HAL
open science

# ARN non-codants et glioblastome : futurs outils diagnostiques, pronostiques et thérapeutiques

Marion Bruelle

## To cite this version:

Marion Bruelle. ARN non-codants et glioblastome : futurs outils diagnostiques, pronostiques et thérapeutiques. Sciences pharmaceutiques. 2014. hal-01733390

**HAL Id: hal-01733390**

**https://hal.univ-lorraine.fr/hal-01733390v1**

Submitted on 14 Mar 2018

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

UNIVERSITÉ DE LORRAINE

AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-thesesexercice-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4
Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10
http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php
http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm

**UNIVERSITÉ DE LORRAINE**

**2014**

---

**FACULTÉ DE PHARMACIE**

# T H È S E

Présentée et soutenue publiquement

Le 1 décembre 2014 sur un sujet dédié à :

# "ARN non-codants et glioblastome: futurs outils diagnostiques, pronostiques et thérapeutiques".

pour obtenir

**le Diplôme d'État de Docteur en Pharmacie**

par **Marion Bruelle**

née le 31 mai 1989

**Membres du Jury**

| | |
|---|---|
| Président du jury: | Professeur Jean-Louis Merlin, Praticien Hospitalier |
| Directeur de thèse : | Professeur Bertrand Rihn, Professeur des Universités |
| Juges : | Professeur Alain le Faou, Professeur des Universités |
| | Docteur Olivier Joubert, Maître de conférence Universitaire |
| | Docteur Mohamed Zaiou, Maître de conférence Universitaire |
| | Docteur Alexandre Harlé, Assistant Hospitalo-Universitaire |

**UNIVERSITÉ DE LORRAINE**
**FACULTÉ DE PHARMACIE**
**Année universitaire 2014-2015**

***DOYEN***
Francine PAULUS
***Vice-Doyen***
Francine KEDZIEREWICZ
***Directeur des Etudes***
Virginie PICHON
***Président du Conseil de la Pédagogie***
Brigitte LEININGER-MULLER
***Président de la Commission de la Recherche***
Christophe GANTZER
***Président de la Commission Prospective Facultaire***
Chantal FINANCE
***Responsable de la Cellule de Formations Continue et Individuelle***
Béatrice FAIVRE

| | |
|---|---|
| ***Responsable ERASMUS :*** | Francine KEDZIEREWICZ |
| ***Responsable de la filière Officine :*** | Béatrice FAIVRE |
| ***Responsables de la filière Industrie :*** | Isabelle LARTAUD,<br>Jean-Bernard REGNOUF de VAINS |
| ***Responsable de la filière Hôpital :*** | Béatrice DEMORE |
| ***Responsable Pharma Plus E.N.S.I.C. :*** | Jean-Bernard REGNOUF de VAINS |
| ***Responsable Pharma Plus E.N.S.A.I.A. :*** | Raphaël DUVAL |

***DOYENS HONORAIRES***

Chantal FINANCE
Claude VIGNERON

***PROFESSEURS EMERITES***
Jeffrey ATKINSON
Max HENRY
Gérard SIEST
Claude VIGNERON

***PROFESSEURS HONORAIRES***

Roger BONALY
Pierre DIXNEUF
Marie-Madeleine GALTEAU
Thérèse GIRARD
Maurice HOFFMANN
Michel JACQUE
Pierre LABRUDE
Lucien LALLOZ
Pierre LECTARD
Vincent LOPPINET
Marcel MIRJOLET
Maurice PIERFITTE
Janine SCHWARTZBROD
Louis SCHWARTZBROD

***MAITRES DE CONFERENCES HONORAIRES***

Monique ALBERT
Mariette BEAUD
Gérald CATAU
Jean-Claude CHEVIN
Jocelyne COLLOMB
Bernard DANGIEN
Marie-Claude FUZELLIER
Françoise HINZELIN
Marie-Hélène LIVERTOUX
Bernard MIGNOT
Jean-Louis MONAL
Blandine MOREAU
Dominique NOTTER
Christine PERDICAKIS
Marie-France POCHON
Anne ROVEL
Maria WELLMAN-ROUSSEAU

