Lignées cellulaires.....	84
B Conditions de culture .....	84
C Comptage en cellule de Malassez .....	85
II Cohorte de patients.....	86
III Biologie cellulaire .....	86
A Transfection des oligonucléotides.....	86
B Transfection des plasmides .....	87
C Test de migration et d'invasion .....	88
D Test de chimiorésistance .....	89
IV Biologie moléculaire.....	90
A Isolation des ARN totaux.....	90
B RT-qPCR.....	91
C Immunoprécipitation de la chromatine (ChIP).....	94
D Hybridation in situ .....	97
V Biochimie .....	98
A Western blot.....	98
B Test luciférase.....	99
VI Immunohistochimie.....	100
VII Analyse statistique.....	100
Bibliographie .....	101
Annexe.....	116

## Résumé

Le carcinome rénal à cellules claires (cRCC) est le principal type histologique de carcinome rénal et l'une des tumeurs les plus résistantes à la chimio et à la radiothérapie. L'absence de biomarqueurs pour la détection précoce et pour le suivi des patients est responsable d'un mauvais pronostic. Il est nécessaire d'identifier de nouveaux biomarqueurs et des cibles thérapeutiques pour améliorer la prise en charge des patients. Les microARNs, des petits ARN non codants de 22 nucléotides, qui ont été précédemment montrés comme favorisant l'initiation et la progression tumorale, semblent être de bons candidats.

Nous avons focalisé notre étude sur (i) miR-21 qui est le principal oncomiR surexprimé dans le cRCC et (ii) le récepteur nucléaire PPAR $\alpha$  (Peroxisome Proliferator Activated Receptor), l'une des cibles de miR-21.

D'une part, sur une cohorte de 99 échantillons de cRCC primaires, nous avons montré que l'expression de miR-21 était plus élevée dans les tissus cancéreux que dans les tissus non tumoraux adjacents. *In vitro*, miR-21 est également surexprimé dans les lignées cellulaires de carcinomes rénaux comparées à la lignée cellulaire épithéliale HK-2 provenant de tubes proximaux humains. De plus, nous avons également montré que la surexpression de miR-21 augmente les propriétés de migration et d'invasion des cellules cancéreuses rénales ainsi que les voies de signalisation prolifératives et anti-apoptotiques, alors que des résultats opposés ont été observés en utilisant une stratégie d'inhibition anti-miR-21. Enfin, nous avons évalué le rôle du miR-21 dans la chimiorésistance du cRCC et montré, en outre, que l'inhibition de miR-21 augmentait significativement la chimiosensibilité au paclitaxel, au 5-fluorouracile, à l'oxaliplatine et au dovitinib, diminuait l'expression des transporteurs à efflux MRP1-6/ABCC1-6 et augmentait l'expression des transporteurs à influx SLC22A1/OCT1, SLC22A2/OCT2 et SLC31A1/CTR1. Ces résultats ont permis la publication d'un article dans *Tumor Biology* se trouvant en annexe.

D'autre part, dans les tissus de patients atteints de cRCC, nous avons montré pour la première fois que la surexpression de miR-21 est en corrélation avec une perte d'expression de PPAR $\alpha$ . *In vitro*, nous avons montré que miR-21 cible le 3'-UTR de PPAR $\alpha$  et diminue son expression protéique et que la surexpression de miR-21 diminue l'activité transcriptionnelle de PPAR $\alpha$ . En outre, la surexpression et l'activation de PPAR $\alpha$  diminuent l'expression de miR-21. En effet, PPAR $\alpha$  interagit avec les facteurs de transcription AP-1 et NF- $\kappa$ B et empêche ainsi leur liaison au promoteur de miR-21 diminuant ainsi sa transcription.

En conclusion, nous avons montré que (i) miR-21 est un acteur clé de la progression du cancer du rein et joue un rôle important dans la résistance aux chimiothérapies et (ii) qu'il existe une boucle de régulation négative entre miR-21 et PPAR $\alpha$  dans le cRCC.

## Abstract

Renal clear cell carcinoma (cRCC) is the major histological type of renal carcinoma and one of the most chemo- and radio-resistant tumors. The absence of biomarkers for early detection and for monitoring patients is responsible of a poor prognosis. It is necessary to identify new biomarkers and therapeutic targets to improve patient care. MicroRNAs, small noncoding RNAs of 22 nucleotides, which have been previously shown to promote malignant initiation and progression, appear to be good candidates.

We focused our study on (i) miR-21 which is the main overexpressed oncomirs in cRCC and (ii) the nuclear receptor PPAR $\alpha$  (Peroxisome Proliferator Activated Receptor), one of miR-21 targets.

In one hand, by using a cohort of 99 primary cRCC samples, we showed that miR-21 expression in cancer tissues was higher than in adjacent non-tumor tissues. *In vitro*, miR-21 was also overexpressed in renal carcinoma cell lines compared to HK-2 human proximal tubule epithelial cell line. Moreover, we also showed that miR-21 overexpression increased migratory, invasive, proliferative, and anti-apoptotic signaling pathways whereas opposite results were observed using an anti-miR-21-based silencing strategy. Finally, we assessed the role of miR-21 in mediating cRCC chemoresistance and further showed that miR-21 silencing significantly increased chemosensitivity of paclitaxel, 5-fluorouracil, oxaliplatin and dovitinib, decreased expression of multi-drug resistance genes and increased SLC22A1/OCT1, SLC22A2/OCT2 and SLC31A1/CTR1 platinum influx transporter expression. These results led to the publication of an article in Tumor Biology in annex.

In other hand, in cRCC tissue patients, we showed for the first time that miR-21 overexpression correlates with a loss of expression of PPAR $\alpha$ . *In vitro*, we showed that miR-21 targets PPAR $\alpha$  3'-UTR and decreases its protein expression and miR-21 overexpression decreases the transcriptional activity of PPAR $\alpha$ . Furthermore, PPAR $\alpha$  overexpression and activation decrease miR-21 expression. In fact, PPAR $\alpha$  interacts with AP-1 and NF-kappaB transcription factors and thus prevents their binding to the miR-21 promoter thus decreasing its transcription.

In conclusion, we have shown that (i) miR-21 is a key actor of renal cancer progression and plays an important role in the resistance to chemotherapeutic drugs and (ii) there is a negative regulatory loop between miR-21 and PPAR $\alpha$  in cRCC.

## Liste des abréviations

ABCC : ATP binding cassette subfamily C  
ABD : AGO binding domain  
ADN : Acide désoxyribonucléique  
AG : Acide Gras  
AP-1 : Activator protein 1  
ASO : oligonucléotide antisens  
ARE : AU rich element  
ARN : Acide ribonucléique  
ARNi : ARN interference  
ARNm : ARN messenger  
ARNr : ARN ribosomique  
ARNt : ARN de transfert  
CCAFU : Comité de cancérologie de l'Association française d'urologie  
ChIP : immunoprécipitation de la chromatine  
chRCC : Carcinome rénal à cellules chromophobes  
cRCC : Carcinome rénal à cellules claires  
CTR : Copper transporter  
DBD : DNA Bindind Domain  
DGCR8 : DiGeorge Syndrome Critical Region Gene 8  
ECOG : Eastern Cooperative Oncology Group  
EGF : Epidermal growth factor  
EPO : érythropoïétine  
FC : facteur de croissance  
FT : facteurs de transcription  
FXR1 : fragile X mental retardation related protein 1  
GW182 : glycine-tryptophan repeat-containing protein of 182 kDA  
HGF : Hepatocyte growth factor  
HIF : Hypoxia Inducible Factor  
HRE : Hypoxia Responsive Element  
IFN $\alpha$  : Interferon alpha  
IGF : Insulin growth factor  
IL2 : Interleukin 2

IRM : Imagerie par résonance magnétique  
ISUP : International Society of Urological Pathology  
LBD : Ligand Binding Domain  
LDH : Lactate déshydrogénase  
LNA : locked nucleic acid  
lncARN : long ARN non codant  
miARN : microARN  
MMP : métalloprotéase  
MRE : miRNA Response Element  
MRP : Multidrug resistance-associated protein  
mTOR : mammalian Target of Rapamycin  
mTORC : mammalian Target of Rapamycin complex  
NF- $\kappa$ B : nuclear factor-kappa B  
NLS : Nuclear localization sequence  
OC : Oncocytome  
OCT : Organic cation transporter  
OUU : Obstruction urétérale unilatérale  
PAZ : PIWI-ARGONAUTE-ZWILLE  
PD-1 : programmed death 1  
PDCD4 : Programmed cell death protein 4  
PDGF $\beta$  : Platelet derived growth factor beta  
PDK1 : Pyruvate Dehydrogenase Kinase 1  
PI3K : phosphoinositide 3-kinase  
piARN : ARN associé à PIWI  
PIP2 : phosphatidyl-inositol-diphosphate  
PIP3 : phosphatidyl- inositol-triphosphate  
PPAR $\alpha$  : Peroxisome Proliferator Activated Receptor  
PPRE : PPAR Response Element  
pRCC : Carcinome rénal à cellules papillaires  
PTEN : phosphatase and tensin homolog  
RCC : Carcinome à cellules rénales  
RISC : RNA-induced silencing complex  
RLC : RISC loading complex  
RTK : Récepteur tyrosine kinase  
RXR : Retinoïd X Receptor)

siARN : petit ARN interférent  
SLC : Solute carrier  
snARN : petit ARN nucléolaire  
SNP : Single Nucleotide Polymorphism  
TDM : Tomodensitométrie  
TGF : Transforming growth factor  
TLDA : TaqMan Low Density Arrays  
TMEM49 : Transmembrane protein 49  
TNF $\alpha$  : Tumor necrosis factor  
TNM : Tumor, Nodes, Metastasis  
TNRC : Trinucleotide repeat-containing protein  
TSC : Tuberos Sclerosis Complex  
TSS : site d'initiation de la transcription  
UTR : Untranslated Transcribed Region  
VEGF : Vascular endothelial growth factor  
VHL : von Hippel-Lindau  
XPO5 : Exportine 5

## Objectifs de thèse

Ce travail de thèse s'articule autour de deux axes.

Dans un premier temps, nous avons reconfirmé les données de la littérature concernant le rôle de miR-21 dans le cRCC. Tout d'abord, *in vivo*, nous avons déterminé le profil d'expression de miR-21 sur une cohorte de patients atteints de cRCC par rapport aux tissus sains correspondants. Ensuite, *in vitro*, nous disposons d'un panel de lignées cancéreuses rénales et des outils nécessaires à la modulation de l'expression de miR-21 (premiR-21 et LNA-anti-miR-21) permettant de déterminer son effet sur les différentes propriétés cellulaires (migration, invasion, prolifération et apoptose). Finalement, nous nous sommes intéressés à un éventuel rôle de miR-21 dans la chimiorésistance caractéristique du cRCC.

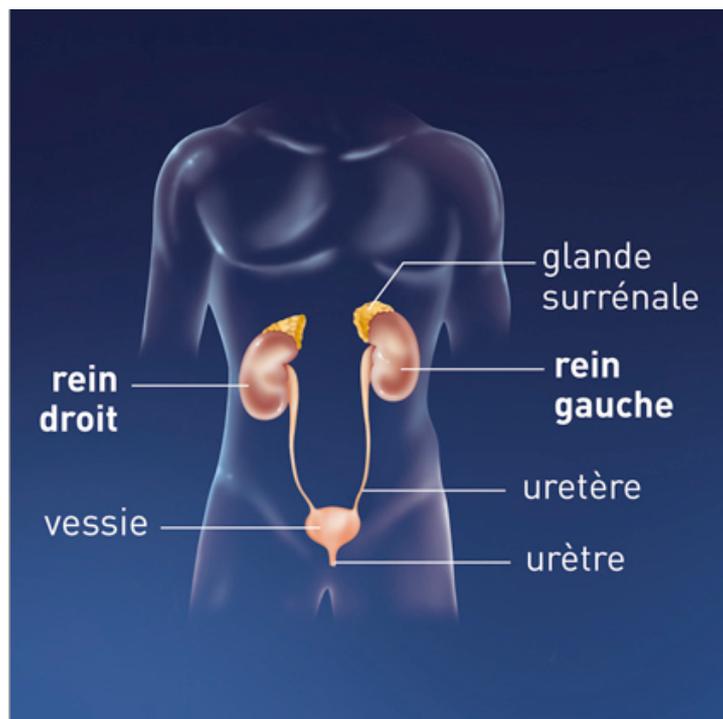
Dans un deuxième temps, nous nous sommes focalisés sur l'une des cibles de miR-21, PPAR $\alpha$ . L'analyse de la littérature nous a laissé penser qu'il pouvait exister une boucle de régulation négative entre ces deux protagonistes. D'un côté, PPAR $\alpha$  inhibe les voies de signalisation AP-1 et NF-kB qui sont-elles même impliquées dans la régulation transcriptionnelle de miR-21. D'un autre côté, miR-21 cible PPAR $\alpha$  et diminue son expression.

# Introduction

# **I Le cancer du rein**

## **A Anatomie et fonction du rein**

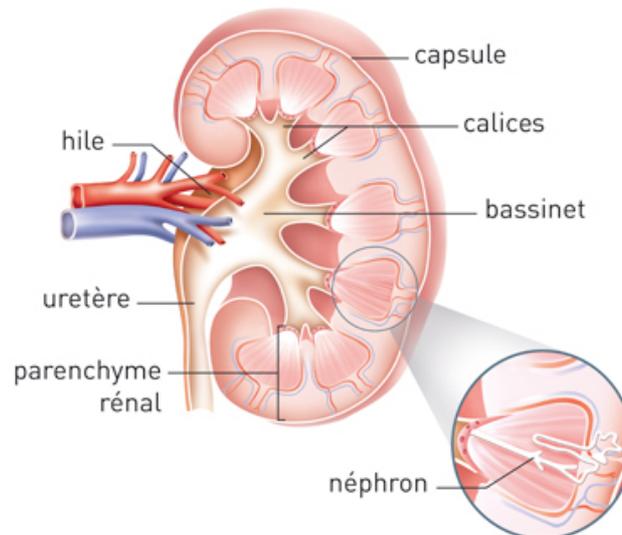
Les reins appartiennent à l'appareil urinaire qui comprend également la vessie, les uretères reliant la vessie aux reins et l'urètre reliant la vessie à l'extérieur (Figure 1). Leur rôle est important puisqu'ils servent de filtre qui séparent les déchets circulant dans le sang et les éliminent en produisant l'urine.



**Figure 1 : Place des reins dans le système urinaire (www.e-cancer.fr)**

L'Homme possède en principe deux reins, situés dans l'abdomen immédiatement sous le diaphragme à la hauteur des deux dernières côtes et à proximité du dos. Ils sont disposés de manière symétrique de chaque côté du corps ; le rein droit se trouve en dessous et en arrière du foie et le rein gauche en dessous et en arrière de la rate. Toutefois, un seul rein suffit pour vivre et 5% des individus n'en ont qu'un, le plus souvent il s'agit du rein droit. Il est protégé par plusieurs couches tissulaires ; tout d'abord une couche de graisse appelée graisse périrénale puis ensuite d'une couche de tissu conjonctif appelée fascia rénal ou fascia de Gérota. D'une longueur moyenne de 12 centimètres, d'une hauteur de 6 centimètres et d'une largeur de 3 centimètres, il se compose de plusieurs parties (Figure 2), tout d'abord, la capsule qui est l'enveloppe externe protégeant le rein,

ensuite, le parenchyme rénal comprenant le cortex périphérique et finalement la médullaire profonde centrale. Il s'agit de la partie renfermant les néphrons qui sont les unités structurales et fonctionnelles du rein. Ils sont composés de plusieurs parties : le glomérule, le tube proximal, le tube intermédiaire, le tube distal et le segment d'union. Finalement les calices et le bassinnet collectent l'urine produite par les néphrons pour la déverser dans la vessie *via* l'urètre.



**Figure 2 : Structure du rein (www.e-cancer.fr)**

Le rein assure de nombreuses fonctions. Son rôle principal est l'équilibre hydro-électrique en éliminant les sels (sodium, potassium, calcium, etc.) et l'eau en excès ainsi que les déchets produits par l'organisme comme l'urée, l'acide urique ou la créatinine. Il joue également un rôle de détoxification en éliminant des substances exogènes telles que des résidus de médicament qui pourraient être nocifs pour l'organisme. Il a finalement une fonction endocrine permettant de réguler certaines fonctions physiologiques. Il produit ainsi l'érythropoïétine (EPO) qui stimule la production des globules rouges dans la moelle osseuse, et la rénine qui participe au contrôle de la tension artérielle.

## **B Les cancers du rein**

Un cancer survient lorsqu'une cellule rénale normale se transforme et se multiplie de manière incontrôlée pour donner un amas de cellules cancéreuses appelé tumeur. La plupart des tumeurs du rein se développent à partir des cellules du parenchyme rénal. Elles peuvent provenir de différentes parties du néphron ce qui donnera différentes tumeurs. A l'heure actuelle, seule l'analyse histologique permet

de différencier les différents types de tumeurs du rein lors du diagnostic de la maladie (Figure 3).

#### *a) Tumeurs bénignes*

Dans 10% des cas, les tumeurs rénales sont bénignes. Il s'agit d'une néoformation tissulaire très similaire à un tissu sain et l'évolution lente restera locale. Elles ne donneront pas de métastases et n'aboutiront pas au décès du patient. Il s'agira le plus fréquemment d'adénomes papillaires souvent retrouvés en cas d'hypertension artérielle ou de néphroangiosclérose. Ces tumeurs sont le plus souvent asymptomatiques mais leur coexistence fréquente avec le carcinome papillaire peut suggérer une évolution maligne. Il peut également s'agir d'oncocytomes (OC) qui se développent à partir des cellules des tubes collecteurs tout comme le carcinome chromophile. Il partage des caractéristiques morphologiques similaires à celui-ci qui complique le diagnostic (Méjean et al. 2004).

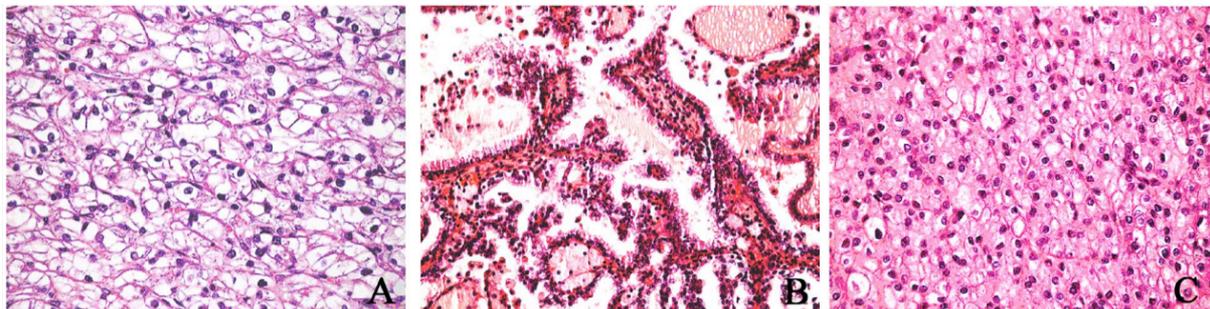
#### *b) Tumeurs malignes*

Les cancers du rein sont des carcinomes qui se développent à partir des tissus épithéliaux que l'on nomme carcinomes à cellules rénales (RCC). Plus d'une trentaine de sous-type histologique de tumeurs du rein sont décrits en fonction de leur origine mais la majorité, 70% des cas, est représentée par les carcinomes rénaux à cellules claires (cRCC). Ils proviennent des cellules du tube contourné proximal et se caractérisent par une prolifération de cellules au cytoplasme apparemment vide d'où son appellation. On trouve dans ces tumeurs une activité angiogénique importante ainsi que des foyers de polynucléaires éosinophiles. Les tumeurs peuvent avoir plusieurs formes ; solide, papillaire ou kystique. Ce sont des tumeurs très agressives et de mauvais pronostic. La mutation du gène *vhl* (von Hippel-Lindau) est fréquemment retrouvée dans les cRCC ce qui en fait une tumeur richement vascularisée. Les patients atteints de cRCC ont le plus mauvais pronostic quel que soit le stade ou le grade (Capitanio et al. 2009). Le taux de survie à 5 ans est de 91%, 74%, 67% et 32% pour les stades I, II, III et IV de la classification TNM (voir chapitre F page 20) (Tsui et al. 2000). Ce sont ces tumeurs qui vont nous intéresser dans notre étude.

Dans 15% des cas, on trouve les carcinomes rénaux à cellules papillaires (pRCC) issus des cellules du tube contourné distal. Ils présentent une trisomie des

chromosomes 7 et 17 ainsi qu'une perte du chromosome Y. Les pRCC sont hétérogènes avec deux sous-types présentant chacun une histologie et un pronostic propre. Comparé au cRCC, les pRCC sont plus localisés avec un taux de pT1 plus important (74,9% vs 62,9%) et ont un meilleur pronostic avec une survie à 5 ans de 85,1% vs 76,9% (Steffens et al. 2012). Les pRCC de type 1 sont composés de petites cellules cubiques à cytoplasme basophile et à noyau peu nucléolé et sont en général de bon pronostic. Tandis que les pRCC de type 2 sont composés de cellules plutôt cylindriques à cytoplasme éosinophile et à noyau nucléolé et ont un moins bon pronostic (Sukov et al. 2012).

Dans 5% des cas, on trouve les carcinomes rénaux à cellules chromophobes (chRCC) qui se développent à partir des cellules intercalaires du tube collecteur. La tumeur, souvent unique, est composée des cellules à membranes cytoplasmiques très nettes et non optiquement vides. Des pertes des chromosomes 2, 10, 13, 17 et 21 sont fréquemment retrouvées. Le pronostic des chRCC est plutôt bon avec un taux de survie à 5 ans de 93% et à 10 ans de 88,9% (Volpe et al. 2012).



**Figure 3 : Coupes histologiques des différents types de RCC (Corti et al. 2006). (A) cRCC, (B) pRCC et (C) chRCC**

### **C Données épidémiologiques**

En 2015, en France, on estime à 13 000 le nombre de nouveaux cas de cancer du rein. Il représente ainsi environ 3% de l'ensemble des cancers de l'adulte. Il est situé en troisième position des tumeurs urologiques après le cancer de la prostate et le cancer de la vessie. Il touche deux fois plus les hommes que les femmes. L'âge moyen au moment du diagnostic est de 65 ans (e-cancer.fr).

Les formes familiales ne concernent qu'un individu sur 36 000 naissances et se caractérisent par la survenue précoce (avant 30 ans) d'une tumeur de petite taille qui peut être bilatérale.

On a observé au cours des vingt dernières années une augmentation constante de l'ordre de 2% de l'incidence de survenue du cancer du rein en Europe mais également dans le monde entier. Son incidence reste généralement plus importante dans les pays développés. Cela est dû à des facteurs de risques tels que le tabagisme et l'obésité qui sont de plus en plus présents mais également à une découverte fortuite lors d'examen de routine également plus importante. Ce taux d'incidence semble toutefois se stabiliser.

En France, 3 957 décès par cancer du rein ont été estimés en 2012 (2 651 chez les hommes et 1 306 chez les femmes). L'âge de mortalité se situe entre 75 et 85 ans. Le taux de mortalité a augmenté régulièrement jusque dans les années 1990, pour ensuite se stabiliser et finalement entamer une baisse pouvant s'expliquer par une baisse du tabagisme et une maîtrise des autres facteurs de risques ([www.artur-rein.org](http://www.artur-rein.org)).

## **D Facteurs de risques**

Parmi les facteurs de risque, on pointe le mode de vie et plus particulièrement le tabagisme, l'obésité et l'hypertension artérielle. Il existe d'autres facteurs de risques suspectés dont l'implication n'est pas encore totalement prouvée.

### **a) Tabac**

Le premier facteur de risque établi est le tabac, responsable dans 25 à 30% des cas de la survenue de la maladie. Un homme fumeur a un risque de cancer du rein augmenté de 50% par rapport à un non-fumeur ; pour une femme fumeuse, le risque de cancer du rein est augmenté de 20% par rapport à une non fumeuse. Une fois la fumée inhalée, une partie de ses composants passe dans le sang pour ensuite être éliminée par le système urinaire, en premier lieu par le rein, puis par la vessie. Cependant, le mécanisme d'action du tabac sur la carcinogenèse rénale n'est pas encore connu (Hunt et al. 2005).

### **b) Obésité**

Il s'agit du second facteur de risque établi. En effet, plusieurs études ont montré un lien entre un indice de masse corporelle élevé et un risque de cancer du rein plus important que ce soit chez l'homme ou chez la femme. 25% des cas de cancer du rein seraient dû à un excès de poids qui conduit à des perturbations hormonales impliquées dans cette survenue accrue (Ljungberg et al. 2011).

### *c) Hypertension artérielle*

L'hypertension artérielle est également présentée comme étant à l'origine de la survenue du cancer du rein. Il existerait une relation de type dose-effet entre la pression artérielle élevée et le cancer du rein : plus les valeurs de la pression artérielle sont élevées plus le risque augmente et inversement si les valeurs diminuent le risque diminue avec le temps. Les mécanismes associant hypertension artérielle et cancer du rein sont eux aussi mal connus (Weikert et al. 2008).

### *d) Insuffisance rénale*

Les patients atteints d'une insuffisance rénale chronique ont un risque plus important de développer un cancer du rein. Le fait que ces patients soient traités par dialyse durant plusieurs années fait apparaître des kystes au niveau des reins que l'on nomme maladie kystique ou dysplasie multikystique qui augmentent le risque de cancer du rein (Hora et al. 2008).

## **E Diagnostic**

Le but du diagnostic est d'établir la maladie : quel est le type de cancer et quel est son stade d'avancement ? Afin de permettre aux cliniciens d'adapter la prise en charge du patient et de définir la stratégie thérapeutique à adopter.

### *a) Circonstance de découverte*

Le cancer du rein reste longtemps asymptomatique. Il est dans 40% des cas découvert de manière fortuite lors d'un examen médical pratiqué pour une raison autre. Il existe toutefois des signes cliniques tels que l'hématurie, des douleurs lombaires ou plus rarement une masse lombaire. Ces trois signes sont caractéristiques d'une maladie avancée et agressive (Patard et al. 2003). Le cancer du rein peut être également diagnostiqué suite à la découverte de métastases (poumons, ganglions, os, foie, cerveau). En effet, au moment du diagnostic 25% des patients sont déjà à un stade avancé métastatique. Le cancer du rein peut être simplement découvert à la suite de symptômes non spécifiques : amaigrissement, fièvre, sueurs nocturnes (Kim et al. 2003).

Plus rarement, dans les cas de formes familiales, le cancer du rein peut être découvert suite à un dépistage systématique. En effet, quand une forme héréditaire

est suspectée, un dépistage sera réalisé chez les proches à partir d'un âge fixé selon la forme héréditaire suspectée.

## ***b) Imagerie diagnostique***

### ***Echographie abdominale***

L'échographie est une technique d'imagerie médicale reposant sur la capacité des tissus à rétrodiffuser les ultrasons. Elle permet de mettre en évidence une masse solide. Il ne s'agit pas de l'examen de référence car peu sensible et peu spécifique. Il s'agit souvent de l'examen qui permet de découvrir une tumeur du rein de manière fortuite.

### ***Tomodensitométrie (TDM ou scanner)***

Le scanner est l'examen de référence en l'absence de contre-indications aux produits de contrastes iodés. Il repose sur l'absorption des rayons X par les tissus suite à l'injection de produit de contraste. Cela permet de reconstituer des images en 2D ou en 3D des structures anatomiques. Il permet une étude détaillée, il peut parfois distinguer la nature histologique de la tumeur rénale, rechercher des envahissements veineux ou ganglionnaires mais également des métastases.

### ***Imagerie par résonance magnétique (IRM)***

L'IRM remplacera le scanner en cas de contre-indication (insuffisance rénale, allergie à l'iode, grossesse). Il repose sur la résonance magnétique nucléaire des atomes composant les tissus. Il peut également être utilisé en complément du scanner pour caractériser certaines tumeurs ou pour le diagnostic d'extension locale.

## ***c) Bilan biologique***

Le bilan biologique permet d'évaluer la fonction rénale et de dépister d'éventuelles anomalies accompagnant la tumeur. Il inclut obligatoirement la créatininémie et l'hémogramme. En cas de métastases, des examens supplémentaires sont à réaliser afin d'évaluer les facteurs pronostiques. A l'heure actuelle, il n'existe malheureusement pas de marqueurs sanguins du cancer du rein.

## ***d) Biopsie***

La biopsie percutanée est recommandée dans plusieurs cas (i) pour le diagnostic histologique en cas de tumeurs difficiles à classer, (ii) dans le cas de tumeurs de petite taille pour déterminer la surveillance, (iii) avant un traitement ablatif

et (iv) avant de sélectionner la thérapie à mettre en place en cas de maladie métastatique. Elle est réalisée sous anesthésie locale, en ambulatoire, sous scanner ou échographe pour le guidage. La biopsie rénale a une sensibilité et une spécificité élevée pour une morbidité minimale.

Elle permettra d'effectuer un examen anatomopathologique qui permet de confirmer le diagnostic et de déterminer les caractéristiques de la tumeur. Elle permettra également d'adapter la prise en charge thérapeutique du patient en fonction du type de tumeur et de son avancée.

#### *e) Bilan d'extension*

Le bilan d'extension permet de déterminer si le cancer est étendu à d'autres organes comme les poumons, le foie, les os, le cerveau ou les glandes surrénales. Il comprend un scanner du thorax (souvent réalisé en même temps que le scanner de l'abdomen) pour les métastases pulmonaires, d'une scintigraphie pour les métastases osseuses, d'un scanner ou d'une IRM pour les métastases cérébrales.

Suite au bilan diagnostique, une réunion de concertation pluridisciplinaire est réunie afin de définir la prise en charge thérapeutique du patient.

### **F Pronostic**

L'évaluation du pronostic du cancer du rein reste difficile mais est nécessaire afin de prévoir l'évolution de la maladie et l'efficacité du traitement. Elle repose essentiellement sur le stade auquel la maladie est diagnostiquée, la taille et le grade histologique de la tumeur.

#### *a) Classification TNM 2009*

La classification TNM est la plus utilisée pour la pratique clinique et scientifique. Elle repose sur la taille de la tumeur (T), l'atteinte des ganglions (N) au moment de l'intervention et la présence de métastases (M) (Tableau 1). Elle permet de différencier les formes localisées (stade I et II), les formes localement avancées (stade III) et les cancers métastatiques (stade IV) (Tableau 2) (Sobin et al. 2010).

**Tableau 1 : Classification TNM 2009 des carcinomes rénaux**

<b>T - TUMEUR PRIMITIVE</b>	
TX	Non évaluable
T0	Tumeur primitive non retrouvée
T1	Tumeurs ≤ 7 cm, limitée au rein
T1a	≤ 4 cm
T1b	> 4 cm et ≤ 7 cm
T2	Tumeur > 7 cm, limitée au rein
T2a	> 7 cm et ≤ 10 cm
T2b	> 10 cm
T3	Tumeur avec thrombus veineux ou infiltrant le tissu adipeux proche sans atteinte de la glande surrénale ou du fascia de Gérota homolatéral
T3a	Envahissement du tissu adipeux péri-rénal et/ou le tissu adipeux hilair mais pas le fascia de Gérota et/ou thrombus macroscopique dans la VR ou dans l'une de ses branches
T3b	Thrombus dans la veine cave inférieure sous diaphragmatique
T3c	Thrombus dans la veine cave inférieure sus-diaphragmatique ou infiltration de sa paroi musculaire
T4	Tumeur infiltrant le fascia de Gérota et/ou envahissant par contiguïté la surrénale
<b>N - ADENOPATHIES REGIONALES</b>	
NX	Non évaluable
N0	Pas d'atteinte ganglionnaire métastatique régionale
N1	Métastase dans un seul ganglion lymphatique régional
N2	Métastase dans plus d'un ganglion lymphatique régional
<b>M - METASTASES A DISTANCE</b>	
M0	Pas d'atteinte métastatique à distance
M1	Atteinte métastatique à distance

**Tableau 2 : Détermination des stades d'avancée des RCC en fonction de la classification TNM**

Regroupement des stades TNM			
Stade I	T1	N0	M0
Stade II	T2	N0	M1
Stade III	T3	N0	M2
	T1, T2, T3	N1	M3
Stade IV	T4	Tout les N	M4
	Tout les T	N2	M5
	Tout les T	Tout les N	M1

*b) Grade nucléaire de Fühрман / grade nucléolaire de l'ISUP*

Le grade de Fühрман est utilisé pour évaluer la malignité d'une tumeur. Une analyse microscopique est effectuée, par des anatomopathologistes, soit sur une biopsie soit sur une pièce opératoire après néphrectomie. Elle est basée sur la taille et les contours des nucléoles, sur l'aspect des nucléoles et sur la présence de cellules monstrueuses. Ces éléments reflètent le degré de différenciation des cellules présentes dans la tumeur associé à l'avancée de la maladie. En effet, plus les cellules semblent être bien différenciées (similaires aux cellules rénales normales), plus la maladie est précoce et donc de bon pronostic. A l'inverse, plus les cellules ont un faible niveau de différenciation (semblables à des cellules embryonnaires), plus la maladie se trouve à un stade avancé avec un pronostic péjoratif.

Ces observations histologiques vont permettre de définir 4 grades avec une agressivité croissante et un pronostic de moins en moins bon :

- grade 1 : nucléoles ronds de petite tailles (10µm), avec contour régulier, non visibles à x400, aspect normal, bon pronostic (28% des cancers du rein)
- grade 2 : nucléoles un peu plus gros (15µm), avec membranes nucléaires légèrement irrégulière, visibles à x400, pronostic intermédiaire (30%)
- grade 3 : nucléoles volumineux (20µm), avec membrane nucléaire irrégulière, visibles à x100, pronostic intermédiaire (30%)
- grade 4 : idem que grade 3 plus présence de cellules monstrueuses multilobées, mauvais pronostic (10%)

Les nouvelles recommandations en onco-urologie 2016-2018 du CCAFU (Comité de Cancérologie de l'Association Française d'Urologie) indiquent que l'utilisation du grade de Fühрман doit être remplacée par celle du grade nucléolaire

de l'ISUP (International Society of Urological Pathology) sauf dans les cas de cRCC et de pRCC (Bensalah et al. 2016). Cette classification définit également 4 grades mais repose uniquement sur le critère de la taille du noyau :

- grade 1 : nucléole peu ou pas visible au grossissement x400 (10µm)
- grade 2 : nucléole visible au grossissement x400 (15µm)
- grade 3 : nucléole visible au grossissement x100 (20µm)
- grade 4 : pléomorphisme nucléaire et présence de cellules monstrueuses

### *c) Systèmes pronostiques*

Plusieurs systèmes de pronostic sont utilisés que ce soit pour les cancers localisés ou métastatiques. Ils reposent sur la combinaison de différents facteurs :

- clinique : évaluation du degré d'autonomie et de dépendance d'un patient par l'utilisation de l'index ECOG (Eastern Cooperative Oncology Group) ou de l'index de Karnofsky, symptômes locaux et systémiques, cachexie, délai entre le diagnostic et le traitement.

- anatomique : classification TNM

- histologique : grade de Führman/grade nucléolaire, sous-type histologique, composante sarcomatoïde et/ou rhabdoïde, présence d'embolies vasculaires et présence de nécrose tumorale

- biologique : polynucléaires neutrophiles, hémoglobine, plaquettes, LDH, calcémie

Ces systèmes vont permettre de définir des groupes de bon ou mauvais pronostic et ainsi orienter le suivi des patients mais également de sélectionner des patients pour des études cliniques.

