



# ***Etude de l'implication des miARNs dans le cancer du sein basal-like et la régulation de BRCA1***

---

**Insaf FKIH M'HAMED**  
fkihinsaf@yahoo.com

Laboratoire d'Oncologie Moléculaire  
Centre Jean Perrin  
Clermont-Ferrand FRANCE  
Pr. Yves-Jean BIGNON  
Dr. Maud PRIVAT

Laboratoire de Biochimie, UR  
"Mécanismes Moléculaires et Pathologies"  
Faculté de Médecine de Monastir TUNISIE  
Pr. Abderraouf KENANI

# ***PLAN***

## ❖ État de l'Art

- Définition des cancers du sein Basal-like:
  - Classification moléculaire des cancers du sein
  - Description clinico-pathologique
  
- BRCA1
  
- miARN

## ❖ Matériel & Méthodes et Résultats

## ❖ Discussion et Conclusion

## ❖ Perspectives

# **PLAN**

## ❖ État de l'Art

- Définition des cancers du sein Basal-like:
  - Classification moléculaire des cancers du sein
  - Description clinico-pathologique
  
- BRCA1
  
- miARN

## ❖ Matériel & Méthodes et Résultats

## ❖ Discussion et Conclusion

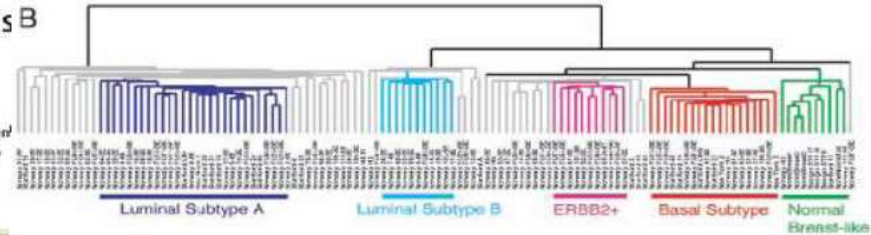
## ❖ Perspectives

# Classification Moléculaire des Cancers du Sein

Gene expression patterns of breast carcinomas<sup>B</sup> distinguish tumor subclasses with clinical implications

Therese Sorlie<sup>a,b</sup>, Charles M. Perou<sup>a,c</sup>, Robert Tibshirani<sup>d</sup>, Turid Aas<sup>e</sup>, Stephanie Geisler<sup>f</sup>, Hilde Johnsen<sup>g</sup>, Michael B. Eisen<sup>h</sup>, Matt van de Rijn<sup>i</sup>, Stefanie S. Jeffrey<sup>j</sup>, Thor Thorsen<sup>k</sup>, Hanne Quist<sup>l</sup>, John C. Matese<sup>c</sup>, Patrick O. Brown<sup>m</sup>, David Botstein<sup>n</sup>, Per Eystein Lønning<sup>o</sup>, and Anne-Lise Borresen-Dale<sup>b,n</sup>

PNAS | September 11, 2001 | vol. 98 | no. 19 | 10869-10874



## Classification Intrinsèque

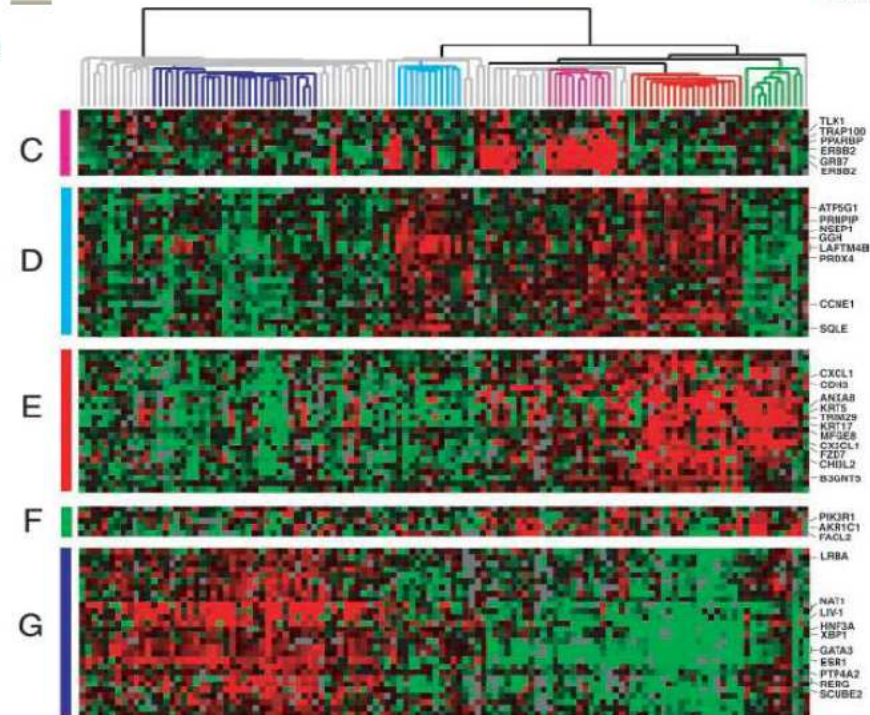
1. Luminal A

2. Luminal B

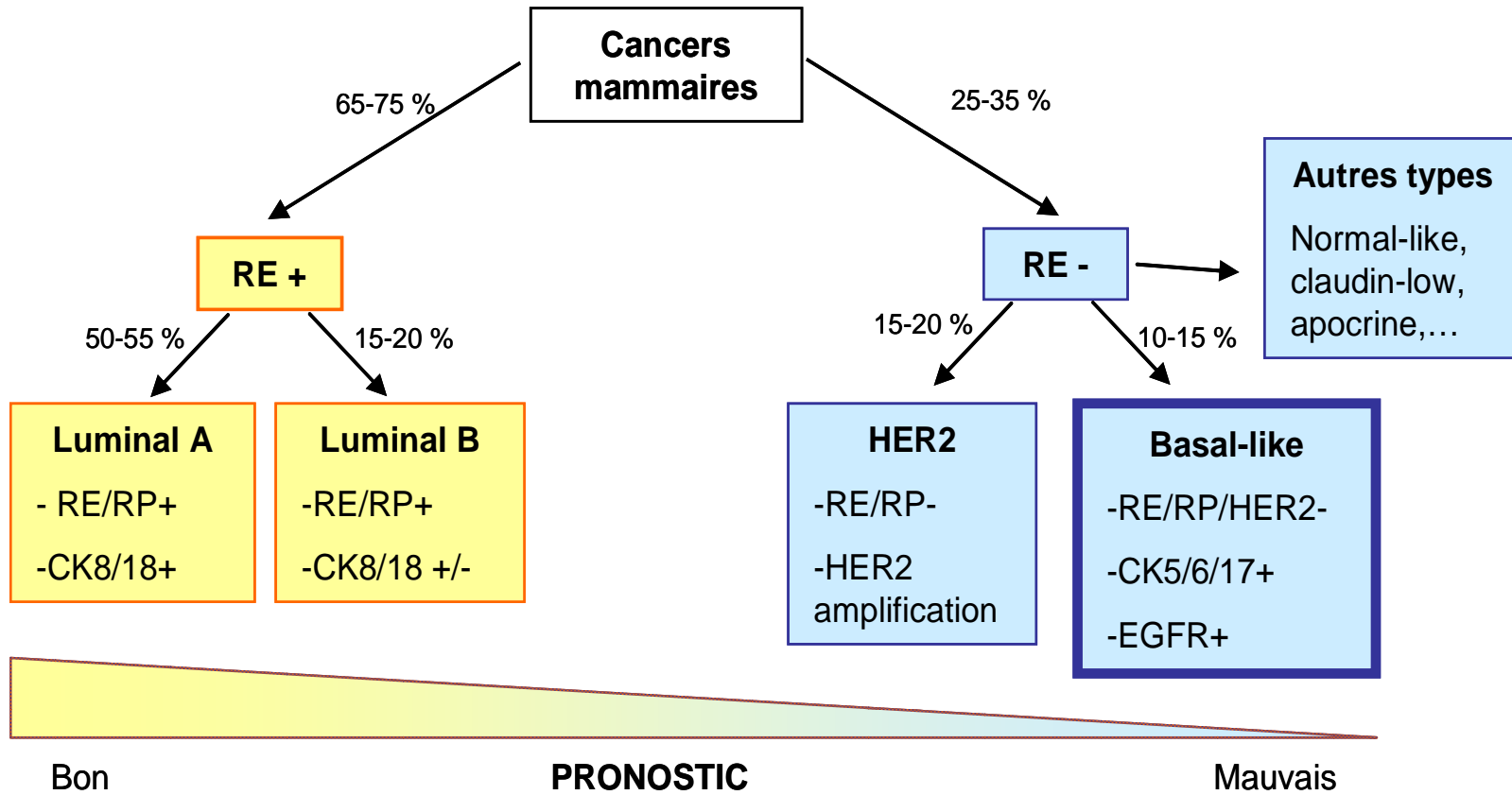
3. Her2

4. Basal

5. Normal breast like



## Classification Moléculaire des Cancers du Sein



D'après Mev Dominguez Valentin et al., 2012

# ***PLAN***

## ❖ **État de l'Art**

- Définition des cancers du sein Basal-like:
  - Classification moléculaire des cancers du sein
  - Description clinico-pathologique
  
