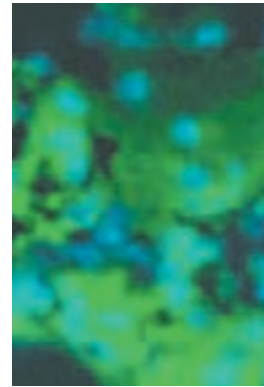


► Les micro-ARN (miARN) sont des petits ARN régulateurs de l'expression génique. De nombreux travaux ont montré leur implication dans des fonctions physiologiques cellulaires essentielles et en particulier dans les tumeurs. Les altérations d'expression de plusieurs miARN pourraient être directement impliquées dans les mécanismes de carcinogenèse, les miARN pouvant agir comme de véritables oncogènes ou gènes suppresseurs de tumeurs. Par ailleurs, les dérégulations d'expression de certains miARN semblent spécifiques de types ou sous-types particuliers de tumeurs suggérant que ces molécules pourraient être utilisées comme de véritables biomarqueurs tumoraux. Cet article fait le point sur les travaux récents concernant le rôle de la dérégulation d'expression des miARN dans les mécanismes de tumorigenèse hépatocellulaire, ainsi que leur possible utilisation en tant qu'outils diagnostiques ou prédictifs du pronostic de ces tumeurs. ◀

Micro-ARN (miARN) et cancer : le cas des tumeurs hépatocellulaires

Yannick Ladeiro, Jessica Zucman-Rossi



Inserm U674, Équipe Génétique des tumeurs hépatiques.
Université Paris Diderot, Génomique fonctionnelle des tumeurs solides,
27, rue Juliette Dodu,
75010 Paris, France.
zucman@cephb.fr

Les miARN, petits ARN régulateurs de l'expression des gènes

Les miARN sont des petits ARN non codants d'environ 22 nucléotides, capables de réguler de façon négative l'expression des ARN messagers (ARNm) ; ils ont été identifiés pour la première fois en 1993 chez *Caenorhabditis elegans* avec la découverte de lin-4, miARN essentiel au développement du nématode (voir pour revue [1, 2]). Chez l'homme, les miARN sont en général transcrits à partir de locus chromosomiques isolés ou regroupés en *clusters* sous la forme d'un transcrit précurseur de plusieurs centaines de nucléotides appelé pri(pour *primary*)-miARN ; cette molécule d'ARN comporte des structures en tige-boucle d'environ 80 nucléotides (pré-miARN, pour *precursor miRNA*) qui sont clivées par l'endonucléase nucléaire Drosha [37] (→). Après l'exportation du pré-miARN dans le cytoplasme par l'exportine-5 et ran-GTP, les précurseurs sont clivés

(→) Voir l'article de Patrice Dunoyer, page 505 de ce numéro

par Dicer en un miARN mature de 19 à 23 nucléotides. Le miARN mature est ensuite pris en charge par le complexe protéique RISC (*RNA-induced silencing complex*). Cette association permet l'appariement du miARN à un ARNm cible puis l'induction, suivant la complémentarité des deux molécules, d'une inhibition de la traduction et/ou d'une déstabilisation de l'ARN messenger. La petite taille du miARN et la présence de mésappariements entre les séquences du miARN et celles de l'ARNm cible expliquent qu'un miARN peut reconnaître plusieurs ARNm et *vice versa*, un ARNm peut être reconnu par plusieurs miARN. Ainsi, ces différentes combinaisons d'appariement attestent d'un mécanisme très fin de régulation de l'expression des gènes.