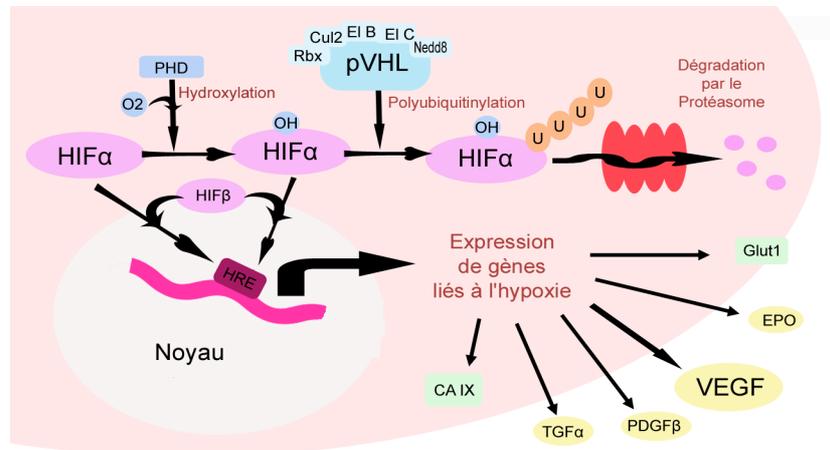
## **G Voies moléculaires impliquées**

Le cancer du rein survient à la suite d'une série de mutations dans les cellules du néphron qui vont conduire à un dérèglement de la signalisation intracellulaire. Pour chaque type histologique de RCC, des voies moléculaires sont impliquées dans les étapes de la carcinogenèse rénales et seront prises en compte dans le choix thérapeutique. Dans le cadre du cRCC, deux voies présentent une importance majeure dans la biologie du cRCC, la voie VHL/HIF/VEGF et la voie PI3K/Akt/mTOR.

### a) La voie VHL/HIF/VEGF

Le cancer du rein est une tumeur richement vascularisée et présentant des taux de VEGF (Vascular Endothelial Growth Factor) circulant élevés. Cela est dû à une activation constitutive de la voie VHL/HIF/VEGF dans une majorité de cRCC. Elle permet le développement d'une néoangiogenèse tumorale par la surexpression de facteurs proangiogéniques par les cellules tumorales, qui activeront à leur tour les cellules endothéliales pour la formation de nouveaux vaisseaux tumoraux (Edeline et al. 2010).

L'inactivation du gène *vhl*, soit par mutations somatiques soit par hyperméthylation du promoteur, est retrouvée dans 70% des cRCC et n'est pas retrouvée dans les autres types de RCC (Gnarra et al. 1994). Le gène *vhl* code pour la protéine pVHL dont le rôle principal est la régulation du facteur HIF (Hypoxia Inducible Factor) (Figure 4). HIF est un facteur de transcription existant sous deux formes, HIF1 et HIF2, et composé de deux sous-unités,  $\alpha$  et  $\beta$ , qui contrôle notamment l'expression des gènes de survie et de réponse au stress hypoxique dans les cellules.



**Figure 4 : La voie VHL/HIF/VEGF (Edeline et al. 2010)**

*En présence d'oxygène, l'hydroxylation de HIF par la prolylhydroxylase (PHD) va permettre sa polyubiquitinylation par le complexe multiprotéique formé autour de pVHL (Rbx, Culin2, Elongin B et C, et Nedd8) et conduire à sa dégradation par le protéasome. En absence d'oxygène ou d'inactivation de VHL, HIF $\alpha$  va se lier à HIF $\beta$  dans le noyau et entraîner la surexpression de nombreux gènes liés à l'hypoxie en interagissant avec les domaines HRE (Hypoxia Responsive Element) contenus dans les promoteurs de ces gènes cibles.*

En condition normoxique, la sous-unité  $\alpha$ , qui est constitutivement exprimée, va être hydroxylée par la prolylhydroxylase puis reconnue par la protéine pVHL ce

qui va conduire au recrutement d'un complexe multiprotéique (Rbx, Culin2, Elongin B et C et NEDD8) induisant sa poly-ubiquitinylation qui entraîne à son tour sa dégradation par le protéasome. En condition hypoxique ou en cas d'inactivation de *vhl*, HIF $\alpha$  va pouvoir s'hétérodimeriser avec la sous-unité  $\beta$  et jouer son rôle de facteur de transcription en allant se fixer sur ses gènes cibles présentant des éléments de réponses à l'hypoxie (HRE) (Kondo et Kaelin, 2001).

Les gènes activés par HIF sont nombreux et présentent des fonctions très variées : l'angiogenèse (*via* VEGF et PDGF $\beta$  (Platelet-Derived Growth Factor)), le métabolisme cellulaire au niveau du transporteur au glucose (GLUT1), la prolifération cellulaire (avec l'implication du TGF $\alpha$  (Transforming Growth Factor)), la régulation de l'érythropoïèse (EPO). Ces facteurs, conduisent en situation physiologique, à faciliter la survie cellulaire en condition d'hypoxie, et en situation pathologique à stimuler la croissance tumorale et à stopper l'entrée des cellules en apoptose.

L'inactivation du gène *vhl* permettant l'activation de la voie VHL/HIF/VEGF est un évènement primordial dans la carcinogenèse rénale. La surexpression des facteurs qui s'ensuit permet à la tumeur de croître, de proliférer, et lui confère un pouvoir métastatique. Cela fait de cette voie une cible thérapeutique majeure.

#### *b) La voie PI3K/Akt/mTOR*

La voie PI3K/Akt/mTOR est une voie de signalisation intracellulaire souvent dérégulée dans les cancers. Les protéines la constituant sont pour la plupart des gènes suppresseurs de tumeurs ou des proto-oncogènes pouvant être mutés, délétés ou surexprimés et favorisant alors le développement tumoral.

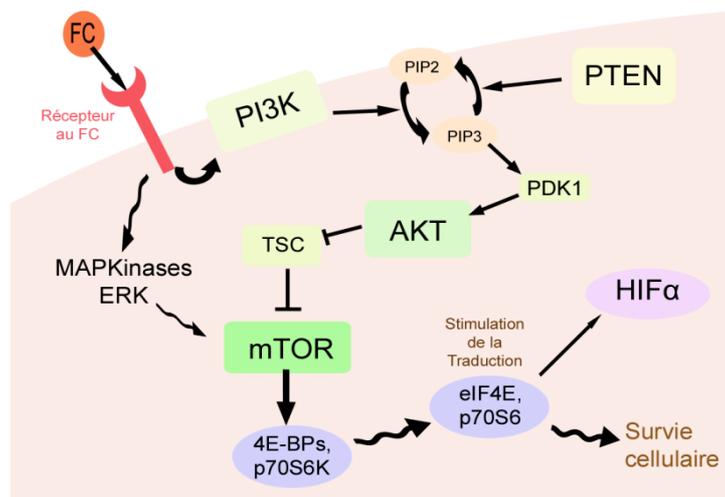
La voie PI3K/Akt/mTOR est activée suite à la fixation d'un facteur de croissance (EGF, IGF, HGF) sur son récepteur tyrosine kinase (RTK) ce qui va enclencher une cascade de phosphorylation : la PI3Kinase (PI3K), activée par le RTK, phosphoryle le phosphatidyl-inositol-diphosphate (PIP2) en phosphatidyl-inositol-triphosphate (PIP3) qui active PDK1 (Pyruvate Dehydrogenase Kinase 1), qui active ensuite Akt qui finalement active mTOR (mammalian target of rapamycin) en inhibant TSC (Tuberous Sclerosis Complex) (Figure 5).

mTOR est principalement activé par la voie PI3K/Akt mais peut également l'être par la voie des MAPKinases *via* ERK. mTOR est une kinase qui peut former deux complexes multiprotéiques :

- mTORC1, en association avec Raptor, va conduire à la surexpression et à la stabilisation d'HIF1 $\alpha$  et contribuer à la néoangiogenèse.

- mTORC2, en association avec Rictor, va phosphoryler les facteurs p70S6K et 4E-BP1, dont les substrats sont respectivement la protéine ribosomale p70S6 et le facteur d'initiation de la traduction eIF4E, et ainsi stimuler l'initiation de la traduction de protéines impliquées dans la prolifération (Cycline D1, c-myc).

En situation physiologique, la phosphatase PTEN (phosphatase and tensin homolog) régule cette voie en s'opposant à la PI3K par déphosphorylation de PIP3 en PIP2 ce qui inhibe Akt. En situation cancéreuse, la voie PI3K/Akt/mTOR peut être altérée à de nombreux niveaux : (i) perte de fonction de PTEN par mutation, (ii) activation constitutive des RTK par surexpression ou par mutation ou (iii) mutation de PI3K et Akt. Toutefois, aucune mutation de mTOR n'est pour le moment connue ce qui en fait une cible thérapeutique intéressante (Dreyer et al. 2009).



**Figure 5 : La voie PI3K/Akt/mTOR (Edeline et al. 2010)**

Après fixation d'un facteur de croissance (FC) sur son récepteur, la PI3K activée phosphoryle le PIP2 en PIP3. Le PIP3 active PDK1, qui active ensuite Akt qui finalement active mTOR en inhibant TSC. mTOR régule des facteurs qui contrôlent des protéines-clés dans la traduction : d'une part, mTOR inhibe les protéines 4E-BP qui lient et inhibent le facteur initiateur de la traduction eIF4E, et d'autre part, mTOR active la p70S6K qui active la protéine ribosomale p70S6. Finalement, nous avons une stimulation de la traduction de protéines liées à la survie cellulaire via TORC1 et une augmentation de l'expression d'HIF $\alpha$  via TORC2.

## **H Traitement**

### **a) Chirurgie**

Malgré les récentes avancées dans le traitement du RCC, la thérapie de référence, que ce soit à un stade local ou avancé, reste l'exérèse chirurgicale. Dans le cas des tumeurs localisées, la néphrectomie partielle est privilégiée à la néphrectomie totale si celle-ci est techniquement possible. Elle permet ainsi de préserver une fonction rénale et donc d'améliorer la survie du patient (Scosyrev et al. 2013). D'autres techniques dites thermo-ablatives existent, la radiofréquence et la cryothérapie sont celles utilisées actuellement tandis que d'autres sont en cours d'évaluation (micro-ondes, laser, ultrasons, radiothérapie). Ces techniques sont recommandées chez les patients, avec une tumeur de petite taille, qui ne sont pas de bon candidat pour la chirurgie à cause d'un risque de morbidité important notamment dû à un âge avancé (Ljungberg et al. 2015).

Dans le cas des tumeurs localement avancées c'est à dire qu'elles ne sont ni intracapsulaires (pT1, pT2) ni métastatiques (M1), une néphrectomie totale est recommandée avec possibilité de curage ganglionnaire. Dans le cas des tumeurs métastatiques, une néphrectomie cyto-reductrice pourra être réalisée chez les patients de bon pronostic ou de pronostic intermédiaire avant un traitement médical (Zini et al. 2008).

En cas de métastases, une chirurgie peut également être proposée afin d'améliorer la survie des patients. Concernant les métastases pulmonaires, hépatiques et pancréatiques, la métastasectomie totale améliore la survie globale (Alt et al. 2011). En cas de métastases osseuses ou cérébrales, l'exérèse chirurgicale peut également permettre d'améliorer la survie globale mais de manière moins importante (Fuchs et al. 2005 ; Shuch et al. 2008).

### **b) Chimiothérapies classiques**

Les chimiothérapies cytotoxiques classiques ainsi que l'hormonothérapie et la radiothérapie n'ont pas montré d'efficacité dans le traitement du cancer du rein métastatique.

### *c) Immunothérapies*

Jusqu'en 2005, le traitement du cancer du rein métastatique était l'immunothérapie. Elle reposait sur l'utilisation de cytokines, molécules produites par les lymphocytes et participant à la défense de l'organisme contre les cellules cancéreuses, notamment l'interleukine 2 (IL-2) et l'interféron alpha (IFN $\alpha$ ). Ces deux molécules ont permis d'obtenir des régressions importantes mais seulement chez une très faible proportion de patients et avec une toxicité importante.

Actuellement seul l'IFN $\alpha$  est utilisé mais uniquement, en traitement de première ligne, à faible dose, en association avec une thérapie ciblée : le bevacizumab (Tableau 3).

### *d) Thérapies ciblées*

De 2005 à 2015, le développement des thérapies ciblées a changé les schémas thérapeutiques. Il s'agit de molécules agissant sur l'une des deux voies de l'angiogenèse, soit une inhibition directe du VEGF sur son récepteur soit une inhibition de la voie PI3K/Akt/mTOR.

Actuellement, 7 molécules sont disponibles en France :

- 4 inhibiteurs de tyrosines kinases (TKIs) : le sunitinib (SUTENT® Laboratoire PFIZER), le sorafenib (NEXAVAR® Laboratoire BAYER), le pazopanib (VOTRIENT® Laboratoire GSK) et l'axitinib (INLYTA® Laboratoire PFIZER)

- 1 anticorps monoclonal inhibiteur du VEGF : le bevacizumab (AVASTIN® Laboratoire ROCHE)

- 2 inhibiteurs de mTOR : le temsirolimus (TORISEL® Laboratoire WYETH) et l'évérolimus (AFINITOR® Laboratoire NOVARTIS)

L'efficacité de ces molécules a été principalement évaluée pour le cRCC. Les recommandations actuelles dépendent dans un premier temps sur la classification pronostique et ensuite sur la ligne de traitement suivie (Tableau 3).

Depuis septembre 2015, deux nouvelles thérapies sont développées en cas d'échec d'un premier traitement anti-VEGF. Le nivolumab (OPDIVO® Laboratoire BRISTOL-MYERS SQUIBB), il s'agit d'un anticorps monoclonal qui se lie au récepteur PD-1 (Programmed death 1) et bloque ainsi son interaction avec ses ligands PD-L1 et PD-L2. Il potentialise ainsi la réponse immunitaire vis à vis des

cellules cancéreuses. Il a été approuvé par l'agence européenne du médicament en octobre 2016 comme traitement du cRCC métastatique en cas d'échec d'un traitement par un anti-VEGF. Il présente une survie plus importante que l'évérolimus avec une meilleure tolérance et une meilleure qualité de vie. Un nouvel inhibiteur de tyrosine kinase est également disponible, le cabozantinib (CABOMETYX® Laboratoire IPSEN PHARMA) présentant une activité anti-MET, anti-VEGFR-1,-2 et -3 et anti-AXL. Il présente une meilleure survie sans progression et une meilleure survie que l'évérolimus. Il a été approuvé par l'agence européenne du médicament en janvier 2017 comme traitement de seconde ligne ([www.has-sante.fr](http://www.has-sante.fr)).

**Tableau 3 : Synthèse des recommandations des traitements systémiques dans le cRCC métastatique**

Ligne thérapeutique	Classification pronostique	Standard	Option
Première ligne	Bon ou intermédiaire	Sunitinib Bevacizumab + IFN Pazopanib	IL2 haute dose Sorafenib Bevacizumab + faible dose IFN
	Mauvais	Temsirolimus	Sunitinib Sorafenib Pazopanib
Deuxième ligne	Post cytokines	Axitinib Sorafenib Pazopanib	Sunitinib
	Post-TKI anti-VEGFRs	Nivolumab Cabozantinib	Axitinib Everolimus Sorafenib
Troisième ligne	Post-deux TKI anti VEGFRs	Nivolumab Cabozantinib	Everolimus
	Post-TKI anti-VEGFR et mTOR	Sorafenib Nivolumab Cabozantinib	Autre TKI anti-VEGFR Rechallenge
	Post-TKI anti-VEGFR / Nivolumab	Cabozantinib	Axitinib Everolimus
	Post-TKI anti-VEGFR/ Cabozantinib	Nivolumab	Everolimus Axitinib

## **II Les microARNs**

Les microARNs sont une nouvelle classe de petits ARNs non codants de 20-22 nucléotides. Ils permettent la régulation post-transcriptionnelle de protéines cibles en s'appariant de manière spécifique aux ARNs messagers. Ils inhibent leur traduction ou entraînent leur dégradation et, dans d'autres cas, activent leur traduction. Ils permettent la régulation d'au moins 50% des gènes codants pour des protéines impliquées dans de nombreux processus cellulaires (prolifération, différenciation et apoptose) et sont associés à de nombreuses pathologies humaines.

### **A Les petits ARNs régulateurs**

Après analyse du génome, on s'est rendu compte que 70% de celui-ci était activement transcrit mais que seulement 1,2% codait pour des protéines. Il existe donc de nombreux ARNs non codants. Parmi eux, nous trouvons des ARNs de structure tels que les ARNs de transfert (ARNt), les ARNs ribosomiques (ARNr) et les petits ARNs nucléaires (snARN) mais nous trouvons également de nombreux petits ARNs régulateurs (Birney et al. 2007).

**Tableau 4 : Classification des ARNs régulateurs  
(adapté de Cech et Steitz. 2014)**

<b>Nom</b>	<b>Définition</b>	<b>Fonction</b>	<b>Taille</b>
siARN	petit ARN interférent	Produit du clivage d'un ARN double brin par Dicer, quand il se complexe avec la protéine AGO, il induit le clivage de son ARNm cible parfaitement complémentaire	22 nt
miARN	microARN	ARN qui, en complexe avec la protéine AGO, va s'apparier avec son ARNm cible grâce à sa séquence "seed" se trouvant à son extrémité 5' pour induire sa déadénylation et sa dégradation ou la répression de sa traduction	22 nt
piARN	ARN associé à PIWI	ARN qui agit sur les modification de la chromatine pour réprimer la transcription, bien caractérisé dans la lignée germinale mâle	27 nt
lncARN	long ARN non codant	ARN transcrit de manière autonome ne codant pas de protéine; souvent coiffé et polyadénylé; peut être nucléaire, cytoplasmique ou les deux	> 200 nt

Chez les eucaryotes, il existe plusieurs types de petits ARNs régulateurs endogènes classés dans 3 grandes catégories selon leur nature, leur mode d'action et leur cofacteurs (Tableau 4) : les siARNs endogènes (small interfering RNA), les microARNs (microARN) et les piARNs (PIWI interacting RNA) (Kim et al. 2009). Plus

récemment, il a été mis en évidence une nouvelle catégorie ; les lncARNs (long non coding RNA) (Gutschner et Diederichs 2012).

## **B Découverte de l'interférence**

Le premier phénomène de l'interférence a été découvert en 1990 par l'équipe de Jorgensen (Napoli et al. 1990). En voulant surexprimer le gène de la Chalcone synthase, qui permet la coloration violette chez le pétunia, par l'introduction de copies supplémentaires de celui-ci, ils ont obtenu le résultat inverse. En effet, les fleurs obtenues étaient soit totalement soit partiellement blanches et leur taux d'ARNm était inférieur à celui des fleurs sauvages. Ils ont appelé ce mécanisme la « co-suppression » où les deux copies du gène (endogène et exogène) interagissent de manière négative en se « co-supprimant ».

En 1998, Andrew Fire et Craig Mello décrivent pour la première fois le mécanisme d'inactivation des gènes par l'ARN interférence (ARNi) chez *Caenorhabditis elegans* (Fire et al. 2008). Ils montrent que l'injection d'un ARN double brin homologue au gène ciblé inhibe de manière spécifique et efficace l'expression endogène de ce gène et cela de façon plus importante que l'injection d'ARN simple brin sens ou antisens. Ces travaux ont été récompensés en 2006 par le Prix Nobel de Médecine et de Physiologie pour la découverte de l'ARNi.

## **C Découverte des microARNs**

En parallèle à la découverte du mécanisme de ARNi, différentes études sur *C. elegans* ont permis de mettre en évidence l'existence de petits ARNs interférents transcrits à partir du génome cellulaire : les microARNs. Le premier microARN découvert en 1993 par les équipes de Victor Ambros et Gary Ruvkun est *lin-4* impliqué dans le développement larvaire (Lee et al. 1993). Ils ont montré que le gène *lin-4* ne codait pas pour une protéine mais pour deux transcrits de petites tailles dont une partie est partiellement complémentaire à une partie du 3'-UTR de l'ARNm de *lin-14* permettant ainsi la régulation de sa traduction par une interaction ARN-ARN.

En 2000, l'équipe de Ruvkun découvre un second microARN ; *let 7* qui inhibe l'expression de *lin-41* impliqué dans le développement larvaire de *C.elegans*. (Reinhart et al. 2000). Contrairement à *lin-4*, *let-7* présente de nombreux homologues chez d'autres organismes notamment chez les mammifères (Pasquinelli et al. 2000).

Depuis, il a été mis en évidence par diverses équipes l'existence de nombreux gènes codants pour des petits ARNs semblables à lin-4 et let-7. Il existe des microARNs chez beaucoup d'organismes aussi éloignés que les végétaux et les animaux mais ils sont absents chez les organismes unicellulaires que ce soit les bactéries ou les levures. Les voies de biogenèse et les mécanismes d'action sont différents chez les végétaux et les animaux. De plus aucune famille de microARN n'est conservée entre les deux espèces ce qui suggère une origine différente au cours de l'évolution. Chez les animaux, de nombreux microARNs sont conservés chez des espèces aussi différentes que le nématode, la drosophile et l'homme montrant ainsi l'importance de leur rôle au cours de l'évolution (Ibanez-Ventoso et al. 2008). De nos jours, plus de 1 000 microARNs humains ont été identifiés, séquencés et annotés dans le génome ([www.mirbase.org](http://www.mirbase.org)).

## **D Organisation génomique**

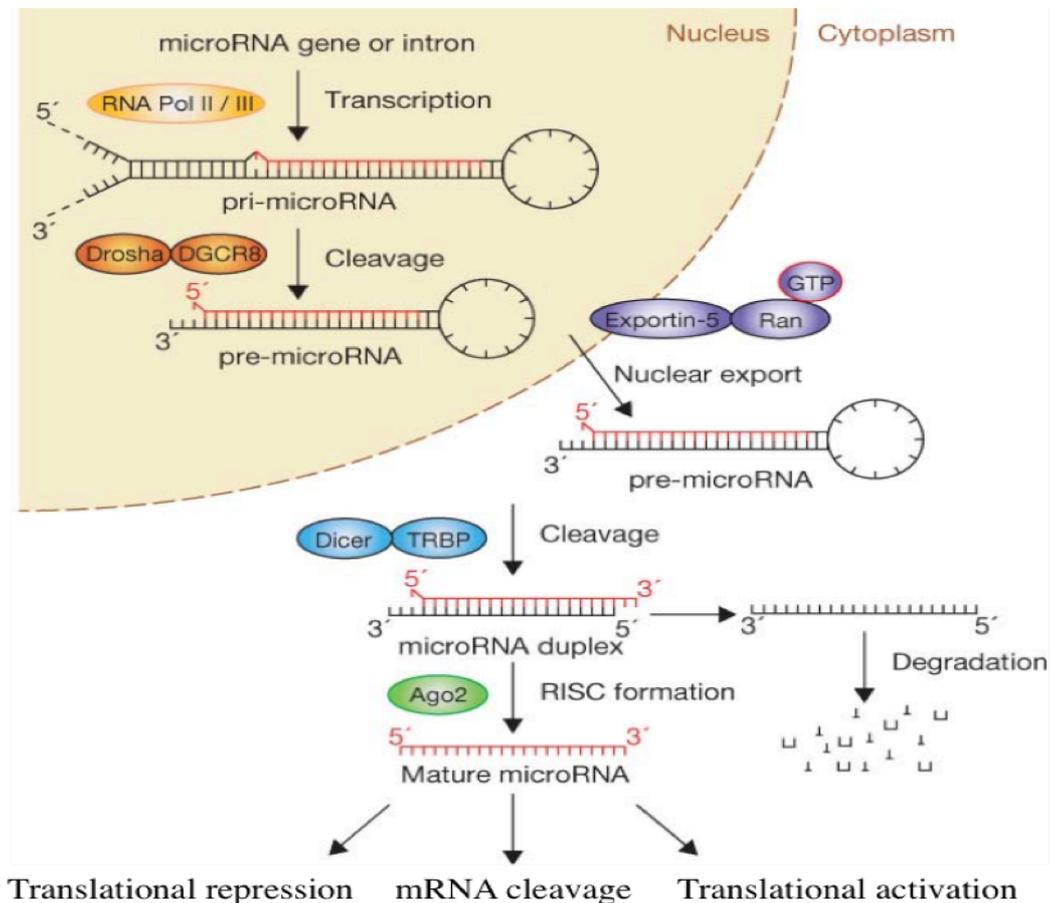
Les microARNs sont dans 40% des cas au sein d'unités transcriptionnelles codant des protéines et dans 60% des cas dans des gènes non codants. Environ 40% des gènes codant pour un microARN sont dans des unités introniques connues du génome (Griffiths-Jones et al. 2008 ; Rodriguez et al. 2004 ; Saini et al. 2007). Ils sont dans la majorité des cas transcrits à partir du promoteur de leur gène hôte et sont alors obtenus par épissage alternatif. Dans d'autres cas transcrits à partir d'un promoteur indépendant et, dans de rares cas, un microARN peut être transcrit à partir de deux promoteurs différents. Quelques microARNs sont présents dans des régions exoniques, il s'agit alors principalement des gènes non codants. Un tiers des microARNs sont organisés en « cluster », et sont transcrits en un seul pri-microARN polycistronique qui sera ensuite clivé en plusieurs microARNs (Lee et al. 2002).

## **E Biogenèse des microARNs**

### **a) Transcription du pri-microARN**

La synthèse des microARNs est complexe et implique de nombreuses enzymes et protéines (Figure 6). Les microARNs sont transcrits dans le noyau dans la majorité des cas par l'ARN polymérase II (Lee et al. 2004) mais certains semblent être transcrits par l'ARN polymérase III (Borchert et al. 2006). Ils forment alors un long précurseur primaire de plusieurs kilobases. Ces transcrits primaires sont composés d'une tige d'environ 33 paires de base, d'une boucle terminale reliant les

deux brins de la tige ainsi que de séquences « flanquantes » simple brin. Ils portent alors tout comme les ARNm des marques caractéristiques telles que la coiffe représentée par la structure 7-méthyl-guanosine (m7G) à l'extrémité 5' et la queue poly-A à l'extrémité 3'.



**Figure 6 : Voie canonique de la biogenèse des microARNs (d'après Winter et al. 2009)**

La synthèse des microARNs commence dans le noyau par la transcription par l'ARN polymérase de type II du pri-microARN qui est ensuite clivé par la RNase Drosha pour donner le pré-microARN. Le pré-microARN est ensuite exporté vers le cytoplasme via l'exportine 5 afin d'y être clivé par le complexe Dicer et donner un microARN double brin. Le brin mature est pris en charge par le complexe RISC qui le dirige vers son ou ses ARNm cibles pour induire sa dégradation, l'inhibition ou l'activation de sa traduction.

## b) Maturation

### Formation du pré-microARN dans le noyau

Le pri-microARN va alors subir un premier clivage dans le noyau afin de donner un pré-microARN d'environ 70 nucléotides ayant une structure tige-boucle avec deux brins complémentaires. Le microprocesseur nucléaire composé de

Drosha, une RNase de type III et de DGCR8 (DiGeorge Syndrome Critical Region Gene 8) va permettre ce clivage. DGCR8 est une protéine possédant des domaines de fixation à l'ARN double brin. Elle reconnaît une structure particulière se trouvant à la jonction ARN double brin et de l'ARN simple brin permettant le bon positionnement du microprocesseur sur le pri-microARN et ainsi un bon positionnement du site catalytique de Drosha aboutissant au clivage et à la formation du pré-microARN (Denli et al. 2004 ; Gregory et al. 2004 ; Han et al. 2004). Ce processus se fait de manière co-transcriptionnelle n'entravant pas la bonne transcription du gène hôte (Morlando et al. 2008).

#### ***Export du pré-microARN vers le cytoplasme***

Le pré-microARN va ensuite être pris en charge par l'Exportine-5 (XPO5) pour être exporté dans le cytoplasme *via* les pores nucléaires (Yi et al. 2003). La fixation du pré-microARN à l'Exportine-5 est dépendante d'une Ran GTPase. Le complexe premiR/XPO5/RanGTP assure une protection contre la dégradation par les nucléases. L'hydrolyse du GTP en GDP permet la libération du pré-microARN dans le cytoplasme (Zeng et Cullen 2004).

#### ***Formation du microARN mature dans le cytoplasme***

Le pré-microARN libéré dans le cytoplasme va être pris en charge par le complexe RLC (RISC loading complex) composé de Dicer, une seconde RNase de type III associée aux protéines TRBP, PACT et Ago2 (Macrae et al. 2008). Le pré-microARN va alors subir un second clivage *via* Dicer pour donner un duplex microARN-microARN de 22 nucléotides. Le brin dit passager va être éliminé tandis que le brin guide va être incorporé au complexe RISC (RNA-induced silencing complex). Après dissociation du RLC, le complexe RISC activé, composé du microARN mature et de la protéine Ago2, va conduire le microARN mature vers son ARNm cible et conduire ainsi au « silencing » (Kim et al. 2007).

## ***F Nomenclature des microARNs***

Un système de nomenclature a été mis en place selon plusieurs critères (Griffiths-Jones et al. 2006). Il est indiqué dans un premier temps par un préfixe en 3-4 lettres précisant l'espèce d'origine comme hsa-miR-101 pour *homo sapiens*. Ensuite, viens l'annotation « miR » pour les microARNs matures ou « mir » pour leur précurseur ou leur gène codant suivi d'un tiret et d'un numéro s'appuyant sur l'ordre de leur découverte.

Lorsque deux microARNs matures ne diffèrent que d'un ou deux nucléotides, on ajoute comme suffixe deux lettres différentes, mmu-miR-10a et mmu-miR-10b par exemple.

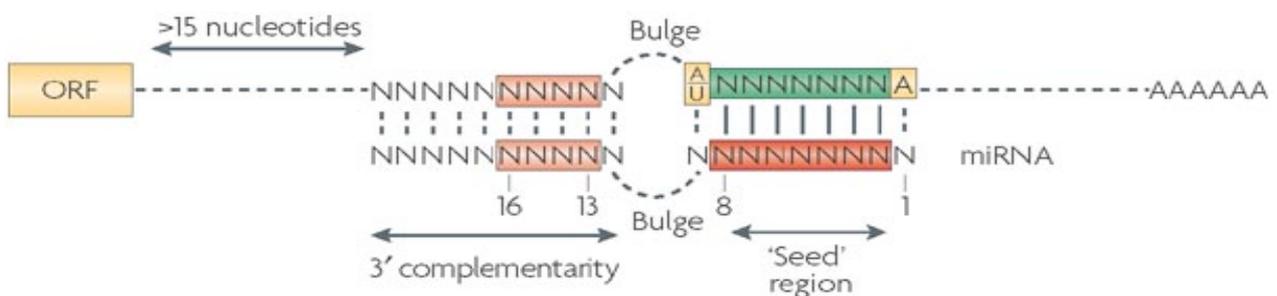
Lorsque deux microARNs matures proviennent de deux précurseurs différents et possèdent la même séquence mature, on ajoute comme suffixe un numéro supplémentaire, dme-mir-281-1 et dme-mir-281-2 par exemple.

Lorsqu'un pré-microARN aboutit à deux microARNs matures, on ajoute comme suffixe -5p ou -3p pour indiquer le brin d'origine (5' ou 3'), miR-17-5p et miR-17-3p par exemple.

## G Mode d'action

### a) Interaction microARN-ARNm cible

La régulation par les microARNs est spécifique grâce à l'appariement du microARN mature avec une séquence complémentaire située dans l'ARNm cible appelée MRE (miRNA Response Element). Dans 46% des cas, cette séquence se trouve au niveau du 3'-UTR de l'ARNm ; dans 50% au niveau de la partie codante et dans 4% au niveau du 5'-UTR (Thomson et al. 2011). Dans le règne animal, dans la majorité des cas, la complémentarité entre le microARN et la séquence MRE de l'ARNm cible est imparfaite ce qui conduira à un blocage de la traduction, en cas d'appariement parfait l'ARNm sera dégradé.



**Figure 7 : Règles classiques d'appariement entre microARN et ARNm cible (Filipowicz et al. 2008)**

*L'hybridation entre un microARN et l'ARNm cible dans le règne animal est incomplète. Il existe des mésappariements dans la région centrale tandis qu'il y a un appariement parfait au niveau de la partie 5' du microARN (encadré rouge) et des nucléotides de l'ARNm (encadré vert) et un appariement plus ou moins parfait au niveau de la partie 3' du microARN et des nucléotides de l'ARNm (encadrés rose).*

Les règles d'appariement les plus classiques consistent, premièrement à un appariement parfait entre l'ARNm et les nucléotides 2-8 en 5' du microARN qui

constitue la séquence « seed ». Deuxièmement, des mésappariements sont retrouvés au niveau de la région centrale qui protège l'ARNm d'un clivage par la protéine Ago2 contenu dans le complexe RISC. Et finalement, nous retrouvons un appariement plus ou moins parfait au niveau de la région 3' pour augmenter la spécificité d'interaction et compenser les mésappariements centraux (Figure 7) (Filipowicz et al. 2008).

En suivant ces règles d'appariement, des outils bioinformatiques tels que TargetScan permettent de prédire les cibles des microARNs. Il existerait plusieurs centaines de cibles pour un seul microARN. Toutefois, des méthodes expérimentales sont nécessaires afin de valider ces cibles. Elles s'appuient sur la surexpression ou l'inhibition du microARN d'intérêt suivi de la mesure de l'expression de la cible prédite mais également sur l'utilisation de gène rapporteur tel que la luciférase couplée au 3'-UTR de l'ARNm ciblé.

## ***b) Le miRISC***

### ***Les protéines Argonautes***

Les microARNs double-brin matures ne possèdent pas d'activité catalytique propre, leur activité biologique dépend donc de la formation du complexe RISC. Le complexe RISC minimal est composé du microARN mature qui est en interaction direct avec une protéine Argonaute qui constitue l'élément central du complexe sur lequel s'assemblent les autres partenaires.

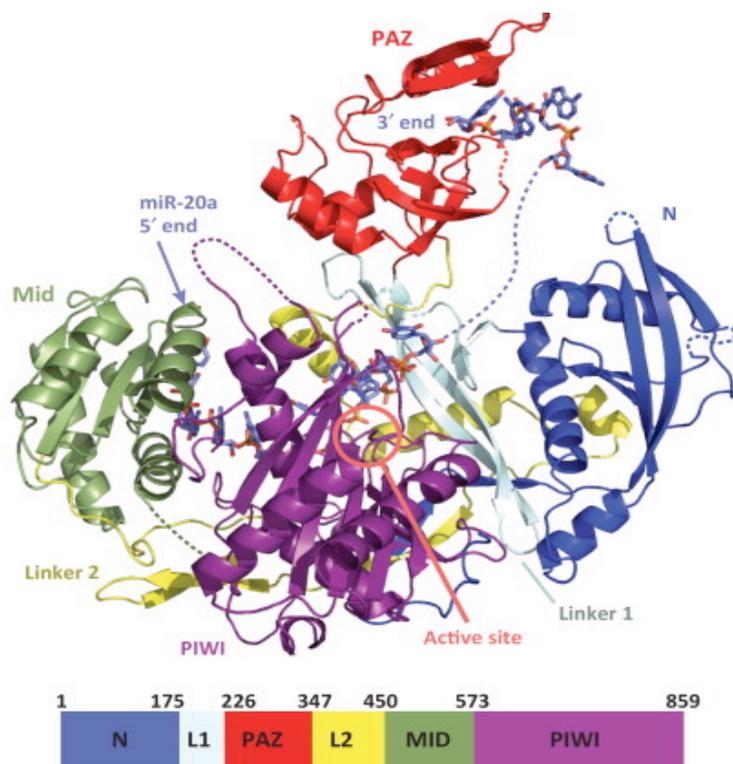
Les protéines AGO appartiennent à la famille Argonaute et jouent des rôles importants dans le développement embryonnaire, la différenciation cellulaire et le maintien des cellules souches (Peters et Meister 2007). Ces protéines sont classées en deux sous-familles en fonction des similitudes de séquence : les protéines de la sous-famille AGO et celles de la sous-famille PIWI. Chez les mammifères, les protéines AGO sont exprimées dans toutes les cellules et prennent en charge les siARNs et les microARNs, tandis que les protéines PIWI, dont l'expression est limitée aux lignées germinales, n'interagissent qu'avec les piARNs (Meister et al. 2004 ; Meister et Tuschl 2004).