***ASSISTANTS HONORAIRES***

Marie-Catherine BERTHE
Annie PAVIS

| ***ENSEIGNANTS*** | *Section CNU** | *Discipline d'enseignement* |
|---|---|---|
| ***PROFESSEURS DES UNIVERSITES - PRATICIENS HOSPITALIERS*** | | |
| Danièle BENSOUSSAN-LEJZEROWICZ | *82* | *Thérapie cellulaire* |
| Chantal FINANCE | *82* | *Virologie, Immunologie* |
| Jean-Louis MERLIN | *82* | *Biologie cellulaire* |
| Alain NICOLAS | *80* | *Chimie analytique et Bromatologie* |
| Jean-Michel SIMON | *81* | *Economie de la santé, Législation pharmaceutique* |
| ***PROFESSEURS DES UNIVERSITES*** | | |
| Jean-Claude BLOCK | *87* | *Santé publique* |
| Christine CAPDEVILLE-ATKINSON | *86* | *Pharmacologie* |
| Raphaël DUVAL | *87* | *Microbiologie clinique* |
| Béatrice FAIVRE | *87* | *Biologie cellulaire, Hématologie* |
| Luc FERRARI | *86* | *Toxicologie* |
| Pascale FRIANT-MICHEL | *85* | *Mathématiques, Physique* |
| Christophe GANTZER | *87* | *Microbiologie* |
| Frédéric JORAND | *87* | *Environnement et Santé* |
| Isabelle LARTAUD | *86* | *Pharmacologie* |
| Dominique LAURAIN-MATTAR | *86* | *Pharmacognosie* |
| Brigitte LEININGER-MULLER | *87* | *Biochimie* |
| Pierre LEROY | *85* | *Chimie physique* |
| Philippe MAINCENT | *85* | *Pharmacie galénique* |
| Alain MARSURA | *32* | *Chimie organique* |
| Patrick MENU | *86* | *Physiologie* |
| Jean-Bernard REGNOUF de VAINS | *86* | *Chimie thérapeutique* |
| Bertrand RIHN | *87* | *Biochimie, Biologie moléculaire* |
| ***MAITRES DE CONFÉRENCES DES UNIVERSITÉS - PRATICIENS HOSPITALIERS*** | | |
| Béatrice DEMORE | *81* | *Pharmacie clinique* |
| Julien PERRIN | *82* | *Hématologie biologique* |
| Marie SOCHA | *81* | *Pharmacie clinique, thérapeutique et biotechnique* |
| Nathalie THILLY | *81* | *Santé publique* |
| ***MAITRES DE CONFÉRENCES*** | | |
| Sandrine BANAS | *87* | *Parasitologie* |
| Xavier BELLANGER | *87* | *Parasitologie, Mycologie médicale* |
| Emmanuelle BENOIT | *86* | *Communication et Santé* |
| Isabelle BERTRAND | *87* | *Microbiologie* |
| Michel BOISBRUN | *86* | *Chimie thérapeutique* |
| François BONNEAUX | *86* | *Chimie thérapeutique* |
| Ariane BOUDIER | *85* | *Chimie Physique* |
| Cédric BOURA | *86* | *Physiologie* |
| Igor CLAROT | *85* | *Chimie analytique* |
| Joël COULON | *87* | *Biochimie* |
| Sébastien DADE | *85* | *Bio-informatique* |
| Dominique DECOLIN | *85* | *Chimie analytique* |
| Roudayna DIAB | *85* | *Pharmacie galénique* |
| Natacha DREUMONT | *87* | *Biochimie générale, Biochimie clinique* |
| Joël DUCOURNEAU | *85* | *Biophysique, Acoustique* |