- BRCA1
  
- miARN

## ❖ Matériel & Méthodes et Résultats

## ❖ Discussion et Conclusion

## ❖ Perspectives

## ***Description clinico-pathologique***

---

- ✓ Incidence: 10 à 15 % des cancers du sein sont Basal like
- ✓ Survient souvent chez les femmes jeunes <50 ans
- ✓ Forte agressivité clinique
- ✓ Carence en cibles thérapeutiques
- ✓ Grade histologique élevé
- ✓ Index mitotique élevé
- ✓ Infiltration Lymphocytaire importante
- ✓ Indice de marquage Ki-67 élevé
- ✓ Mutations du gène p53

# ***PLAN***

## ❖ **État de l'Art**

- Définition des cancers du sein Basal-like:
  - Classification moléculaire des cancers du sein
  - Description clinico-pathologique
  
- **BRCA1**
  
- miARN

## ❖ Matériel & Méthodes et Résultats

## ❖ Discussion et Conclusion

## ❖ Perspectives

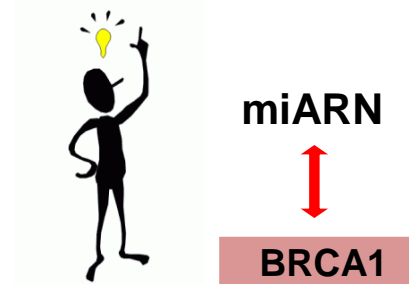


## **BRCA1 / TNBC**

- **BRCA1: BREAST CANCER 1 GENE**
- Localisation Cytogénétique: **17q21.31**
- *BRCA1* = un gène suppresseur de tumeur
- Multiples rôles:
  - Réparation des cassures double brin de l'ADN par recombinaison homologue
  - Ubiquitination
  - Contrôle du centrosome
  - Transcription
  - Cycle cellulaire
- TNBC (triple negative breast cancer) : forte proportion altération du gène *BRCA1*  
  
Par mutation germinale pour le cancer du sein familial

## **BRCA1 / TNBC sporadiques**

- *BRCA1* est fréquemment inactivé au niveau transcriptionnel  
= une inactivation somatique par :
  - méthylation du promoteur de *BRCA1*
  - inhibition de son promoteur par une protéine telle que ID4
- Plus récemment cette extinction de *BRCA1* pouvait être liée à une régulation post-transcriptionnelle par des micro-ARN.



# ***PLAN***

## ❖ **État de l'Art**

- Définition des cancers du sein Basal-like:
  - Classification moléculaire des cancers du sein
  - Description clinico-pathologique
  
- BRCA1
  
- **miARN**

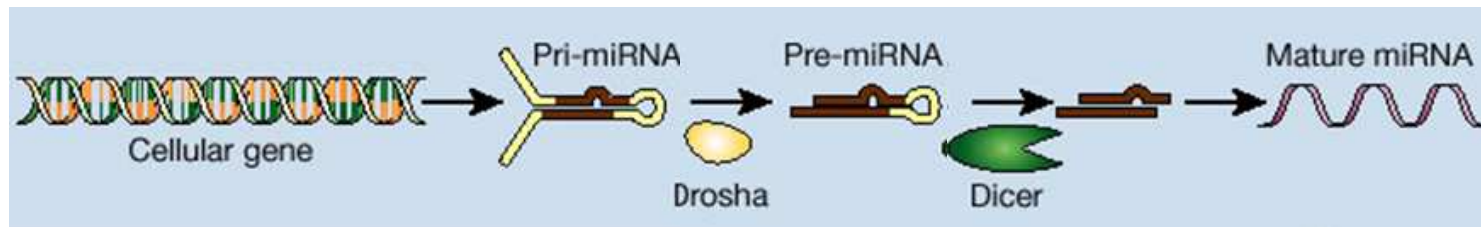
## ❖ Matériel & Méthodes et Résultats

## ❖ Discussion et Conclusion

## ❖ Perspectives

## *miARN: microARN*

- 21-25 nt
- Étant exclusivement produits de façon endogène
- Issus d'ARN double brin se repliant en tige-boucle (pré-miRNAs)
- Appariement dans la tige est en général imparfait
- Impliqués dans le contrôle post-transcriptionnel de gènes autres que les loci les produisant.



# miARN / cancer du sein

O'Day and Lal *Breast Cancer Research* 2010, 12:201  
<http://breast-cancer-research.com/content/12/2/201>



REVIEW

MicroRNAs and their target gene networks in breast cancer

Elizabeth O'Day and Ashish Lal\*



Tumor suppressor BRCA1 epigenetically regulates oncogenic microRNA-155

Suhwan Chang<sup>1</sup>, Rui-Hong Wang<sup>2</sup>, Keiko Akagi<sup>3</sup>, Kyung-Ae Lee<sup>4</sup>, Kathleen Cunningham<sup>5</sup>, Kathleen Cunningham Foundation Consortium for Research into Breast Cancer<sup>6</sup>, Diana C Haines<sup>8</sup>, Mark Basik<sup>5</sup>, Phuong Mai<sup>9</sup>, Elizabeth Poggendorf<sup>10</sup>, Mark H Greene<sup>9</sup>, Stephen W Byers<sup>10</sup>, Soo H Teo<sup>12,13</sup>, Chu-Xia Deng<sup>11</sup>

Journal of Pathology

*J Pathol* 2008; **215**: 214–221

Published online 14 April 2008 in Wiley InterScience  
([www.interscience.wiley.com](http://www.interscience.wiley.com)) DOI: 10.1002/path.2359

Review Article

## Small is beautiful: microRNAs and breast cancer — where are we now?

ET Vergheese,<sup>1,2\*</sup> AM Hanby,<sup>1,2</sup> V Speirs<sup>2</sup> and TA Hughes<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Leeds Teaching Hospital NHS Trust, UK

<sup>2</sup>Leeds Institute of Molecular Medicine, University of Leeds, UK

available at [www.sciencedirect.com](http://www.sciencedirect.com)

ScienceDirect

Molecular  
Oncology



1875-2875/\$ - see front matter © 2010 Elsevier B.V. All rights reserved.

miRNAs and their target gene networks in breast cancer

Elizabeth O'Day<sup>a</sup>, Luca Braccioli<sup>b</sup>, Patrizia Casalini<sup>b</sup>, Maria Plantamura<sup>b</sup>, Tiziana Triulzi<sup>b</sup>, Carlo M. Croce<sup>a,\*</sup>



Open Access

miRNA expression profiling in tumor models identifies miRNAs associated with mammary carcinoma

Min Zhu<sup>1</sup>, Ming Yi<sup>2</sup>, Chang Hee Kim<sup>3</sup>, Chuxia Deng<sup>4</sup>, Yi Li<sup>5</sup>, Daniel Medina<sup>6</sup>, Robert M Stephens<sup>2</sup> and Jeffrey E Green<sup>1\*</sup>

# **PLAN**

## ❖ État de l'Art

- Définition des cancers du sein Basal-like:
  - Classification moléculaire des cancers du sein
  - Définition phénotypique
  - Description clinico-pathologique
- BRCA1
- miARN

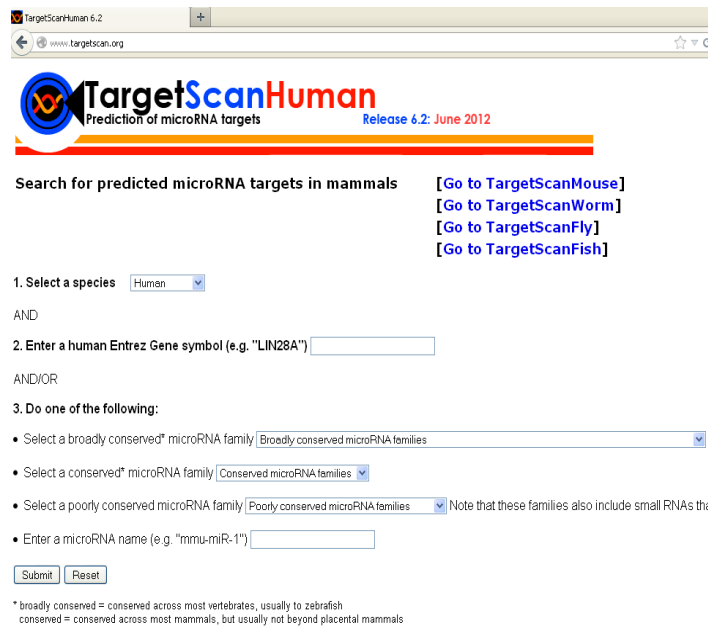
## ❖ Matériel & Méthodes et Résultats

## ❖ Discussion et Conclusion

## ❖ Perspectives

# Algorithmes pour la Sélection des miARNs

Selectionner les miARN pouvant cibler le 3'UTR de BRCA1



TargetScanHuman 6.2  
www.targetscan.org

**TargetScanHuman**  
Prediction of microRNA targets  
Release 6.2: June 2012

Search for predicted microRNA targets in mammals

[Go to TargetScanMouse]  
[Go to TargetScanWorm]  
[Go to TargetScanFly]  
[Go to TargetScanFish]