miARN et cancer

Récemment, les rôles des miARN commencent à être élucidés, en particulier dans le contrôle de grandes fonctions physiopathologiques comme le développement, la différenciation cellulaire, l'inflammation ou la réponse immunitaire. En 2002, l'équipe de Carlo Croce a proposé pour la première fois un lien causal entre l'altération de l'expression de miARN et l'émergence d'un processus de tumorigenèse chez l'homme. Les auteurs ont observé un défaut d'expression de 2 miARN, miR-15a et miR-16-1, dans la majorité des leucémies lymphoïdes chroniques (LLC). Ce *cluster* est localisé dans la région chromosomique 13q14.3, qui est perdue

de manière hétérozygote ou homozygote dans plus de la moitié des LLC [3]. Le rôle de miR-15a et miR-16-1 dans la leucémogénèse a été élucidé par la découverte que le gène anti-apoptotique *BCL2* était une de leurs cibles directes dans les cellules leucémiques [4]. En accord avec ses propriétés onco-suppressives, miR-16-1 a été identifié comme un régulateur négatif de la croissance cellulaire et de la progression dans le cycle cellulaire [5, 36].

Les miARN peuvent être soumis aux mêmes altérations que des oncogènes ou des suppresseurs de tumeur classiques (amplifications, translocations, délétions, mutations), mais leur expression est le plus souvent globalement réprimée dans les tissus tumoraux [6]. L'analyse fonctionnelle des conséquences de la dérégulation d'expression de miARN sur le contrôle du cycle cellulaire ou la prolifération a permis de proposer de véritables fonctions de suppresseur de tumeur pour plusieurs d'entre eux comme miR-145 ou la famille let-7 qui régulent les oncogènes de la famille RAS (voir pour revue [2, 7]). Inversement, des fonctions oncogéniques ont été proposées pour des miARN surexprimés dans les tumeurs comme le cluster miR-17-92 et miR-21 qui contrôle l'expression des suppresseurs de tumeur *PTEN* (*phosphatase and tensin homolog*) et *TMP1* (*thymidylate synthase*), ou miR-155 qui régule *RhoA* [2, 7]. Ces observations soulignent l'importance du rôle des altérations de l'expression des miARN dans les mécanismes de carcinogénèse, contribuant ainsi à l'accumulation des altérations génétiques et épigénétiques essentielles aux étapes d'initiation et de progression tumorales.

Ces dernières années, l'analyse de l'expression d'un grand nombre de miARN dans des tumeurs humaines a permis d'identifier des profils d'expression spécifiques des tissus tumoraux et non tumoraux de même origine [6, 8]. De plus, ces études globales ont aussi permis l'identification de profils d'expression de miARN spécifiques de sous-types tumoraux définis par des phénotypes ou des génotypes particuliers [6, 9]. Enfin, plusieurs miARN surexprimés (miR-10b, miR-373 et miR-21) ou sous-exprimés (let-7, miR-335 et miR-126) de manière récurrente dans les tumeurs ont été identifiés comme contribuant significativement au phénotype métastatique (pour revue, voir [10]). Ces observations devront être complétées et confirmées par l'analyse d'un très grand nombre de tumeurs, mais elles suggèrent dès à présent l'intérêt de l'utilisation de l'expression des miARN ; ceux-ci pourraient s'avérer être des biomarqueurs utiles pour affiner les classifications moléculaires des tumeurs, mais aussi comme marqueurs pronostiques. La robustesse de ces signatures, qui peuvent être obtenues à partir de prélèvements tissulaires fixés, permettant donc un typage de ces marqueurs dans la plupart des situations cliniques, ne fait que renforcer leur intérêt [11].

Les tumeurs hépatocellulaires : une grande diversité de lésions

Parmi les tumeurs hépatocellulaires secondaires à la prolifération des hépatocytes, on distingue les tumeurs bénignes et les tumeurs malignes.

• *Les tumeurs hépatocellulaires bénignes* sont le plus souvent découvertes chez des femmes. Elles comprennent les hyperplasies nodulaires

focales, proliférations hépatocellulaires fréquentes, le plus souvent polyclonales, secondaires à des malformations vasculaires et caractérisées par une activation de la voie β -caténine [12]. À l'inverse, les adénomes hépatocellulaires (AHC) sont des tumeurs rares, monoclonales, dont le principal facteur de risque est la prise de contraception orale. Les AHC peuvent être classés en fonction de leur génotype : mutation inactivatrice d'*HNF1 α* (*human hepatocyte nuclear factor 1 α*) dans 30-45 % des cas [13], mutation activatrice de la β -caténine (15-19 % des AHC) [14] ou mutation inactivatrice de *gp130* qu'accompagne la présence d'un infiltrat inflammatoire (30-35 % des cas) [15-17].