| ***ENSEIGNANTS (suite)*** | *Section CNU** | *Discipline d'enseignement* |
|---|---|---|
| Florence DUMARCAY | *86* | *Chimie thérapeutique* |
| François DUPUIS | *86* | *Pharmacologie* |
| Adil FAIZ | *85* | *Biophysique, Acoustique* |
| Anthony GANDIN | *87* | *Mycologie, Botanique* |
| Caroline GAUCHER | *85/86* | *Chimie physique, Pharmacologie* |
| Stéphane GIBAUD | *86* | *Pharmacie clinique* |
| Thierry HUMBERT | *86* | *Chimie organique* |
| Olivier JOUBERT | *86* | *Toxicologie, Hygiène sanitaire* |
| Francine KEDZIEREWICZ | *85* | *Pharmacie galénique* |
| Alexandrine LAMBERT | *85* | *Informatique, Biostatistiques* |
| Julie LEONHARD | *86* | *Droit en Santé* |
| Faten MERHI-SOUSSI | *87* | *Hématologie* |
| Christophe MERLIN | *87* | *Microbiologie* |
| Maxime MOURER | *86* | *Chimie organique* |
| Coumba NDIAYE | *86* | *Epidémiologie et Santé publique* |
| Francine PAULUS | *85* | *Informatique* |
| Caroline PERRIN-SARRADO | *86* | *Pharmacologie* |
| Virginie PICHON | *85* | *Biophysique* |
| Sophie PINEL | *85* | *Informatique en Santé (e-santé)* |
| Anne SAPIN-MINET | *85* | *Pharmacie galénique* |
| Marie-Paule SAUDER | *87* | *Mycologie, Botanique* |
| Rosella SPINA | *86* | *Pharmacognosie* |
| Gabriel TROCKLE | *86* | *Pharmacologie* |
| Mihayl VARBANOV | *87* | *Immuno-Virologie* |
| Marie-Noëlle VAULTIER | *87* | *Mycologie, Botanique* |
| Emilie VELOT | *86* | *Physiologie-Physiopathologie humaines* |
| Mohamed ZAIOU | *87* | *Biochimie et Biologie moléculaire* |
| Colette ZINUTTI | *85* | *Pharmacie galénique* |
| ***PROFESSEUR ASSOCIE*** | | |
| Anne MAHEUT-BOSSER | *86* | *Sémiologie* |
| ***PROFESSEUR AGREGE*** | | |
| Christophe COCHAUD | *11* | *Anglais* |

**Disciplines du Conseil National des Universités:*

80 : Personnels enseignants et hospitaliers de pharmacie en sciences physico-chimiques et ingéniérie appliquée à la santé

81: Personnels enseignants et hospitaliers de pharmacie en sciences du médicament et des autres produits de santé

82: Personnels enseignants hospitaliers de pharmacie en sciences biologiques, fondamentales et cliniques

85: Personnels enseignants-chercheurs de pharmacie en sciences physiico-chimiques et ingéniérie appliquée à la santé

86: Personnels enseignants chercheurs de pharmacie en sciences du médicament et des autres produits de santé

87: Personnels enseignants-chercheurs de pharmacie en sciences biologiques fondamentales et cliniques

32: Personnel enseignant-chercheur de sciences en chimie organique, minérale, industrielle

11: Professeur agrégé de lettres et sciences humaines en langues et littérature anglaises et anglo-saxonnes

# SERMENT DES APOTHICAIRES

**Je jure, en présence des maîtres de la Faculté, des conseillers de l'ordre des pharmaciens et de mes condisciples :**

**D' honorer ceux qui m'ont instruit dans les préceptes de mon art et de leur témoigner ma reconnaissance en restant fidèle à leur enseignement.**

**D'exercer, dans l'intérêt de la santé publique, ma profession avec conscience et de respecter non seulement la législation en vigueur, mais aussi les règles de l'honneur, de la probité et du désintéressement.**

**De ne jamais oublier ma responsabilité et mes devoirs envers le malade et sa dignité humaine ; en aucun cas, je ne consentirai à utiliser mes connaissances et mon état pour corrompre les mœurs et favoriser des actes criminels.**

**Que les hommes m'accordent leur estime si je suis fidèle à mes promesses.**

**Que je sois couvert d'opprobre et méprisé de mes confrères si j'y manque.**

« LA FACULTE N'ENTEND DONNER AUCUNE APPROBATION, NI IMPROBATION AUX OPINIONS EMISES DANS LES THESES, CES OPINIONS DOIVENT ETRE CONSIDEREES COMME PROPRES A LEUR AUTEUR ».