1. Select a species:

AND

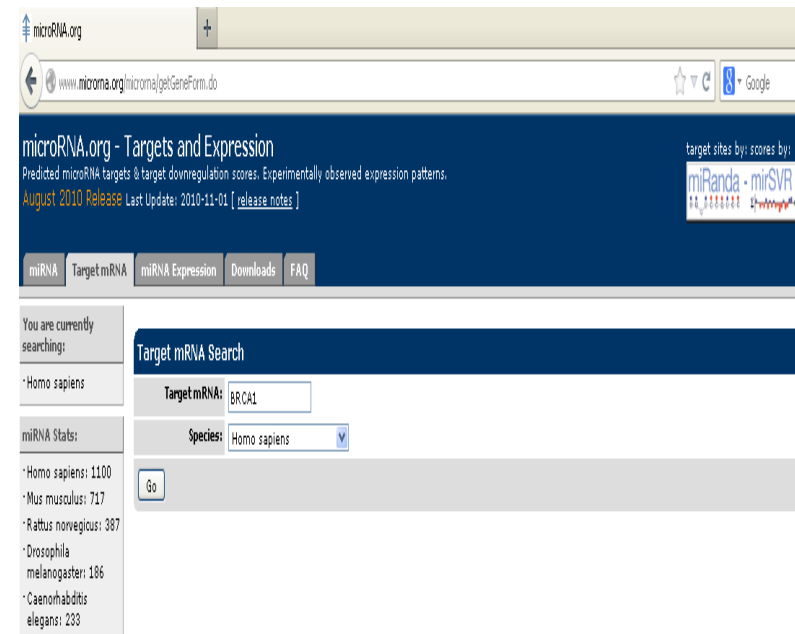
2. Enter a human Entrez Gene symbol (e.g. "LIN28A")

AND/OR

3. Do one of the following:

- Select a broadly conserved\* microRNA family:
- Select a conserved\* microRNA family:
- Select a poorly conserved microRNA family:  Note that these families also include small RNAs that
- Enter a microRNA name (e.g. "mmu-miR-1")

\* broadly conserved = conserved across most vertebrates, usually to zebrafish  
conserved = conserved across most mammals, but usually not beyond placental mammals



microRNA.org  
www.microrna.org/microna/getGeneForm.do

microRNA.org - Targets and Expression  
Predicted microRNA targets & target downregulation scores. Experimentally observed expression patterns.  
August 2010 Release Last Update: 2010-11-01 [release notes]

target sites by: scores by: miRanda · mirSVR

miRNA Target mRNA miRNA Expression Downloads FAQ

You are currently searching:

Homo sapiens

miRNA Stats:

- Homo sapiens: 1100
- Mus musculus: 717
- Rattus norvegicus: 387
- Drosophila melanogaster: 186
- Caenorhabditis elegans: 233

Target mRNA Search

Target mRNA:

Species:

## Algorithmes pour la Sélection des miARNs

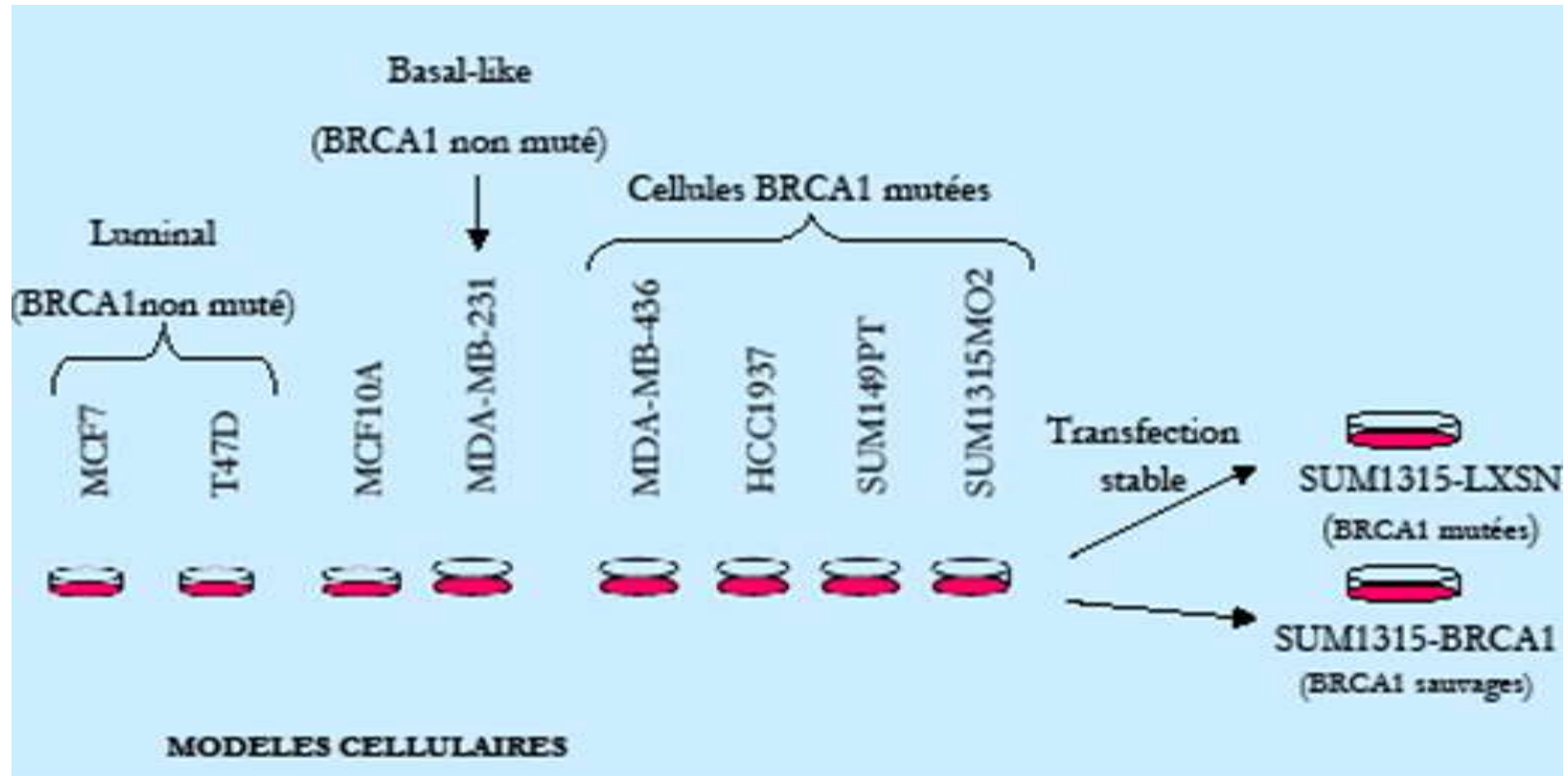
	A	B	C	D	E	F	G
1	Algorithmes	Miranda (2008)	Microcosm Targets (2008)	Pictar (2005)	Tarbase (2009)	TargescanHuman6.1 (2012)	Article Amandine et al. 2011
2	miARNs					Mammaires	
3	hsa-miR-			30a-3p		105	7
4	hsa-miR-		17	132	16	122/123a	8
5	hsa-miR-	1		140	21	125a-3p	15
6	hsa-miR-	125a-3p	28	143	24	129-5p/129ab-5p	16
7	hsa-miR-	132	32	154	192	132	17-5p
8	hsa-miR-	141	92	186	212	150	132
9	hsa-miR-	153	99*	197	335	153	146a
10	hsa-miR-	186	122	205	146a	186	146b-5p
11	hsa-miR-	190	146	370	15a	197	149
12	hsa-miR-	206	153		193b	224	194
13	hsa-miR-	212	187			294	199
14	hsa-miR-	218	200			296	212
15	hsa-miR-	224	220			302	324-3p
16	hsa-miR-	543	224			313	378
17	hsa-miR-	513	333			372	526
18	hsa-miR-	146a	367			373	
19	hsa-miR-	146b-5p	373			411	
20	hsa-miR-	190b	378			427	
21	hsa-miR-	200a	464			428	
22	hsa-miR-	216b	516			448	
23	hsa-miR-		518			708	
24	hsa-miR-		526			768	
25	hsa-miR-		540			1297	
26	hsa-miR-		701			1376	
27	hsa-miR-		760			1407	
28	hsa-miR-		125*			1653	
29	hsa-miR-		143*			4465	
30	hsa-miR-		20*			6127	
31	hsa-miR-					106a	
32	hsa-miR-					106ab	
33	hsa-miR-					Vertebres	
34	hsa-miR-					1420ac	
35	hsa-miR-					146ac/146-5p	
36	hsa-miR-					17 / 17-5p	
37	hsa-miR-					199ab-5p	
38	hsa-miR-					205/205ab	
39	hsa-miR-					212/212-3p	
40	hsa-miR-					216b/216b-5p	
41	hsa-miR-					218/218a	
42	hsa-miR-					24/24ab/24-3p	
43	hsa-miR-					26ab	
44	hsa-miR-					28-5p	
45	hsa-miR-					291a-3p	
46	hsa-miR-					448-3p	
47	hsa-miR-					518a-3p	
48	hsa-miR-					518a-3p	
49	hsa-miR-					519a	
50	hsa-miR-					519d	
51	hsa-miR-					520acd-3p	
52	hsa-miR-					520bc	
53	hsa-miR-					590-3p	
54	hsa-miR-					77ab	
55						93ab	
56						93/93a	