• *Les tumeurs hépatocellulaires malignes* sont essentiellement représentées par les carcinomes hépatocellulaires (CHC) qui touchent préférentiellement les hommes porteurs d'une cirrhose. Parmi les principaux facteurs de risques, on trouve l'infection par les virus de l'hépatite B (VHB) ou C (VHC), la consommation excessive d'alcool, des maladies génétiques comme l'hémochromatose ou l'exposition à des génotoxiques (aflatoxine B1). Pendant les étapes préneoplasiques, les hépatocytes accumulent successivement de nombreuses altérations génétiques (les mutations de *TP53* et de la β -caténine étant les plus fréquentes) et épigénétiques (nombreuses méthylations de promoteurs) qui contribuent à la transformation maligne. Récemment, l'analyse transcriptomique globale de CHC a permis de proposer une classification moléculaire de ces tumeurs étroitement liée à leurs caractéristiques cliniques et génétiques [18].

Expression des miARN dans les tumeurs hépatocellulaires bénignes

Dans un travail récent, nous avons analysé l'expression de 250 miARN par RT-PCR quantitative dans une série de 18 tumeurs bénignes (13 AHC et 5 hyperplasies nodulaires focales), 28 CHC, et 4 échantillons de foies normaux. Une analyse non supervisée de ces données d'expression a montré des profils d'expression de miARN très différents dans les tumeurs bénignes, les CHC et les foies normaux. Deux miARN, miR-200c et miR-203, sont sous-exprimés de manière significative dans toutes les tumeurs bénignes étudiées, non seulement par rapport aux tissus normaux mais aussi par rapport aux carcinomes (données validées dans une deuxième série de tumeurs). De plus, nous avons identifié une sous-expression de certains miARN spécifiquement dans deux des principaux sous-types d'AHC. (1) miR-107 est sous-exprimé dans les AHC caractérisés par des mutations inactivatrices d'*HNF1 α* ; dans un système cellulaire nous avons montré que l'expression de miR-107 était sous le contrôle de



l'expression du facteur de transcription HNF1 α . (2) miR-375 est sous-exprimé dans les AHC ayant une mutation activatrice de la β -caténine ; il existe une corrélation négative forte entre l'expression de miR-375 et celle des gènes cibles de la β -caténine, ce qui suggère une répression de l'expression de miR-375 par cet oncogène [19].

Expression des miARN dans les lésions prénéoplasiques

Dans plus de 90 % des cas, le CHC se développe sur un terrain cirrhotique. L'analyse de tissu hépatique de patients cirrhotiques permet donc d'étudier les étapes très précoces de la carcinogenèse. Jiang *et al* ont observé une surexpression significative mais modeste d'au moins une vingtaine de miARN dans des cirrhoses d'origine virale B ou C chez des patients présentant un CHC [20]. Par analogie avec les dérégulations d'expression de miARN observées dans différents systèmes cellulaires soumis à des stress métaboliques, la surexpression de miR-22, miR-182b, miR-198, miR-221, et miR-222 dans les cirrhoses d'origine virale pourrait être liée à la réponse cellulaire au stress. Dans leur étude, Varnholt *et al* ont analysé l'expression de 80 miARN chez des patients présentant un CHC associé à une infection chronique par le VHC [21]. Ils ont montré que les dérégulations d'expression de miARN observées dans les CHC étaient déjà toutes présentes dans les nodules cirrhotiques dysplasiques prénéoplasiques et à un moins grand degré aussi ; ces résultats suggèrent que l'altération d'expression des miARN est un événement survenant précocement au cours de la tumorigenèse. Ainsi, l'analyse de l'expression des miARN semble pouvoir être utilisée comme marqueur précoce d'initiation et de progression de la tumorigenèse.