Les protéines Argonautes ont une masse moléculaire d'environ 100 kDa. Elles ont une structure commune composée de 4 domaines (Figure 8) : le domaine N-terminal (N), le domaine PAZ (PIWI-ARGONAUTE-ZWILLE), le domaine MID et le domaine PIWI. Des études ont montré que les protéines Argonautes présentent une

structure bilobée avec d'un côté les domaines N et PAZ et de l'autre les domaines MID et PIWI (Yuan et al. 2005 ; Höck et al. 2007)

Le domaine PAZ reconnaît et se fixe au niveau de l'extrémité 3' sortante du duplex microARN/ARNm tandis que le domaine MID forme une poche de fixation pour l'extrémité 5'. Le domaine PIWI forme une poche hydrophobe contenant le domaine catalytique RNase H constitué de résidus conservés (D597, E637, D669 et H807) (Song et al. 2003). La fonction du domaine N est encore peu étudiée, il semblerait avoir un rôle dans l'assemblage du complexe RISC (Kwak et Tomari, 2012).

Chez les mammifères, il a été montré l'existence de 4 protéines Argonautes (Ago1-4) mais seule Ago2 possède une activité catalytique endonucléase capable de cliver l'ARNm cible (Liu et al. 2004).



**Figure 8 : Structure des protéines Argonautes (Kuhn et Joshua-Tor 2013)**

*Le domaine PAZ (en rouge) se trouve à côté du domaine N (en bleu) et est important pour la fixation de l'extrémité 3' du microARN. Le domaine MID (en vert) permet de fixer l'extrémité 5' du microARN. Le domaine PIWI (en rouge) renferme les résidus catalytiques permet le clivage endonucléolytique.*

#### **Les protéines GW182**

Les protéines de la famille GW182 (glycine-tryptophan repeat-containing protein of 182 kDa) sont retrouvées au niveau du complexe miRISC où elles vont

jouer un rôle important pour l'inhibition de l'expression de l'ARNm cible par les microARNs. Elles sont également retrouvées au niveau de foci cytoplasmiques appelés corps-P ou corps-GW contenant des enzymes de dégradation des ARNm et impliqués dans le catabolisme et le stockage des ARNm non traduits (Eystathioy et al. 2003). Chez l'homme, il existe 3 protéines GW182 : TNRC6A, TNRC6B et TNRC6C pour trinucleotide repeat-containing protein.

Les protéines GW182 vont interagir avec les protéines AGO afin de conduire au « silencing » dépendant des microARNs. L'interaction va se faire au niveau du domaine PIWI d'AGO et du domaine ABD (AGO-binding domain) présent au niveau du segment Nt des protéines GW182 constitué de nombreuses répétitions GW, WG ou GWG. Le complexe AGO-GW182 va alors conduire au « silencing » de l'ARNm cible soit par inhibition de la traduction soit par dégradation de l'ARNm.

Le domaine Nt est suivi d'un domaine UBA-like (ubiquitine-associated domain) et d'un domaine riche en résidus glutamine (Q-rich) permettant la localisation des protéines GW182 dans les corps-P. L'extrémité Ct contient le domaine RRM (RNA Recognition Motif) impliqué dans la déstabilisation et l'inhibition de la traduction de l'ARNm (Baillat et Shiekhattar 2009 ; Zipprich et al. 2009) (Figure 9).

Les protéines GW182 vont avoir différents partenaires pour conduire à la dégradation des ARNm ; elles vont interagir avec la protéine PABP (cytoplasmic poly(A)-binding protein) mais aussi avec les complexe de déadenylation PAN2-PAN3 et CCR4-NOT. Leur mode d'action sera décrit plus précisément dans la partie c « Mécanismes de régulation ». L'inhibition de la traduction peut se faire à différentes étapes qui seront décrites également dans la partie c) (Zielezinski et Karlowski 2015).



**Figure 9 : Structure des protéines GW182**

*Les protéines GW182 sont constituées d'un domaine Nt ou N GW182 (en violet) capable d'interagir avec les domaines MID et PIWI des protéines AGO. Les domaines UBA (en bleu) et Q-rich (en vert) sont responsables de la localisation des protéines GW182 dans les corps-P. Le domaine RRM au niveau Ct (en orange) est impliqué dans la déstabilisation et l'inhibition de la traduction de l'ARNm.*

### *c) Mécanismes de régulation*

#### ***Inhibition de la traduction***

Les mécanismes impliqués dans l'inhibition de la traduction restent sujets à controverses. Plusieurs études montrent un blocage de l'initiation de la traduction tandis que d'autres montrent une régulation pendant l'étape d'élongation.

De nombreuses études ont montré que les microARNs entraînaient une diminution de l'expression protéique de la cible sans changement de son taux d'ARNm suggérant donc un blocage de la traduction (Doench et Sharp, 2004 ; Pillai 2005). La coiffe m7G et la queue poly(A) sont nécessaires à la répression de la traduction induite par les microARNs. Ces données suggèrent que le blocage de la traduction par les microARNs intervient à l'étape d'initiation. Les mécanismes proposés sont l'inhibition de la reconnaissance de la coiffe (Mathonnet et al. 2007 ; Thermann et Hentze 2007 ; Wakiyama et al. 2007 ; Wang et al. 2006) ou l'inhibition du recrutement de la sous-unité 60S du complexe ribosomique (Chendrimada et al. 2007 ; Wang et al. 2008).

D'autres données indiquent une inhibition de la traduction après l'étape d'initiation confortée par l'observation d'une association des microARNs aux polysomes (Huntzinger et Izaurralde, 2011). Les mécanismes impliqués seraient un détachement des ribosomes pendant l'élongation ou une dégradation du peptide naissant (Petersen et al. 2006).

#### ***Deadenylation et dégradation de l'ARNm***

Les études initiales sur le rôle des microARNs montraient que le niveau des ARNm réprimés restait inchangé ce qui suggérait que la répression dépendante des microARNs n'affecte pas la stabilité des ARNm. Différentes études réalisées sur l'animal, des cellules en culture ou encore des extraits cellulaires, ont montré depuis que la répression de nombreuses cibles de microARNs s'accompagne de leur déadénylation et de leur dégradation (Wu et al. 2006 ; Eulalio et al. 2008).

Les protéines GW182 recrutées par AGO entraîne une déadénylation de l'ARNm cible en recrutant le complexe CCR4-NOT1 puis le complexe DCP1-DCP2 permet le décoiffage et enfin la digestion exonucléolytique 5'-3' est effectuée par XRN1 (Behm-Ansmant et al. 2006 ; Chen et al. 2009).

### ***Activation de la traduction***

Ces dernières années, deux études sont venues bousculer le mécanisme de régulation négative de l'expression génique par les microARNs puisque des microARNs ont été retrouvés associés à une régulation positive.

Dans la première étude publiée en 2007, l'équipe de Vasudevan a montré que la formation d'un complexe ribonucléoprotéique au niveau du 3'-UTR de l'ARNm codant la protéine TNF $\alpha$  (Tumor necrosis factor alpha) induisait l'activation de sa traduction dans les cellules HEK293. En effet, lors de l'entrée en quiescence des cellules, le miR-369-3 va se fixer au niveau des séquences ARE (AU rich element) présentes au niveau du 3'-UTR permettant ainsi le recrutement de Ago2 et de FXR1 (Fragile X mental retardation-related protein 1) et l'activation de la traduction de la protéine TNF $\alpha$  (Vasudevan et al. 2007).

Dans la seconde étude publiée en 2008, miR-10a va se fixer au niveau de motif TOP (5'-terminal oligopyrimidine tract) présent dans le 5'-UTR d'ARNm codant des protéines ribosomales pour stimuler leur traduction. En stimulant ainsi la biogenèse des ribosomes, miR-10a serait donc un régulateur positif global de la synthèse protéique (Orom et al. 2008).

### ***H Intérêt clinique dans le cadre du cancer du rein***

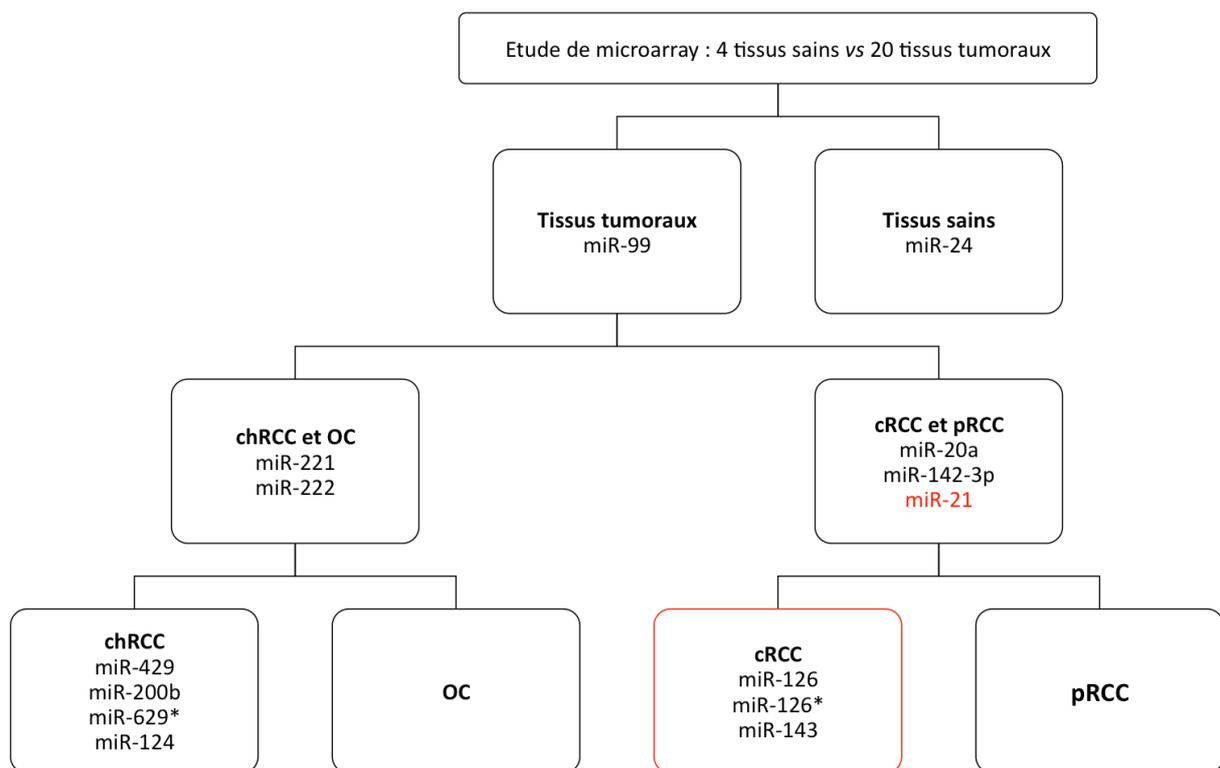
Les microARNs jouent un rôle important dans l'homéostasie et la physiopathologie. En effet, une dérégulation de leur expression a été démontrée dans de nombreuses maladies (inflammation, cancer...). Les gènes codant pour les microARNs sont fréquemment trouvés dans des régions génomiques impliquées dans les cancers (Calin et al. 2004). Des études de microarray chez des patients atteints de cancer du rein ont notamment montré une expression différentielle dans le tissu tumoral par rapport au tissu sain. Certains microARNs sont surexprimés et jouent alors le rôle d'oncogène, on les nomme oncomiRs, tandis que d'autres sont sous exprimés et sont alors considérés comme des suppresseurs de tumeurs. En tant que biomarqueurs, ils pourraient donc être des outils utiles pour le diagnostic, le pronostic et le suivi de la maladie.

Les microARNs peuvent être sécrétés et se retrouver dans des fluides biologiques tels que le sang ou les urines (Weber et al. 2010). Ces microARNs circulants représentent de nouveaux biomarqueurs non invasifs et résistants aux conditions drastiques (pH extrêmes, cycle de congélation/décongélation, chauffage,

stockage prolongé) dans lesquelles la plupart des ARNs sont dégradés (Chen et al. 2008). La dérégulation de leur expression est un événement précoce au cours de la tumorigenèse et leur dosage dans les fluides biologiques pourrait donc permettre la détection précoce des cancers, de suivre ou de prédire la réponse aux traitements et d'avoir une valeur pronostique (Cortez et al. 2011). De plus, les microARNs représentent des nouvelles cibles thérapeutiques potentielles en restaurant ou en bloquant leur expression (Nana-Sinkam et Croce 2013).

a) *Comme biomarqueurs*

**Diagnostic**



**Figure 10 : Schéma récapitulatif de l'étude de microarray permettant de différencier les différents types de cancer du rein à l'aide du profil d'expression de 14 microARNs (Powers et al. 2011)**

Il est important de distinguer les différents sous types de cancer du rein car le pronostic et la thérapie à mettre en place seront différents en fonction du sous-type et le diagnostic par simple étude morphologique n'est pas totalement spécifique. Une étude a montré qu'il était possible de différencier les quatre types de cancer du rein par leur profil d'expression en microARNs. Ils ont effectué une étude de microarray et de caryotype par SNP (Single Nucleotide Polymorphism) sur des tissus de pRCC, chRCC et de cRCC ainsi que sur des OC et des reins sains. Les anomalies

chromosomiques identifiées ne peuvent toutefois pas être corrélées au profil d'expression des microARNs. Ils ont obtenu 14 microARNs dérégulés dans les tissus tumoraux par rapport aux tissus sains permettant de différencier les 4 sous-types de tumeurs rénales (Figure 10). miR-21, connu pour être un oncomiR surexprimé dans de nombreux cancers, est retrouvé surexprimé seulement dans les cRCC et pRCC qui sont les deux formes les plus agressives (Powers et al. 2011).

Une autre équipe s'est intéressée à l'expression des microARNs à la fois dans le tissu tumoral et le sérum en effectuant une analyse par TLDA (TaqMan Low Density Array). Ils ont trouvé 36 microARNs à la fois surexprimés dans la tumeur et le sérum comparé à des tissus et sera sains. Ils ont sélectionné 7 microARNs candidats et ont vérifié leur expression par qPCR dans une cohorte de sera issus de patients atteints de cRCC et de patients sains. Pour la validation, ils ont déterminé l'expression de miR-1233 dans 3 cohortes indépendantes composées de tumeurs malignes, de tumeurs bénignes et de tissus sains. Ils ont retrouvé une surexpression au niveau des cRCC, des pRCC et des chRCC mais également au niveau des tumeurs bénignes ce qui ne permet pas de considérer ce microARN comme un bon marqueur diagnostique (Wulfken et al. 2011).

**Tableau 5 : MicroARN permettant de distinguer en 4 étapes un rein normal des différents sous types de carcinomes rénaux (Youssef et al. 2011)**

$h_1$	$h_2$	$h_3$	$h_4$
miR-200c > miR-222 miR-194 > miR-15b miR-324-5p > miR-34a miR-500* > miR-425 miR-10b* > miR-28-3p miR-532-5p > miR-93	miR-194 > miR-548m miR-192 > miR-221 miR-424 > miR-183 miR-181b > miR-663 miR-100 > miR-182 miR-15a > miR-222 miR-195 > miR-10a miR-26b > let-7g	miR-331-3p > miR-139-5p miR-191 > miR-221 miR-106a > miR-663	miR-99a > miR-200b miR-22 > miR-183 miR-625* > miR-1300
<p><math>h_1</math> step distinguishes class 1, normal from class 2, kidney tumour.  <math>h_2</math> step distinguishes class 1, ccRCC from class 2, other subtypes (pRCC + chRCC + oncocytoma).  <math>h_3</math> step distinguishes class 1, pRCC from class 2, remaining other subtypes (chRCC + oncocytoma).  <math>h_4</math> step distinguishes class 1, chRCC from class 2, oncocytoma.  The "*" sign following a miRNA name denotes the less predominant form of the miRNA arising from the opposite arm of a shared pre-miRNA hairpin. For example, miR-500* is expressed at low levels relative to miR-500 in the cell, and both share the same hairpin.</p>			

De nombreuses autres études ont déterminé des profils d'expression de microARNs que ce soit dans la tumeur primitive ou dans le sérum. Ainsi, Youssef et al ont développé un outil permettant de distinguer les différents sous types de cancer du rein en fonction du profil de microARNs en seulement 4 étapes en suivant un système de classification permettant de créer un arbre hiérarchique de décision (Tableau 5) (Youssef et al. 2011). Tandis que Redova et al ont montré que la simple combinaison de l'expression de miR-378 et miR-451 dans le sérum permettait de

discriminer un patient atteint de cancer du rein d'un patient sain (Redova et al. 2012). Toutes ces études nécessitent la validation clinique pour l'utilisation de ces microARNs pour le diagnostic.

### ***Pronostic/Prédictif***

Les microARNs régulent de nombreux processus cellulaires ce qui suggère qu'ils pourraient être impliqués dans le pronostic du cancer ou dans la réponse aux thérapies. L'identification de ces biomarqueurs est nécessaire pour le suivi des patients.

De nombreuses études ont montré qu'il existe des microARNs dont l'expression est associée avec un mauvais pronostic c'est-à-dire soit avec une faible survie ou une récurrence précoce après néphrectomie. Ainsi en 2009, une première étude de microarray a pu mettre en évidence à la fois un profil d'expression de microARNs associé à chaque sous type de carcinomes rénaux mais également associé aux cRCC de mauvais ou bon pronostic défini en fonction de la survie à 5 ans post-néphrectomie. Ils identifient ainsi la surexpression de miR-32 comme associée à un mauvais pronostic (Petillo et al. 2009). L'équipe de Vyzula a établi un profil d'expression permettant d'identifier les patients avec un haut risque de récurrence après néphrectomie. Pour cela, ils ont effectué une technique de TLDA sur une cohorte de patients atteints de cRCC dont les données cliniques étaient connues. Après validation, ils montrent une sous expression de 6 microARNs chez les patients développant une récurrence. Une analyse par Kaplan-Meier montre que l'expression de miR-127-3p, miR-145 et miR-126 est significativement corrélée avec la survie sans récurrence (Slaby et al. 2012).

20 à 30% des patients présentent des métastases au moment du diagnostic et un tiers en développeront après néphrectomie. Il est donc important pour les cliniciens d'identifier une signature de microARNs corrélée au risque métastatique. Une étude de microarray a comparé l'expression des microARNs à la fois dans le tissu sain, dans la tumeur primitive de patients non métastatiques et dans des tumeurs osseuses provenant de patients métastatiques. Ils ont ainsi établi un profil d'expression différent dans les trois populations (Wotschovsky et al. 2012). La tumeur primitive est donc différente de la métastase ce qui suggère un traitement différent de la tumeur primitive et des métastases. Ce qui serait plus relevant serait d'identifier des différences d'expression entre des tumeurs primitives de patients non

métastatiques comparées à des tumeurs primitives de patients métastatiques afin d'avoir un biomarqueur prédictif de la survenue des métastases. L'équipe de Vyzula s'est donc intéressée à l'expression de microARNs identifiée dans des études de microarray précédentes afin de la corrélérer avec la survie sans récurrence et de trouver un biomarqueur prédictif des métastases après néphrectomie. Pour cela, ils ont analysé leur expression dans une cohorte de cRCC venant de patients ayant développé des métastases précoces ou en rémission. Ils ont identifié un niveau plus faible de miR-155, miR-106a et miR-106b chez les patients métastatiques mais seul miR-106-b atteint la significativité. Une analyse de Kaplan-Meier a montré qu'il existe bien une corrélation de l'expression de miR-106-b avec la survie sans récurrence (Slaby et al. 2010). Une étude de 2012 établit une signature de 4 microARNs afin de déterminer le statut métastatique des patients atteints de cRCC. miR-199-5p et miR-130b sont surexprimés dans les tumeurs métastatiques tandis que miR-10b et miR-139-5p sont sous exprimés. L'expression de ces 4 microARNs dans la tumeur primaire permet d'établir un score qui évalue le risque plus ou moins important de développement de métastases (Wu et al. 2012). Ces études nécessitent une validation clinique sur des cohortes plus larges et indépendantes afin que leur détection puisse être appliquée en routine.

Une des caractéristiques principales du cRCC est leur forte chimiorésistance. Il est donc nécessaire de trouver un ou des biomarqueurs permettant de déterminer la réponse aux différents traitements afin de pouvoir proposer une thérapie adaptée aux patients. Une première étude de 2013 a comparé les profils d'expression en microARNs dans des tissus de patients atteints de cRCC ayant reçu du sunitinib en traitement de première ligne. miR-141 est significativement sous exprimé chez les patients mauvais répondeurs (avec une progression de la maladie dans les 6 mois après le traitement) par rapport aux bon répondeurs (survie sans progression de la maladie dans les 1 an après le traitement). La surexpression *in vitro* de miR-141 conduit à une inversion de la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) et à une sensibilité accrue à l'hypoxie (Berkers et al. 2013). Il reste toutefois à déterminer si l'inversion de la TEM peut affecter la réponse au sunitinib. Une seconde étude a montré une forte expression de miR-942, miR-628-5p, miR-133a et miR-484 chez les patients résistants au sunitinib qui est corrélée à une progression de la maladie plus rapide et à une survie plus courte. Seul miR-942 atteint la significativité et pourrait servir de biomarqueur prédictif (Prior et al. 2014).

## *b) Comme thérapie*

L'avantage des microARNs est leur capacité à cibler plusieurs ARNm, parfois participant au même processus biologique (prolifération, migration, différenciation) ce qui leur donne une grande efficacité dans la régulation de ces processus. Il existe deux grandes stratégies pour l'utilisation des microARNs en thérapie : restaurer l'expression de microARNs dont l'expression est diminuée dans le cancer ou cibler les microARNs surexprimés afin d'inhiber leur action.

### ***Restauration***

La réexpression des microARNs suppresseurs de tumeurs dont l'expression est perdue ou diminuée dans les cellules tumorales peut se faire par l'utilisation soit de microARNs mimics soit de vecteur d'expression codant pour le microARN.

Les microARNs mimics sont des oligonucléotides de synthèse qui imitent le microARN mature double brin endogène. Ils vont donc être pris en charge par le complexe RISC, une fois transfectés dans la cellule, pour donner un microARN mature simple identique au microARN endogène. Les modifications chimiques des mimics sont assez limitées du fait que cela modifierait l'efficacité de prise en charge par le complexe RISC. Afin d'augmenter leur entrée dans la cellule et leur stabilité, des systèmes d'administration basés sur l'utilisation de nanoparticules ont été développés (Rupaimoole et al. 2017).

Il est possible d'utiliser des vecteurs d'expression tels que les adénovirus ou les lentivirus contenant la séquence codant pour le microARN qui une fois transcrite donnera un microARN double brin qui sera naturellement pris en charge par la cellule pour donner un microARN mature simple brin semblable au microARN d'intérêt. Leur avantage est que selon le promoteur utilisé dans la construction l'expression pourra être tissu spécifique (Bader et al. 2010).

### ***Inhibition***

Il est possible d'inhiber l'action des oncomiRs surexprimés dans les cellules tumorales par l'utilisation d'oligonucléotides antisens (ASO) également appelés anti-miRs. Il s'agit d'oligonucléotides complémentaires à la séquence du microARN mature d'intérêt qui ont été modifiés chimiquement pour améliorer leur stabilité dans la cellule. Les antimisRs ont une forte spécificité et affinité pour leur cible, ils vont

donc se fixer au niveau de leur cible pour donner une structure double brin qui ne pourra être prise en charge par le complexe RISC et qui finira par être dégradée.

Plusieurs modifications chimiques ont été développées pour donner soit les antagomiRs soit les locked nucleic acids (LNA). Les antagomiRs présentent l'ajout d'un groupement méthyle sur l'oxygène en 2' du ribose ce qui augmente leur affinité de fixation et diminue leur digestion par les nucléases. Ils sont également couplés au cholestérol pour augmenter leur entrée dans la cellule. Les LNA possèdent un pont méthylène entre l'oxygène en position 2' de l'ose et le carbone en 4' ce qui leur donne l'avantage de former un complexe thermodynamique très stable avec l'ARN. Des tiny LNAs ont également été développés pour cibler spécifiquement la séquence « seed » en 5' du microARN. Leur séquence courte de 8 nucléotides fait qu'ils ne sont pas spécifiques d'un seul microARN mais d'une famille de microARNs partageant la même séquence « seed » (Ling et al. 2013).

D'autres stratégies basées sur l'utilisation de vecteur d'expression ont été développées afin d'inhiber l'action des oncomiRs. Les éponges à microARNs sont des ARNs contenant plusieurs sites de fixation à un microARN. Ces sites peuvent être identiques et ainsi cibler le même microARN pour ainsi augmenter l'inhibition mais ils peuvent également être différents pour ainsi cibler différents microARNs. Les microARNs « erasers » sont des ARNs contenant deux sites de fixation à un microARN. Les microARNs « target protector » sont des ARNs contenant une séquence « seed » identique d'un microARN afin de cibler le 3'-UTR de l'ARNm cible de ce microARN et le protéger ainsi de son action inhibitrice (Lorenzen et al. 2011).

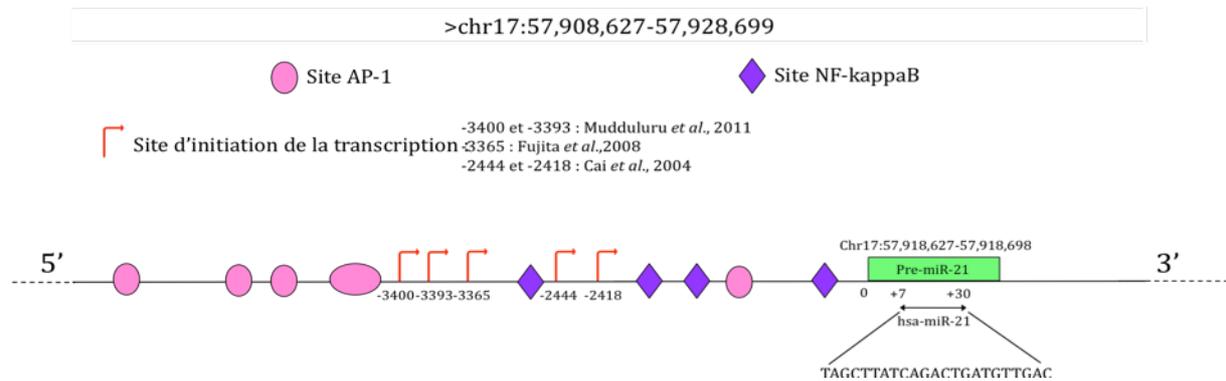
## ***1 miR-21***

MiR-21 semble être l'un des meilleurs marqueurs de dérégulation cancéreuse. En effet, dans une étude de l'expression des microARNs dans un panel de tissus représentant les tumeurs solides les plus fréquentes, il est le seul microARN retrouvé surexprimé dans tous les types de tumeurs (Volinia et al. 2005).

### ***a) Structure***

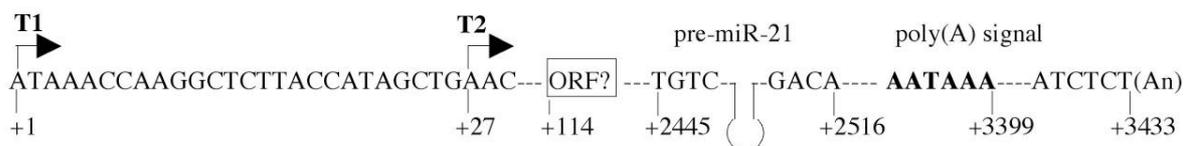
Le gène de miR-21 est situé sur le chromosome 17, il est localisé dans l'intron 10 du gène *TMEM49*. Ils sont transcrits tous les deux dans la même direction mais à partir de promoteurs différents car leur expression n'est pas corrélée (Fujita et al. 2008). De nombreuses études se sont intéressées à l'étude du promoteur de miR-21

et ont mis en évidence une complexité importante avec plusieurs sites d'initiation de la transcription (TSS) différents (Figure 11). C'est pourquoi nous avons décidé contrairement aux normes établies de commencer la numérotation de la séquence au début du pre-miR-21 qui lui est bien défini dans la littérature.



**Figure 11 : Représentation schématique du promoteur de miR-21**

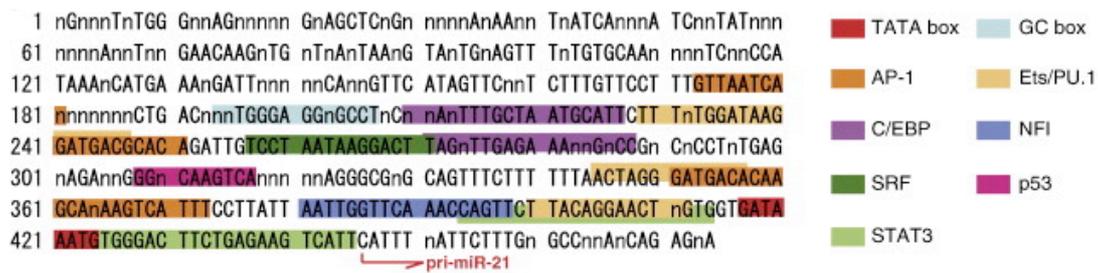
Une première étude de l'équipe de Cullen a permis de montrer que les pri-microARNs tout comme les ARNm portaient une coiffe m7G en 5' et une queue de poly(A) en 3' (Cai et al. 2004). Parmi les 9 microARNs étudiés, ils ont mis en évidence la structure de miR-21 ainsi que la présence de deux TSS ; en -2444 et -2418 à partir de la séquence du pre-miR-21 (Figure 11) ; un site T1 dit mineur et un site T2 dit majeur (Figure 12) mais ces deux sites ne présentent pas de « TATA box » en amont.



**Figure 12 : Représentation schématique du gène de miR-21 (Cai et al. 2004)**

*L'extrémité 3' et le pri-microARN-21 ont été déterminés par RACE tandis que les deux sites d'initiation de la transcription indiquée par T1 et T2 ont été trouvés par RACE et extension d'amorce. Le site de polyadénylation, le site de clivage utilisé pour la polyadénylation ainsi qu'un possible ORF de 124 acides aminés sont également indiqués.*

Une seconde étude a également caractérisé le promoteur de miR-21 (Fujita et al. 2008) (Figure 13). Ils ont mis en évidence par extension d'amorce un autre TSS se trouvant en amont de ceux décrits par Cai ; en -3365 à partir de la séquence du pre-miR-21 ; présentant cette fois-ci une « TATA box ».

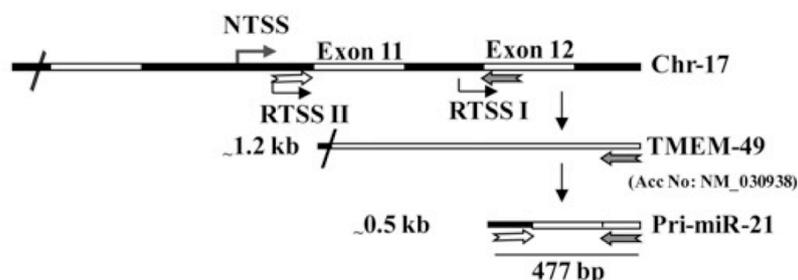


**Figure 13 :** Séquence de la région promotrice de miR-21 (Fujita et al. 2008)

Les bases conservées à travers les vertébrés sont représentées en majuscules tandis les bases non conservées ou les délétions sont désignées par "n". La flèche indique le site d'initiation de la transcription du pri-miR-21.

Fujita et al ont mis en évidence l'existence de plusieurs séquences conservées permettant la fixation d'éléments de réponse activateurs de la transcription au niveau de la région promotrice décrite. Il existe notamment 3 sites de fixation pour AP-1 composé de sous-unités de la famille Fos et Jun mais également des sites de fixation pour p53 ou encore STAT3. Ils ont démontré par des expériences de retard sur gel et d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) que l'hétérodimère c-Fos/c-Jun se fixait bien au niveau des éléments de réponse présents et activait ainsi la transcription du pri-microARN (Fujita et al. 2008). L'équipe de Zhu a re-confirmé par ChIP la fixation du facteur de transcription AP-1 au niveau des 3 éléments de réponses décrits par Fujita (Du et al. 2009).

Une troisième étude a identifié, par la technique de RACE, deux nouveaux TSS se trouvant à -28 et -35 paires de bases de celui décrit par Fujita (Figure 14). Ils ont également mis en évidence un quatrième site de fixation pour AP-1 se trouvant en amont de ceux déjà confirmés et ont montré par ChIP que le facteur de transcription s'y fixait (Mudduluru et al. 2011).



**Figure 14 :** Promoteur de miR-21 (Mudduluru et al. 2011)

RTSSI représente le site majeur d'initiation de la transcription décrit par Cai tandis que RTSSII représente celui décrit par Fujita. NTSS correspond au nouveau site d'initiation de la transcription décrit par Mudduluru.

Deux éléments de réponse permettant la fixation de NF- $\kappa$ B sont présents en amont du promoteur décrit par Cai. Ling et al ont démontré par CHIP que la sous-unité p65 de NF- $\kappa$ B se fixe au niveau du promoteur de miR-21 et active ainsi sa transcription (Ling et al. 2012). Une seconde étude a mis en évidence l'existence de deux sites de fixation à NF- $\kappa$ B supplémentaires se trouvant entre le TSS de Cai et le début de la séquence du pre-miR-21 (Zhou et al. 2010). Madhyastha et al ont montré que dans des conditions d'hyperglycémie, le TGF $\beta$ 1 conduisait à une phosphorylation d'I $\kappa$ B $\alpha$  et ainsi à sa dégradation. Cela permet l'entrée dans le noyau de la sous-unité p65 qui se fixe au niveau des deux nouveaux sites de fixation décrits (Madhyastha et al. 2014).

La spécificité tissulaire ou le type de cancer pourrait rendre compte de la multiplicité des sites d'initiation de la transcription. Ainsi, une étude a observé une induction supérieure de l'activité du promoteur identifiée par Fujita par rapport à celui identifié par Cai dans les cellules HeLa. Ils ont également remarqué que le promoteur décrit par Cai était plus actif dans les cellules HeLa alors qu'il ne l'est pas dans les cellules de mélanome (Ozsolak et al. 2008).

## *b) Rôle de miR-21*

### *Au cours du développement*

Certains microARNs sont très conservés à travers les espèces tandis que d'autres sont spécifiques à un clade. Dans le cas de miR-21, un alignement de séquence du précurseur et du microARN mature a montré qu'il était hautement conservé à travers de nombreuses espèces. Cela suggère un rôle important dans la régulation des gènes (Selcuklu et al. 2009).

MiR-21 joue un rôle très tôt dans le développement embryonnaire. En effet, des études sur le zebrafish ont montré que miR-21 était exprimé dès les stades précoces (12 h) et représentait 40% des microARNs de l'embryon (Chen et al. 2005). Une seconde étude a montré que les niveaux de miR-21 et de l'un de ses facteurs de transcription STAT3 augmentaient durant la transition maternelle zygotique, moment où les ARNm maternels sont dégradés pour laisser place aux ARNm zygotiques. MiR-21 semble donc jouer un rôle important mais encore mal défini dans la dégradation des ARNm maternels (Ramachandra et al. 2008).