**Choisir les miARN qui sont en commun entre au moins 2 algorithmes:**

- hsa-miR-153
- hsa-miR-146a
- hsa-miR-146b-5p
- hsa-miR-132
- hsa-miR-212



# Culture Cellulaire



## **qRT-PCR**

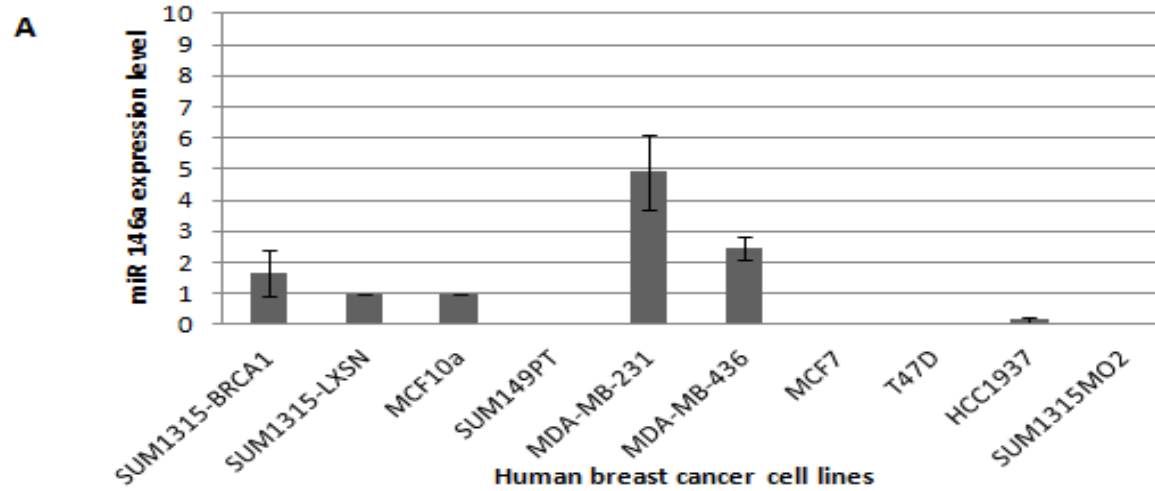
- Extraction d'ARN à partir des cellules en culture  
(kit Qiagen : miRNeasy mini kit)

Dosage d'ARN par Spectrophotomètre

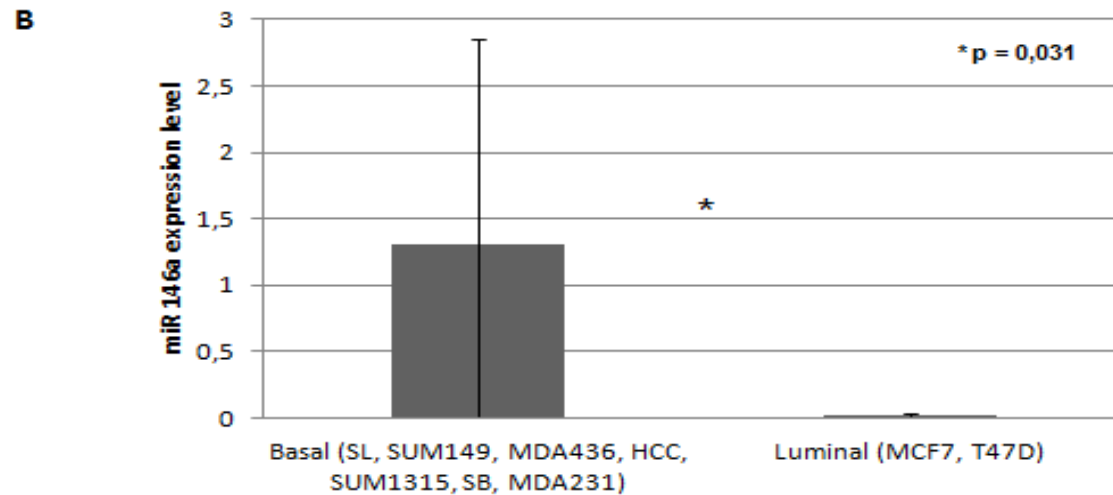
Analyse de la qualité d'ARN par Bioanalyseur 2100 Agilent

- Profilage de 5 miRs sélectionnés par qRT-PCR

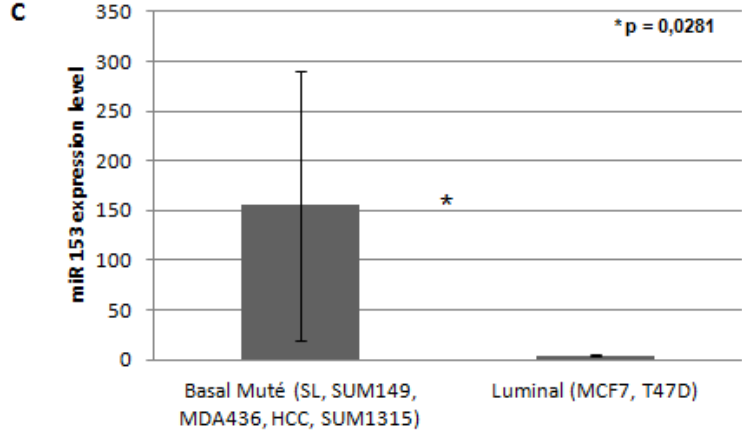
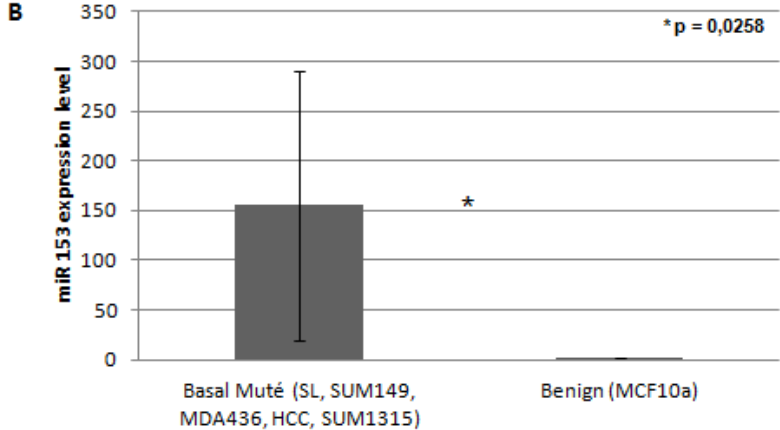
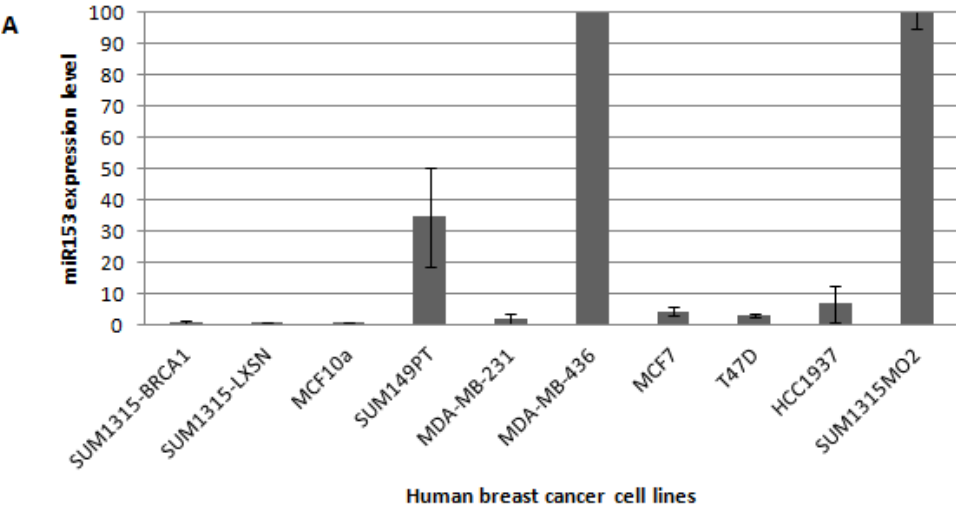
## Expression de miR146a