Altérations de l'expression des miARN dans les CHC

Depuis 2005, une dizaine d'études globales de l'expression des miARN dans les CHC a été publiée (Tableau 1) [19-28]. Varnholt *et al.* ont montré dans une méta-analyse récente que les résultats de ces différentes études étaient assez peu concordants [29]. La variabilité des résultats obtenus peut être en grande partie expliquée par les différences d'échantillonnage des tumeurs (en particulier concernant les facteurs de risques de CHC), le nombre relativement petit de tumeurs analysées dans chaque étude, l'expression des résultats obtenus dans les tumeurs, qui peut être comparée à ceux obtenus dans du tissu hépatique sain ou dans du foie non tumoral, qui sont très hétérogènes par nature (en particulier selon qu'il existe ou non une cirrhose) ; enfin, les méthodes de quantification (PCR quantitative, *microarray*, *Northern blot*) et d'analyse statistique utilisées sont très variables. Cependant, malgré l'hétérogénéité de ces travaux, quelques miARN semblent dérégulés de façon récurrente dans les CHC (Figure 1).

Faible expression de plusieurs miARN dans les CHC

Une expression faible de miR-122, miR-125a, miR-130a, miR-139, miR-145, miR-150, miR-199a, miR-200b, miR-214 et miR-223 dans les CHC est répertoriée de manière récurrente dans la littérature. Un des cas les plus intéressants est celui de miR-122 [30]. Ce miARN représente à lui seul 70 % de l'expression des miARN du foie ; essentiel

au fonctionnement hépatique, il est sous-exprimé dans la majorité des CHC. Récemment, une de ses cibles impliquée dans la régulation du cycle cellulaire, la cycline G1, a été validée expérimentalement dans un modèle cellulaire d'hépatocytes [25]. Par ailleurs, l'observation d'une sous-expression de miR-122 à la fois dans les CHC et les tumeurs bénignes suggère que la dérégulation de miR-122 serait liée à des événements précoces de tumorigenèse [19]. Enfin, l'expression de miR-122 semble essentielle à la réplication et au maintien du VHC dans l'hépatocyte [31]. Cette observation pourrait expliquer la surexpression de miR-122 spécifiquement observée dans les CHC liés à l'infection virale C [21]. De manière intéressante, Varnholt *et al* ont montré que la sous expression de miR-145 était corrélée au degré de différenciation des CHC [21]. Outre le fait que des gènes impliqués dans la carcinogenèse pourraient faire partie de ses cibles hypothétiques, miR-145 est aussi sous-exprimé dans d'autres types de tumeurs, suggérant un rôle général dans l'initiation et/ou la progression tumorale.

Surexpression de miARN dans les CHC

Les données de la littérature indiquent une surexpression récurrente de let-7a, miR-21, miR-106b, miR-221, miR-222, miR-224, miR-301 et miR-93 dans les CHC. La surexpression de miR-21 est aussi un événement fréquent dans d'autres tumeurs malignes. Des arguments expérimentaux ont démontré que miR-21 contrôlait plusieurs suppresseurs de tumeurs dont PDCD4 (*programmed cell death protein 4*) [32]. Dans les CHC, il participerait aussi à la sous-expression de PTEN. De plus, une surexpression importante de miR-21 a été observée dans les CHC les plus faiblement différenciés [24]. La surexpression de miR-221 et miR-222 est elle aussi souvent détectée dans les tumeurs humaines et, dans les CHC, miR-222 est associé à un mauvais pronostic [20]. Enfin, récemment, p27Kip1, impliqué dans la régulation du cycle cellulaire, a été validé comme étant une cible de miR-222 dans des modèles expérimentaux de plusieurs cancers dont celui de la prostate [33].