MiR-21 serait également important au cours du développement pour réguler la pluripotence des cellules embryonnaires. Dans les cellules embryonnaires souches, l'expression de miR-21 est réprimée par le facteur REST. Lorsqu'un KO de REST est effectué dans des cellules embryonnaires souches, une perte de la capacité d'autorenouveaulement de ces cellules est observée ainsi qu'une diminution des marqueurs Oct4, Nanog, Sox2 et c-Myc et un gain d'expression des marqueurs des différents lignages. Des effets similaires sont observés lorsque miR-21 est surexprimé avec une diminution de l'autorenouveaulement des cellules et une diminution d'expression des marqueurs de cellules souches. MiR-21 joue donc un rôle dans la régulation de la balance entre différenciation et pluripotence (Singh et al. 2008).

MiR-21 joue également un rôle au cours de l'organogenèse notamment lors de la morphogenèse ramifiée qui est un processus important pour la formation de certains organes comme le rein ou le poumon. Pour que la morphogenèse se déroule correctement la matrice extracellulaire doit être dégradée par les métalloprotéases (MMP). L'expression des MMPs peut être régulée par le facteur de transcription AP-1 et son activité peut être inhibée par la protéine RECK. MiR-21 en ciblant à la fois RECK et PDCD4, inhibiteur d'AP-1, conduit indirectement à l'activation des MMP et ainsi à la dégradation de la matrice extracellulaire (Hayashi et al. 2011).

### ***En cancérogenèse***

La surexpression de miR-21 dans des tissus tumoraux a été montrée dans plusieurs études ce qui suggère son implication dans la cancérogenèse. L'étude de miRnome de Volinia sur 540 échantillons comprenant des tumeurs pulmonaires, mammaires, gastriques, prostatiques, coliques et pancréatiques aboutit à une signature de plusieurs microARNs surexprimés dans les tissus tumoraux. Seul miR-21 est retrouvé surexprimé dans les 6 types de tumeurs (Volinia et al. 2005).

Plusieurs études ont montré le pouvoir oncogénique de miR-21. Il joue un rôle important dans les processus de prolifération, d'apoptose et d'invasion. L'inhibition de miR-21 conduit à un arrêt du cycle cellulaire, à une augmentation de l'apoptose et à une augmentation de la sensibilité aux chimiothérapies (Chan et al. 2014 ; Zhu et al. 2008 ; Park et al. 2009).

Dans le cancer du rein, miR-21 est surexprimé dans le tissu tumoral par rapport au tissu sain et son niveau d'expression permet de distinguer les différents sous-types de carcinomes rénaux. Son expression est significativement plus élevée dans les cRCC et les pRCC par rapport aux chRCC et aux OC (Faragalla et al. 2012). De plus, une surexpression de miR-21 est corrélée à un stade et à un grade élevés avec une survie réduite et donc à un mauvais pronostic (Zaman et al. 2012). *In vitro*, l'inhibition de l'expression de miR-21 par des antagomiRs supprime la prolifération cellulaire et induit l'apoptose dans les lignées cancéreuses rénales (Zaman et al. 2012). MiR-21 cible de nombreux gènes notamment impliqués dans l'apoptose tels que le Fas ligand ou TIMP3 (Zhang et al. 2011). MiR-21 joue également un rôle dans les propriétés d'invasion des cellules cancéreuses rénales en ciblant des gènes comme TCF21 qui conduit à l'inhibition de KISS1 connu comme étant un gène suppresseur de tumeur impliqué dans la formation des métastases (Zhang et al. 2012). MiR-21 inhibe également PTEN ce qui favorise la prolifération et l'invasion des cellules cancéreuses rénales par la voie Akt/TORC1 (Dey et al. 2012). MiR-21 régule le voie de signalisation NF- $\kappa$ B *via* PTEN et PDCD4 qui font partie de ses cibles décrites (Bera et al. 2013 ; Bera et al. 2014). MiR-21 stimule également la TEM qui est un phénomène important dans les processus métastatiques (Cao et al. 2016).

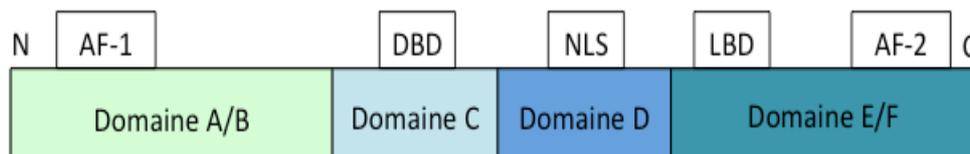
La surexpression de miR-21 est un événement précoce dans la carcinogenèse rénale. Il pourrait donc servir de biomarqueur diagnostique afin de dépister plus tôt la tumeur et permettre une prise en charge rapide du patient. Il pourrait également servir de cible thérapeutique en inhibant son expression par l'utilisation d'anti-miR ou en empêchant sa fixation sur ses différentes cibles par différentes stratégies telles que le « Target protector » (Lorenzen et al. 2011).

### III PPAR $\alpha$

#### A Généralités

PPAR $\alpha$ / NR1C1 appartient à la superfamille des récepteurs nucléaires PPAR (Peroxisome Proliferator Activated Receptor) dont fait partie également PPAR $\beta$ / $\delta$ /NR1C2 et PPAR $\gamma$ /NR1C3 ; il s'agit de facteurs de transcription activés par un ligand. Ces trois PPAR présentent entre 78 et 86% d'homologie dans leur domaine de fixation à l'ADN et entre 63 et 71% dans leur domaine de fixation au ligand. Chaque isoforme est codée par son propre gène, a sa propre distribution tissulaire et sa propre fonction cellulaire. Le gène *hPPAR $\alpha$*  est localisé sur le chromosome 22 en position 22q12-q13.1 et encode un polypeptide de 468 acides aminés. Il est principalement exprimé dans les tissus où le métabolisme des acides gras est important tels que le foie, le muscle squelettique, le cœur et le cortex rénal. Il est également retrouvé dans les cellules des parois vasculaires. Une fois activé, il joue un rôle dans la régulation du métabolisme lipidique et dans le contrôle de la réponse inflammatoire (Berger et Moller 2002).

Comme tous les membres de la superfamille des récepteurs nucléaires, PPAR $\alpha$  est organisé en plusieurs domaines fonctionnels (Figure 15).



**Figure 15 : Structure fonctionnelle de PPAR $\alpha$**

- En position N-terminale, le domaine A/B, peu conservé entre les différents PPAR, possède une fonction de transactivation ligand-indépendante, AF-1, capable de lier des co-régulateurs
- Le domaine C, très conservé, comporte le domaine de fixation à l'ADN (DBD) permettant de se fixer sur les séquences PPRE se trouvant dans le promoteur des gènes cibles
- Le domaine charnière D, interagit avec des co-activateurs et des corépresseurs et contient la séquence de localisation nucléaire (NLS)

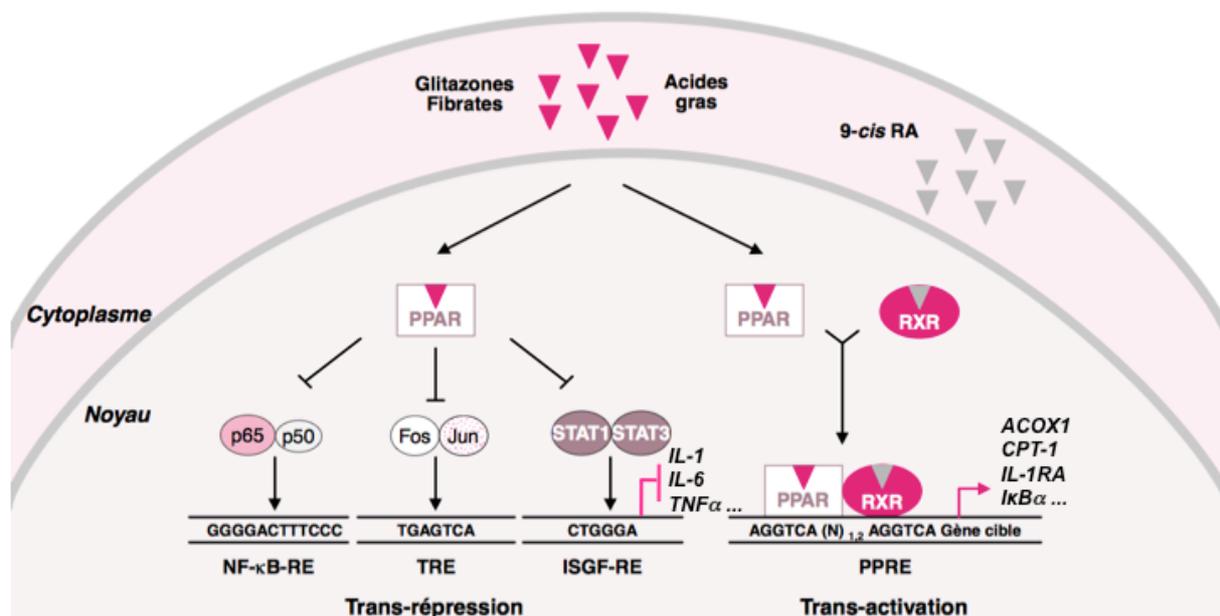
- En position C-terminale, le domaine E/F, comporte le domaine de fixation au ligand (LBD). Il est également impliqué dans l'hétérodimerisation du récepteur avec RXR (Retinoïd X Receptor) ainsi que dans la régulation de la transcription dépendante du ligand grâce à son domaine AF-2 capable de se lier à des co-régulateurs (Pawlak et al. 2015).

## **B Mode d'action des récepteurs PPAR $\alpha$**

Suite à son activation par un ligand, PPAR $\alpha$  va être capable de réguler l'expression de gènes par deux mécanismes : l'un dépendant de sa fixation à l'ADN, la transactivation et l'autre non, la transrépression.

### **a) Ligands de PPAR $\alpha$**

PPAR $\alpha$  peut être activé par de nombreux ligands plus ou moins spécifiques. La plupart des ligands naturels endogènes tels que les acides gras insaturés ou saturés, les eicosanoïdes se lient aux 3 types de récepteurs avec une affinité faible. Tandis que la plupart des ligands synthétiques, développés dans un but thérapeutique, tels le fénofibrate ou le GW7647, spécifique de PPAR $\alpha$ , se lient à plus forte affinité. Des ligands antagonistes tels le GW6471 ayant les mêmes propriétés de spécificité et d'affinité sont également développés dans un but de recherche scientifique (Blanquart et al. 2003).



**Figure 16 : Mécanismes d'action de PPAR $\alpha$**

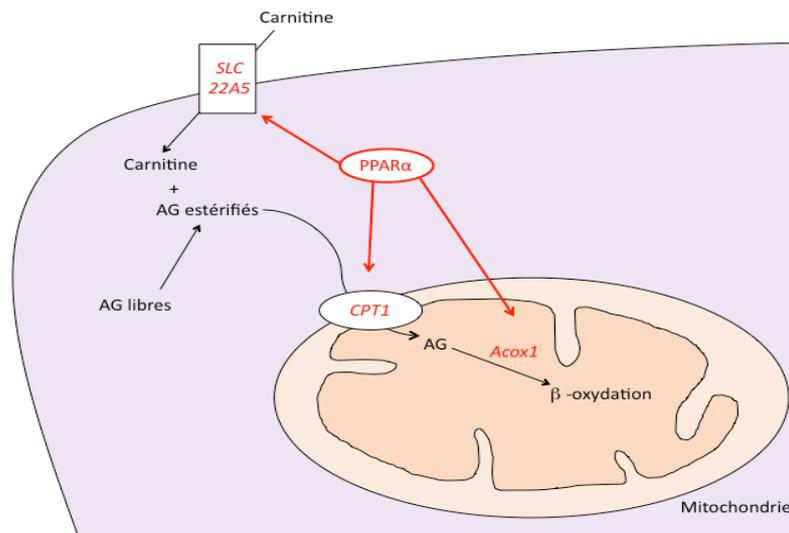
### b) La transactivation

Lorsque PPAR $\alpha$  se trouve dans un état inactif, il est associé avec des protéines co-répresseurs et peut alors avoir une localisation cytoplasmique ou nucléaire. Après fixation d'un de ces ligands, il va se dissocier de ces protéines pour s'associer avec des co-activateurs. Il va se dimériser avec son partenaire RXR. Cette hétérodimère va alors reconnaître des séquences spécifiques se trouvant dans le promoteur de ses gènes cibles, les PPAR Response Element (PPRE). Ces éléments sont constitués de séquences AGGTCA séparées par un ou deux nucléotides. Ces gènes activés sont principalement impliqués dans l'homéostasie des lipides tels que *ACOX1* et *CPT-1* (Blanquart et al. 2003) (Figure 16 et 17).

### c) La transrepression

PPAR $\alpha$  réprime également l'expression de gènes de manière indépendante de sa fixation à l'ADN en réprimant des voies de signalisation comme NF- $\kappa$ B et AP-1. L'inhibition de ces voies est due à des interactions protéines-protéines conduisant à la formation de complexes inactifs. Ainsi, PPAR $\alpha$  interagit avec les sous-unités p65 de NF $\kappa$ B et avec la sous-unité c-Jun du complexe AP-1. Ce mécanisme aboutit aux propriétés anti-inflammatoires de PPAR $\alpha$  avec l'inhibition de cytokines pro-inflammatoires comme l'IL-1 et l'IL-6 (Blanquart et al. 2003) (Figure 16).

## C Rôle dans le métabolisme lipidique



**Figure 17 :** Rôle de PPAR $\alpha$  dans le catabolisme des acides gras (AG)

PPAR $\alpha$  régule l'expression des gènes impliqués dans la capture cellulaire des acides gras, leur estérification en acyl-CoA et leur dégradation par la voie de la  $\beta$ -oxydation peroxysomale et mitochondriale (Schoonjans et al. 1996). Tout d'abord, il stimule l'expression du transporteur SLC22A5, qui permet l'entrée de la carnitine dans la cellule, et de la protéine CPT1, se trouvant à la membrane externe mitochondriale, nécessaire à l'entrée des acides gras dans la mitochondrie. Il stimule finalement l'expression de Acox1 qui est une des enzymes clefs de la  $\beta$ -oxydation (Figure 17).

### **D Rôle en cancérogenèse**

Le rôle de PPAR $\alpha$  dans la cancérogenèse a été montré pour la première fois chez les rongeurs qui développent des tumeurs hépatiques après avoir ingéré sur une longue période des fibrates (Reddy et al. 1979) mais chez l'homme, ces agents n'ont pas d'incidence sur la fréquence d'apparition des cancers (Bonovas et al. 2012). Par contre, l'administration orale d'agonistes de PPAR $\alpha$  chez des souris inhibe la croissance *in vitro* de plusieurs lignées cancéreuses du côlon, du foie, du sein, de l'endomètre et de la peau (Grabacka et al. 2013). Il inhibe également *in vitro* et *in vivo* le potentiel métastatique des cellules de mélanomes *via* la phosphorylation d'Akt (Grabacka et al. 2006). Cette inhibition de la croissance tumorale est due, en partie, à l'inhibition de l'angiogenèse et de la production du VEGF et à l'augmentation de l'expression de TSP-1 et de l'endostatine (Panigrahy et al. 2008) et à une diminution de la perméabilité endothéliale (Piwowarczyk et al. 2015). PPAR $\alpha$  peut aussi inhiber la tumorigenèse par deux autres voies : d'une part, en agissant négativement sur l'inflammation en inhibant les signaux inflammatoires tels que NF- $\kappa$ B, l'IL-1, le TNF $\alpha$  ou encore Cox2 et, d'autre part, en contrant l'effet Warburg qui permet la prolifération des cellules cancéreuses. PPAR $\alpha$  interfère avec différentes voies métaboliques ; par exemple, il augmente l'oxydation des acides gras et diminue la production de glutamine ce qui inhibe la croissance des cellules tumorales (Aoyama et al. 1998).

### **E PPAR $\alpha$ et miR-21**

De nombreuses cibles de miR-21 ont été validées expérimentalement. Nous nous sommes focalisés sur PPAR $\alpha$  qui a été décrit comme étant rénoprotecteur dans la fibrose rénale. En effet, une surexpression de miR-21 dans le rein fibrosé associée à une diminution de l'expression de PPAR $\alpha$  est observée dans un modèle murin

d'obstruction urétérale unilatérale (OUU) et dans des tissus humains (Glowacki et al. 2013 ; Gomez et al. 2015). Lorsque l'OUU est réalisée dans des souris miR-21<sup>-/-</sup> ou surexprimant PPAR $\alpha$ , les lésions de fibrose sont retardées et moins sévères. Lorsque les souris sont déficientes en PPAR $\alpha$ , les effets anti-fibrotiques de l'anti-miR-21 ne sont plus observés (Chau et al. 2012).

PPAR $\alpha$  est une cible directe de miR-21, que ce soit dans des cellules musculaires lisses (Sarkar et al. 2010), des cellules hépatiques (Kida et al. 2011), des cellules endothéliales (Zhou et al. 2011) et des cellules de glioblastomes (Zhang et al. 2014). Une analyse par TargetScan a montré l'existence de deux sites de fixation à miR-21 au niveau du 3'-UTR de PPAR $\alpha$ . Ces différentes études ont montré par des tests de luciférase que miR-21 se fixe au niveau de ces sites ce qui induit une diminution de l'expression de PPAR $\alpha$  au niveau protéique.

Dans la littérature, il est décrit que PPAR $\alpha$  inhibe les voies de signalisation médiée par AP-1 et NF- $\kappa$ B (Ramanan et al. 2008 ; Delerive et al. 1999). Ces deux facteurs de transcription sont impliqués dans la régulation transcriptionnelle de miR-21 *via* leur fixation sur son promoteur. Il semble donc exister une boucle de régulation entre miR-21 et PPAR $\alpha$ .

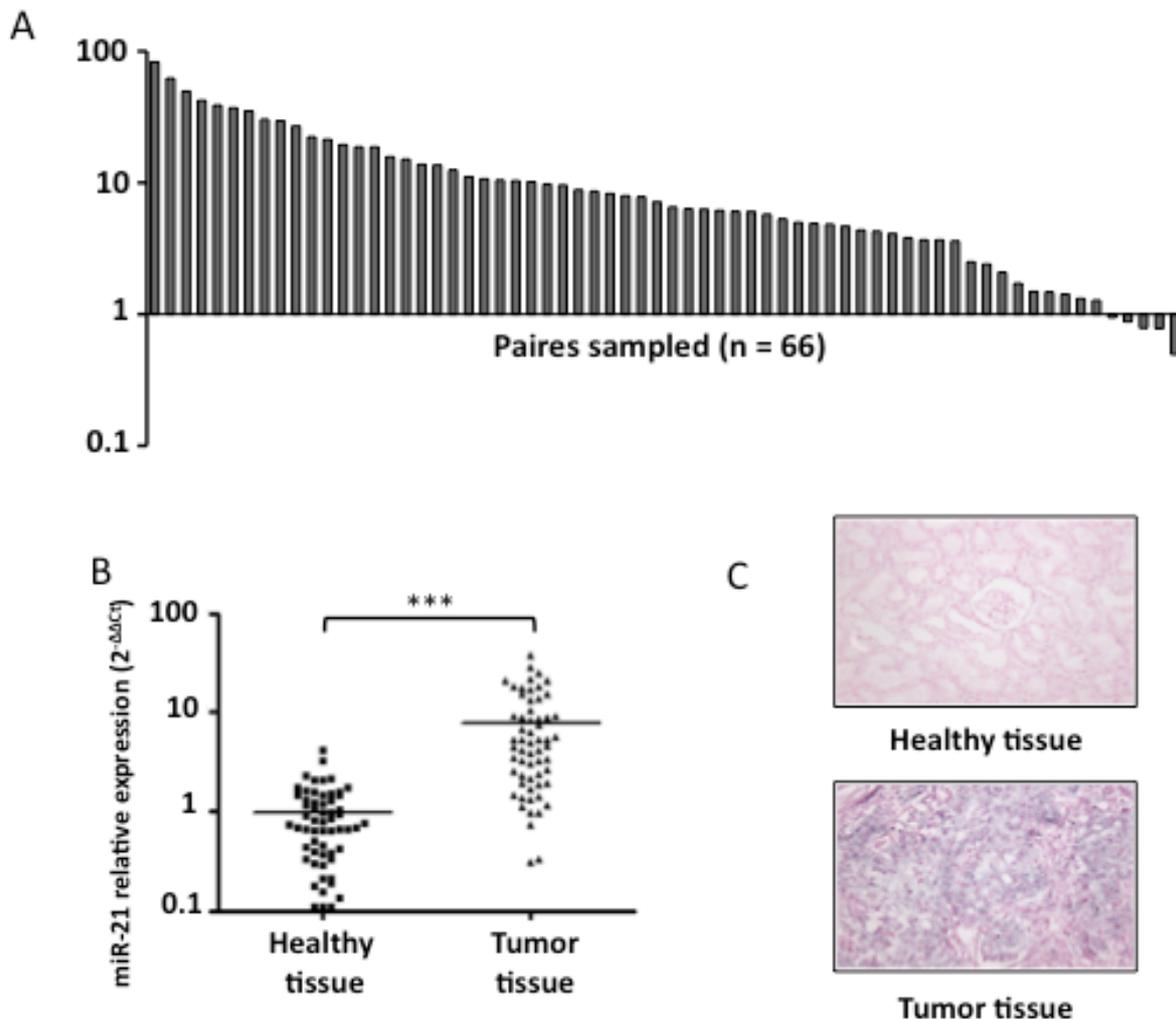
# Résultats

# Partie I :

*Rôle de miR-21 dans la progression tumorale et la chimiorésistance des carcinomes rénaux à cellules claires*

Dans cette première partie, nous avons voulu confirmer les données de la littérature concernant l'expression de miR-21 dans le cRCC et son rôle sur les propriétés des cellules cancéreuses rénales (migration, invasion, prolifération et apoptose). Nous nous sommes également intéressés à un rôle potentiel de miR-21 dans la chimiorésistance caractéristique du cRCC.

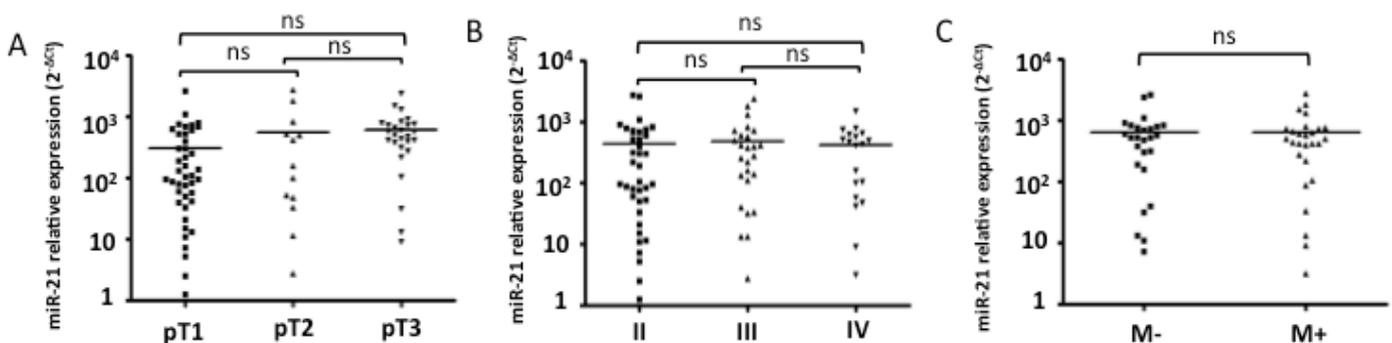
### A *miR-21 est surexprimé dans le cRCC*



**Figure 18 :** miR-21 est significativement surexprimé dans des tissus humains de cRCC comparés à des tissus sains appariés. L'expression de miR-21 dans les tissus tumoraux et sains adjacents d'une cohorte de 66 patients atteints de cRCC est déterminée par qPCR, le RNU6B est utilisé comme contrôle interne. (A) le niveau de miR-21 dans chaque tumeur est mis en relation avec le niveau d'expression de miR-21 dans le tissu sain apparié. (B) L'expression moyenne de miR-21 dans le cRCC est mis en relation avec la valeur moyenne obtenue dans les tissus sains (\*\*\*)  $p < 0,001$ . (C) L'hybridation in situ du miR-21 montre une surexpression dans le tissu tumoral par rapport au tissu sain.

Tout d'abord, nous avons examiné l'expression de miR-21, par RT-qPCR, dans 66 tumeurs de cRCC appariées à des tissus non tumoraux adjacents. L'expression de miR-21 a été (i) détectée dans tous les tissus étudiés, (ii) augmentée dans 61 des tumeurs par rapport aux tissus sains appariés (92,4%) et (iii) diminuée dans seulement 5 tumeurs (7,6%) (Figure 18A). L'expression de miR-21 a été significativement augmentée dans les cRCC par rapport aux tissus rénaux normaux ( $14,48 \pm 2,6$  vs  $1,48 \pm 2$  respectivement,  $p < 0,001$ ; Figure 18B). La surexpression de miR-21 a été confirmée par un test d'hybridation *in situ* dans lequel le signal de coloration du miR-21 était très faible ou absent dans les tissus non tumoraux et forts dans les tissus de cRCC (Figure 18C).

Ensuite, dans une cohorte de 99 tumeurs de cRCC, nous n'avons trouvé aucune relation entre l'expression de miR-21 et l'âge ou le sexe ( $p > 0,05$ ). Il n'y a pas de différence significative ni entre les différents stades (pT1, pT2 et pT3) (Figure 19A) et ni entre les différents grades de Furhman (II, III et IV) (Figure 19B) et ni entre les patients atteints de cRCC sans métastases pendant 5 ans après la chirurgie ( $n = 26$ ) et les patients atteints de cRCC développant des métastases dans les 5 ans ( $n = 27$ ) ( $p = 0,66$ , Figure 19C). L'expression de miR-21 dans les tumeurs primaires n'est pas un facteur prédictif de la maladie métastatique

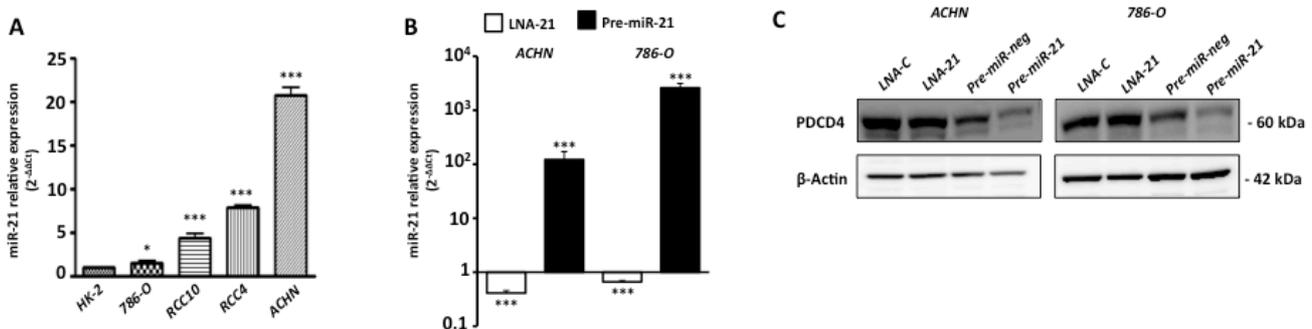


**Figure 19 :** Expression de miR-21 en fonction des caractéristiques clinico-pathologiques des patients atteints de cRCC. L'expression de miR-21 dans les tissus tumoraux de 99 patients atteints de cRCC est déterminée par qPCR, le RBU6B est utilisé comme contrôle interne.

En conclusion, dans notre cohorte, nous avons montré que miR-21 est surexprimé dans les tissus du cRCC indépendamment du stade et du grade de la tumeur.

## **B miR-21 augmente les propriétés d'invasion et de migration des cellules tumorales rénales**

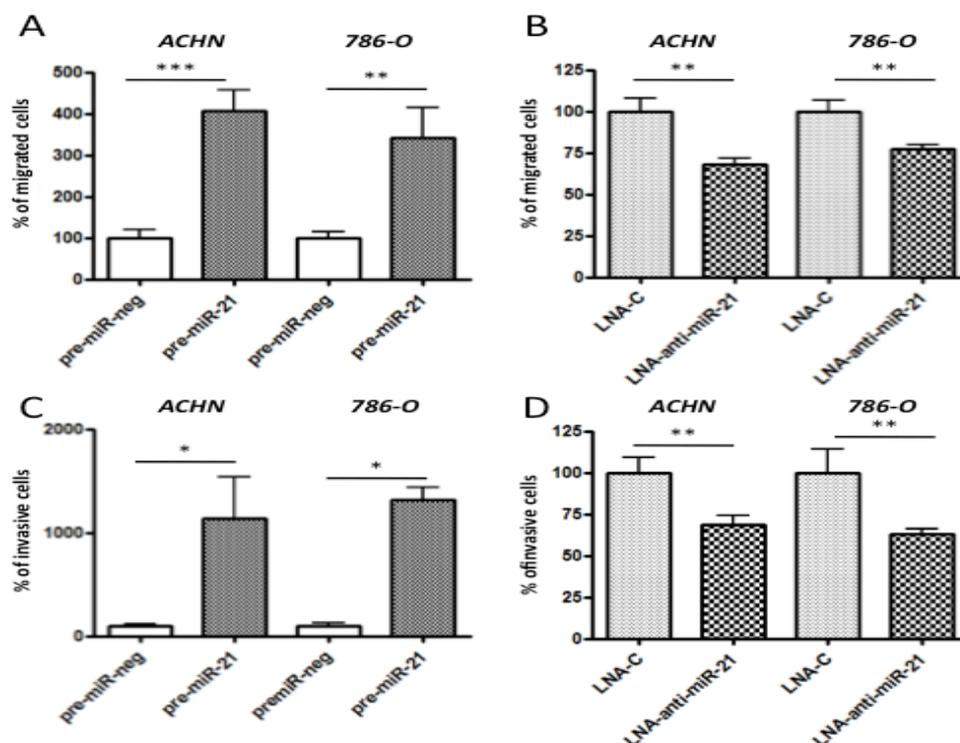
Ensuite, nous avons étudié le niveau d'expression de miR-21 dans une lignée de cellule épithéliale humaine provenant des tubules proximaux, HK-2, et dans des lignées cellulaires humaines de cRCC. Par RT-qPCR, nous avons montré que l'expression de miR-21 était significativement augmentée dans les lignées cellulaires cancéreuses 786-O, RCC4, RCC10 et ACHN par rapport aux cellules HK-2 ( $p < 0,05$  et  $p < 0,001$ ; Figure 20A). Afin de déterminer le rôle du miR-21 sur les propriétés des cellules cancéreuses rénales, du pré-miR-21 ou de l'anti-miR-21 (LNA) ont été transfectés dans les lignées cellulaires de cRCC pour surexprimer ou inhiber miR-21 (Figure 20B et 20C, respectivement).



**Figure 20 : miR-21 est surexprimé dans les lignées cancéreuses rénales et son expression peut être modulée par la transfection d'un pré-miR-21 ou d'un LNA-anti-miR-21.** (A) L'expression de miR-21 dans les cellules cancéreuses rénales 786-O, RCC10, RCC4 et ACHN est comparée aux cellules épithéliales rénales normales HK-2. Le RNU48 est utilisé comme contrôle interne. (B-C) Les cellules ACHN et 786-O ont été transfectées avec 10 nM de pré-miR-21, pré-mi-Neg, LNA-C ou LNA-anti-miR-21. 24 h après la transfection, les expressions relatives de miR-21 ou PDCD4 ont été mesurées par qPCR et western blot, respectivement. Les valeurs sont des moyennes et représentent au moins trois expériences distinctes (\*  $p < 0,05$  et \*\*\*  $p < 0,001$ ).

Le rôle de miR-21 dans la migration cellulaire a été évalué en utilisant des chambres de Boyden. Nous avons observé une migration significativement accrue dans les lignées cellulaires ACHN et 786-O transfectées avec le pré-miR-21 (respectivement 4,2 et 3,8 fois, Fig. 21A). En revanche, dans les lignées cellulaires transfectées avec le LNA-anti-miR-21, une migration significativement réduite a été observée par rapport aux cellules témoins transfectées avec un LNA-contrôle (27% et 24% d'inhibition,  $p < 0,01$ , Fig. 21B). Les tests d'invasion, en chambres de Boyden recouvertes de Matrigel®, ont montré que la surexpression de miR-21 augmentait

significativement l'invasion des cellules ACHN et 786-O (10,8 et 12,4 fois respectivement,  $p < 0,05$  ; Fig. 21C) alors que le blocage de l'activité des miR-21 a réduit l'invasion de 30% ( $p < 0,01$  ; Fig. 21D).

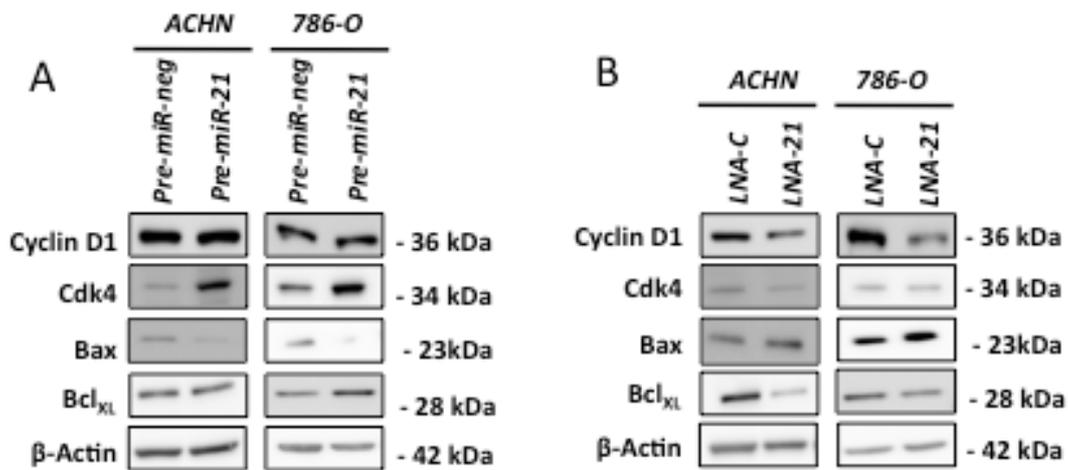


**Figure 21 : miR-21 augmente les propriétés de migration et d'invasion des cellules ACHN et 786-O.** Les cellules ACHN et 786-O sont transfectées avec 10 nM de pré-miR-21, pré-miR-Neg (A-C), LNA-anti-miR-21 ou LNA-C (B-D). Ensuite, la migration cellulaire et l'invasion ont été évaluées en utilisant des chambres Boyden à 24 puits revêtues ou non avec du Matrigel® avec 10% de sérum bovin foetal en tant que chimioattractant. Après 24 heures, le nombre de cellules migratrices (A-B) et invasives (C-D) a été déterminé. Les valeurs sont des moyennes et représentent au moins trois expériences distinctes (\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  et \*\*\*  $p < 0,001$ ).

### C Rôle de miR-21 dans la signalisation intracellulaire

Après avoir montré que miR-21 favorise la migration cellulaire et l'invasion, nous avons étudié l'impact de la surexpression de miR-21 sur les principales voies de signalisation intracellulaire par immuno détection. Dans les cellules surexprimant miR-21 par rapport aux cellules transfectées par le pré-miR-neg, aucun impact n'est observé sur l'expression de la cycline D1 mais l'expression de sa kinase partenaire Cdk4 est augmentée (Figure 22A). En revanche, dans les cellules transfectées par le LNA-21 par rapport aux cellules transfectées par le LNA-C, l'expression de la cycline D1 et de Cdk4 est diminuée (Figure 22B). Ces données ont montré que l'expression de miR-21 est impliquée dans la régulation de la progression du cycle cellulaire.