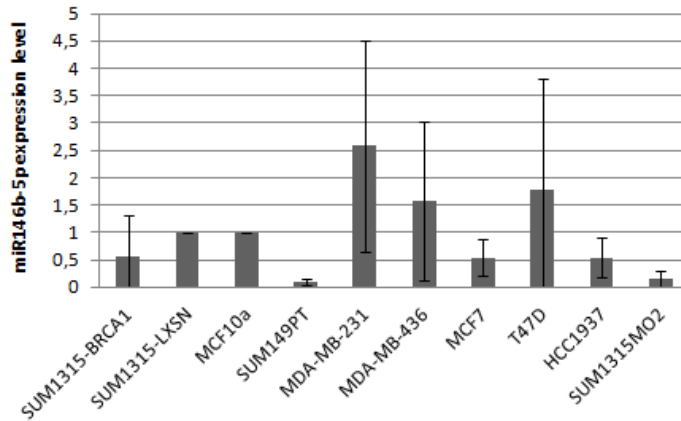
MCF10a: Benign cell lines; MCF7, T47D: Luminal; SUM1315-BRCA1 (SB), MDA-MB-231: Basal BRCA1+; SUM1315-LXSN (SL), SUM149PT, MDA-MB-436, HCC1937, SUM1315MO2: Basal BRCA1-



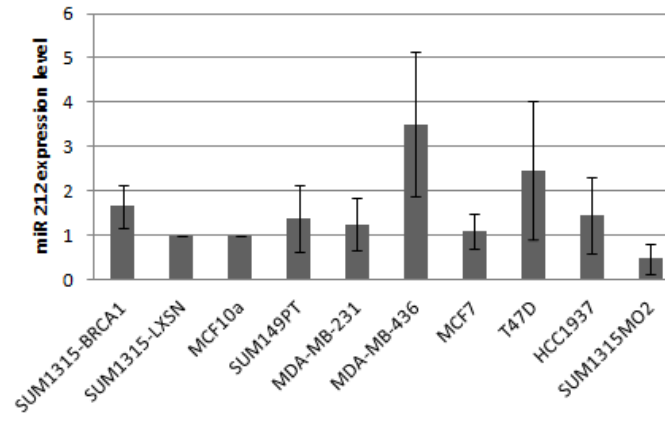
# Expression de miR153



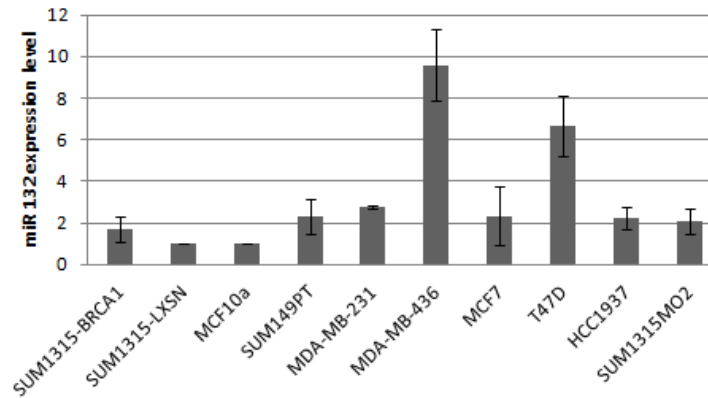
## Expression de miR146b-5p, miR132, miR212



Human breast cancer cell lines



Human breast cancer cell lines



Human breast cancer cell lines

# Profilage de miARNs par miScript miRNA PCR Array Human Breast cancer

## Human Breast Cancer miRNA PCR Array

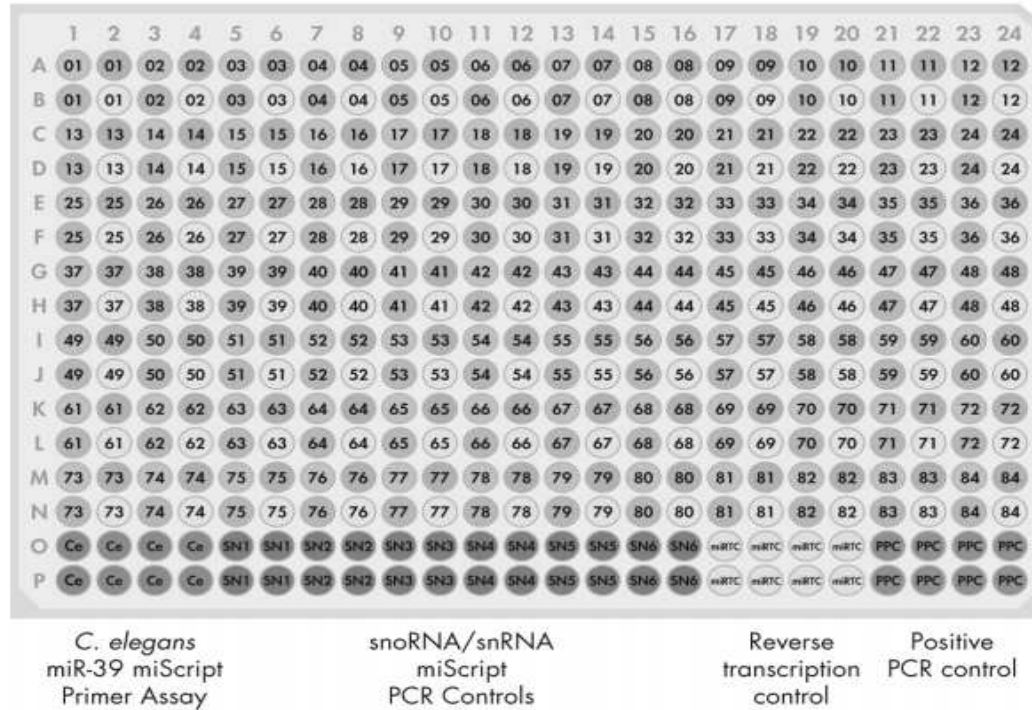


Figure 4. Pathway-Focused miScript miRNA PCR Array layout for plate formats E, G.

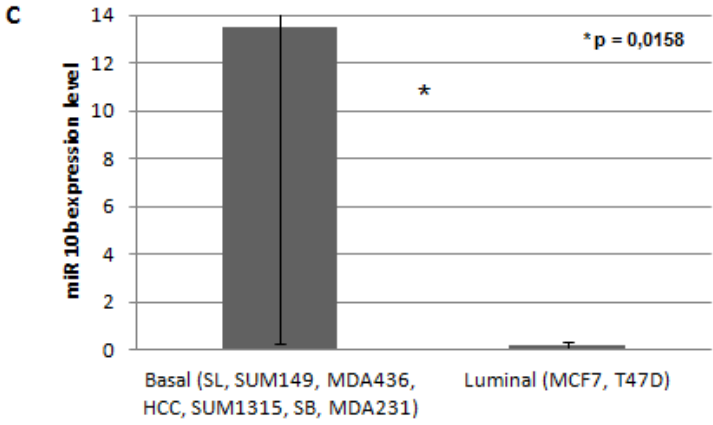
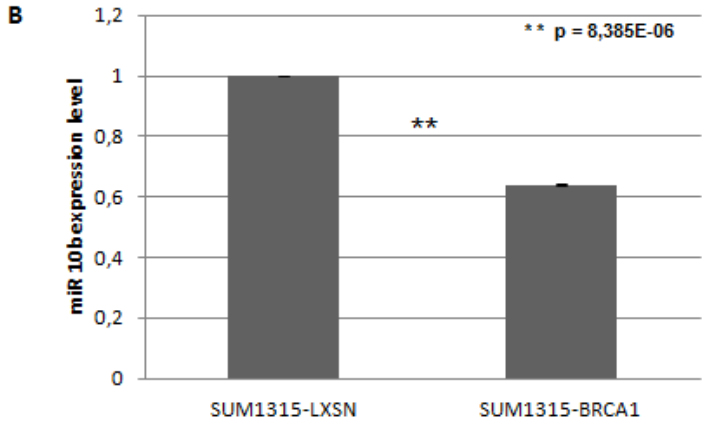
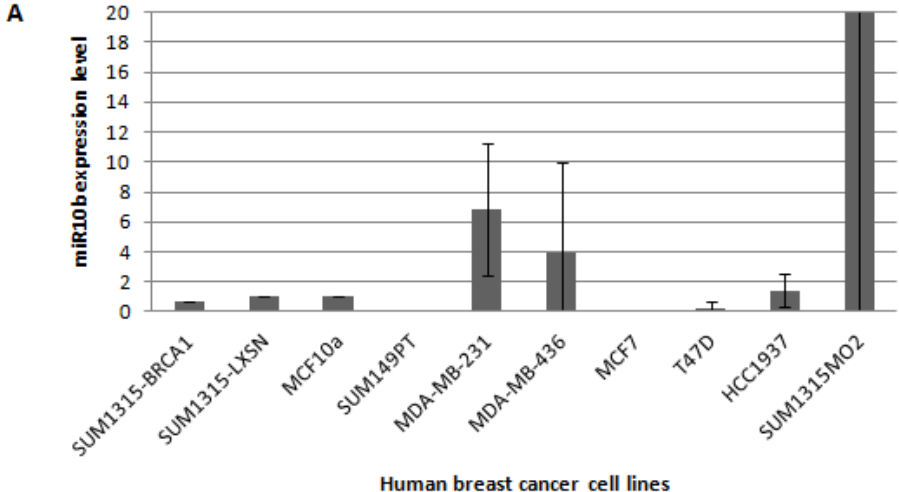
Cette plaque profile l'expression de **84 miARN** connus ou prévus pour modifier leur expression lors de l'initiation ou la progression du cancer du sein

hsa-miR-10b  
 hsa-miR-15b  
 hsa-miR-26a  
 hsa-miR-155  
 hsa-miR-206  
 hsa-miR-485-5p