# REMERCIEMENTS

***À mon président de thèse, Monsieur Jean-Louis Merlin,*** Professeur des Universités et Praticien Hospitalier,

Je vous remercie de me faire l'honneur de présider ma thèse, de m'avoir accueillie dans votre laboratoire et de m'avoir transmis votre passion pour la recherche translationnelle en oncologie. Vos conseils et votre soutien bienveillant m'ont permis d'orienter mes choix professionnels. Merci également pour votre générosité, votre disponibilité, votre énergie toujours positive et votre grande humanité.

***À mon directeur de thèse, Monsieur Bertrand Rihn*****,** Professeur des Universités,

Je vous remercie d'avoir accepté de diriger et de corriger mon travail, d'avoir soutenu ma démarche vers la recherche scientifique, de m'avoir accueillie dans votre laboratoire et de m'avoir communiqué votre passion pour la biologie moléculaire. Merci également pour votre exigence scientifique, vos anecdotes et votre esprit.

***Aux membres du jury:***

***Monsieur Alexandre Harlé*****,** Assistant Hospitalo-Universitaire,

Je vous remercie de me faire l'honneur de siéger parmi les membres du jury, de m'avoir initiée au fonctionnement du laboratoire et à de nombreuses techniques de biologie moléculaire. Merci également de m'avoir permis de prendre confiance en moi, d'avoir été disponible et d'avoir encadré mon stage d'initiation à la recherche...et merci pour Hendrix au gala!

***Monsieur Olivier Joubert,*** Maître de conférence à la faculté de Pharmacie de Nancy,

Je vous remercie de me faire l'honneur de siéger parmi les membres du jury, d'avoir accepté de juger mon travail. Merci également pour votre pédagogie au cours des TP de toxicologie et pour votre disponibilité.

***Monsieur Mohamed Zaiou,*** Maître de conférence à la faculté de Pharmacie de Nancy,

Je vous remercie de me faire l'honneur de siéger parmi les membres du jury, d'avoir accepté de juger mon travail. Merci également pour votre patience au cours des TP de biochimie et de biologie moléculaire.

***Monsieur Alain le Faou,*** Professeur des Universités,

Je vous remercie de me faire l'honneur de siéger parmi les membres du jury et d'avoir accepté rapidement de juger mon travail.

***Mes remerciements s'adressent également à:***

***Toute l'équipe de l'UBT de l'Institut de Cancérologie de Lorraine,***

Je vous remercie de m'avoir accueillie et intégrée parmi vous depuis ma 3ème année d'étude, de m'avoir enseigné de nombreuses techniques et analyses de biologie moléculaire et cellulaire. Merci également pour votre convivialité, vos critiques gastronomiques et votre humour!

***Toute l'équipe du Centre de Recherche en Cancérologie de Lyon,***

Je souhaite remercier particulièrement le **Professeur Alain Puisieux** de m'avoir accueillie dans son équipe, de m'avoir accordée du temps, de m'avoir écoutée et soutenue au cours de mon master 2. Je remercie également le **Docteur Guillaume Collin**, pour sa patience, sa sincérité, son soutien et ses précieux enseignements au cours de mes stages de master 1 et de master 2. Merci au **Docteur Qing Wang**, au **Docteur Louise Hill** et au **Docteur Stéphane Ansieau** de m'avoir accordé leur temps et leur confiance. Merci à **Christelle, Freddie, Anne-Pierre et Mamibou** pour leurs conseils techniques précieux et leur humour pétillant. Merci au **Docteur Agnès Tissier** d'avoir été là dans les moments de doute. Merci au **Docteur Caroline Moyret-Lalle** d'avoir appuyé ma candidature et de m'avoir permis d'entrer dans le M2 GBCP. Merci à **tous les étudiants** pour votre soutien et votre énergie débordante: Manu, Ebticem, Baptiste, JC, Laurent, Geoffrey...!

Merci au **Docteur Mathieu Gabut** et **au Docteur François Ducray** de m'accueillir bientôt dans leur équipe et de me faire confiance.

***Aux étudiants en médecine et en pharmacie du master 2 GBCP,***

Merci à Laurianne, Delphine, Baptiste, JC, Maël et Pierre. Sans vous, j'aurai été perdue dans ce monde de scientifiques!