L'expression de miR-21 dans les cellules ACHN et 786-O est également associée à la survie cellulaire. L'expression du marqueur pro-apoptotique Bax est diminuée tandis que l'expression du marqueur anti-apoptotique Bcl-xL est augmentée. Le rapport Bcl-xL / Bax est augmenté suggérant une augmentation de la résistance à l'apoptose dans les cellules surexprimant miR-21 (Figure 22A). Des résultats opposés ont été observés avec la stratégie LNA-anti-miR-21 (Figure 22B).



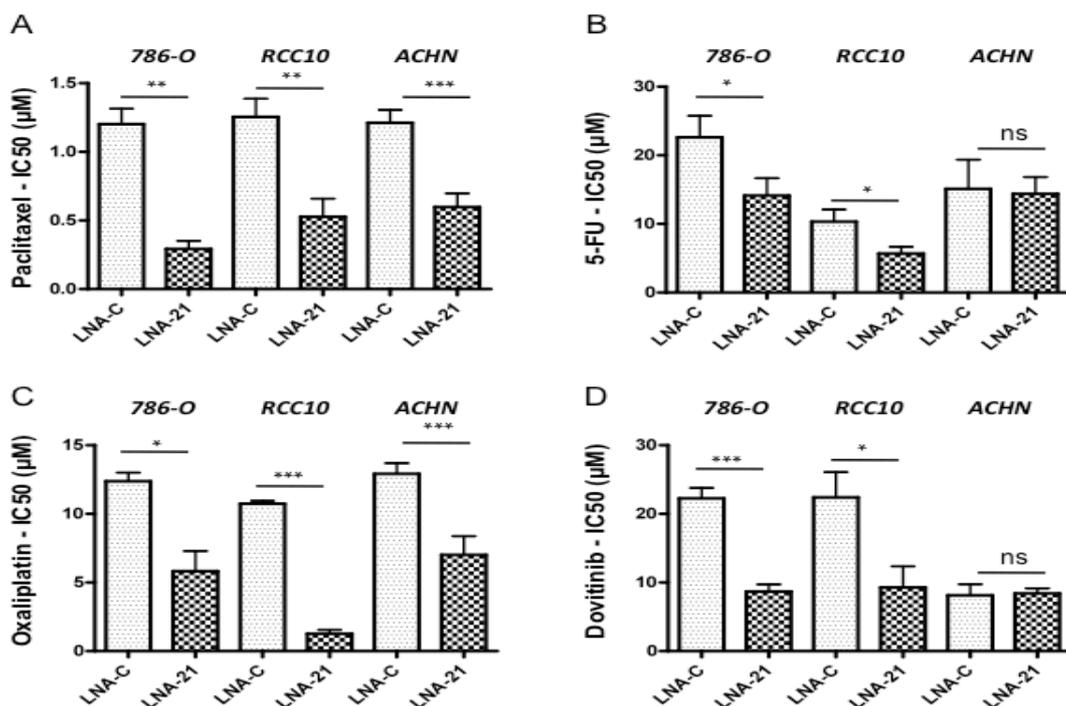
**Figure 22 : Impact de miR-21 sur l'expression des voies de signalisation.** *Un western blot a été réalisé sur des extraits totaux des cellules ACHN et 786-O transfectées 24h avec 10 nM de pre-miR-21, pre-miR-neg, LNA-C ou LNA-anti-miR-21. Des anticorps dirigés contre la cycline D1, Cdk4, Bax, Bcl-xL et la b-actine ont été utilisés.*

### **D miR-21 augmente la chimiorésistance des cRCC**

Étant donné que les cRCC sont très résistants aux chimiothérapies cytotoxiques classiques et que la surexpression de miR-21 est associée à une chimiorésistance dans de nombreux cancers comme le côlon et le pancréas (Deng et al. 2014 ; Wei et al. 2016), nous avons étudié l'impact de la stratégie anti-miR-21 sur les réponses des cellules cancéreuses rénales à différents agents anticancéreux incluant une thérapie ciblée.

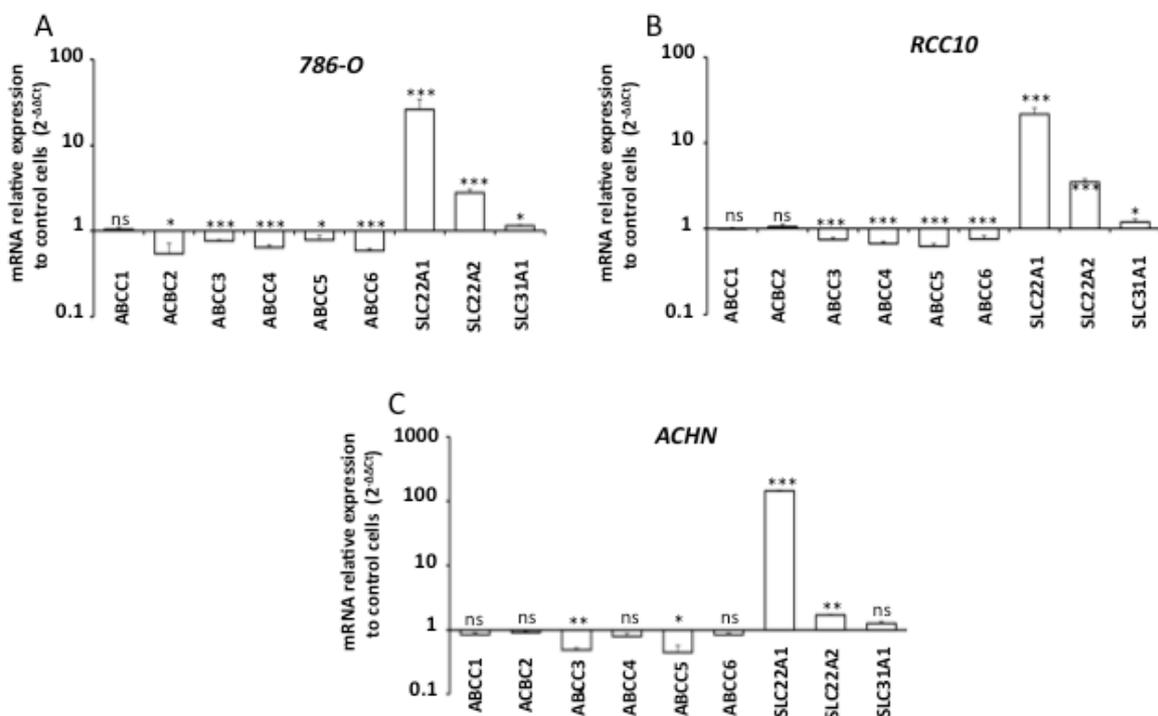
Premièrement, nous avons testé le Paclitaxel, une drogue connue pour inhiber la division cellulaire en se liant à la tubuline et par conséquent en bloquant le désassemblage des microtubules. La mesure des IC<sub>50</sub> a montré une sensibilité accrue des cellules 786-O (LNA-C = 1,2 ± 0,13 µM vs LNA-21 = 0,29 ± 0,06 µM, p <0,001), RCC10 (LNA-C = 1,25 ± 0,13 µM vs LNA-21 = 0,53 ± 0,13 µM, p <0,001) et ACHN (LNA-C = 1,21 ± 0,09 µM vs LNA-21 = 0,59 ± 0,1 µM, p <0,001) (Figure 23A) au Paclitaxel. Des résultats similaires ont été obtenus avec (i) le 5-fluorouracile

fluoropyrimidine (5-FU), un médicament anti-métabolite (Figure 23B) (LNA-C = 22,6 ± 3,1 µM vs LNA-21 = 14,1 ± 2,5 µM dans des cellules 786-O et LNA-C = 10,3 ± 1,8 µM vs LNA-21 = 5,7 ± 0,95 µM dans les cellules RCC10) et (ii) l'oxaliplatine, un médicament de chimiothérapie à base de platine entraînant la formation d'adduits de platine sur l'ADN qui bloquent la réplication de l'ADN (Figure 23C) (LNA-C = 12,4 ± 0,63 µM vs LNA-21 = 5,8 ± 1,5 µM dans les cellules 786-O et LNA-C = 10,8 ± 0,21 µM vs LNA-21 = 1,27 ± 0,28 µM dans les cellules RCC10 Et LNA-C = 12,92 ± 0,77 µM vs LNA-21 = 7,02 ± 1,36 µM dans les cellules ACHN). Ensuite, nous avons testé le sunitinib, un inhibiteur multi cible de RTK utilisé en première ligne chez les patients atteints de cRCC avancé. La sensibilité des cellules 786-O, RCC10 et ACHN au sunitinib n'a pas été influencée par la stratégie LNA-anti-miR-21. En revanche, pour la première fois, nous avons montré que le LNA-21 sensibilise les cellules 786-O et RCC10 au dovinitib, un autre inhibiteur multi-cible de tyrosine kinase (Figure 23D) (LNA-C = 22,3 ± 1,5 µM vs LNA-21 = 8,7 ± 1,1 µM et LNA-C = 22,4 ± 3,7 µM vs LNA-21 = 9,3 ± 3,1 µM, respectivement).



**Figure 23 :** La stratégie anti-miR-21 sensibilise les cellules cancéreuses rénales au paclitaxel, au 5-FU, à l'oxaliplatine et au dovinitib. Les cellules 786-O, RCC10 et ACHN sont transfectées avec 10 nM de LNA-C ou de LNA-anti-miR-21. 24 H après transfection, les cellules sont incubées avec du paclitaxel (A), du 5-FU (B), de l'oxaliplatine (C) et du dovinitib (D). Les IC50 sont mesurées après 72 H de traitement par un test MTS. Les valeurs sont des moyennes et représentent au moins trois expériences distinctes (\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$  et \*\*\*  $p < 0.001$ ).

Pour mieux comprendre l'impact du miR-21 sur la chimiorésistance, nous avons concentré notre attention sur des gènes connus pour conférer un phénotype de résistance multidrogue (MDR) aux cellules cancéreuses : une famille de transporteurs de liaison à l'ATP (ABC). Par qPCR, nous avons montré que la stratégie anti-miR-21 diminue significativement l'expression d'ABCC3-6 et ABCC2-6 et ABBC3&5 dans les cellules RCC10 (Figure 24A), 786-O (Fig. 24B), et ACHN (Figure 24C) respectivement. En outre, dans les trois lignées cellulaires, la stratégie LNA-anti-miR-21 augmente significativement les expressions des transporteurs d'influx de platine SLC22A1 / OCT1, SLC22A2 / OCT2 et SLC31A1 / CTR1.



**Figure 24 :** La stratégie anti-miR-21 diminue l'expression des gènes de multi-drogue résistance mais augmente l'expression des transporteurs à influx de platine. Les cellules RCC10 (A), 786-O (B) et ACHN (C) ont été transfectées avec 10nM de LNA-C ou de LNA-anti-miR-21. 24 H après transfection, l'expression relative d'ABCC1-6, SLC22A1, SLC22A2 et SLC31A1 est déterminée par qPCR. PPIA est utilisé comme contrôle interne. Les valeurs sont des moyennes et représentent au moins 3 expériences séparées (\*  $p < 0.05$  et \*\*\*  $p < 0.001$ ).

En conclusion, miR-21 est un acteur de chimiorésistance observé dans les tumeurs cRCC.

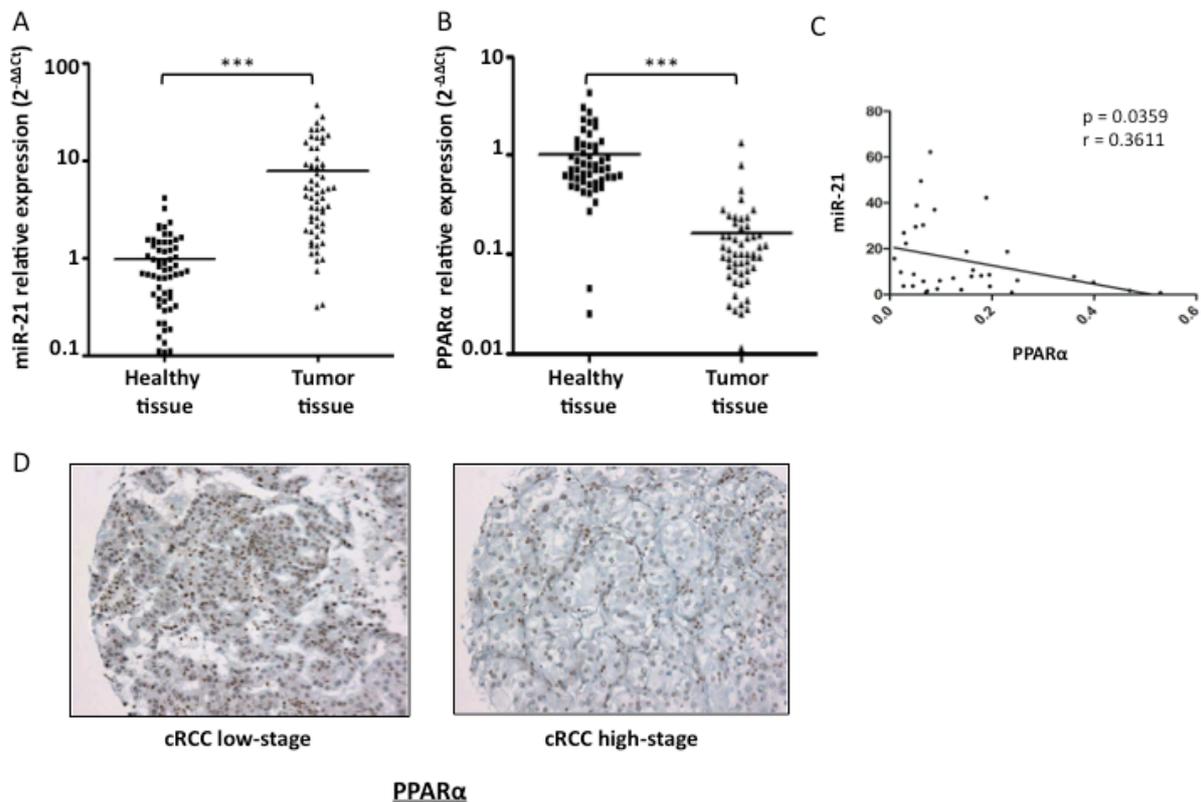
# ***Partie II :***

***Etude de la boucle de régulation entre miR-21 et PPAR $\alpha$***

L'analyse de la littérature nous a laissé penser qu'il pouvait exister une boucle de régulation négative entre miR-21 et l'une de ses cibles, PPAR $\alpha$ . D'un côté, PPAR $\alpha$  inhibe les voies de signalisation AP-1 et NF- $\kappa$ B qui sont elles même impliquées dans la régulation transcriptionnelle de miR-21. D'un autre côté, miR-21 cible PPAR $\alpha$  et diminue son expression.

### **A L'expression de PPAR $\alpha$ est perdue dans les cRCC**

Afin de valider notre hypothèse de boucle de régulation négative entre miR-21 et PPAR $\alpha$ , nous avons déterminé les niveaux d'expression de miR-21 et de PPAR $\alpha$  par RT-qPCR en comparant le tissu tumoral par rapport au tissu sain correspondant, sur une cohorte de 60 patients. Nous montrons de manière significative une surexpression de miR-21 dans les cRCC (14,48 $\pm$ 2,6 fois,  $p < 0,0001$ ) (Figure 25A) alors que nous observons une perte d'expression de PPAR $\alpha$  (85% d'inhibition,  $p < 0,0001$ ) (Figure 25B). Le test de corrélation de Spearman montre pour la première fois que la surexpression de miR-21 dans les cRCC est corrélée à une perte d'expression de PPAR $\alpha$  (Figure 27C). Par immunohistochimie, nous montrons, pour la première fois, une expression de PPAR $\alpha$  dans les cRCC de bas grade qui est perdue dans les cRCC de haut grade (Figure 25D).

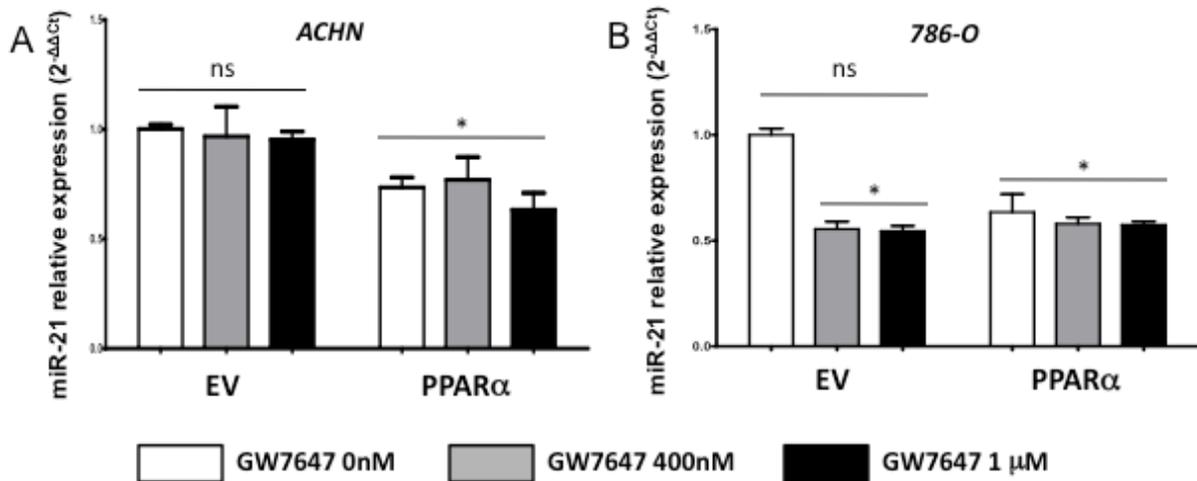


**Figure 25 :** La surexpression de miR-21 dans les cRCC est corrélée à une perte d'expression de PPAR $\alpha$ . Les niveaux d'expression de miR-21 (A) et de PPAR $\alpha$  (B) ont été déterminés par qPCR, selon la méthode de comparaison des Ct ( $2^{-\Delta\Delta CT}$ ) avec comme microARN de référence le RNU6B, en comparant le tissu tumoral par rapport au tissu sain périphérique sur une cohorte de 60 patients. La surexpression de miR-21 dans le tissu tumoral est corrélée à la perte d'expression de PPAR $\alpha$  (C) par le test de corrélation de Spearman ( $p = 0,0359$ ) \*\*\* $p < 0,0001$ . (D) L'immunohistochimie montre une expression de PPAR $\alpha$  au niveau nucléaire dans les cRCC de bas grade qui est perdue dans les cRCC de haut de grade. Les petites cellules marquées correspondent aux lymphocytes (X200).

Pour la première fois, dans le cRCC, dans une cohorte de 60 patients atteints de cRCC, nous montrons une perte d'expression de PPAR $\alpha$  au niveau protéique dans les cRCC de haut grade ainsi qu'au niveau ARNm en corrélation avec la surexpression de miR-21.

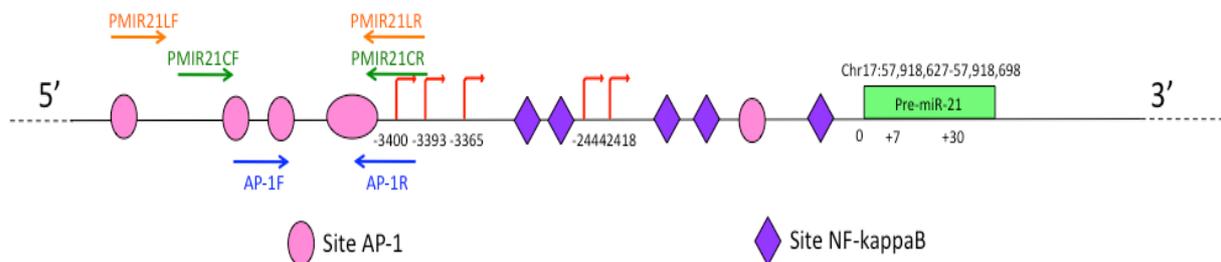
### **B Régulation de miR-21 par PPAR $\alpha$**

Nous avons commencé par nous intéresser à l'effet de l'expression et de l'activation de PPAR $\alpha$  sur l'expression de miR-21. Pour tester notre hypothèse, nous disposons d'un plasmide pSG5 contenant la séquence codante pour PPAR $\alpha$  ainsi que son plasmide vide contrôle (EV) et d'un agoniste, le GW7647, permettant d'activer PPAR $\alpha$ . Le séquençage de ce plasmide a montré que l'ADNc comporte une partie du 3'-UTR de PPAR $\alpha$  mais pas la partie contenant les deux sites de fixation à miR-21. Ainsi, l'ARNm surexprimé par ce plasmide ne peut pas être ciblé par miR-21. Nous observons que dans la lignée ACHN présentant un fort taux de miR-21, l'activation de PPAR $\alpha$  n'a aucun effet sur l'expression de miR-21 mais que sa surexpression conduit à une diminution de 30% de l'expression de miR-21 (Figure 26A). Tandis que dans la lignée 786-O présentant un faible taux de miR-21, le traitement seul au GW7647 est suffisant pour diminuer l'expression de miR-21 de l'ordre de 45%. Nous observons cette même diminution de 43% lorsque PPAR $\alpha$  est surexprimé (Figure 26B). Dans les deux cas, un traitement au GW7647 combiné à une surexpression de PPAR $\alpha$  n'induit pas une diminution plus marquée de l'expression de miR-21.

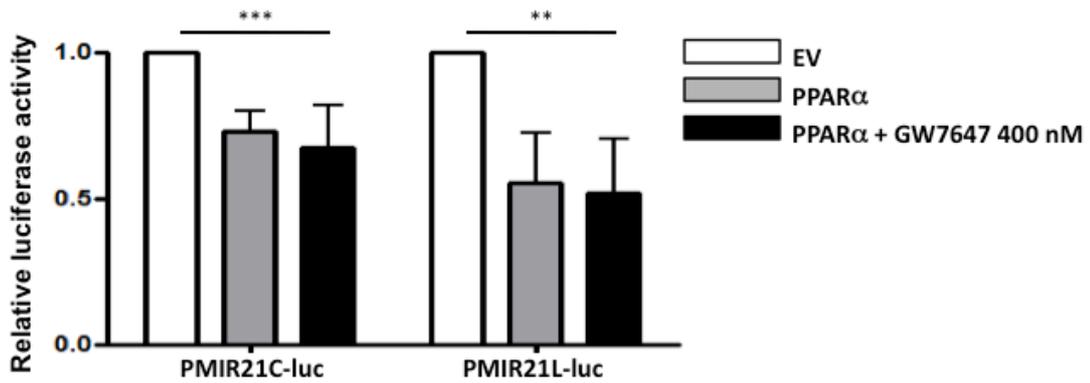


**Figure 26 :** La surexpression et l'activation de PPAR $\alpha$  diminuent l'expression de miR-21. Les cellules ACHN (A) et 786-O (B) ont été transfectées avec un vecteur vide ou un plasmide codant PPAR $\alpha$  puis traitées ou non avec différentes concentrations de GW7647. 48 H post-transfection, les niveaux d'expression de miR-21 ont été déterminés par qPCR, selon la méthode de comparaison des Ct ( $2^{-\Delta\Delta C_T}$ ) avec comme microARN de référence le RNU6B

Afin de déterminer de quelle manière PPAR $\alpha$  régule l'expression de miR-21, nous avons cloné le promoteur de miR-21 décrit par Fujita et al et avons obtenu deux constructions différentes (PMIR21C-luc et PMIR21L-luc) pour effectuer des tests luciférase (Fujita et al. 2008) (Figure 27). Dans les cellules 786-O, nous montrons une inhibition de l'activité transcriptionnelle du promoteur de miR-21 de l'ordre de 25% avec le PMIR21C-luc et de 45% avec le PMIR21L-luc avec la surexpression de PPAR $\alpha$  mais le traitement au GW7847 ne potentialise pas les effets de PPAR $\alpha$  (Figure 28).

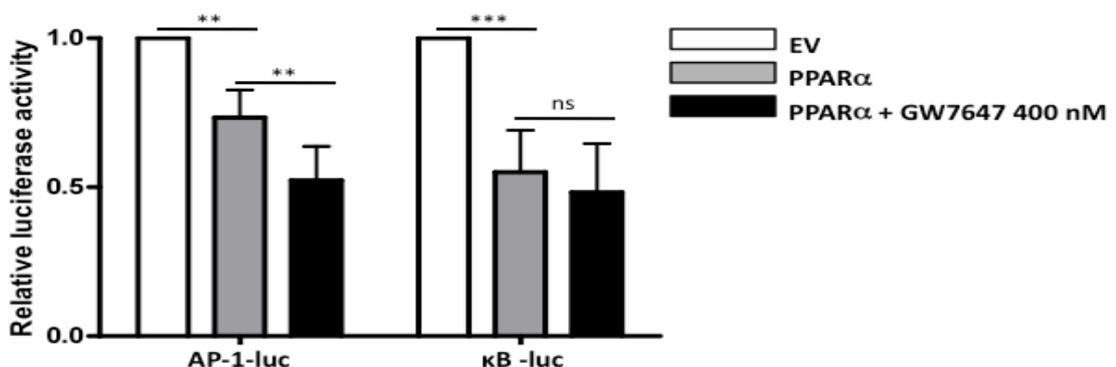


**Figure 27 :** Schéma du promoteur de miR-21. PMIR21LF/R et PMIR21CF/R sont les couples d'amorces utilisés pour le clonage du promoteur de miR-21. AP-1F/R est le couple d'amorce utilisé pour l'expérience de chip. Les différents éléments de réponses à AP-1 et NF-kB décrit dans la littérature sont indiqués par un rond rose et un losange violet respectivement.



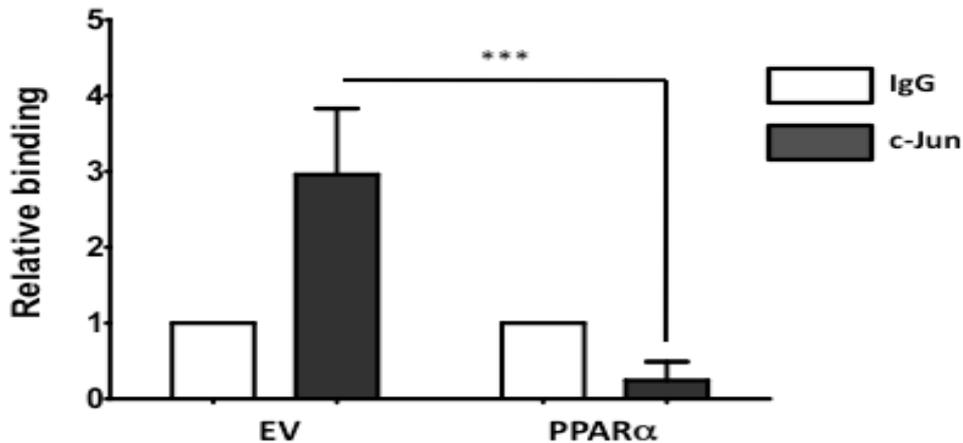
**Figure 28 :** La surexpression et l'activation de PPAR $\alpha$  inhibent la transcription de miR-21. Les cellules 786-O ont été co-transfectées avec un vecteur vide (EV) ou un plasmide codant pour PPAR $\alpha$  et un plasmide rapporteur luciférase contenant deux constructions différentes du promoteur de miR-21 (PMIR21C-luc et PMIR21L-luc) puis traitées ou non avec 400 nM de GW7647. L'activité luciférase a été mesurée 48 H post-transfection. \*\*\*  $p < 0,001$ .

Nous avons également déterminé l'effet de la surexpression et de l'activation de PPAR $\alpha$  sur l'activité transcriptionnelle des facteurs de transcription AP-1 et NF- $\kappa$ B. Pour cela, nous avons effectué des tests luciférase avec des constructions contenant le gène de la luciférase sous le contrôle d'un promoteur contenant les éléments de réponse soit à NF- $\kappa$ B ( $\kappa$ B-luc) soit à AP-1 (AP-1-luc). Dans les cellules 786-O, nous observons que la surexpression de PPAR $\alpha$  conduit à une diminution de l'activité transcriptionnelle contrôlée par AP-1 et NF- $\kappa$ B de 30 à 55% respectivement et que cet effet est renforcé par l'activation du récepteur avec du GW7647 pour AP-1 et non pour NF- $\kappa$ B (Figure 29).



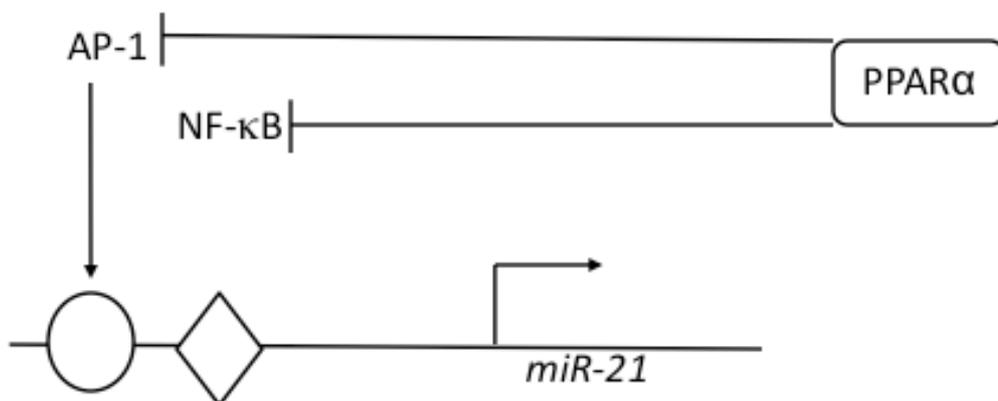
**Figure 29 :** La surexpression et l'activation de PPAR $\alpha$  régulent l'activité transcriptionnelle d'AP-1 et NF- $\kappa$ B. Les cellules 786-O ont été co-transfectées avec un vecteur vide (EV) ou un plasmide codant pour PPAR $\alpha$  et un plasmide rapporteur luciférase AP-1-luc ou  $\kappa$ B-luc puis traitées ou non avec 400 nM de GW7647. L'activité luciférase a été mesurée 48 H post-transfection. \*\*  $p < 0,01$  et \*\*\*  $p < 0,001$ .

Enfin, nous avons voulu vérifier la fixation du facteur AP-1 au niveau du promoteur de miR-21, en utilisant une technique d'immunoprécipitation de la chromatine (ChIP). Nous nous sommes appuyés sur la publication de Du (Du et al. 2009) pour désigner un couple d'amorce qui encadre les sites de fixation à AP-1 décrit par Fujita (Figure 27). L'expérience de ChIP montre que la sous-unité c-Jun d'AP-1 interagit bien avec le promoteur de miR-21. La surexpression de PPAR $\alpha$  conduit à une diminution de 90% de cette fixation (Figure 30).



**Figure 30 :** La surexpression de PPAR $\alpha$  inhibe la fixation de c-Jun sur le promoteur de miR-21. Les cellules 786-O ont été transfectées avec un vecteur vide (EV) ou un plasmide codant pour PPAR $\alpha$ . Les cellules ont été récupérées 24 H post-transfection pour une expérience de ChIP. L'enrichissement a été mesuré par qPCR normalisé par rapport aux IgG contrôle.

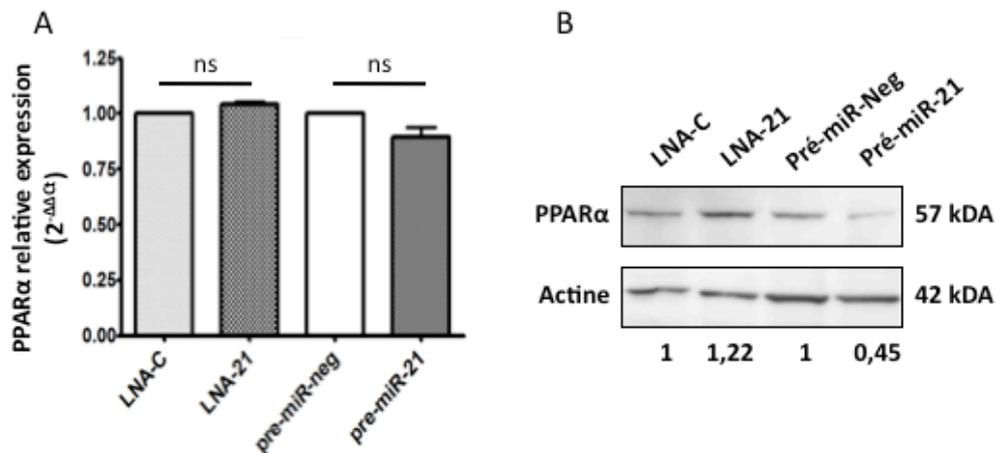
Nous avons donc démontré la première partie de la boucle de régulation : la surexpression de PPAR $\alpha$  conduit à une diminution (i) de l'activité transcriptionnelle contrôlée par AP-1 et NF- $\kappa$ B, (ii) de la fixation d'AP-1 sur ses éléments de réponse présents dans le promoteur de miR-21 et (iii) de l'expression de miR-21 (Figure 31).



**Figure 31 :** Régulation de miR-21 par PPAR $\alpha$

### C Régulation de l'activité de PPAR $\alpha$ par miR-21

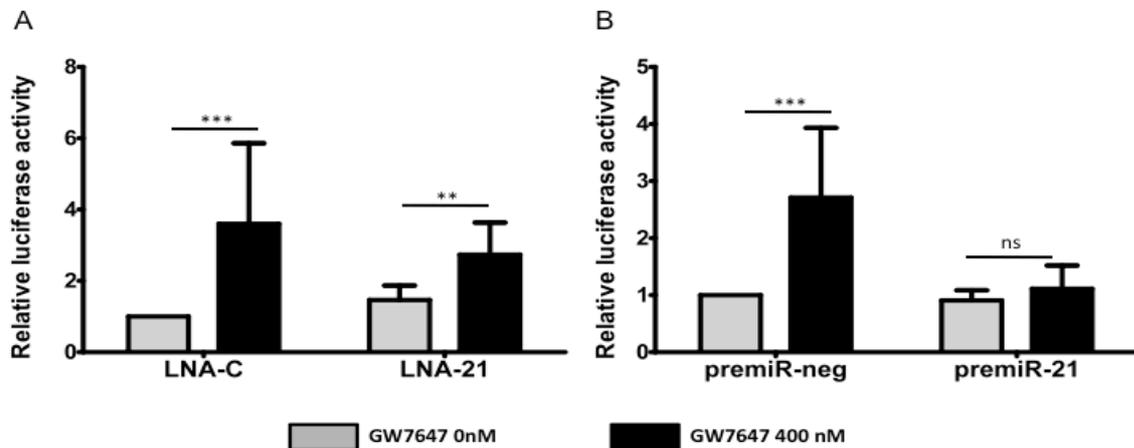
Dans la littérature, il a été montré que miR-21 ciblait PPAR $\alpha$  au niveau de deux sites de fixation présents dans son 3'-UTR. Nous avons voulu voir à quel niveau miR-21 régulait PPAR $\alpha$ . Par qPCR, nous n'observons pas de différence d'expression de PPAR $\alpha$  au niveau ARNm lorsque nous surexprimons ou inhibons miR-21 (Figure 32A). Par contre, nous observons une variation de son expression au niveau protéique, par western blot, lorsque nous modulons l'expression de miR-21. Lorsque nous surexprimons miR-21 par la transfection d'un premiR-21 nous observons une diminution de l'expression de PPAR $\alpha$  par rapport au contrôle et inversement lorsque nous inhibons miR-21 par un LNA-anti-miR-21, nous avons une augmentation de l'expression de PPAR $\alpha$  (Figure 32B).