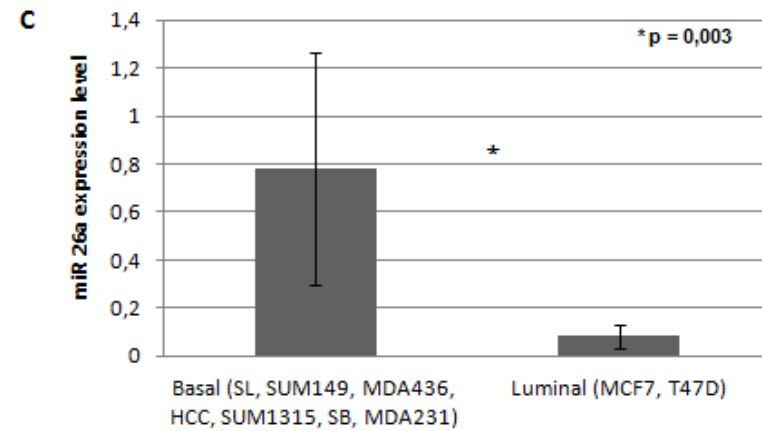
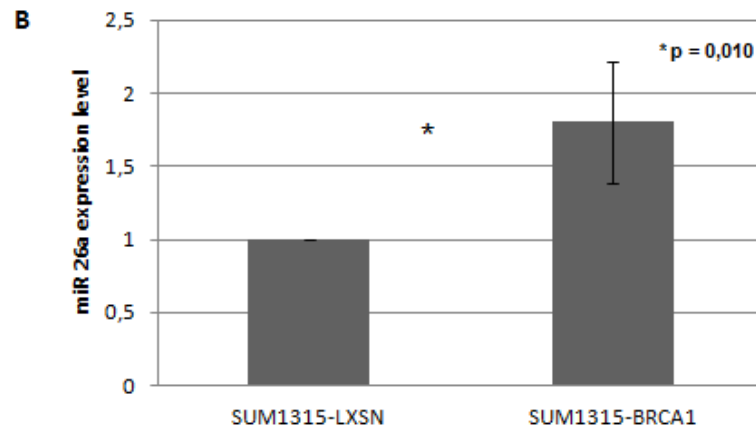
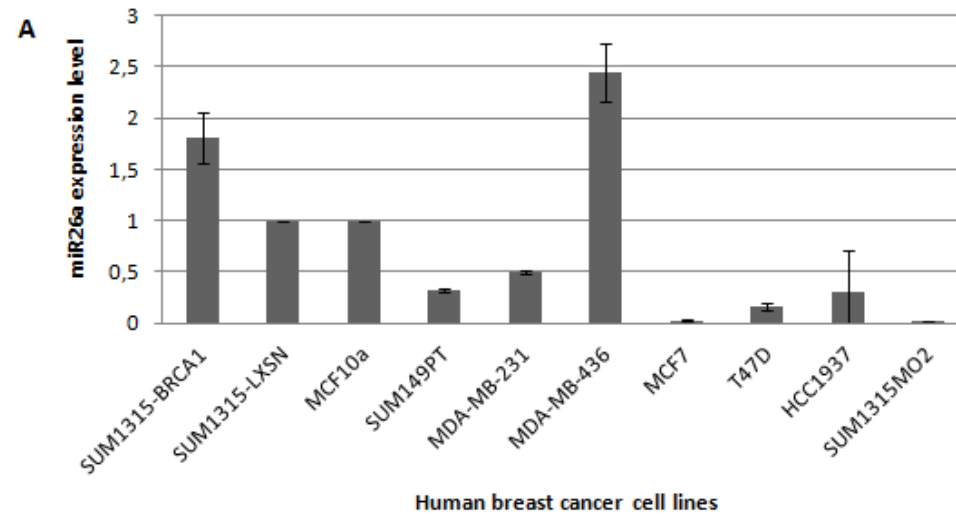
↓  
qRT-PCR

hsa-miR-10b  
 hsa-miR-26a

# Expression de miR10b



## Expression de miR26a

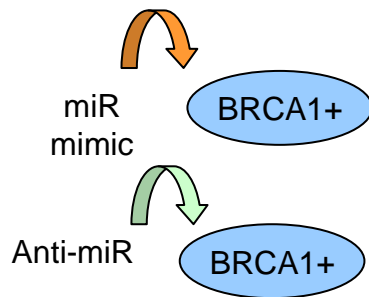




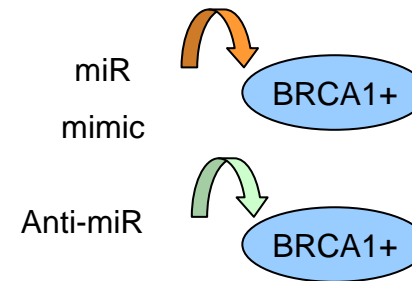
## Transfection

Transfection des miARNs candidats et des anti-miR à part dans des lignées cellulaires de cancers mammaires

(Lipofectamine™ 2000 Transfection Reagent)



Cellules Basales: MDA-MB-231

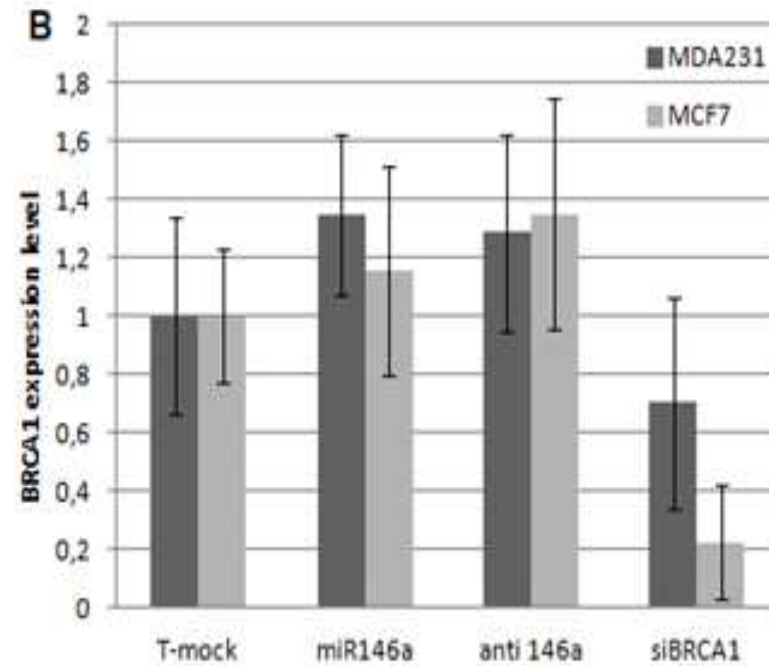
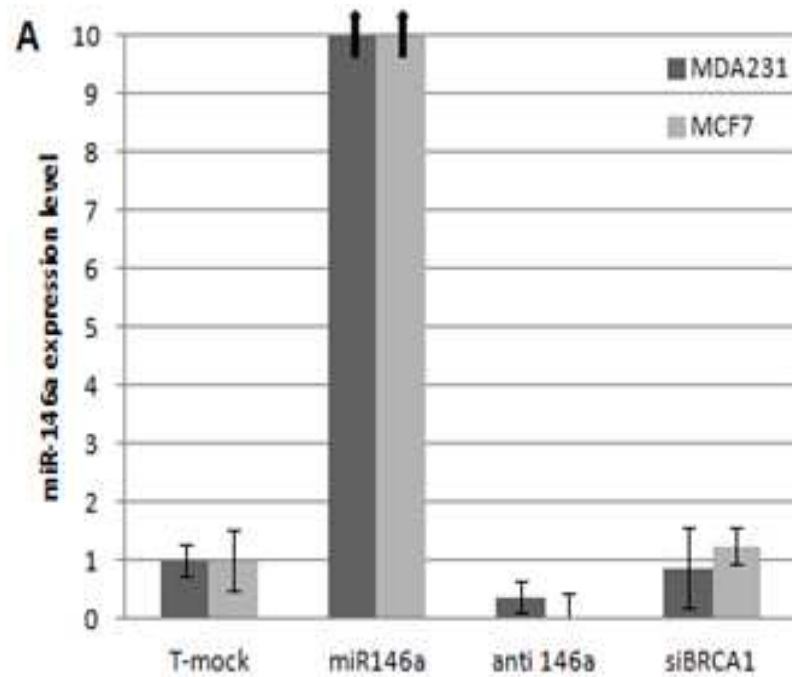