***Je dédie cette thèse à:***

**À ma mère,** merci de m'avoir appris le goût de l'effort, la sensibilité et la passion de la nature et du shopping (ça ne va pas trop ensemble à vrai dire). Sans rire, merci de croire en moi et d'être toujours là pour moi!

**À mon père,** merci de ton soutien, de ta patience, de ta confiance et de ton écoute qu'importe nos choix, nos erreurs et nos doutes. Merci de nous avoir appris l'exigence, la tolérance, la liberté et l'importance des petits bonheurs.

**À mon frère, Paul,** merci pour ta force, ta tendresse, ton soutien, ta créativité et ton humour. Merci de me supporter en toutes circonstances et de me dire quand je déraille. Merci de m'avoir appris Illustrator, sans toi, mes schémas n'auraient pas été si chouettes.

**À Françoise et Francis** merci pour votre soutien, votre jeunesse, votre sagesse, votre courage, votre malice et votre amour. Merci pour tout ce que vous faites pour nous. Vous êtes impressionnants.

**À Marie-Jo, Philou, Nico, Juliette, Merlin, Fleur, Blanche, Christine, Chloé et Hélène** merci pour tous les moments de bonheur et de rigolade partagés ensemble. Merci pour votre générosité et votre chaleur!

**À Sylvie et Yves et à Claire et Delphin,** merci pour votre gentillesse, votre sensibilité, votre générosité, votre soutien et votre humour. Merci de m'avoir fait découvrir les John Deere, Grimaud et les allées de St Tropez. Et merci d'être là pour partager ce moment avec moi!

**À mes amis,** Hemant, JC-Lionel, Jérémy, Charlain, Léo, , Flore et Simon, Marie et Jérôme, BenJ, Alex, Camille, Yoann , Maxime et Élo, Julien, Juliette, Julia, Mathilde, Ben et Mélo. Vous êtes les rayons du soleil, les bulles du champagne, les soirées interminables, les parties de poker, les nasalettes folles, les crevettes au coca-cola, les systèmes immunitaires végétaux, les pokémons-cytrynowka, les petites cubettes d'amour, les Rieslings aux accents lyriques et les wesh-wesh du 07/06/2004 qui font pétiller ma vie! Je vous aime fort!

**À Pierre-Louis,** merci pour ton sourire, tes grimaces, ton espièglerie, ta patience, ta sagesse dans les moments de doute et ton courage. Merci de m'avoir suivie à Lyon et d'éclairer tous les jours ma vie. Tu es un bonheur. Je t'aime!

## SOMMAIRE

**1. INTRODUCTION ..... 17**

1.1 LES GLIOBLASTOMES: DÉFINITION ET ÉPIDÉMIOLOGIE ..... 17

*1.1.1 Épidémiologie ..... 17*

*1.1.2 Physiopathologie et biologie du glioblastome ..... 17*

*1.1.3 Une classification moléculaire en renfort de la classification histopathologique de l'OMS 19*

1.2 LES STRATÉGIES THÉRAPEUTIQUES ACTUELLES ..... 19

*1.2.1 Gold standard ..... 19*

*1.2.2 Les thérapies ciblées et biothérapies à l'étude ..... 20*

1.3 LES CELLULES SOUCHES DE GLIOBLASTOME: IMPLICATION ET POTENTIEL THÉRAPEUTIQUE ..... 20

*1.3.1 Découverte et définition des cellules souches de glioblastome ..... 20*

*1.3.2 Approches thérapeutiques exploitant la théorie des cellules souches de glioblastome ..... 20*

1.4 IMPLICATIONS DES ARN NON-CODANTS DANS LA TUMORIGÉNICITÉ DU GLIOBLASTOME ET DES CELLULES SOUCHES DE GLIOBLASTOME ..... 21

1.5 EXPOSÉ DES MOTIFS DE LA THÈSE ..... 21

**2. LES MICROARN ..... 23**

2.1 LES MICROARN: GÉNÉRALITÉS ..... 23

*2.1.1 Introduction: Biogenèse et fonction des microARN ..... 23*

*2.1.2 Lien entre microARN et tumorigenèse ..... 24*

*2.1.3 MicroARN candidats au maintien de la tumorigénicité du glioblastome ..... 25*