**Figure 32 :** Impact de miR-21 sur l'expression de PPAR $\alpha$ . Les cellules 786-O ont été transfectées avec 10 nM de pre-miR-21, pre-miR-neg, LNA-C ou LNA-anti-miR-21. Les ARNs totaux et les protéines ont été récupérés 48 H après transfection. Les niveaux d'expression de PPAR $\alpha$  ont été déterminés par qPCR, selon la méthode de comparaison des Ct ( $2^{-\Delta\Delta CT}$ ) avec comme microARN de référence le PPIA (A) et par western blot. Des anticorps contre PPAR $\alpha$  et la  $\beta$ -actine ont été utilisés. (B).

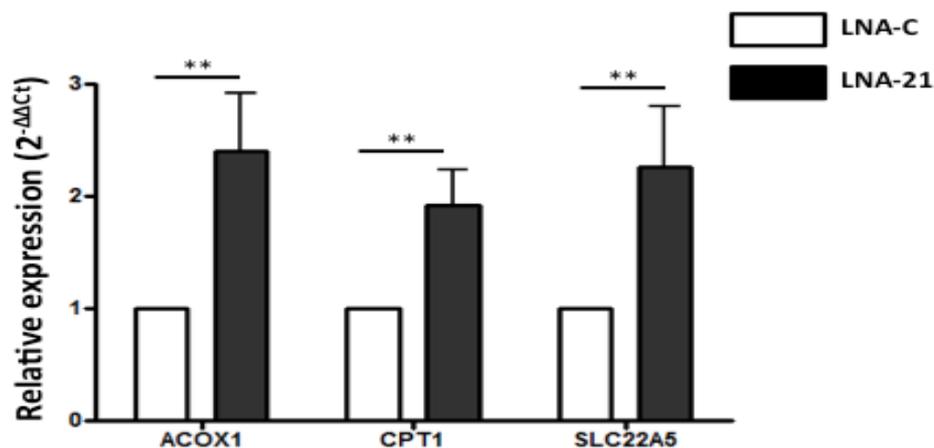
Ensuite, nous avons déterminé l'impact de la surexpression de miR-21 sur la signalisation induite par PPAR $\alpha$ . Dans un premier temps, nous avons utilisé le plasmide J6-PPRE-TK-luc codant pour le gène de la luciférase placé sous le contrôle du promoteur de la thymidine kinase contenant 3 éléments PPRE. Lorsque nous le co-transfectons avec soit du LNA-C ou du LNA-21 et que nous traitons les cellules avec du GW7647, nous observons une augmentation de l'activité luciférase qui est représentative de la transcription des gènes cibles de PPAR $\alpha$  (Figure 33A). Lorsque nous le co-transfectons avec un pre-miR-neg, l'activité luciférase augmente

également après traitement au GW7647. A l'inverse, dans des cellules transfectées avec du pre-miR-21 et traitées au GW7647, nous n'observons pas d'activation transcriptionnelle de PPAR $\alpha$  (Figure 33B).



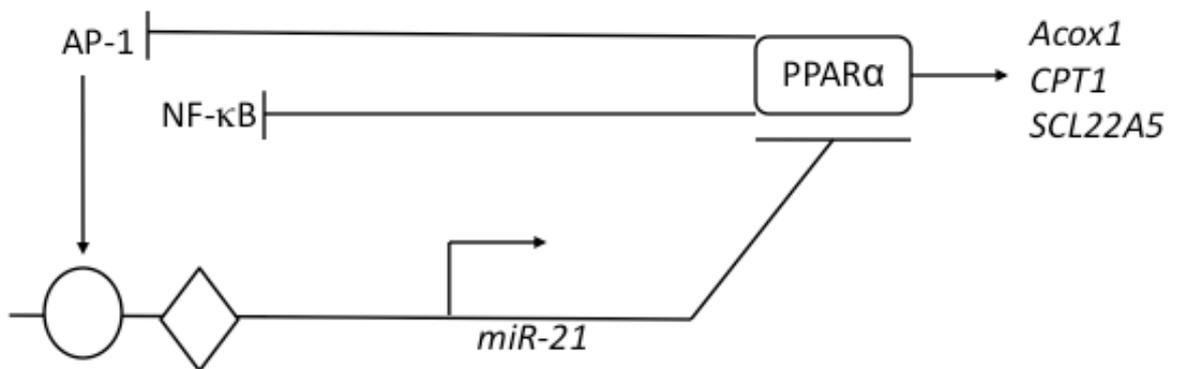
**Figure 33:** La surexpression de miR-21 régule négativement l'activité transcriptionnelle de PPAR $\alpha$ . Les cellules 786-O ont été co-transfectées avec le plasmide J6-PPRE-TK-luc et soit du LNA-C ou du LNA-21 (A) soit du premiR-neg ou du premiR-21 (B). L'activité luciférase a été mesurée 48 H post-transfection. \*\*  $p < 0,01$  et \*\*\*  $p < 0,001$ .

Dans un second temps, afin de vérifier si l'expression de miR-21 pouvait jouer un rôle dans l'activité transcriptionnelle de PPAR $\alpha$ , nous avons évalué l'expression de 3 de ses gènes cibles (ACOX1, CPT-1 et SLC22A5) lorsque nous modulons l'expression miR-21. Dans la lignée 786-O, nous observons une augmentation des ARNm de ces trois gènes cibles lorsque nous inhibons miR-21 par la transfection d'un LNA-21 par rapport aux cellules contrôles (Figure 34). L'inhibition de miR-21 permettrait donc d'augmenter l'expression de PPAR $\alpha$ , qui se traduit par une augmentation de l'expression des ses gènes cibles *via* sa fixation sur leurs éléments de réponse PPRE.



**Figure 34 :** L'inhibition de miR-21 augmente l'expression des gènes cibles de PPAR $\alpha$ . Les cellules 786-O ont été transfectées avec 10nM de LNA-C ou de LNA-anti-miR-21. 48 H post-transfection, l'expression relative d'ACOX1, de CPT-1 et de SLC22A5 est déterminée par qPCR. PPIA est utilisé comme contrôle interne.

Nous avons donc ainsi démontré la seconde partie de la boucle de régulation : la surexpression de miR-21 conduit à une diminution (i) de l'expression protéique de PPAR $\alpha$ , (ii) de l'activité transcriptionnelle de PPAR $\alpha$  et (iii) de l'expression de ses gènes cibles. Le phénomène inverse est observé lorsque miR-21 est inhibé par une stratégie anti-miR-21 (Figure 35).



**Figure 35 :** Régulation de PPAR $\alpha$  par miR-21

# Discussion

## **I miR-21 et cRCC**

Le carcinome rénal à cellules claires (cRCC) est le sous type histologique majeur des carcinomes rénaux (Jonasch et al. 2015). Dans 80% des cas, il est observé une inactivation du gène suppresseur de tumeur von Hippel Lindau (VHL) qui conduit à une activation constitutive de la voie de l'hypoxie, voie majeure de la carcinogénèse rénale. De plus, les cRCC sont les cancers les plus résistants à la chimiothérapie et à la radiothérapie. Le traitement de référence est basé sur la néphrectomie partielle ou totale du rein même en présence de métastases (Allory et al. 2011). A l'heure actuelle, l'absence de biomarqueurs, permettant la détection précoce et le suivi des patients atteints de cRCC, est responsable d'un dépistage tardif et d'un mauvais pronostic. Il est donc nécessaire d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques ainsi que de nouveaux biomarqueurs et signatures moléculaires afin de guider la thérapeutique. En ce sens, les microARNs semblent être de bons candidats. Dans ce projet, nous avons focalisé notre attention sur miR-21 qui est l'un des neuf microARNs le plus exprimé dans les cRCC (Osanto et al. 2012).

Dans la première partie de ce travail, nous avons confirmé la surexpression de miR-21 dans le cRCC. Cette surexpression n'est pas associée aux caractères clinico-pathologiques (âge, sexe, grade, stade) et à la survenue de métastases. Ainsi, l'expression de miR-21 dans les tumeurs primaires est d'un intérêt limité en tant que biomarqueur pronostique. Il pourrait toutefois servir de biomarqueur diagnostique du cRCC par rapport aux autres types de RCC, en association avec d'autres microARN (miR-126, miR-126\* et miR-143) (Powers et al. 2011).

Nous avons également confirmé le rôle de miR-21 en montrant que sa surexpression dans les cellules cancéreuses rénales conduisait à une augmentation de la migration, de l'invasion, de la prolifération et des propriétés anti-apoptotiques. Une stratégie anti-miR-21 conduit à une diminution de ce potentiel oncogénique ce qui pourrait en faire une bonne cible thérapeutique. Son action oncogénique a déjà été démontrée expérimentalement dans divers modèles et notamment en utilisant des stratégies antagomiR, LNA ou des « éponges » à microARN. La diminution de l'expression de miR-21 dans des cellules cancéreuses mammaires MCF7 et MDA-MB-231 a pour conséquence, *in vitro*, une diminution de la prolifération cellulaire et

une augmentation de l'apoptose et, *in vivo*, dans un modèle de xénogreffe chez la souris nude, une diminution de la croissance tumorale et de la formation de métastases pulmonaires (Si et al. 2007 ; Zhu et al. 2007). La diminution de l'expression de miR-21 dans différentes lignées de carcinomes hépatocellulaires provoque une augmentation de l'expression du gène suppresseur de tumeur PTEN, cible directe de miR-21, et une diminution de la prolifération, la migration et l'invasion cellulaire. A l'inverse, l'augmentation de son expression conduit à une augmentation de ces propriétés (Meng et al. 2007). De même, dans des lignées cellulaires et dans des prélèvements tissulaires de cancers colorectaux, il existe une corrélation inverse entre les niveaux d'expression de miR-21 et de sa cible PDCD4, un gène suppresseur de tumeur. Une stratégie anti-miR-21 conduit à une augmentation du niveau protéique de PDCD4 et à une diminution de l'invasion tandis que la surexpression de miR-21 augmente le pouvoir invasif et métastatique de ces cellules (Asangani et al. 2008). L'utilisation de souris transgéniques montre que miR-21 est un acteur clé dans la carcinogenèse pulmonaire en activant la voie de signalisation Ras/MEK/ERK (Hatley 2010). Toutes ces études confortent nos résultats et montrent bien que miR-21 a une activité oncogénique en étant un facteur anti-apoptotique et en augmentant la prolifération, l'invasion et la formation de métastases : des propriétés importantes pour la progression tumorale.

Par ailleurs, nous avons montré que l'inhibition de miR-21 conduit à une sensibilisation des cellules cancéreuses rénales à différentes drogues de chimiothérapie classique (Paclitaxel, 5-FU et Oxaliplatine) mais également à un inhibiteur de RTK, le dovitinib. Dans un essai clinique de phase III, l'efficacité du dovitinib a été montrée équivalente au sorafenib pour le traitement de troisième ligne du cRCC (Motzer et al. 2014). Il semble donc y avoir une corrélation entre l'expression de miR-21 et la chimiorésistance du cRCC. Ces résultats sont cohérents avec des études menées sur d'autres tumeurs solides provenant de différents tissus tels que le sein, le pancréas ou le colon. Dans des cellules cancéreuses mammaires, l'inhibition de miR-21 conduit à une augmentation de la chimiosensibilité au Tamoxifène par une inhibition de la voie PI3K/Akt/mTOR *via* l'inhibition de PTEN (Yu et al. 2016). Dans des cellules cancéreuses pancréatiques résistantes au 5-FU, des niveaux importants de miR-21 sont observés par rapport à des cellules sensibles. Cette résistance est due à l'inhibition des gènes suppresseurs de tumeurs PTEN et PDCD4. Lorsque ces derniers sont re-exprimés, la sensibilité des cellules au 5-FU

est restaurée (Wei et al. 2016). Deux études ont montré que l'inhibition de miR-21 agit en synergie avec le sunitinib dans le glioblastome (Costa et al. 2013) et le cancer du pancréas (Passadourou et al. 2014) mais cette stratégie n'a pas fonctionné *in vitro* dans les cellules cancéreuses rénales. La combinaison d'une chimiothérapie avec une stratégie anti-miR-21 pourrait donc contrer la chimiorésistance du cRCC.

L'inhibition de miR-21, dans différentes lignées cancéreuses rénales, conduit également à une diminution de l'expression des protéines associées aux résistances à de multiples drogues (MRP1-6/ABCC1-6). Il s'agit de transporteurs membranaires participant à l'efflux des xénobiotiques de la cellule. Des études ont montré que l'expression des MRP pouvait conduire à une résistance à de nombreuses drogues (Slot et al. 2011). A l'inverse, l'inhibition de miR-21 aboutit à une augmentation des transporteurs à influx de platine SLC22A1/OCT1, SLC22A2/OCT2 et SLC31A1/CTR1. Ces transporteurs participent à l'entrée dans la cellule des drogues dérivées des sels de platine telle l'oxaliplatine. Dans le carcinome hépatocellulaire, la perte d'expression d'OCT1 est associée à un meilleur pronostic pour les patients traités au sorafenib (Geier et al. 2017). La modulation de l'expression de ces deux types de transporteurs, entraînant alors une accumulation des drogues dans la cellule, pourrait donc être un des mécanismes par lequel miR-21 contribue à la chimiorésistance. miR-21 pourrait inhiber l'expression des transporteurs MRP de façon indirecte *via* l'inhibition de PTEN. En effet, des études ont montré que l'activation de la voie PI3K/Akt/mTOR conduisait à l'expression et à l'activation des transporteurs MRP-2 (Suda et al. 2016 ; Shen et al. 2012). L'activation des transporteurs à influx de platine par miR-21 pourrait se faire de la même façon.

La chimiorésistance peut également être due à l'existence de cellules souches cancéreuses (CSC). Il s'agit d'une sous population de cellules aux caractéristiques proches des cellules souches normales. Elles sont capables de s'autorenouveler, de proliférer et de se différencier afin de maintenir la tumeur. Ces cellules sont résistantes aux chimio et radiothérapies et sont donc responsables des récives après traitement (Islam et al. 2015). Une étude a montré une surexpression de miR-21 dans les sous population de CSC qui conduit à leur autorenewement et à leur maintien (Chung et al. 2013). Dans le cancer colorectal, une inhibition de l'expression miR-21 conduit à une différenciation des cellules souches cancéreuses

ce qui aboutit à une augmentation de leur chimiosensibilité (Yu et al. 2013). Dans le cancer pulmonaire, la surexpression de miR-21 dans les CSC est responsable de leur radorésistance, une stratégie anti-miR-21 conduit à une sensibilisation à la radiothérapie (Zhang et al. 2015).

Le processus de TEM est un processus embryonnaire qui permet une transdifférenciation cellulaire. Elle permet d'engendrer des cellules mésenchymateuses à partir de cellules épithéliales. La TEM est réactivée au cours de la progression tumorale et va permettre aux cellules cancéreuses d'acquérir les propriétés des cellules souches : elle est donc responsable de la chimiorésistance (Pradella et al. 2017). La surexpression de miR-21 est associée avec la TEM dans de nombreux cancers dont le cRCC (Cao et al. 2016)

En conclusion, miR-21, en tant que « masteroncomiR », influe de manière importante sur la tumorigenèse rénale de différentes manières (croissance tumorale, différenciation, apoptose, métastase et chimiorésistance). L'implication de miR-21 dans la résistance aux chimiothérapies classiques et aux thérapies ciblées montre l'intérêt d'une stratégie anti-miR-21 en application clinique. Une étude récente a fait émerger une nouvelle approche thérapeutique avec la délivrance en simultanée d'un anti-miR-21 et d'une pro-drogue dans une nanoparticule. Ces deux composés agissent alors en synergie pour améliorer l'efficacité anticancéreuse (Rui et al. 2016). Dans le cRCC, l'inhibition de miR-21 est une stratégie prometteuse afin d'offrir un panel de chimiothérapies plus large aux cliniciens.

## **II miR-21 et PPAR $\alpha$**

Dans la seconde partie de ce travail, nous nous sommes intéressés à une des cibles connues de miR-21 : le récepteur nucléaire PPAR $\alpha$  décrit dans la fibrose rénale comme ayant un effet néoprotecteur. En effet, dans un modèle murin d'obstruction urétérale unilatérale (OUU) et dans des tissus humains, une surexpression de miR-21 est détectée dans le rein fibrosé et est associée à une diminution de l'expression de PPAR $\alpha$  (Glowacki et al. 2013, Gomez et al. 2015). Lorsque l'OUU est réalisée dans des souris miR-21<sup>-/-</sup> ou surexprimant PPAR $\alpha$ , les lésions de fibrose sont retardées et moins sévères. Chez des souris déficientes en PPAR $\alpha$ , les effets anti-fibrotiques de l'anti-miR-21 ne sont plus observés (Chau et al. 2012). Une étude publiée en juillet 2013 dans le journal *Nature* sur plus de 400 tumeurs de cRCC (Cancer Genome Atlas Research Network, 2013) confirme miR-21 comme facteur de mauvais pronostic et met en évidence pour la première fois l'existence d'un «shift» métabolique, qui se traduit notamment par une augmentation de la production des acides gras nécessaires pour la prolifération accrue des cellules cancéreuses rénales.

Nous avons montré, pour la première fois, dans une cohorte de 60 patients, une corrélation entre la surexpression de miR-21 et une perte d'expression de PPAR $\alpha$  au niveau protéique et au niveau ARNm dans les cRCC de haut grade et de haut stade.

Dans la littérature, il est décrit, d'une part, que PPAR $\alpha$  joue un rôle transpresseur sur les voies de signalisation contrôlées par AP-1, NF- $\kappa$ B, STAT3 et HIF-1 (Pawlak et al. 2015). D'autre part, le clonage et l'analyse du promoteur de miR-21 montrent des sites de fixation potentiels pour ces mêmes facteurs de transcription (Fujita et al. 2007). Il semblerait donc exister une boucle de régulation négative entre miR-21 et PPAR $\alpha$ .

Nos résultats préliminaires confirment ceux obtenus précédemment dans les cellules endothéliales où il a été montré que l'activation de PPAR $\alpha$  inhibe l'activité du facteur de transcription AP-1 (Zhou et al. 2011). De plus, nous montrons que la surexpression de PPAR $\alpha$  bloque la liaison d'AP-1 sur le promoteur de miR-21 ce qui conduit à une diminution de son expression. Ce blocage serait dû à une interaction

entre PPAR $\alpha$  et c-Jun et il en serait de même avec le facteur de transcription NF- $\kappa$ B (Pawlak et al. 2015). L'ensemble de ces travaux démontre l'existence de la première partie de la boucle de régulation : PPAR $\alpha$  régule négativement l'expression de miR-21. A l'inverse, dans la deuxième partie de la boucle, nous montrons que la surexpression de miR-21 conduit à une diminution de l'expression de PPAR $\alpha$  au niveau protéique, qui se traduit par une absence de l'activation de ses gènes cibles. A contrario, un traitement avec un LNA-anti-miR-21 augmente l'expression de PPAR $\alpha$  ainsi que l'expression de ses gènes cibles : ACOX1, CPT1 et SLC22A5.

En conclusion, nos travaux suggèrent que miR-21 et PPAR $\alpha$  pourraient être de nouvelles cibles thérapeutiques grâce à l'utilisation d'une stratégie anti-miR-21 ou « PPAR $\alpha$  Target Protector » afin de (i) de diminuer la croissance tumorale, (ii) d'augmenter le catabolisme des lipides et, (iii) de restaurer la chimiosensibilité aux drogues classiques ainsi qu'aux thérapies ciblées.

# Perspectives

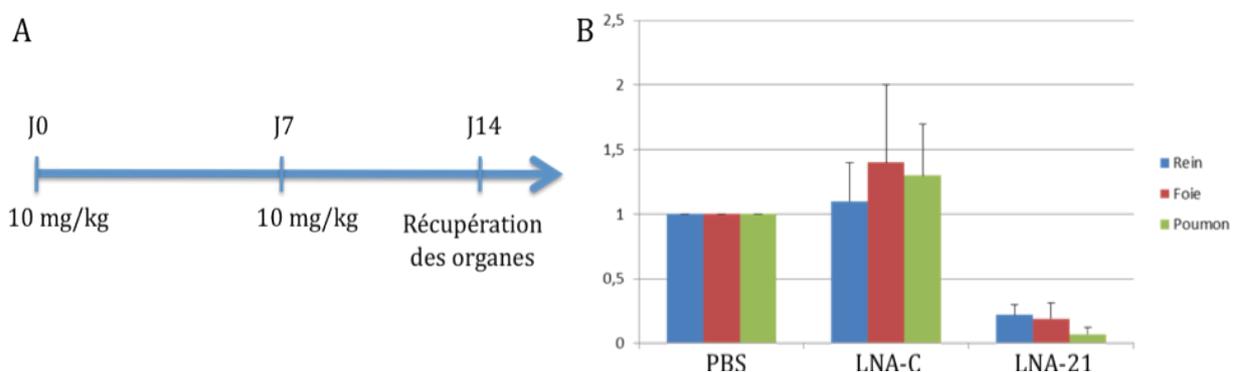
## I miR-21 et cRCC

MiR-21 semble être une cible thérapeutique intéressante. En effet, son inhibition conduit, d'une part, à inhiber les propriétés des cellules cancéreuses rénales et d'autre part, à restaurer leur chimio-sensibilité vis à vis de drogues classiques et de thérapies ciblées. Pour valider cette hypothèse dans le cadre du cRCC, nous réaliserons des études *in vivo* en effectuant des xénogreffes en sous cutanée ou sous la capsule rénale de cellules de cRCC surexprimant ou non miR-21 chez la souris nude. Nous utiliserons une stratégie LNA anti-miR-21. Nos premiers résultats montrent que le LNA-21 diffuse dans au moins trois tissus et permet une diminution de l'expression de 5 à 10 fois du miR-21 endogène (Figure 36).

En parallèle, nous évaluerons les effets secondaires du LNA-21 car miR-21 possède de nombreuses cibles, présente une expression ubiquitaire et participe à de nombreux processus physiopathologiques tels que la protection au stress oxydatif des cardiomyocytes (Cheng et al., 2009). Une stratégie « Target protector » sur un gène cible ayant un rôle central dans la cancérogenèse rénale pourra alors être utilisée afin de contrer ses effets secondaires.

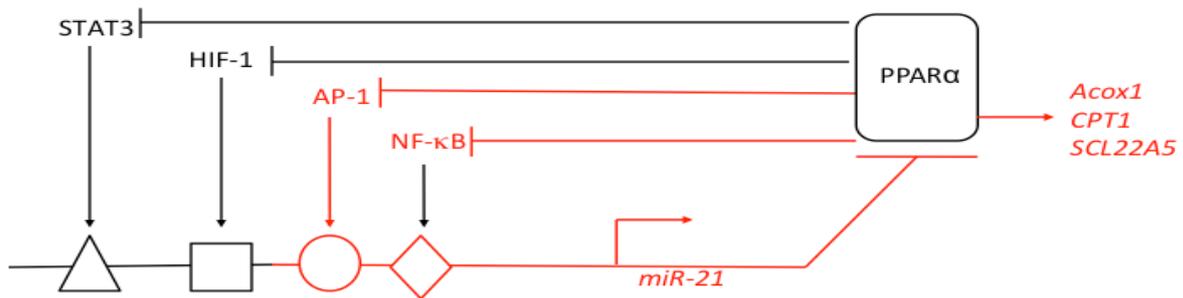
Dans les deux cas, nous évaluerons l'effet de la stratégie anti-miR-21 et de la stratégie « Target protector » sur la croissance tumorale mais également sur la chimiorésistance en traitant ou non les souris avec différentes classes de drogues.

Pour la première fois *in vivo*, nous montrerons ou non l'intérêt d'utiliser la stratégie antagomiR du point de vue thérapeutique dans le cRCC.



**Figure 36 : Inhibition de l'expression du miR-21 endogène dans le rein, le foie et le poumon après injection de LNA-21 chez la souris nude.** Des souris C57BL6 ( $n=3$  pour chaque condition) ont subi deux injections intra-péritonéales de PBS, d'antimir contrôle ou d'antimir ciblant miR-21 à raison de 10 mg/kg (A). A J14, le foie, le rein et les poumons ont été récupérés et l'expression de miR-21 dans ces organes a été déterminée par qPCR (B).

## miR-21 et PPAR $\alpha$



**Figure 37 :** Boucle de régulation négative entre miR-21 et PPAR $\alpha$ . En rouge, la partie validée durant mes travaux de thèse et en noir la partie à confirmer

Dans la deuxième partie de ma thèse, je me suis donc intéressée à l'existence d'une potentielle boucle de régulation entre miR-21 et PPAR $\alpha$ . Une partie de cette boucle a été confirmée (Figure 37) :

- la surexpression de PPAR $\alpha$  conduit à une diminution de l'expression de miR-21 *via* une diminution de l'activité des facteurs AP-1 et NF- $\kappa$ B. La surexpression de PPAR $\alpha$  diminue la fixation d'AP-1 sur ses éléments de réponse présents sur le promoteur de miR-21.

- la modulation de l'expression de miR-21 agit de façon inverse sur l'expression de PPAR $\alpha$  au niveau protéique, sur son activité transcriptionnelle et sur l'expression de ces gènes cibles.

L'analyse du promoteur de miR-21 montre l'existence de sites potentiels de fixation également pour HIF-1 et STAT3 qui sont également réprimés par PPAR $\alpha$ . Tout d'abord, nous déterminerons si la surexpression de PPAR $\alpha$  diminue la fixation des facteurs AP-1, NF- $\kappa$ B, STAT3 et HIF-1 sur le promoteur de miR-21. En parallèle, afin d'expliquer la diminution de cette fixation, nous mettrons en évidence l'interaction protéine-protéine entre PPAR $\alpha$  et ces 4 facteurs de transcription.

Ainsi, nous aurons finalisé la caractérisation de la boucle de régulation négative entre miR-21 et PPAR $\alpha$ . Comme la caractéristique du cRCC est l'accumulation de gouttelettes lipidiques dans son cytoplasme et que PPAR $\alpha$  est impliqué dans le catabolisme de ces lipides, la restauration de l'expression de PPAR $\alpha$  devrait contrer le « shift » métabolique observé dans le cRCC en empêchant l'accumulation de ces lipides, en favorisant la  $\beta$ -oxydation et en activant la respiration cellulaire.

Nous déterminerons donc l'intérêt clinique ou non de cibler PPAR $\alpha$  par une stratégie « Target protector ». D'une part, *in vitro*, la restauration de l'expression de PPAR $\alpha$  et son activation ont-ils des effets similaires à l'inhibition de l'expression de miR-21 sur les propriétés des cellules cancéreuses rénales (prolifération, migration, invasion, chimiorésistance) ? D'autre part, *in vivo*, cette stratégie « PPAR $\alpha$  target protector » diminue-t-elle la croissance tumorale de cellules cancéreuses rénales xénogreffes dans la souris nude et améliore-t-elle le traitement par des drogues diverses ?

En conclusion, les résultats attendus sont :

- sur le plan fondamental, de mieux comprendre le rôle de miR-21 et de PPAR $\alpha$  dans la cancérogenèse rénale et de valider *in vitro* et *in vivo* si la diminution de l'expression de miR-21 par une stratégie LNA-anti-miR-21 et/ou le maintien de l'expression de PPAR $\alpha$  par une stratégie «Target protector » permet de diminuer la croissance tumorale et de restaurer la chimiosensibilité aux drogues classiques ainsi qu'aux thérapies ciblées.

- sur le plan clinique, d'identifier miR-21 et de PPAR $\alpha$  comme de nouvelles cibles thérapeutiques pour ainsi fournir aux cliniciens de nouveaux outils pour potentialiser les effets des chimiothérapies et d'élargir les différentes lignes de traitement.

# Appendice technique

## **I Culture cellulaire**

### **A** **Lignées cellulaires**

#### **a) ACHN**

La lignée cellulaire humaine ACHN est issue d'une effusion pleurale maligne d'un patient mâle de type caucasien âgé de 22 ans présentant un adénocarcinome rénal métastatique. Il s'agit de cellules adhérentes présentant une morphologie épithéliale et ne portant pas de mutation pour *VHL*. Ces cellules proviennent de l'ATCC.

#### **b) 786-O**

La lignée cellulaire humaine 786-O est dérivée de la tumeur primaire d'un patient mâle de type caucasien âgé de 58 ans souffrant d'un adénocarcinome rénal à cellules claires. Il s'agit de cellules adhérentes présentant une morphologie épithéliale et portant une mutation pour *VHL*. Ces cellules proviennent de l'ATCC.

#### **c) RCC10/RCC4**

Les lignées cellulaires humaines RCC10 et RCC4 ont été obtenues auprès du Dr David Bernard (Centre Léon Bérard, Lyon). Il s'agit de lignées de carcinomes rénaux à cellules claires mutées pour *VHL*.

#### **d) HK-2**

La lignée HK-2 (human kidney 2) est dérivée d'un rein normal d'un adulte mâle. Il s'agit de cellules épithéliales du tube proximal qui ont été immortalisées par la transduction des gènes E6/E7 du papilloma virus humain 16 (HPV-16). Ces cellules proviennent de l'ATCC.

### **B** **Conditions de culture**

Les lignées cellulaires sont cultivées dans des flacons de culture sous hotte à flux laminaire en conditions stériles et ensuite incubées dans une étuve à 37°C en atmosphère humidifiée à 5% de CO<sub>2</sub> et 95% d'air. Les milieux de culture utilisés sont décrits dans le tableau 6.

L'appréciation de la confluence était réalisée par contrôle visuel au microscope inversé. Une fois celle-ci atteinte, une division des cellules est effectuée.

Pour cela, le milieu de culture est aspiré et le tapis cellulaire lavé au PBS 1X afin de retirer les résidus de milieu éventuels. Les cellules sont ensuite détachées par incubation de 5 min à 37°C avec une solution de trypsine EDTA 1X. Le tapis cellulaire décollé est ensuite récupéré avec 5 mL de milieu et transféré dans un tube pour y être centrifugé 5 min à 1 500 tour/min à température ambiante. Après aspiration du surnageant, le culot est solubilisé dans du milieu de culture et 10 µl est prélevé pour effectuer un comptage en cellule de Malassez.

**Tableau 6 : Lignées cellulaires et milieu de culture**

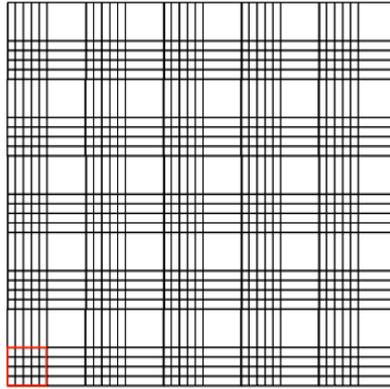
Lignées cellulaires	Composition des milieux
ACHN	Milieu MEM + 10% de SVF + 0,1% d'une solution d'acides aminés non essentiels (100X) + 1% de Pyruvate de Sodium 100mM + 1% de L- glutamine 200mM + 1% de Pénicilline/Streptomycine
786-O	Milieu DMEM glucose 4,5g/L + 10% de SVF + 1% de L- glutamine 200mM + 1% de Pénicilline/Streptomycine
RCC10/RCC4	Milieu RPMI 1640 + 10% de SVF + 1% de L- glutamine 200mM + 1% de Pénicilline/Streptomycine
HK-2	Milieu Keratinocyte-SFM + 0,05mg/mL de facteur de croissance épidermique (EGF) recombinant humain +5ng/mL d'extrait pituitaire bovin (BPE)

### **C Comptage en cellule de Malassez**

Pour effectuer le comptage cellulaire nous utilisons une cellule de Malassez. Il s'agit d'une lame en verre comprenant un quadrillage spécifique comprenant 25 rectangles contenant eux-mêmes 20 petits carrés (Figure 36). Nous disposons entre cette cellule et une lamelle, un mélange comprenant à volume équivalent de notre solution cellulaire et du bleu trypan qui permettra de distinguer les cellules mortes des cellules vivantes. Sous microscope inversé, nous comptons le nombre de cellules présentes dans chaque rectangle et nous appliquons la formule suivante afin d'obtenir le nombre de cellules par millilitre :

**$N = n.F / a.v$  avec :**

- N = nombre de cellules /mL
- n = nombre de cellules comptées
- F = Facteur de dilution (2 dans notre cas)
- a = nombre de carreaux comptés
- v = volume d'un carreau (0,01 µl dans notre cas soit 0,01.10<sup>-2</sup> mL)



**Figure 38 : Schéma d'une cellule de Malassez**

## **II Cohorte de patients**

Nous avons à notre disposition une série de 99 tumeurs primaires, issues de patients atteints de cRCC, avec le tissu sain associé (n=66) ou non (n=33) qui ont été recueillies après chirurgie et stockées dans la banque de collecte de tumeurs et de tissus du département de pathologie du CHRU de Lille. Un formulaire de consentement écrit a été obtenu de chaque patient et l'étude a été approuvée par le comité scientifique de la Tumorothèque du CHRU de Lille" (approbation n ° CSTMT078).

## **III Biologie cellulaire**

### ***A Transfection des oligonucléotides***

Les lyophilisats de 5 nM de premiARN hsa-miR-21-5p et premiARN Négative Contrôle#2 (Ambion) sont repris par 100 µl d'eau Nuclease-free fournie afin d'obtenir une solution stock à 50 µM aliqualitée en tubes de 20 µl, afin d'éviter les cycles de congélation décongélation qui pourraient dégrader l'oligonucléotide conservés à -20°C. Lors de l'utilisation de ce réactif, nous ajoutons un volume de 80 µl d'eau Nuclease-free de sorte à obtenir une concentration finale de 10 µM correspondant à 10 pmol/µL.

Le miRCURY LNA inhibiteur ciblant hsa-miR-21-5p et le miRCURY LNA inhibiteur contrôle (Exiqon) sont également présentés sous forme lyophilisée à 5 nM et sont repris de la même manière que les premiARNs afin d'obtenir un concentration finale de 10 µM lors de l'utilisation.

La manipulation est effectuée sous PSM en conditions stériles. Les volumes décrits correspondent à l'utilisation de plaques à 6 puits. Lorsque nous travaillons dans un autre format le protocole est adapté (Tableau 7). Nous utilisons un protocole de transfection soit dite « reverse » c'est à dire que les cellules sontensemencées et transfectées simultanément soit dite « forward », la transfection se fait lorsque nous sommes à 50% de confluence cellulaire. Les cellules sontensemencées à une concentration de 250 000 cellules/mL.

Dans un tube, un volume de 7,5 µL d'agent de transfection Lipofectamine®. RNAiMAX (Invitrogen) est dilué dans 242,5 µL de milieu Opti-MEM® (Life Technologies) tandis que dans un autre tube un volume de 5 µL d'oligonucléotide est dilué dans 245 µL de milieu Opti-MEM®. Après une incubation de 5 min à température ambiante, nous mélangeons ces deux réactifs que nous incubons de nouveau 30 min à température ambiante afin que les complexes ARN/agent de transfection puissent se former. Le mélange final, avec une concentration d'oligonucléotide de 10 nM, est alors ajouté sur les cellules ainsi que 2 mL de milieu de culture sans antibiotiques.