Cellules lumorales MCF7

Extraction d'ARN

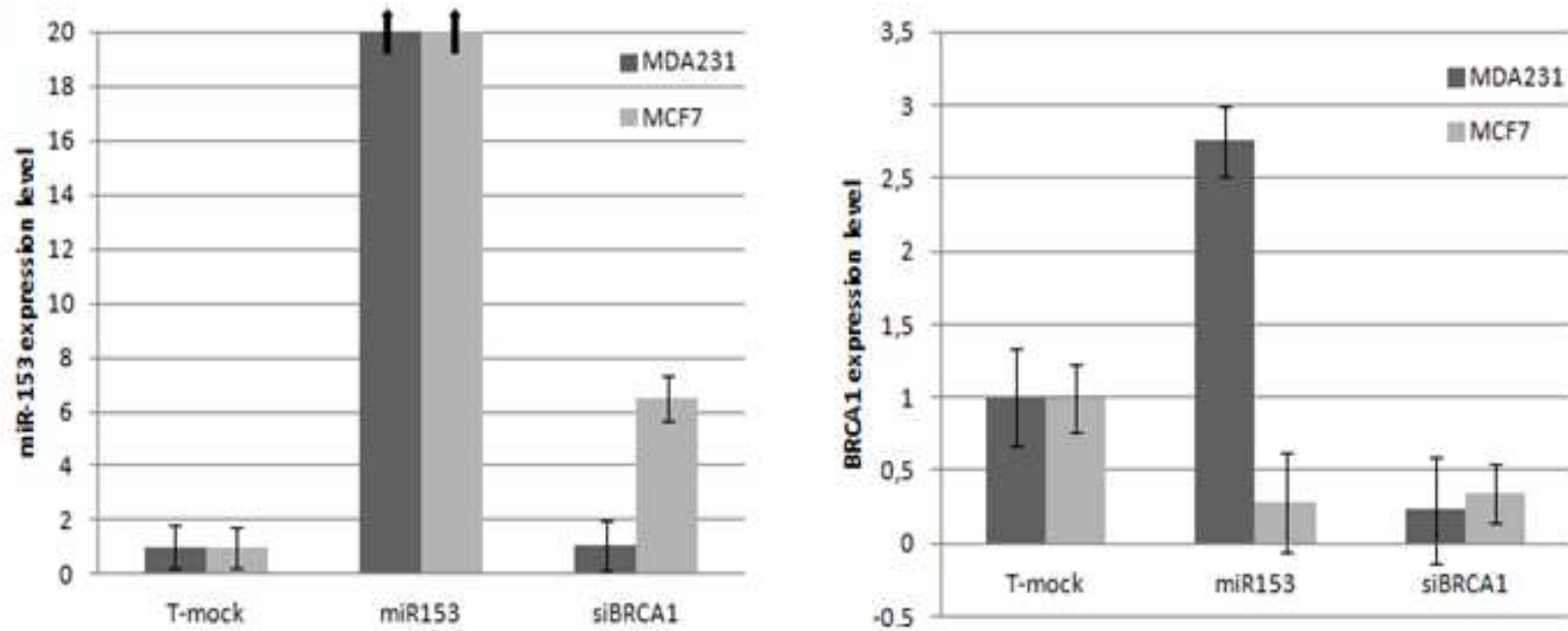
Etude de niveau d'expression de miR et BRCA1 (q-RT-PCR)

## Expression de miR146a et BRCA1



Aucun effet de miR 146a sur l'expression de gène BRCA1

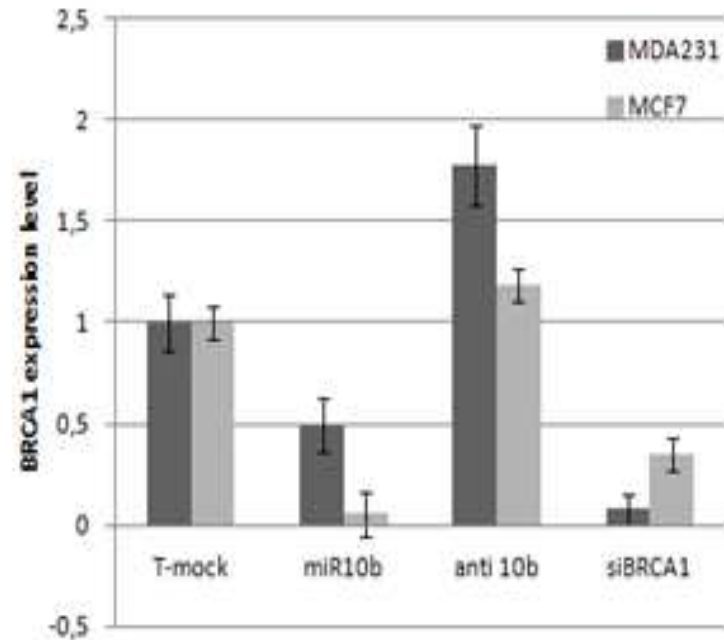
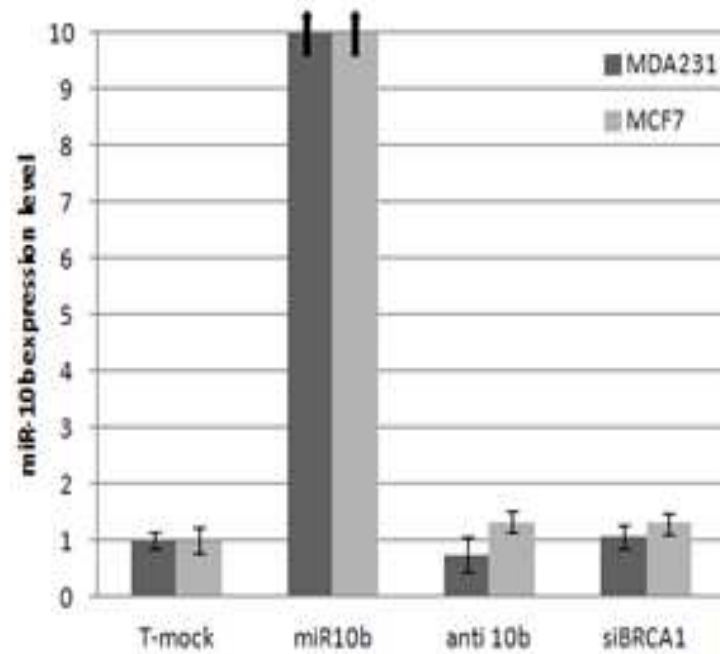
## Expression de miR153 et BRCA1



miR-153 régule négativement l'expression du gène BRCA1 dans des cellules MCF7

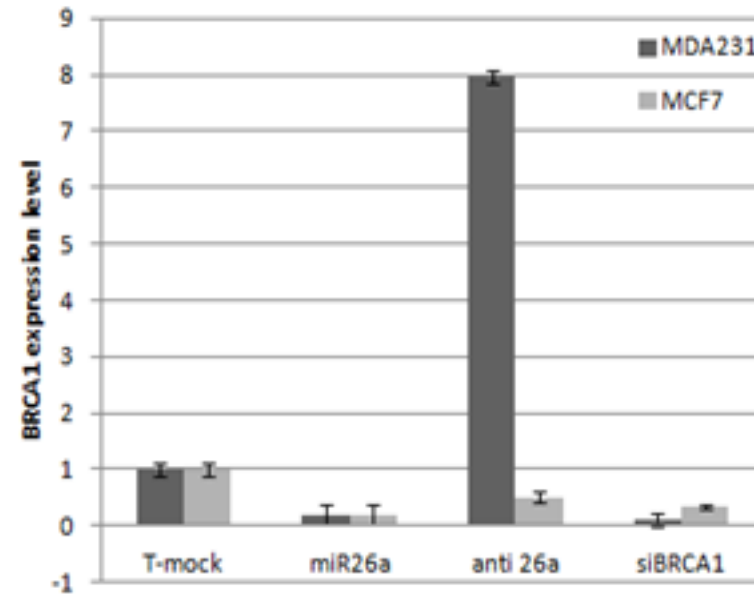
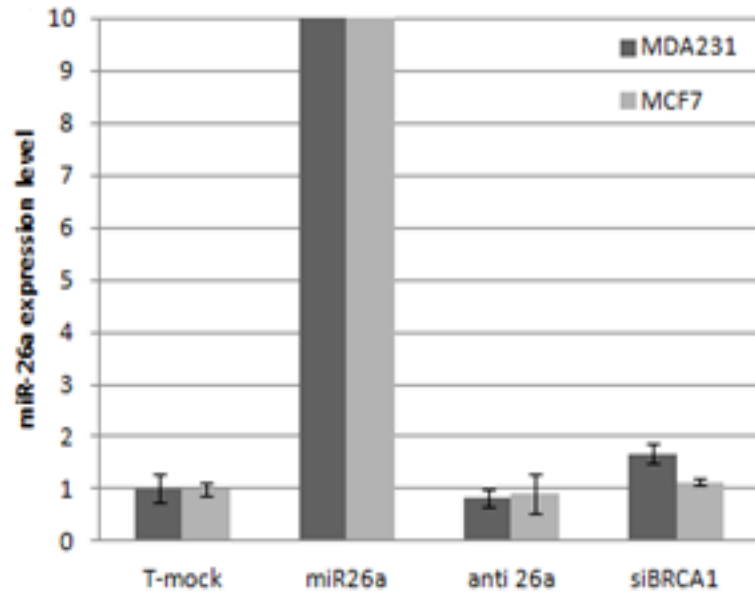
# Cellules MDA-MB-231