Corrélation entre l'expression de miARN et des caractéristiques génétiques, cliniques ou des facteurs de risque dans les CHC

Comme c'est le cas dans les adénomes, l'expression de miR-375 est diminuée dans les CHC ayant une mutation de la β -caténine par rapport à l'expression observée dans les tumeurs non mutées [19]. Une forte corrélation négative entre l'expression de ce miARN et celle des gènes cibles directs de la β -caténine activée est aussi identifiée. Une expression particulière de certains miARN

Études	Techniques	Nombre de CHC analysés	Facteurs de risque associés aux CHC	Nombre de miARN testés	Échantillons de référence	miARN sous-exprimés dans les CHC	miARN sur-exprimés dans les CHC
Murakami et al. [22]	MA NB	25	Mixte	180	FNT (prédominance de cirrhose)	miR-18, <u>125a</u> , 195, <u>199a</u> , 199b, 200a	<u>miR-224</u>
Kutay et al. [23]	MA NB	20	Pas d'information	85	FNT (cirrhose ou non)	<u>miR-122a</u> , 123, 215	<u>let-7a</u> , miR-20, <u>21</u> , 23a, 23b, 24, <u>93</u> , 99b, 101b, 103, 106a, <u>106b</u> , 130, 172, 219, 320, 328
Meng et al. [24]	MA NB RT- PCRq	20	Pas d'information	206	FN	miR-92, <u>122a</u> , <u>125a</u> , 125b, 292	miR-21, 34a, 210, 213, <u>222</u> , 294, 373, 376a
Gramantieri et al. [25]	MA NB RT- PCRq	60	Mixte	238	FNT (cirrhose)	miR-124a, <u>130a</u> , 136, 141, 142, 143, <u>145</u> , <u>150</u> , 181a, 195, <u>199a</u> , <u>200b</u> , <u>214</u> , <u>223</u>	<u>miR-221</u>
Huang et al. [26]	MA NB	10	Non associés au VHB ou au VHC	331	FNT	miR-235	<u>let-7a</u> , let-7b, let-7g, let-7i, <u>miR-21</u> , 22, 98, 126, 195, 352
Wang et al. [27]	RT- PCRq	19	Pas d'information	157	FNT	miR- <u>139</u> , <u>145</u> , <u>214</u>	miR-9, <u>21</u> , 25, 96, 137, 151, 155, 182, 183, 186, 216, <u>221</u> , <u>222</u> , <u>224</u> , <u>301</u> , <u>324</u> , 374
Jiang et al. [20]	RT- PCRq	54	Mixte	196	FNT (cirrhose ou non)	miR-101, <u>139</u> , <u>150</u> , <u>199a</u> , <u>200b</u> , <u>214</u> , <u>223</u>	miR-18, <u>21</u> , 33, 130b, 135a, <u>221</u> , <u>301</u>
Varnholt et al. [21]	RT- PCRq	52	VHC	80	FN	miR-9, 29c, 95, 104, 137, <u>145</u> , 147, 159a, 185, 198, 199b, 204, 218, 302b, 368	miR-9a, 10a, <u>15a</u> , 16, <u>21</u> , 100, 122a, 125b, 299, 326, 370
Ladeiro et al. [19]	RT- PCRq	55	Mixte	250	FN et FNT cirrhotique ou non	miR- <u>122a</u> , <u>199a</u> , 422b	miR-10b, <u>21</u> , <u>222</u> , <u>224</u>
Connolly et al. [28]	Clonage Séquençage RT-PCRq	23	VHB	-	FN	Let-7a, miR-22, 99a, <u>122a</u> , 126, <u>130a</u>	miR- <u>15a</u> , 17, 18a, 19b, 20a, <u>21</u> , 27a, 92, <u>93</u> , <u>106b</u> , 148a, <u>324</u>

Tableau 1. Comparaison des différentes études de profilage d'expression des miARN dans les CHC. MA : microarray ; NB : Northern blot ; RT-PCR quantitative : RT-PCRq ; FNT : foie non tumoral adjacent ; FN : foie normal ; miARN soulignés : miARN communs à au moins 2 études ; VHB : virus de l'hépatite B ; VHC : virus de l'hépatite C.