**Tableau 7 : Protocole de transfection des oligonucléotides**

Format de culture	Volume final de culture	Volume final de dilution des réactifs	Volume d'oligonucléotide	Volume de Lipofectamine®-RNAiMAX
96 puits	100 µL	2 X 10 µL	0,1 µL	0,3 µL
24 puits	500 µL	2 x 50 µL	1 µL	1,5 µL
6 puits	2,5 mL	2 x 250 µL	5 µL	7,5 µL
T25	5 mL	2 x 500 µL	10 µL	15 µL

## **B Transfection des plasmides**

Les plasmides J6-PPRE-TK-Luc, pSG5-PPARα et pSG5-Neg (don du Pr B. Staels, INSERM U 1011, Institut Pasteur de Lille, France) sont obtenus par maxipréparation après transformation dans les bactéries compétentes *E.Coli*. Pour cela, nous incubons 1 µL de plasmide avec 49 µL de bactéries 30min sur glace, ensuite nous effectuons un choc thermique à 42°C durant 45s et finalement nous laissons reposer 2min sur glace. Le mélange de bactérie est rincubé dans 450 µL de milieu S.O.C (ThermoFisher Scientific) 2 heures sous agitation à 37°C pour ensuite être étalé sur des boîtes de pétri contenant du milieu LB avec de l'ampicilline à 0,1 µL/mL puis incubé sur la nuit dans une étuve à 37°C. Les clones isolés obtenus sont ensuite mis en culture dans 300 mL de milieu LB avec de l'ampicilline à 0,1 µL/mL

sur la nuit à 37°C permettant la préparation en grande quantité des différents plasmides à l'aide du kit NucleoBond® Xtra Maxi Plus EF (Macherey-Nagel). La quantité de plasmide obtenue est déterminée par spectrophotométrie à la longueur d'onde de 260 nm (Nanodrop® ND-1000 Spectrophotometer, Thermo Scientific). Les souches bactériennes des clones sont conservées à -80°C dans 2 ml de glycérol stérile.

Les expériences de transfection sont effectuées sous PSM en conditions stériles. Les volumes décrits correspondent à l'utilisation de plaques à 6 puits. Lorsque nous travaillons dans un autre format le protocole est adapté (Tableau 8). Comme pour la transfection des oligonucléotides nous utilisons un protocole de transfection soit « reverse » soit « forward » avec une concentration à 250 000 cellules/mL et 1 µg de plasmide.

Dans un tube, un volume de 2,5 µL de PLUS® Reagent (Invitrogen) est mélangé avec 1 µg de plasmide dans 490 µL de milieu Opti-MEM® (Life Technologies) et incubé 5 min à température ambiante. Nous ajoutons ensuite 7,5 µL d'agent de transfection Lipofectamine® LTX Reagent (Invitrogen) et incubons de nouveau 30 min à température ambiante afin que les complexes plasmide/agent de transfection puissent se former. Le mélange final alors ajouté sur les cellules ainsi que 2 mL de milieu de culture sans antibiotiques.

**Tableau 8 : Protocole de transfection des plasmides**

Format de culture	Volume final de culture	Volume final de dilution des réactifs	Quantité de plasmide	Volume de PLUS® Reagent	Volume de Lipofectamine® LTX Reagent
96 puits	100 µL	20 µL	0,1 µg	0,1 µL	0,3 µL
24 puits	500 µL	100 µL	0,5 µg	2 µL	1,5 µL
6 puits	2,5 mL	500 µL	1 µg	2,5 µL	7,5 µL
T25	5 mL	1500 µL	5 µg	5 µL	15 µL

### **C Test de migration et d'invasion**

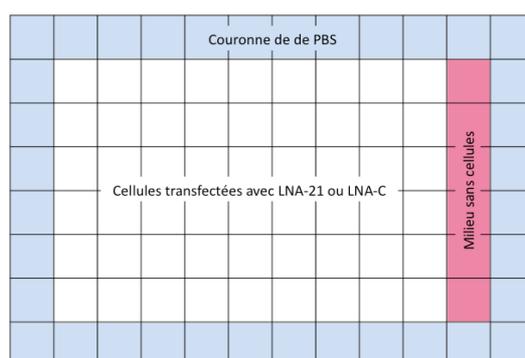
Pour tester à la fois le pouvoir invasif et migratoire des cellules tumorales, nous utilisons respectivement une chambre de Boyden® recouverte ou non de Matrigel™ mimant une lame basale (BD BioCoat Control Insert et BD BioCoat Matrigel™ Invasion Chamber, BD Bioscience). 50 000 cellules, ayant subi une transfection reverse, sontensemencées dans le haut de l'insert dans un milieu

déplété en SVF, tandis que du milieu avec 10% de SVF est placé dans le puits du dessous. Les cellules sont incubées pendant 24h à l'étuve à 37°C sous 5% CO<sub>2</sub>.

Les cellules se déplacent du haut vers le bas par chimioattractisme soit à travers les pores pour la migration soit à travers le Matrigel™ et les pores pour l'invasion, elles se retrouvent sur la face inférieure de la chambre. Après 24 heures, les cellules n'ayant pas migré ou n'ayant pas digéré le Matrigel™ sont retirées à l'aide de cotons-tiges. Ensuite, les cellules migrantes ou invasives sont fixées 5 minutes dans une solution commerciale de méthanol (kit Diff-Quick, Medion Diagnostics) puis rincées 3 fois dans du PBS 1X. Les membranes sont découpées puis colorées et montées sur une lame de verre avec le liquide de montage Vectashiel® HardSet Mounting Medium (Vector Laboratories) contenant du 4',6'-diamidino-2-phénylindole (DAPI) permettant le marquage des noyaux cellulaires. Les cellules ayant traversées la membrane sont dénombrées en microscopie à fluorescence afin de déterminer le pouvoir migratoire ou invasif.

#### **D Test de chimiorésistance**

Notre objectif est de déterminer les IC<sub>50</sub> de différentes drogues pour les cellules exprimant plus ou moins miR-21 afin d'établir un éventuel rôle de celui-ci dans la chimiorésistance des cellules cancéreuses. L'IC<sub>50</sub> est la concentration inhibitrice à 50%, c'est-à-dire qu'il s'agit de la quantité nécessaire de drogues pour tuer 50% des cellules.



**Figure 39 : Plan de plaque 96 puits pour détermination des IC<sub>50</sub>**

Dans une plaque 96 puits, à J0, 5000 cellules ayant été transfectées avec le LNA inhibiteur de miR-21 ou le LNA contrôle sontensemencées dans les puits centraux. Les puits périphériques contiennent 200 µL de PBS afin d'éviter l'évaporation du milieu alors que l'avant dernière colonne contient du milieu sans

cellules nous permettant ainsi de déterminer l'absorbance intrinsèque du milieu servant de blanc (Figure 37).

A J1, le milieu est aspiré et remplacé par du milieu contenant des concentrations croissantes de différentes drogues anticancéreuses : Paclitaxel, Oxaliplatine, 5-FU, Dovitinib, Sunitinib (Euromedex).

Pour mesurer la viabilité cellulaire, nous utilisons le kit Promega «Celltiter96® Aqueous Non Radioactive Cell Proliferation Assay ». Il s'agit d'une méthode colorimétrique basée sur l'utilisation d'un sel de tetrazolium (MTS) qui est métabolisé sous forme de formazan par les cellules vivantes. La quantité de formazan formé est mesurée par spectrophotométrie à une longueur d'ondes de 490 nm et est proportionnelle au nombre de cellules vivantes dans le milieu.

A J4, après 72 heures d'exposition à la drogue, le test MTS est effectué ; les cellules sont traitées avec 20 µL de MTS puis incubées 1 heure à 37°C. La lecture de l'absorbance est effectuée sur un lecteur de microplaques VersaMax (Molecular Device) et les résultats sont analysés grâce au logiciel Shortcut to SoftMax® Pro 4.7.1 qui permet de déterminer les IC50.

## **IV Biologie moléculaire**

### ***A Isolation des ARN totaux***

#### ***a) A partir de culture cellulaire ou de tissus congelés***

L'extraction des ARNs totaux à partir de culture cellulaire ou de copeaux de 3 x 30 µm de tissus de patients congelés se fait à l'aide du kit miRNeasy® Mini (Qiagen) qui permet de récupérer une fraction d'ARN totaux comprenant les ARN de petite taille et donc les miARN. Le principe repose sur l'utilisation d'une solution monophasique de phénol/guanidine qui permet une lyse des cellules tout en inhibant les RNases et en éliminant une majeure partie de l'ADN cellulaire et des protéines grâce à une extraction organique utilisant le chloroforme. La fraction d'ARN totaux récupérée est ensuite purifiée sur une colonne de silice et éluée dans 30 µl d'eau RNase free.

### *b) A partir de tissus inclus en paraffine*

L'extraction des ARNs totaux à partir de copeaux de 3 x 30 µm de tissus de patients inclus dans la paraffine se fait à l'aide du kit RecoverAll™ Total Nucleic Acid Isolation (Ambion). La fraction d'ARN totaux récupérée est purifiée sur une colonne de silice et éluée dans 30 µl d'eau RNase *free*.

### *c) Dosage des ARNs totaux*

La quantité des ARN est déterminée par spectrométrie à la longueur d'onde de 260 nm (Nanodrop® ND-1000 Spectrophotometer, Thermo Scientific). La pureté est vérifiée par le calcul des rapports A260 nm/A280 nm et A260 nm/A230 nm. Pour une qualité optimale, ces ratios doivent être compris entre 1,8 et 2. Les échantillons sont ensuite conservés à - 80°C jusqu'à utilisation.

## **B RT-qPCR**

### *a) Retrotranscription des ARNs classiques*

La synthèse d'ADNc est obtenue en utilisant le kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems™). Pour cela, nous diluons dans un microtube 1 µg d'ARN totaux dans 10 µl d'eau RNase *free*. En parallèle, nous préparons un mélange réactionnel comprenant (volume donné pour une réaction) :

- 2 µL de 10X RT Buffer
- 0,8 µL de 25X dNTP Mix (100mM)
- 2 µL de 10X RT Random primer
- 1 µL de Multiscribe™ Reverse Transcriptase
- 4,2 µL d'eau Nuclease *free*

Nous ajoutons 10 µl de ce mélange aux 10 µl d'ARN totaux, après centrifugation et incubation 5min sur glace, les microtubes sont mis dans un thermocycleur MJ Mini™ Personal Thermal Cycler (Bio-Rad) pour subir le programme suivant :

- 25 °C : 10min
- 37°C : 120min
- 85°C : 5min
- 4°C : ∞

Les ADNc ainsi synthétisés sont ensuite conservés à -20°C.

## *b) Retrotranscription des microARNs*

La synthèse d'ADNc est obtenue en utilisant le kit TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription (Applied Biosystems™). Cette technologie repose sur l'utilisation d'amorce de transcription inverse spécifique du microARN à retrotranscrire qui permet d'ajouter une boucle au niveau de l'extrémité 3' du microARN mature. Pour cela, nous préparons au préalable des dilutions intermédiaire d'ARN totaux à 5 ng/μL. Cette concentration peut être adaptée en fonction de la quantité de microARN présente dans les échantillons à analyser, si il s'agit d'un microARN peu exprimé il faudra partir d'une concentration de départ plus importante pour réussir à détecter un signal. En parallèle, nous préparons un mélange réactionnel comprenant (volume donné pour une réaction) :

- 0,15 μL de dNTP à 100 mM
- 1 μL de Multiscribe™ Reverse Transcriptase
- 1,5 μL de Reverse Transcription Buffer 10X
- 0,19 μL de RNase Inhibitor
- 5,16 μL d'eau Nuclease free

A ce mélange, nous ajoutons 3 μL de primer spécifique au microARN d'intérêt et 3 μL de primer spécifique au petit ARN servant de contrôle interne et nous finissons par 1 μL de l'échantillon d'ARN totaux dilué à 5 ng/μL. Après centrifugation et incubation 5min sur glace, les microtubes sont mis dans un thermocycleur MJ Mini™ Personal Thermal Cycler (Bio-Rad) pour subir le programme suivant :

- 16 °C : 30min
- 42°C : 30min
- 85°C : 5min
- 4°C : ∞

Les ADNc ainsi synthétisés sont ensuite conservés à -20°C.

## *c) qPCR des ARNs classiques*

L'amplification de l'ADNc par qPCR se fait avec des sondes spécifiques (Tableau 9) utilisant la technologie TaqMan® (Applied Biosystems™). Il s'agit d'une sonde portant à son extrémité 5' un fluorophore (FAM™: 6-carboxyfluorescéine) et à son extrémité 3' un quencher non fluorescent. Le principe repose sur l'activité exonucléase 5'-3' de la Taq polymérase. Lorsque le quencher est à proximité du fluorophore, la fluorescence émise lors de l'excitation par la source de lumière du

thermocycleur sera inhibée. Après hybridation de la sonde sur le brin d'ADNc, le quencher sera clivée au cours de l'élongation par la Taq polymérase permettant ainsi une émission de fluorescence qui augmentera au fur et à mesure des cycles jusqu'à atteindre le signal seuil (Ct : Cycle threshold).

Pour réaliser cette qPCR, nous utilisons le TaqMan® Gene Expression Master Mix (Applied Biosystem) contenant tout les composés nécessaires (de l'ADN polymérase AmpliTaq Gold®, UP (Ultra Pure) ; de l'uracile ADN glycosylase (UDG) ; du mélange de dNTP comprenant des dUTP ; et la référence interne basée sur le colorant ROX™ exclusif). Nous préparons, pour chaque gène, un mélange réactionnel composé, pour une réaction, de 10 µl de MasterMix, de 1 µl de sonde TaqMan® et de 8 µl d'eau RNase free. Sur une plaque 96 puits, nous déposons en duplicate 19 µl de mélange réactionnel contenant la sonde spécifique à notre gène d'intéret et 19 µl de celui contenant la sonde spécifique au gène de référence et 1 µl d'ADNc. Pour le profil d'expression de PPARα (peroxisome proliferator-activated receptor alpha), nous utilisons le gène de ménage PPIA (peptidylprolyl isomerase A (cyclophilin A)) comme contrôle interne. Après centrifugation, la plaque est placée dans un thermocycleur couplé à un système d'optique (C1000 Biorad™ PCR System (Bio-Rad)) programmé de la façon suivante :

- 50°C : 2min
- 95°C : 10min
- 95°C : 15s
- 60°C : 60s } X40
- 4°C : ∞

**Tableau 9 : Listes des sondes TaqMan utilisées pour la qPCR « classique »**

Gènes	Référence	Gènes	Référence
ABCC1	hs01561502_m1	SLC22A2	hs01010723_m1
ABCC2	hs00166123_m1	SLC31A1	Hs00977268_g1
ABCC3	hs00978473_m1	PPARα	hs00947536_m1
ABCC4	hs00988717_m1	ACOX1	hs01074241_m1
ABCC5	hs00981087_m1	CPT1	hs00912671_m1
ABCC6	hs00184566_m1	SCL22A5	hs000929869_m1
SLC22A1	hs00427552_m1	PPIA	hs04194521_s1

Les niveaux d'expression relative des ARNm sont ensuite calculés selon la méthode de comparaison des Ct. La quantité de transcrits présents est normalisée

par rapport au gène endogène de référence ( $\Delta CT = Ct \text{ gène} - Ct \text{ gène endogène}$ ). La relation mathématique  $2^{-\Delta\Delta CT}$ , dans laquelle :  $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ échantillon cible} - Ct \text{ échantillon calibrant}$  donne le facteur d'expression relatif d'un échantillon par rapport à un autre.

#### d) *qPCR des microARNs*

Pour l'amplification par qPCR des microARNs, la technologie TaqMan® est également utilisée avec le le TaqMan® Gene Expression Master Mix (Applied Biosystem) (Tableau 10). Nous préparons, pour chaque gène, un mélange réactionnel composé, pour une réaction, de 10 µl de MasterMix, de 1 µl de sonde TaqMan® et de 7,67 µl d'eau RNase free. Sur une plaque 96 puits, nous déposons en duplicate 19 µl de mélange réactionnel contenant la sonde spécifique à notre gène d'intéret et 18,67 µl de celui contenant la sonde spécifique au gène de référence et 1,33 µl d'ADNc. Pour déterminer le niveau d'expression de miR-21 présent dans les ARN totaux extrait à partir de tissus de patients, nous utilisons comme contrôle interne le RNU6B tandis que pour ceux issus de cultures cellulaires nous utilisons le RNU48. Après centrifugation, la plaque est placée dans le thermocycleur C1000 Biorad™ PCR System programmé de la façon suivante

- 95°C : 10min  
 - 95°C : 15s  
 - 60°C : 60s } X40  
 - 4°C : ∞

**Tableau 10 :** Liste des sondes TaqMan utilisées pour la qPCR « miR »

Gènes	Référence
hsa-miR-21	sonde 000397
RNU48	sonde 001006
RNU6B	sonde 001093

### C *Immunoprécipitation de la chromatine (ChIP)*

#### a) *Fixation et récupération des cellules*

Les cellules sont ensemencées en boîtes de Pétri (100 x 20mm, 55cm<sup>2</sup>) à raison de 1 x 10<sup>6</sup> cellules en présence de 10 mL de milieu. A 80% de confluence, les cellules sont fixées avec 270 µl de formaldéhyde (pour une concentration finale de

0,1%) pendant 10 minutes sous agitation. Le milieu est ensuite éliminé et la réaction arrêtée par 5 mL de D-PBS 1X contenant 0,125 M de glycine pendant 5 minutes. Les cellules sont ensuite rincées une première fois avec 5 ml de PBS 1X froid puis une deuxième avec 2 ml de PBS 1X froid contenant des inhibiteurs des protéases (EDTA-Na<sub>2</sub> 0,2 mM pH8 ; PMSF 0,5 Mm ; aprotinine 10 µg/ml ; leupeptine hémisulfate 10 µg/ml). Les boîtes de Pétri sont ensuite placées sur glace et le tapis cellulaire est récupéré dans un tube de 50 mL avec un grattoir en présence de 3 mL de PBS 1X contenant des inhibiteurs de protéase. Cette étape est réalisée une seconde fois avec 2 mL de PBS 1X. La suspension est centrifugée 5 minutes à 685 g à 4°C. Le surnageant est éliminé et le culot cellulaire peut être conservé à -80°C jusqu'à fragmentation de la chromatine.

### *b) Fragmentation de la chromatine*

Le culot cellulaire est resuspendu dans du tampon de lyse (HEPES/KOH 10mM, pH 7,9 ; KCl 10mM ; MgCl<sub>2</sub> 1.5mM) à raison de 100 µL pour 1 x 10<sup>6</sup> cellules et incubé 10 minutes sur la glace. La chromatine est fragmentée par sonication à l'aide du système Bioruptor (Diagenode) par impulsion de 30 secondes à la puissance maximale (200W) suivie de 30 secondes de pause durant 10 minutes. Cette sonication permet une fragmentation de la chromatine toutes les 150 à 200 pb. Les échantillons sont ensuite centrifugés à 10 000 g pendant 10 minutes à 4°C et les surnageants récupérés dans un nouveau tube.

### *c) Immunoprécipitation*

Les échantillons sont fractionnés afin d'obtenir 100 µl soit 1 x 10<sup>6</sup> cellules par anticorps. 50 µl est prélevé et stocké à -20°C pour servir d'Input. A une fraction est ajoutée 4 µg d'anticorps d'intérêt anti-c-jun : (D) sc-44 (Santa Cruz) et à une autre la même quantité d'IgG contrôle de lapin. Les échantillons sont incubés toute la nuit à 4°C sous rotation.

Les billes magnétiques sont préparées à l'aide d'un portoir magnétique en mélangeant 50 µl de billes couplées à la protéine G (Invitrogen #100-020), 150 µl de billes couplées à la protéine A (Invitrogen #100-030) et 1 mL de solution de blocage (D-PBS 1X, pH 7,1 - 7,4 ; 0,5% BSA). 3 rinçages sont effectués avec cette solution de blocage et ensuite les billes sont incubées dans 1 mL sous agitation sur la nuit à 4°C.

100  $\mu$ L billes magnétiques est ajouté aux échantillons avant d'être incubés à 4°C, 4h sous rotation. Après élimination du surnageant, les billes sont lavées 5 fois avec 500  $\mu$ l de « Low Salt Wash Buffer » (Tris-HCl 20 mM, pH 8,1 ; NaCl 150 mM ; EDTA 2 mM ; SDS 0,1% ; Triton X-100 1%) puis 1 fois avec 1 mL de « High Salt Wash Buffer » (Tris-HCl 20 mM, pH 8,1 ; NaCl 500 mM ; EDTA 2 mM ; SDS 0,1% ; Triton X-100 1%). Après un rinçage avec 1 mL de TE 1X (Tris-HCl 10 mM, pH 8,0 ; EDTA-Na<sub>2</sub> 1 mM), les échantillons sont centrifugés 3 minutes à 960 g et les complexes immuns élués avec 210  $\mu$ L de tampon d'éluion préparé extemporanément (Tris-HCl 50mM, pH 8,1 ; EDTA-Na<sub>2</sub> 25mM ; SDS 1%) et une incubation de 15 minutes à 65°C sous agitation. Les billes sont éliminées par centrifugation 1 minute à 16 000 g et 200  $\mu$ L de surnageant est récupéré.

#### *d) Réversion et digestion enzymatique des protéines*

La fraction Input est complétée à 200  $\mu$ L avec de l'eau stérile. 8  $\mu$ L de NaCl 5 M et ajouté pour une concentration finale de 0,2 M et l'ensemble est incubé à 65°C sur la nuit. Les protéines sont ensuite digérées par l'incubation de 16  $\mu$ L de Q protéase et de 208  $\mu$ L de TE 1X pendant 1 H à 50°C.

#### *e) Purification des fragments d'ADN*

Les fragments d'ADN sont purifiés à l'aide du kit NucleoSpin® Gel and PCR Clean-up (Macherey Nagel) suivant les recommandations du fournisseur. La concentration et la pureté en ADN sont déterminées par spectrophotométrie à une longueur d'onde de 260 nm (Nanodrop 1000). Les échantillons sont conservés à -20°C.

#### *f) Amplification par qPCR*

L'enrichissement est analysé à partir de 2  $\mu$ L d'échantillon et du couples d'amorces des fragments d'intérêts (AP-1F : TAA GGA TGA CGC ACA GAT TGT C . AP-1R : TCA GAA GTC CCA CAT TTA TCA CC) par qPCR à l'aide de la Taq Polymerase SsoFast Evagreen Supermix (Biorad™) selon les conditions suivantes : 10  $\mu$ L d'enzyme ; 1,6  $\mu$ L d'amorce sens à 5  $\mu$ M ; 1,6  $\mu$ L d'amorce antisens à 5  $\mu$ M ; qsp 18  $\mu$ L d'eau stérile et avec le programme suivant 95°C 30 sec ; (95°C 3 sec ; 55°C 3 sec) X 60 dans le thermocycleur C1000 Biorad™ PCR System. L'expression relative des fragments d'intérêts est calculée d'après la méthode du  $\Delta\Delta$ Ct et normalisée par l'input de chaque anticorps. L'enrichissement des fragments

d'intérêts est calculé par le rapport de l'expression relative de l'anticorps d'intérêt sur l'expression relative de l'IgG.

## **D Hybridation in situ**

L'hybridation *in situ* des sondes miR-21, du contrôle positif (snRNAU6) et du contrôle négatif (microARN scrambled) est réalisée en utilisant les sondes LNA™ marquées à la digoxigénine (DIG) (Exiqon). Les lames de tissus de patients sont déparaffinées par 3 bains successifs de 5 min dans le xylène, puis réhydratées dans des bains d'alcool à concentrations décroissantes (2 fois 10 min à 99,9%, 1 fois 5 min à 99,9%, 1 fois 10 min à 96%, 1 fois 5 min à 96%, 1 fois 10 min à 70% et 1 fois 5 min à 76%) puis finalement rincées par un bain de 5 min de PBS. Les lames sont ensuite perméabilisées par incubation avec 300 µl de protéinase K à 15 µg/mL pendant 15 minutes à 37°C. Après rinçage au PBS, les lames sont déshydratées dans des bains d'alcool à concentrations croissantes (1 fois 10 min à 70%, 1 fois 1 min à 70%, 1 fois 10 min à 96%, 1 fois 1 min à 96%, 1 fois 10 min à 99,9% et 1 fois 1 min à 99,9%) puis incubées avec le tampon d'hybridation (1 nM de sonde snRNA U6 LNA™ marquée en 5', 50 nM de sonde microRNA scrambled LNA™ doublement marquée et 50 nM de sondes microRNA LNA™ doublement marquée) 2 heures à 45°C dans un four d'hybridation. Les lames sont rincées successivement dans des solutions SSC (Saline-Sodium Citrate) 1 fois 5 min à 5X, SSC, 2 fois 5 min à 1X et 2 fois 5 min à SSC 0,2X à la même température d'hybridation puis de nouveau avec du SSC 0,2X à température ambiante. S'ensuit une incubation de 15 minutes avec la solution de blocage (PBS-Tween 0,1%, 2% de sérum de mouton, 1% de BSA) puis 2 heures à température ambiante avec une solution anti-DIG Reagent (anticorps anti-DIG couplé à la phosphatase alcaline (PA) issu du mouton) dilué au 1/800ème dans la solution de blocage. Après lavage 3 fois pendant 3 min au PBS-T, les lames sont incubées sur nuit à température ambiante dans une chambre humide, avec le substrat soluble de l'enzyme PA (5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate (BCIP) + nitro blue tetrazolium (NBT)) qui donnera un précipité bleu/violet insoluble (BCIP-NBT). La réaction colorée est arrêtée par 2 lavages de 5 min avec du KBTB (Tris-HCl 50 mM, NaCl 150 mM, KCl 10 mM). Les lames sont contre-colorées avec du Nuclear Fast Red (Sigma) et montées avec de l'Eukitt (Sigma).

## V **Biochimie**

### A **Western blot**

#### a) *Préparation des extraits cellulaire totaux*

Le travail se fait sur glace. 48 heures après transfection, le milieu des cellules est aspiré et le tapis cellulaire est rincé avec 5mL de PBS 1X et ensuite recouvert de 5 mL de PBS 1X. Les cellules sont ensuite récupérées dans un tube de 15mL après avoir été décollées à l'aide d'un grattoir. Cette opération est renouvelée 2 fois afin de récupérer le maximum de cellules puis l'ensemble est centrifugé 5min à 1500tr/min à 4°C. Le surnageant est éliminé et les culots cellulaires sont lysés dans 100 µL de tampon de lyse RIPA (Radio Immune Precipitation Assay, Sigma-Aldrich) (50mM Tris-HCl pH 7,6, 150mM NaCl, 1% NP40, 1% Sodium deoxycholate, 0,1% SDS) contenant des inhibiteurs de protéases (Roche, Applied Science). Les culots subissent ensuite une sonication puis une homogénéisation par rotation 2 heures à 4°C pour finir par une centrifugation 20min à 14 000tr/min à 4°C. Les surnageants sont récupérés dans un nouveau tube et les protéines sont dosées par la méthode BCA utilisant l'acide bicinchoninique (BCA<sup>TM</sup> Protein Assay Reagent, Pierce). La densité optique est lue à 570nm. L'échantillon est conservé à -80°C.

#### b) *Western blot*

10 µg de protéines sont incubés 5 minutes à 99°C dans un tampon permettant de dénaturer et de réduire les liaisons disulfure des protéines (5 µL NuPAGE® LDS Sample Buffer (4X) (contient du dodécylsulfate de lithium de pH 8,4) + 2 µL NuPAGE® Sample Reducing Agent (10X) (contient 500 mM de dithiothréitol (DTT)) + qsp H<sub>2</sub>O 20 µL) (*Life Technologies*).

Le mélange est ensuite déposé sur un gel NuPAGE® Novex 4-12% Bis-Tris (*Life Technologies*) pour subir une électrophorèse dans une cuve Xcell Surelock<sup>TM</sup> Mini-Cell Electrophoresis System dans un tampon de migration NuPAGE® MOPS SDS Running Buffer (*Life Technologies*) à 200 V pendant 60min. Simultanément, un mélange d'étalon protéique de 5 µL de Novex® Sharp (Invitrogen) donnant des bandes colorées visibles à l'œil nue et de 3 µL de MagicMark<sup>TM</sup> XP Western (Invitrogen), qui donne des bandes visibles en chimioluminescence, est déposé sur le gel pour subir une séparation en fonction du poids moléculaire par électrophorèse.

Après migration, les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose (Ibлот® Gel transfert stacks nitrocellulose regular (Invitrogen)) grâce au système de transfert Iblot (Invitrogen) durant 7min à 25 V. Pour vérifier la qualité du transfert, les membranes de nitrocellulose sont baignées dans une solution de rouge ponceau qui permet une coloration des protéines présentes, elles sont ensuite rincées dans du TBS-T 1X (Tris-HCl 50 mM pH 7,5 + NaCl 150 mM + Tween-20 0,05%).

Les sites aspécifiques sont alors saturés par une solution TBST-T 1X + lait à 5% (ou BSA% pour certains anticorps) durant 1 heure à température ambiante sous agitation. Après 3 rinçages avec du TBS-T 1X, les membranes sont incubées avec l'anticorps primaire (Tableau 11) dilué dans du TBS-T 1X sur la nuit à 4°C sous agitation, puis de nouveau rincées 3 fois avec du TBS-T 1X et incubées 1H avec l'anticorps secondaire spécifique couplé à la peroxydase de Raifort (HRP) dilué également dans du TBS-T 1X.

Les membranes sont ensuite incubées 5 minutes dans une solution ECL (Enhanced Chemiluminescence, Pierce), puis finalement révélées par chimioluminescence au LAS4000 (Fujifilm). L'analyse densitométrique a été réalisée avec le logiciel ImageJ. La  $\beta$ -actine est utilisée comme témoin de charge.

**Tableau 11 : Liste des anticorps primaires utilisés pour le western blot**

Antigène	Référence	Poids moléculaire	Dilution
PDCD4	D29C6 (Cell Signaling)	60 kDa	1/500
Cycline D1	DCS6 (Cell Signaling)	36 kDa	1/500
Cdk4	(H-22): sc-601 (Santa Cruz)	34 kDa	1/500
Bax	(N-20): sc-493 (Santa Cruz)	23 kDa	1/250
Bcl-XL	(H-5): sc-8392 (Santa Cruz)	30 kDa	1/500
PPAR $\alpha$	n° 10170 (Cayman)	57 kDa	1/500
$\beta$ - Actine	Clone AC-15 (Sigma)	42 kDa	1/3000

## **B Test luciférase**

Quarante huit heures après la co-transfection, les cellules sont lysées avec 100 $\mu$ L de PLB 1X (Passive Lysis Buffer) (Promega) pendant 10 minutes sous agitation puis récupérées et centrifugées 5min à 8 000g. Le surnageant est récupéré pour effectuer un dosage protéique BCA (Pierce) et un dosage de l'activité luciférase. Pour ce dernier, 20  $\mu$ L du surnageant sont incubés avec le substrat

Luciferase Assay Reagent (Promega) et une mesure de la quantité relative de lumière (RLU) est effectuée à l'aide du Mithras (Berthold).

## **VI Immunohistochimie**

L'immunohistochimie est réalisée sur un automate immunostainer (Benchmark, Ventana) avec le kit diaminobenzidine XT Ultraview (Ventana). Les échantillons sont soumis à un prétraitement dans un tampon citrate pH 6,0 par chauffage à 37°C puis incubés avec l'anticorps primaire anti-PPAR $\alpha$  (clone ab8934, Abcam; dilution 1/200). Les contrôles négatifs sont effectués par omission de l'anticorps primaire.

## **VII Analyse statistique**

Les données sont présentées sous forme valeurs moyennes. Des analyses statistiques ont été effectuées avec le logiciel GraphPad Prism (GraphPad Software, San Diego, CA). Les différences entre plusieurs groupes ont été évaluées par une analyse de variance à sens unique (ANOVA) suivie du test de comparaison multiple de Bonferroni. Les différences statistiques entre chacun des deux groupes ont été déterminées par le test t de Student. La corrélation entre l'expression de miR-21 et PPAR $\alpha$  est évaluée à l'aide du test de Spearman. Les différences ont été considérées comme significatives lorsque  $p < 0,05$ .

# Bibliographie

## A

Allory Y, Culine S, de la Taille A. Kidney cancer pathology in the new context of targeted therapy. *Pathobiology*. 2011;78(2):90–8.

Alt AL, Boorjian SA, Lohse CM, Costello BA, Leibovich BC, Blute ML. Survival after complete surgical resection of multiple metastases from renal cell carcinoma. *Cancer*. 2011 Jul 1;117(13):2873–82.

Aoyama T, Peters JM, Iritani N, Nakajima T, Furihata K, Hashimoto T, et al. Altered constitutive expression of fatty acid-metabolizing enzymes in mice lacking the peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha). *J Biol Chem*. 1998 Mar 6;273(10):5678–84.

Asangani IA, Rasheed S a. K, Nikolova DA, Leupold JH, Colburn NH, Post S, et al. MicroRNA-21 (miR-21) post-transcriptionally downregulates tumor suppressor Pcd4 and stimulates invasion, intravasation and metastasis in colorectal cancer. *Oncogene*. 2008 Apr 3;27(15):2128–36.

## B

Bader AG, Brown D, Winkler M. The promise of microRNA replacement therapy. *Cancer Res*. 2010 Sep 15;70(18):7027–30.

Baillat D, Shiekhhattar R. Functional dissection of the human TNRC6 (GW182-related) family of proteins. *Mol Cell Biol*. 2009 Aug;29(15):4144–55.

Behm-Ansmant I, Rehwinkel J, Doerks T, Stark A, Bork P, Izaurralde E. mRNA degradation by miRNAs and GW182 requires both CCR4:NOT deadenylase and DCP1:DCP2 decapping complexes. *Genes Dev*. 2006 Jul 15;20(14):1885–98.

Bensalah K, Albiges L, Bernhard J-C, Bigot P, Bodin T, Boissier R, et al. [CCAFU french national guidelines 2016-2018 on renal cancer]. *Prog Urol*. 2016 Nov;27 Suppl 1:S27–51.

Bera A, Das F, Ghosh-Choudhury N, Kasinath BS, Abboud HE, Choudhury GG. microRNA-21-induced dissociation of PDCD4 from rictor contributes to Akt-IKKβ-mTORC1 axis to regulate renal cancer cell invasion. *Exp Cell Res*. 2014 Oct 15;328(1):99–117.

Bera A, Ghosh-Choudhury N, Dey N, Das F, Kasinath BS, Abboud HE, et al. NFκB-mediated cyclin D1 expression by microRNA-21 influences renal cancer cell proliferation. *Cell Signal*. 2013 Dec;25(12):2575–86.

Berger J, Moller DE. The mechanisms of action of PPARs. *Annu Rev Med*. 2002;53:409–35.

Berkers J, Govaere O, Wolter P, Beuselinck B, Schöffski P, van Kempen LC, et al. A possible role for microRNA-141 down-regulation in sunitinib resistant metastatic clear cell renal cell carcinoma through induction of epithelial-to-mesenchymal transition and hypoxia resistance. *J Urol*. 2013 May;189(5):1930–8.

Birney E, Stamatoyannopoulos JA, Dutta A, Guigó R, Gingeras TR, Margulies EH, et al. Identification and analysis of functional elements in 1% of the human genome by the ENCODE pilot project. *Nature*. 2007 Jun 14;447(7146):799–816.

Blanquart C, Barbier O, Fruchart JC, Staels B, Glineur C. Peroxisome proliferator-activated receptors: regulation of transcriptional activities and roles in inflammation. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 2003 Jun;85(2–5):267–73.

Bonovas S, Nikolopoulos GK, Bagos PG. Use of fibrates and cancer risk: a systematic review and meta-analysis of 17 long-term randomized placebo-controlled trials. *PLoS ONE*. 2012;7(9):e45259.

Borchert GM, Lanier W, Davidson BL. RNA polymerase III transcribes human microRNAs. *Nat Struct Mol Biol*. 2006 Dec;13(12):1097–101.