## Expression de miR10b et BRCA1



miR-10b régule négativement l'expression du gène BRCA1 dans des cellules MDA-MB-231 et MCF7

## Expression de miR26a et BRCA1



miR-26a régule négativement l'expression du gène BRCA1 dans des cellules MDA-MB-231 et MCF7

# **PLAN**

## ❖ État de l'Art

- Définition des cancers du sein Basal-like:
  - Classification moléculaire des cancers du sein
  - Description clinico-pathologique
  
- BRCA1
  
- miARN

## ❖ Matériel & Méthodes et Résultats

## ❖ Discussion et Conclusion

## ❖ Perspectives

- Le cancer du sein est le cancer le plus fréquent chez les femmes
- La transfection de cellules MDA- MB-231 et MCF- 7 avec ( miR- 146a ou miR- 153 ou miR10b ou miR- 26a) pourrait déterminer l'interaction entre ces miARN et l'expression endogène de BRCA1:
  - ✓ miR146a ne régule pas l'expression de BRCA1 dans des cellules MDA- MB-231 et MCF- 7 # Gracia et ses collègues: miR146a régule négativement l'expression du gène BRCA1 dans les cancers du sein sporadiques triple négatif . Cette différence pourrait être due à la nature des lignées cellulaires utilisées dans les essais de transfection (cellules HeLa).
  - ✓ miR-153 régule négativement l'expression du gène BRCA1 dans des cellules MCF7 et non pas dans des cellules MDA- MB- 231 . Cette différence peut être expliquée par le niveau d'expression de miR153 qui a été significativement plus exprimé dans MCF7 que dans MDA-MB- 231. L'augmentation de l'expression du gène BRCA1 dans des cellules MDA-MB- 231 pourrait être induite par une autre voie de signalisation .

- ✓ miR-10b régule négativement l'expression du gène BRCA1 dans des cellules MDA-MB-231 et MCF7.  
Notre travail et plusieurs articles montrent globalement que la fonction de miR-10b était comme un micro-ARN oncogène dans des lignées cellulaires de cancer du sein .
  
- ✓ miR-26a régule négativement l'expression du gène BRCA1 dans des cellules MDA-MB-231 et MCF7 # En revanche, Gao et ses collaborateurs ont rapporté que miR26a inhibe la prolifération et la migration des cellules de cancer du sein par la répression de MCL- 1.  
Dans d'autres recherches , miR- 26a favorise la prolifération du cancer de l'ovaire et la tumorigenèse.  
→ La fonction de miR- 26a pourrait donc être plus complexe et dépendre du contexte de la tumeur .



## En conclusion

A notre connaissance, notre étude fournit la première preuve pour déterminer l'interaction entre miR153 , miR10b ou miR 26a et BRCA1 dans MDA-MB- 231 et MCF7 . Ces miARN pourraient servir de bio-marqueurs potentiels pour prédire la progression du cancer du sein .

Cependant, le travail sur ces miARN est encore à ses débuts et nécessite des recherches supplémentaires avant d'être introduit dans la clinique .

# **PLAN**

## ❖ État de l'Art

- Définition des cancers du sein Basal-like:
  - Classification moléculaire des cancers du sein
  - Définition phénotypique
  - Description clinico-pathologique
- BRCA1
- Épigénétique, ARNi , miARN

## ❖ Matériel & Méthodes et Résultats

## ❖ Discussion et Conclusion

## ❖ Perspectives

- Etude de la prolifération cellulaire
- Etude de la migration/invasion cellulaire
- Etude de l'apoptose : par Western Blot ou par Cytométrie en flux
- Irradiation des cellules , Test de formation des colonies, Test de prolifération..  
(voir si les miARN augmentent ou non la radiosensibilité des cellules)

# ***Merci pour votre attention***

---





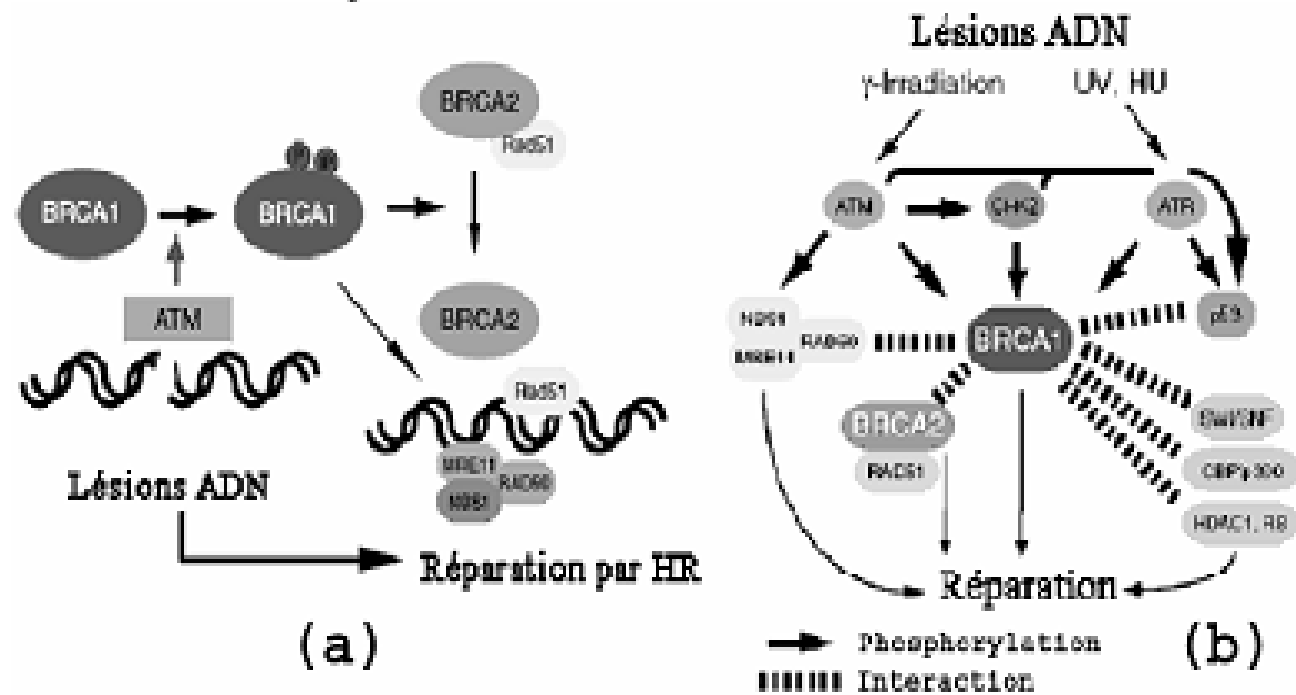


Figure 2. Un modèle du rôle joué par les protéines BRCA dans la réponse aux lésions ADN [Yoshida, 2004]. (a) Suite aux DSB, BRCA1 est phosphorylé par ATM. La forme phosphorylée de BRCA1 active la réparation de l'ADN par HR, en coopération avec BRCA2 et Rad51. BRCA1 recrute également le complexe Rad50-Mre11-NBS1 au niveau des sites d'altération ADN. (b) Quelques partenaires moléculaires de BRCA1

## Épigénétique, ARNi , miARN

- **Épigénétique** = Étude des modifications de l'expression des gènes qui sont transmissibles lors de la mitose et/ou la méiose, mais ne découlent pas de modifications dans la séquence de l'ADN.
  
- **ARNi (ARN interférence)** :
  - 1990, phénomène d'ARNi, Richard Jorgensen.
  - Mécanisme naturel conservé au cours de l'évolution et se retrouve dans divers organismes uni- et pluricellulaires.

## **ARNi**

- Permet d'éteindre l'expression d'un gène de manière séquence - spécifique en utilisant l'ARN double brin pour provoquer la dégradation de l'ARN messenger homologue ou l'inhibition de la traduction.
- Impliqué dans les défenses contre les virus, les éléments transposables mais également dans la régulation transcriptionnelle et surtout post-transcriptionnelle de l'expression des gènes.