est aussi associée à des facteurs de risque : une surexpression de miR-96 a été identifiée dans des CHC liés à l'infection par le VHB, ce qui n'est pas le cas dans les tissus hépatiques non tumoraux infectés par le VHB, suggérant un lien entre la surexpression de miR-96 et le processus de carcinogenèse spécifique à l'infection par ce virus. Autre exemple, nous avons observé une diminution de l'expression de miR-126*¹ dans les CHC associés à la consommation excessive d'alcool. Cette dérégulation n'est pas retrouvée dans les cirrhoses d'origine alcoolique, suggérant également son association préférentielle au processus de carcinogenèse spécifique à ce facteur de risque [19]. Récemment, Liu *et al.* ont identifié une surexpression de miR-18a spécifiquement dans des CHC développés chez des femmes. Cette observation est intéressante car les auteurs ont montré que miR-18a régule l'expression du récepteur α des œstrogènes (ER α) bloquant l'effet potentiellement protecteur des œstrogènes [34]. Ainsi, il pourrait contribuer à expliquer la faible incidence des CHC chez la femme par l'action des œstrogènes [34]. Enfin, Budhu *et al.* ont récemment identifié une vingtaine de miARN dont l'expression est associée au potentiel métastatique des CHC [35].

Conclusion

L'étude de l'expression des miARN apporte de nouvelles informations pour la compréhension des mécanismes de carcinogenèse hépatique. Des profils de dérégulation et d'expression de miARN semblent spécifiques à des sous-groupes de tumeurs, en particulier lorsqu'elles sont associées à des caractéristiques cliniques, génétiques,

phénotypiques et des facteurs de risque particuliers. Afin de mieux comprendre le rôle oncogénique ou supprimeur de tumeur des miARN, il est très important d'identifier leurs gènes cibles potentiellement impliqués dans la prolifération cellulaire et ce domaine est en pleine émergence. Par ailleurs, ces mêmes miARN peuvent être sous le contrôle d'oncogènes et/ou de gènes suppresseurs de tumeurs classiques et participer au réseau complexe de contrôle de l'expression des gènes. Enfin, ces petits ARN non codants constituent des outils particulièrement prometteurs pour le développement de nouveaux marqueurs diagnostiques et pronostiques. \diamond

SUMMARY

miRNAs in cancer: the case of liver tumors

Micro RNAs (miRNAs) are small non-coding RNAs that regulate gene expression. Many studies show that they are implicated in essential physiological functions and particularly in tumors. Specific alterations of miRNA expression have been identified directly involved in carcinogenesis. Indeed, miRNAs could act as oncogenes or tumor suppressors. In addition, some miRNAs deregulations seem to be associated to specific tumors subtypes, suggesting that they could be used as tumor biomarkers. In this review, we summarize recent works about miRNAs and hepatocellular tumorigenesis in order to understand the role of these

small non-coding RNAs in the carcinogenesis process and their possible use as diagnostic and prognostic markers of these tumors. \diamond

REMERCIEMENTS

Ce travail a bénéficié de financements de l'ANRS, l'Inserm (réseaux de recherche clinique et réseaux de recherche en santé des populations), et de la Ligue nationale contre le cancer. Y.L. est financé par une bourse de l'ANRS.

Figure 1. miARN dérégulés de manière récurrente dans les tumeurs hépatocellulaires [19-28]. Les miARN dont l'expression est altérée de façon similaire dans au moins 2 études ou plus sont soulignés. L'expression des miARN est associée à des caractéristiques cliniques, génétiques, phénotypiques et des facteurs de risque particuliers de ces tumeurs. \uparrow : sur-expression dans la tumeur ; \downarrow : sous-expression dans la tumeur ; CHC : carcinome hépatocellulaire ; AHC : adénome hépatocellulaire ; VHB : virus de l'hépatite B.

¹ L'astérisque indique le brin concerné par la forme mature du miR (nomenclature officielle).