Brunot A, Dagher J, Perrin C, Patard JJ, Bensalah K, Verhoest G, et al. Le carcinome rénal à cellules claires (CRCC) sans altération du gène de Von Hippel–Lindau (VHL) : une entité anatomo-clinique à part ? *Progrès en Urologie*. 2014 Nov 1;24(13):835.

## C

Cai X, Hagedorn CH, Cullen BR. Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs. *RNA*. 2004 Dec;10(12):1957–66.

Calin GA, Sevignani C, Dumitru CD, Hyslop T, Noch E, Yendamuri S, et al. Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2004 Mar 2;101(9):2999–3004.

Cancer Genome Atlas Research Network. Comprehensive molecular characterization of clear cell renal cell carcinoma. *Nature*. 2013 Jul 4;499(7456):43–9.

Cao J, Liu J, Xu R, Zhu X, Liu L, Zhao X. MicroRNA-21 stimulates epithelial-to-mesenchymal transition and tumorigenesis in clear cell renal cells. *Mol Med Rep*. 2016 Jan;13(1):75–82.

Capitanio U, Cloutier V, Zini L, Isbarn H, Jeldres C, Shariat SF, et al. A critical assessment of the prognostic value of clear cell, papillary and chromophobe histological subtypes in renal cell carcinoma: a population-based study. *BJU Int*. 2009 Jun;103(11):1496–500.

Cech TR, Steitz JA. The noncoding RNA revolution-trashing old rules to forge new ones. *Cell*. 2014 Mar 27;157(1):77–94.

Chan JK, Blansit K, Kiet T, Sherman A, Wong G, Earle C, et al. The inhibition of miR-21 promotes apoptosis and chemosensitivity in ovarian cancer. *Gynecol Oncol*. 2014 Mar;132(3):739–44.

Chau BN, Xin C, Hartner J, Ren S, Castano AP, Linn G, et al. MicroRNA-21 Promotes Fibrosis of the Kidney by Silencing Metabolic Pathways. *Science Translational Medicine*. 2012 Feb 15;4(121):121ra18-121ra18.

Chen C-YA, Zheng D, Xia Z, Shyu A-B. Ago-TNRC6 triggers microRNA-mediated decay by promoting two deadenylation steps. *Nat Struct Mol Biol.* 2009 Nov;16(11):1160–6.

Chen PY, Manninga H, Slanchev K, Chien M, Russo JJ, Ju J, et al. The developmental miRNA profiles of zebrafish as determined by small RNA cloning. *Genes Dev.* 2005 Jun 1;19(11):1288–93.

Chen X, Ba Y, Ma L, Cai X, Yin Y, Wang K, et al. Characterization of microRNAs in serum: a novel class of biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Res.* 2008 Oct;18(10):997–1006.

Chendrimada TP, Finn KJ, Ji X, Baillat D, Gregory RI, Liebhaber SA, et al. MicroRNA silencing through RISC recruitment of eIF6. *Nature.* 2007 Jun 14;447(7146):823–8.

Cheng Y, Liu X, Zhang S, Lin Y, Yang J, Zhang C. MicroRNA-21 protects against the H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced injury on cardiac myocytes via its target gene PDCD4. *J Mol Cell Cardiol.* 2009 Jul;47(1):5–14.

Chung W-M, Chang W-C, Chen L, Chang Y-Y, Shyr C-R, Hung Y-C, et al. MicroRNA-21 promotes the ovarian teratocarcinoma PA1 cell line by sustaining cancer stem/progenitor populations in vitro. *Stem Cell Res Ther.* 2013 Jul 26;4(4):88.

Cortez MA, Bueso-Ramos C, Ferdin J, Lopez-Berestein G, Sood AK, Calin GA. MicroRNAs in body fluids--the mix of hormones and biomarkers. *Nat Rev Clin Oncol.* 2011 Jun 7;8(8):467–77.

Costa PM, Cardoso AL, Nóbrega C, Pereira de Almeida LF, Bruce JN, Canoll P, et al. MicroRNA-21 silencing enhances the cytotoxic effect of the antiangiogenic drug sunitinib in glioblastoma. *Hum Mol Genet.* 2013 Mar 1;22(5):904–18.

## D

Delerive P, De Bosscher K, Besnard S, Vanden Berghe W, Peters JM, Gonzalez FJ, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor alpha negatively regulates the vascular inflammatory gene response by negative cross-talk with transcription factors NF- $\kappa$ B and AP-1. *J Biol Chem.* 1999 Nov 5;274(45):32048–54.

Deng J, Lei W, Fu J-C, Zhang L, Li J-H, Xiong J-P. Targeting miR-21 enhances the sensitivity of human colon cancer HT-29 cells to chemoradiotherapy in vitro. *Biochem Biophys Res Commun.* 2014 Jan 17;443(3):789–95.

Denli AM, Tops BBJ, Plasterk RHA, Ketting RF, Hannon GJ. Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature.* 2004 Nov 11;432(7014):231–5.

Dey N, Das F, Ghosh-Choudhury N, Mandal CC, Parekh DJ, Block K, et al. microRNA-21 governs TORC1 activation in renal cancer cell proliferation and invasion. *PLoS ONE.* 2012;7(6):e37366.

Doench JG, Sharp PA. Specificity of microRNA target selection in translational repression. *Genes Dev.* 2004 Mar 1;18(5):504–11.

Dreyer C, Sablin M-P, Faivre S, Raymond E. [Topics in mTOR pathway and its inhibitors]. *Bull Cancer*. 2009 Jan;96(1):87–94.

Du J, Yang S, An D, Hu F, Yuan W, Zhai C, et al. BMP-6 inhibits microRNA-21 expression in breast cancer through repressing  $\delta$ EF1 and AP-1. *Cell Res*. 2009 Apr;19(4):487–96.

## E

Edeline J, Vigneau C, Patard J-J, Rioux-Leclercq N. [Signalling pathways in renal-cell carcinoma: from the molecular biology to the future therapy]. *Bull Cancer*. 2010;97:5–15.

Eulalio A, Huntzinger E, Izaurralde E. GW182 interaction with Argonaute is essential for miRNA-mediated translational repression and mRNA decay. *Nat Struct Mol Biol*. 2008 Apr;15(4):346–53.

Eystathioy T, Jakymiw A, Chan EKL, Séraphin B, Cougot N, Fritzler MJ. The GW182 protein colocalizes with mRNA degradation associated proteins hDcp1 and hLSm4 in cytoplasmic GW bodies. *RNA*. 2003 Oct;9(10):1171–3.

## F

Faragalla H, Youssef YM, Scorilas A, Khalil B, White NMA, Mejia-Guerrero S, et al. The clinical utility of miR-21 as a diagnostic and prognostic marker for renal cell carcinoma. *J Mol Diagn*. 2012 Jul;14(4):385–92.

Filipowicz W, Bhattacharyya SN, Sonenberg N. Mechanisms of post-transcriptional regulation by microRNAs: are the answers in sight? *Nat Rev Genet*. 2008 Feb;9(2):102–14.

Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 1998 Feb 19;391(6669):806–11.

Fuchs B, Trousdale RT, Rock MG. Solitary bony metastasis from renal cell carcinoma: significance of surgical treatment. *Clin Orthop Relat Res*. 2005 Feb;(431):187–92.

Fujita S, Ito T, Mizutani T, Minoguchi S, Yamamichi N, Sakurai K, et al. miR-21 Gene expression triggered by AP-1 is sustained through a double-negative feedback mechanism. *J Mol Biol*. 2008 May 2;378(3):492–504.

## G

Geier A, Macias RIR, Bettinger D, Weiss J, Bantel H, Jahn D, et al. The lack of the organic cation transporter OCT1 at the plasma membrane of tumor cells precludes a positive response to sorafenib in patients with hepatocellular carcinoma. *Oncotarget*. 2017 Feb 28;8(9):15846–57.

Glowacki F, Savary G, Gnemmi V, Buob D, Van der Hauwaert C, Lo-Guidice J-M, et al. Increased circulating miR-21 levels are associated with kidney fibrosis. *PLoS ONE*. 2013;8(2):e58014.

Gnarra JR, Tory K, Weng Y, Schmidt L, Wei MH, Li H, et al. Mutations of the VHL tumour suppressor gene in renal carcinoma. *Nat Genet*. 1994 May;7(1):85–90.

Gomez IG, MacKenna DA, Johnson BG, Kaimal V, Roach AM, Ren S, et al. Anti-microRNA-21 oligonucleotides prevent Alport nephropathy progression by stimulating metabolic pathways. *J Clin Invest*. 2015 Jan 2;125(1):141–56.

Grabacka M, Pierzchalska M, Reiss K. Peroxisome proliferator activated receptor  $\alpha$  ligands as anticancer drugs targeting mitochondrial metabolism. *Curr Pharm Biotechnol*. 2013;14(3):342–56.

Grabacka M, Plonka PM, Urbanska K, Reiss K. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor  $\alpha$  Activation Decreases Metastatic Potential of Melanoma Cells In vitro via Down-Regulation of Akt. *Clin Cancer Res*. 2006 May 15;12(10):3028–36.

Gregory RI, Yan K, Amuthan G, Chendrimada T, Doratotaj B, Cooch N, et al. The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature*. 2004 Nov 11;432(7014):235–40.

Griffiths-Jones S, Grocock RJ, van Dongen S, Bateman A, Enright AJ. miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature. *Nucleic Acids Res*. 2006 Jan 1;34(suppl\_1):D140–4.

Griffiths-Jones S, Saini HK, van Dongen S, Enright AJ. miRBase: tools for microRNA genomics. *Nucleic Acids Res*. 2008 Jan;36(Database issue):D154-158.

Gutschner T, Diederichs S. The hallmarks of cancer: a long non-coding RNA point of view. *RNA Biol*. 2012 Jun;9(6):703–19.

## H

Han J, Lee Y, Yeom K-H, Kim Y-K, Jin H, Kim VN. The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes Dev*. 2004 Dec 15;18(24):3016–27.

Hatley ME, Patrick DM, Garcia MR, Richardson JA, Bassel-Duby R, van Rooij E, et al. Modulation of K-Ras-dependent lung tumorigenesis by MicroRNA-21. *Cancer Cell*. 2010 Sep 14;18(3):282–93.

Hayashi T, Koyama N, Azuma Y, Kashimata M. Mesenchymal miR-21 regulates branching morphogenesis in murine submandibular gland in vitro. *Dev Biol*. 2011 Apr 15;352(2):299–307.

Höck J, Weinmann L, Ender C, Rüdell S, Kremmer E, Raabe M, et al. Proteomic and functional analysis of Argonaute-containing mRNA-protein complexes in human cells. *EMBO Rep*. 2007 Nov;8(11):1052–60.

Hora M, Hes O, Reischig T, Urge T, Klecka J, Ferda J, et al. Tumours in end-stage kidney. *Transplant Proc*. 2008 Dec;40(10):3354–8.

Hunt JD, van der Hel OL, McMillan GP, Boffetta P, Brennan P. Renal cell carcinoma in relation to cigarette smoking: meta-analysis of 24 studies. *Int J Cancer*. 2005 Mar 10;114(1):101–8.

Huntzinger E, Izaurralde E. Gene silencing by microRNAs: contributions of translational repression and mRNA decay. *Nat Rev Genet*. 2011 Feb;12(2):99–110.

## I

Ibáñez-Ventoso C, Vora M, Driscoll M. Sequence Relationships among *C. elegans*, *D. melanogaster* and Human microRNAs Highlight the Extensive Conservation of microRNAs in Biology. *PLOS ONE*. 2008 Jul;3(7):e2818.

Islam F, Qiao B, Smith RA, Gopalan V, Lam AK-Y. Cancer stem cell: Fundamental experimental pathological concepts and updates. *Experimental and Molecular Pathology*. 2015 Apr;98(2):184–91.

## J

Jonasch E. Kidney cancer: current and novel treatment options. *J Natl Compr Canc Netw*. 2015 May;13(5 Suppl):679–81.

## K

Kida K, Nakajima M, Mohri T, Oda Y, Takagi S, Fukami T, et al. PPAR $\alpha$  Is Regulated by miR-21 and miR-27b in Human Liver. *Pharm Res*. 2011 Oct 1;28(10):2467–76.

Kim HL, Beldegrun AS, Freitas DG, Bui MHT, Han K, Dorey FJ, et al. Paraneoplastic signs and symptoms of renal cell carcinoma: implications for prognosis. *J Urol*. 2003 Nov;170(5):1742–6.

Kim K, Lee YS, Carthew RW. Conversion of pre-RISC to holo-RISC by Ago2 during assembly of RNAi complexes. *RNA*. 2007 Jan;13(1):22–9.

Kim VN, Han J, Siomi MC. Biogenesis of small RNAs in animals. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2009 Feb;10(2):126–39.

Kondo K, Kaelin WG. The von Hippel-Lindau tumor suppressor gene. *Exp Cell Res*. 2001 Mar 10;264(1):117–25.

Kuhn C-D, Joshua-Tor L. Eukaryotic Argonautes come into focus. *Trends Biochem Sci*. 2013 May;38(5):263–71.

Kwak PB, Tomari Y. The N domain of Argonaute drives duplex unwinding during RISC assembly. *Nat Struct Mol Biol*. 2012 Jan 10;19(2):145–51.

## L

Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*. 1993 Dec 3;75(5):843–54.

Lee Y, Jeon K, Lee J-T, Kim S, Kim VN. MicroRNA maturation: stepwise processing and subcellular localization. *EMBO J*. 2002 Sep 2;21(17):4663–70.

Lee Y, Kim M, Han J, Yeom K-H, Lee S, Baek SH, et al. MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J*. 2004 Oct 13;23(20):4051–60.

Ling H, Fabbri M, Calin GA. MicroRNAs and other non-coding RNAs as targets for anticancer drug development. *Nat Rev Drug Discov*. 2013 Nov;12(11):847–65.

Ling M, Li Y, Xu Y, Pang Y, Shen L, Jiang R, et al. Regulation of miRNA-21 by reactive oxygen species-activated ERK/NF- $\kappa$ B in arsenite-induced cell transformation. *Free Radical Biology and Medicine*. 2012 May 1;52(9):1508–18.

Liu J, Carmell MA, Rivas FV, Marsden CG, Thomson JM, Song J-J, et al. Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science*. 2004 Sep 3;305(5689):1437–41.

Ljungberg B, Bensalah K, Canfield S, Dabestani S, Hofmann F, Hora M, et al. EAU Guidelines on Renal Cell Carcinoma: 2014 Update. *European Urology*. 2015 May 1;67(5):913–24.

Ljungberg B, Campbell SC, Choi HY, Cho HY, Jacqmin D, Lee JE, et al. The epidemiology of renal cell carcinoma. *Eur Urol*. 2011 Oct;60(4):615–21.

Lorenzen JM, Haller H, Thum T. MicroRNAs as mediators and therapeutic targets in chronic kidney disease. *Nat Rev Nephrol*. 2011 May;7(5):286–94.

## M

Mace TA, Collins AL, Wojcik SE, Croce CM, Lesinski GB, Bloomston M. Hypoxia induces the overexpression of MicroRNA-21 in pancreatic cancer cells. *The Journal of surgical research*. 2013 Oct;184(2):855.

MacRae IJ, Ma E, Zhou M, Robinson CV, Doudna JA. In vitro reconstitution of the human RISC-loading complex. *PNAS*. 2008 Jan 15;105(2):512–7.

Madhyastha R, Madhyastha H, Pengjam Y, Nakajima Y, Omura S, Maruyama M. NF $\kappa$ B activation is essential for miR-21 induction by TGF $\beta$ 1 in high glucose conditions. *Biochem Biophys Res Commun*. 2014 Sep 5;451(4):615–21.

Mathonnet G, Fabian MR, Svitkin YV, Parsyan A, Huck L, Murata T, et al. MicroRNA inhibition of translation initiation in vitro by targeting the cap-binding complex eIF4F. *Science*. 2007 Sep 21;317(5845):1764–7.

Meister G, Landthaler M, Dorsett Y, Tuschl T. Sequence-specific inhibition of microRNA- and siRNA-induced RNA silencing. *RNA*. 2004 Mar;10(3):544–50.

Meister G, Tuschl T. Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature*. 2004 Sep 16;431(7006):343–9.

Méjean A, André M, Doublet JD, Fendler J-P, de Fromont M, Hélénon O, et al. [Kidney tumors]. *Prog Urol*. 2004 Nov;14(4 Suppl 1):997, 999–1035.

Meng F, Henson R, Wehbe-Janek H, Ghoshal K, Jacob ST, Patel T. MicroRNA-21 regulates expression of the PTEN tumor suppressor gene in human hepatocellular cancer. *Gastroenterology*. 2007 Aug;133(2):647–58.

Morlando M, Ballarino M, Gromak N, Pagano F, Bozzoni I, Proudfoot NJ. Primary microRNA transcripts are processed co-transcriptionally. *Nat Struct Mol Biol*. 2008 Sep;15(9):902–9.

Motzer RJ, Porta C, Vogelzang NJ, Sternberg CN, Szczylik C, Zolnierok J, et al. Dovitinib versus sorafenib for third-line targeted treatment of patients with metastatic renal cell carcinoma: an open-label, randomised phase 3 trial. *Lancet Oncol*. 2014 Mar;15(3):286–96.

Mudduluru G, George-William JN, Muppala S, Asangani IA, Kumarswamy R, Nelson LD, et al. Curcumin regulates miR-21 expression and inhibits invasion and metastasis in colorectal cancer. *Biosci Rep*. 2011 Jun;31(3):185–97.

## N

Nana-Sinkam SP, Croce CM. Clinical applications for microRNAs in cancer. *Clin Pharmacol Ther*. 2013 Jan;93(1):98–104.

Napoli C, Lemieux C, Jorgensen R. Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into *Petunia* Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans. *Plant Cell*. 1990 Apr 1;2(4):279–89.

## O

Ørom UA, Nielsen FC, Lund AH. MicroRNA-10a binds the 5'UTR of ribosomal protein mRNAs and enhances their translation. *Mol Cell*. 2008 May 23;30(4):460–71.

Osanto S, Qin Y, Buermans HP, Berkers J, Lerut E, Goeman JJ, et al. Genome-wide microRNA expression analysis of clear cell renal cell carcinoma by next generation deep sequencing. *PLoS ONE*. 2012;7(6):e38298.

Ozsolak F, Poling LL, Wang Z, Liu H, Liu XS, Roeder RG, et al. Chromatin structure analyses identify miRNA promoters. *Genes Dev*. 2008 Nov 15;22(22):3172–83.

## P

Panigrahy D, Kaipainen A, Huang S, Butterfield CE, Barnés CM, Fannon M, et al. PPARalpha agonist fenofibrate suppresses tumor growth through direct and indirect angiogenesis inhibition. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008 Jan 22;105(3):985–90.

Park J-K, Lee EJ, Esau C, Schmittgen TD. Antisense inhibition of microRNA-21 or -221 arrests cell cycle, induces apoptosis, and sensitizes the effects of gemcitabine in pancreatic adenocarcinoma. *Pancreas*. 2009 Oct;38(7):e190-199.

Pasquinelli AE, Reinhart BJ, Slack F, Martindale MQ, Kuroda MI, Maller B, et al. Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA. *Nature*. 2000 Nov 2;408(6808):86–9.

Passadouro M, Pedroso de Lima MC, Faneca H. MicroRNA modulation combined with sunitinib as a novel therapeutic strategy for pancreatic cancer. *Int J Nanomedicine*. 2014;9:3203–17.

Patard J-J, Leray E, Rodriguez A, Rioux-Leclercq N, Guillé F, Lobel B. Correlation between symptom graduation, tumor characteristics and survival in renal cell carcinoma. *Eur Urol.* 2003 Aug;44(2):226–32.

Pawlak M, Lefebvre P, Staels B. Molecular mechanism of PPAR $\alpha$  action and its impact on lipid metabolism, inflammation and fibrosis in non-alcoholic fatty liver disease. *J Hepatol.* 2015 Mar;62(3):720–33.

Peters L, Meister G. Argonaute proteins: mediators of RNA silencing. *Mol Cell.* 2007 Jun 8;26(5):611–23.

Petersen CP, Bordeleau M-E, Pelletier J, Sharp PA. Short RNAs repress translation after initiation in mammalian cells. *Mol Cell.* 2006 Feb 17;21(4):533–42.

Petillo D, Kort EJ, Anema J, Furge KA, Yang XJ, Teh BT. MicroRNA profiling of human kidney cancer subtypes. *Int J Oncol.* 2009 Jul;35(1):109–14.

Pillai RS. MicroRNA function: multiple mechanisms for a tiny RNA? *RNA.* 2005 Dec;11(12):1753–61.

Piwowarczyk K, Wybieralska E, Baran J, Borowczyk J, Rybak P, Kosińska M, et al. Fenofibrate enhances barrier function of endothelial continuum within the metastatic niche of prostate cancer cells. *Expert Opin Ther Targets.* 2015 Feb;19(2):163–76.

Powers MP, Alvarez K, Kim H-J, Monzon FA. Molecular classification of adult renal epithelial neoplasms using microRNA expression and virtual karyotyping. *Diagn Mol Pathol.* 2011 Jun;20(2):63–70.

Pradella D, Naro C, Sette C, Ghigna C. EMT and stemness: flexible processes tuned by alternative splicing in development and cancer progression. *Mol Cancer.* 2017 Jan 30;16(1):8.

Prior C, Perez-Gracia JL, Garcia-Donas J, Rodriguez-Antona C, Guruceaga E, Esteban E, et al. Identification of tissue microRNAs predictive of sunitinib activity in patients with metastatic renal cell carcinoma. *PLoS ONE.* 2014;9(1):e86263.

## R

Ramachandra RK, Salem M, Gahr S, Rexroad CE, Yao J. Cloning and characterization of microRNAs from rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): their expression during early embryonic development. *BMC Dev Biol.* 2008 Apr 15;8:41.

Ramanan S, Kooshki M, Zhao W, Hsu F-C, Robbins ME. PPAR $\alpha$  ligands inhibit radiation-induced microglial inflammatory responses by negatively regulating NF- $\kappa$ B and AP-1 pathways. *Free Radic Biol Med.* 2008 Dec 15;45(12):1695–704.

Reddy JK, Rao MS, Azarnoff DL, Sell S. Mitogenic and carcinogenic effects of a hypolipidemic peroxisome proliferator, [4-chloro-6-(2,3-xylidino)-2-pyrimidinylthio]acetic acid (Wy-14, 643), in rat and mouse liver. *Cancer Res.* 1979 Jan;39(1):152–61.

Redova M, Poprach A, Nekvindova J, Iliev R, Radova L, Lakomy R, et al. Circulating miR-378 and miR-451 in serum are potential biomarkers for renal cell carcinoma. *J Transl Med.* 2012 Mar 22;10:55.

Reinhart BJ, Slack FJ, Basson M, Pasquinelli AE, Bettinger JC, Rougvie AE, et al. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature.* 2000 Feb 24;403(6772):901–6.

Rodriguez A, Griffiths-Jones S, Ashurst JL, Bradley A. Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units. *Genome Res.* 2004 Oct;14(10A):1902–10.

Rui M, Qu Y, Gao T, Ge Y, Feng C, Xu X. Simultaneous delivery of anti-miR21 with doxorubicin prodrug by mimetic lipoprotein nanoparticles for synergistic effect against drug resistance in cancer cells. *Int J Nanomedicine.* 2017;12:217–37.

Rupaimoole R, Slack FJ. MicroRNA therapeutics: towards a new era for the management of cancer and other diseases. *Nat Rev Drug Discov.* 2017 Mar;16(3):203–22.

## S

Saini HK, Griffiths-Jones S, Enright AJ. Genomic analysis of human microRNA transcripts. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2007 Nov 6;104(45):17719–24.

Sandlund J, Ljungberg B, Wikström P, Grankvist K, Lindh G, Rasmuson T. Hypoxia-inducible factor-2 $\alpha$  mRNA expression in human renal cell carcinoma. *Acta Oncol.* 2009;48(6):909–14.

Sarkar J, Gou D, Turaka P, Viktorova E, Ramchandran R, Raj JU. MicroRNA-21 plays a role in hypoxia-mediated pulmonary artery smooth muscle cell proliferation and migration. *American Journal of Physiology - Lung Cellular and Molecular Physiology.* 2010 Dec 1;299(6):L861–71.

Schoonjans K, Staels B, Auwerx J. The peroxisome proliferator activated receptors (PPARS) and their effects on lipid metabolism and adipocyte differentiation. *Biochim Biophys Acta.* 1996 Jul 26;1302(2):93–109.

Scosyrev E, Messing E, Campbell S. Radical versus partial nephrectomy for a small renal mass: does saving nephrons save lives? *Expert Review of Anticancer Therapy.* 2013 Dec 1;13(12):1349–51.

Selcuklu SD, Donoghue MTA, Spillane C. miR-21 as a key regulator of oncogenic processes. *Biochem Soc Trans.* 2009 Aug;37(Pt 4):918–25.

Shen K, Cui D, Sun L, Lu Y, Han M, Liu J. Inhibition of IGF-IR increases chemosensitivity in human colorectal cancer cells through MRP-2 promoter suppression. *J Cell Biochem.* 2012 Jun;113(6):2086–97.

Shuch B, La Rochelle JC, Klatte T, Riggs SB, Liu W, Kabbinavar FF, et al. Brain metastasis from renal cell carcinoma: presentation, recurrence, and survival. *Cancer.* 2008 Oct 1;113(7):1641–8.

Si M-L, Zhu S, Wu H, Lu Z, Wu F, Mo Y-Y. miR-21-mediated tumor growth. *Oncogene*. 2007 Apr 26;26(19):2799–803.

Singh SK, Kagalwala MN, Parker-Thornburg J, Adams H, Majumder S. REST maintains self-renewal and pluripotency of embryonic stem cells. *Nature*. 2008 May 8;453(7192):223–7.

Slaby O, Jancovicova J, Lakomy R, Svoboda M, Poprach A, Fabian P, et al. Expression of miRNA-106b in conventional renal cell carcinoma is a potential marker for prediction of early metastasis after nephrectomy. *J Exp Clin Cancer Res*. 2010 Jul 7;29:90.

Slaby O, Redova M, Poprach A, Nekvindova J, Iliev R, Radova L, et al. Identification of MicroRNAs associated with early relapse after nephrectomy in renal cell carcinoma patients. *Genes Chromosomes Cancer*. 2012 Jul;51(7):707–16.

Slot AJ, Molinski SV, Cole SPC. Mammalian multidrug-resistance proteins (MRPs). *Essays Biochem*. 2011 Sep 7;50(1):179–207.

Sobin LH, Compton CC. TNM seventh edition: what's new, what's changed: communication from the International Union Against Cancer and the American Joint Committee on Cancer. *Cancer*. 2010 Nov 15;116(22):5336–9.

Song J-J, Liu J, Tolia NH, Schneiderman J, Smith SK, Martienssen RA, et al. The crystal structure of the Argonaute2 PAZ domain reveals an RNA binding motif in RNAi effector complexes. *Nat Struct Biol*. 2003 Dec;10(12):1026–32.

Steffens S, Janssen M, Roos FC, Becker F, Schumacher S, Seidel C, et al. Incidence and long-term prognosis of papillary compared to clear cell renal cell carcinoma--a multicentre study. *Eur J Cancer*. 2012 Oct;48(15):2347–52.

Suda J, Rockey DC, Karvar S. Akt2-Dependent Phosphorylation of Radixin in Regulation of Mrp-2 Trafficking in WIF-B Cells. *Dig Dis Sci*. 2016 Feb;61(2):453–63.

Sukov WR, Lohse CM, Leibovich BC, Thompson RH, Cheville JC. Clinical and pathological features associated with prognosis in patients with papillary renal cell carcinoma. *J Urol*. 2012 Jan;187(1):54–9.

## T

Thermann R, Hentze MW. Drosophila miR2 induces pseudo-polysomes and inhibits translation initiation. *Nature*. 2007 Jun 14;447(7146):875–8.

Thomson DW, Bracken CP, Goodall GJ. Experimental strategies for microRNA target identification. *Nucleic Acids Res*. 2011 Sep 1;39(16):6845–53.

Tsui KH, Shvarts O, Smith RB, Figlin RA, deKernion JB, Belldegrun A. Prognostic indicators for renal cell carcinoma: a multivariate analysis of 643 patients using the revised 1997 TNM staging criteria. *J Urol*. 2000 Apr;163(4):1090–1095; quiz 1295.

## V

Vasudevan S, Tong Y, Steitz JA. Switching from repression to activation: microRNAs can up-regulate translation. *Science*. 2007 Dec 21;318(5858):1931–4.

Volinia S, Calin GA, Liu C-G, Ambs S, Cimmino A, Petrocca F, et al. A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006 Feb 14;103(7):2257–61.

Volpe A, Novara G, Antonelli A, Bertini R, Billia M, Carmignani G, et al. Chromophobe renal cell carcinoma (RCC): oncological outcomes and prognostic factors in a large multicentre series. *BJU Int*. 2012 Jul;110(1):76–83.

## W

Wakiyama M, Takimoto K, Ohara O, Yokoyama S. Let-7 microRNA-mediated mRNA deadenylation and translational repression in a mammalian cell-free system. *Genes Dev*. 2007 Aug 1;21(15):1857–62.

Wang B, Love TM, Call ME, Doench JG, Novina CD. Recapitulation of short RNA-directed translational gene silencing in vitro. *Mol Cell*. 2006 May 19;22(4):553–60.

Wang B, Yanez A, Novina CD. MicroRNA-repressed mRNAs contain 40S but not 60S components. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2008 Apr 8;105(14):5343–8.

Weber JA, Baxter DH, Zhang S, Huang DY, Huang KH, Lee MJ, et al. The microRNA spectrum in 12 body fluids. *Clin Chem*. 2010 Nov;56(11):1733–41.

Wei X, Wang W, Wang L, Zhang Y, Zhang X, Chen M, et al. MicroRNA-21 induces 5-fluorouracil resistance in human pancreatic cancer cells by regulating PTEN and PDCD4. *Cancer Med*. 2016 Apr;5(4):693–702.

Weikert S, Boeing H, Pischon T, Weikert C, Olsen A, Tjønneland A, et al. Blood pressure and risk of renal cell carcinoma in the European prospective investigation into cancer and nutrition. *Am J Epidemiol*. 2008 Feb 15;167(4):438–46.

Winter J, Jung S, Keller S, Gregory RI, Diederichs S. Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nat Cell Biol*. 2009 Mar;11(3):228–34.

Wotschovsky Z, Liep J, Meyer H-A, Jung M, Wagner I, Disch AC, et al. Identification of Metastamirs as Metastasis-associated MicroRNAs in Clear Cell Renal Cell Carcinomas. *International Journal of Biological Sciences*. 2012;8(10):1363–74.

Wu L, Fan J, Belasco JG. MicroRNAs direct rapid deadenylation of mRNA. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2006 Mar 14;103(11):4034–9.

Wu X, Weng L, Li X, Guo C, Pal SK, Jin JM, et al. Identification of a 4-microRNA Signature for Clear Cell Renal Cell Carcinoma Metastasis and Prognosis. *PLOS ONE*. 2012 mai;7(5):e35661.

Wulfken LM, Moritz R, Ohlmann C, Holdenrieder S, Jung V, Becker F, et al. MicroRNAs in Renal Cell Carcinoma: Diagnostic Implications of Serum miR-1233 Levels. *PLOS ONE*. 2011 Sep 30;6(9):e25787.

## Y

Yi R, Qin Y, Macara IG, Cullen BR. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. *Genes Dev*. 2003 Dec 15;17(24):3011–6.

Youssef YM, White NMA, Grigull J, Krizova A, Samy C, Mejia-Guerrero S, et al. Accurate Molecular Classification of Kidney Cancer Subtypes Using MicroRNA Signature. *European Urology*. 2011 May 1;59(5):721–30.

Yu X, Li R, Shi W, Jiang T, Wang Y, Li C, et al. Silencing of MicroRNA-21 confers the sensitivity to tamoxifen and fulvestrant by enhancing autophagic cell death through inhibition of the PI3K-AKT-mTOR pathway in breast cancer cells. *Biomed Pharmacother*. 2016 Feb;77:37–44.

Yu Y, Sarkar FH, Majumdar APN. Down-regulation of miR-21 Induces Differentiation of Chemoresistant Colon Cancer Cells and Enhances Susceptibility to Therapeutic Regimens. *Transl Oncol*. 2013 Apr;6(2):180–6.

Yuan Y-R, Pei Y, Ma J-B, Kuryavyi V, Zhadina M, Meister G, et al. Crystal structure of *A. aeolicus* argonaute, a site-specific DNA-guided endoribonuclease, provides insights into RISC-mediated mRNA cleavage. *Mol Cell*. 2005 Aug 5;19(3):405–19.

## Z

Zaman MS, Shahryari V, Deng G, Thamminana S, Saini S, Majid S, et al. Up-regulation of microRNA-21 correlates with lower kidney cancer survival. *PLoS ONE*. 2012;7(2):e31060.

Zeng Y, Cullen BR. Structural requirements for pre-microRNA binding and nuclear export by Exportin 5. *Nucleic Acids Res*. 2004 Jan 1;32(16):4776–85.

Zhang A, Liu Y, Shen Y, Xu Y, Li X. miR-21 modulates cell apoptosis by targeting multiple genes in renal cell carcinoma. *Urology*. 2011 Aug;78(2):474.e13-19.

Zhang H, Guo Y, Shang C, Song Y, Wu B. miR-21 downregulated TCF21 to inhibit KISS1 in renal cancer. *Urology*. 2012 Dec;80(6):1298–1302.e1.

Zhang J, Zhang C, Hu L, He Y, Shi Z, Tang S, et al. Abnormal Expression of miR-21 and miR-95 in Cancer Stem-Like Cells is Associated with Radioresistance of Lung Cancer. *Cancer Invest*. 2015 May;33(5):165–71.

Zhang K, Han L, Chen L, Shi Z, Yang M, Ren Y, et al. Blockage of a miR-21/EGFR regulatory feedback loop augments anti-EGFR therapy in glioblastomas. *Cancer Letters*. 2014 Jan 1;342(1):139–49.

Zhou J, Wang K-C, Wu W, Subramaniam S, Shyy JY-J, Chiu J-J, et al. MicroRNA-21 targets peroxisome proliferators-activated receptor- $\alpha$  in an autoregulatory loop to

modulate flow-induced endothelial inflammation. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2011 Jun 21;108(25):10355–60.

Zhou R, Hu G, Gong A-Y, Chen X-M. Binding of NF-kappaB p65 subunit to the promoter elements is involved in LPS-induced transactivation of miRNA genes in human biliary epithelial cells. *Nucleic Acids Res*. 2010 Jun;38(10):3222–32.

Zhu S, Si M-L, Wu H, Mo Y-Y. MicroRNA-21 targets the tumor suppressor gene tropomyosin 1 (TPM1). *J Biol Chem*. 2007 May 11;282(19):14328–36.

Zhu S, Wu H, Wu F, Nie D, Sheng S, Mo Y-Y. MicroRNA-21 targets tumor suppressor genes in invasion and metastasis. *Cell Res*. 2008 Mar;18(3):350–9.

Zielezinski A, Karlowski WM. Early origin and adaptive evolution of the GW182 protein family, the key component of RNA silencing in animals. *RNA Biol*. 2015;12(7):761–70.

Zini L, Perrotte P, Jeldres C, Capitanio U, Pharand D, Arjane P, et al. Nephrectomy improves the survival of patients with locally advanced renal cell carcinoma. *BJU Int*. 2008 Dec;102(11):1610–4.

Zipprich JT, Bhattacharyya S, Mathys H, Filipowicz W. Importance of the C-terminal domain of the human GW182 protein TNRC6C for translational repression. *RNA*. 2009 May;15(5):781–93.