*2.1.4 Fonction des microARN dans le maintien des propriétés des cellules souches de glioblastome ..... 28*

2.2 LES MICROARN: PERTINENCE CLINIQUE DANS LA PRISE EN CHARGE DU GLIOBLASTOME ..... 28

*2.2.1 Méthodologies et limitations ..... 28*

*2.2.2 Les microARN : biomarqueurs diagnostiques et pronostiques ..... 29*

*2.2.3 Les microARN: biomarqueurs prédictifs de réponse au traitement ..... 31*

*2.2.4 Les microARN circulants ..... 33*

*2.2.5 Altérations génétiques affectant les gènes codant des microARN ..... 33*

*2.2.6 Les microARNs comme cible thérapeutique ..... 33*

**3. LES ARN LONGS NON-CODANTS ..... 37**

3.1 LES ARN LONGS NON-CODANTS: GÉNÉRALITÉS ..... 37

*3.1.1 Introduction: biogenèse et fonction des lncARN ..... 37*

*3.1.2 Lien entre lncARN et tumorigenèse ..... 38*

*3.1.3 lncARN candidats impliqués dans le maintien des propriétés tumorigènes du glioblastome* ..... *39*

3.2 LES ARN LONGS NON-CODANTS : INTÉRÊT DANS LA PRISE EN CHARGE DU GLIOBLASTOME ..... 41

*3.2.1 Méthodologies et limitations* ..... *41*

*3.2.2 Les lncARN: biomarqueurs diagnostiques, pronostiques et prédictifs* ..... *41*

*3.2.3 Les ARN longs non-codants: biomarqueurs et cibles thérapeutiques potentielles* ..... *42*

*3.2.4 Altérations génétiques affectant les gènes codant les lncARN* ..... *43*

*3.2.5 Stratégies thérapeutiques ciblant les ARN longs non-codants* ..... *43*

**4. LES PETITS ARN NUCLÉAIRES: LES ARNSN ..... 47**

4.1 LES ARNSN : COMPOSANTS CLÉS DU SPLICÉOSOME ..... 47

*4.1.1 L'épissage alternatif* ..... *47*

*4.1.2 Implication de l'épissage alternatif en cancérologie* ..... *48*

*4.1.3 Altérations de l'activité du splicéosome dans le maintien de la tumorigénicité du glioblastome et des cellules souches de glioblastome* ..... *50*

4.2 ARNSN, SNRNP ET FACTEURS D'ÉPISSAGE: INTÉRÊT DANS LA PRISE EN CHARGE DU GLIOBLASTOME ..... 53

*4.2.1 Composants du splicéosome: biomarqueurs diagnostiques, pronostiques et cibles thérapeutiques potentielles* ..... *53*

*4.2.2 Thérapies anti-tumorales ciblant les anomalies d'épissage* ..... *55*

**5. CONCLUSION ET PERSPECTIVES ..... 59**

**BIBLIOGRAPHIE ..... 60**

**ANNEXES ..... 101**

# INDEX DES FIGURES

**Figure 1**: Représentation schématique de l'oncogenèse des glioblastomes primaires et secondaires et voies de signalisation fréquemment altérées 17

**Figure 2:** Altérations génétiques et voies de signalisation les plus fréquemment identifiées dans les glioblastomes 17

**Figure 3:** Parallèle entre la hiérarchisation cellulaire au sein du SNC normal et dans le modèle du GBM 19

**Figure 4:** La biogenèse des microARN 23

**Figure 5:** Fonction paracrine des microARN sécrétés par les cellules tumorales 33

**Figure 6:** Mode d'action schématique des principales stratégies thérapeutiques ciblant l'expression des microARN 35

**Figure 7:** Première structure de lncARN eucaryotes isolés expérimentalement 37

**Figure 8:** Localisation des gènes codant les lncARN 38

**Figure 9:** Représentation schématique du mode d'action des principaux lncARN connus 38

**Figure 10:** Mode d'action schématique des deux lncARN oncogéniques: ASCLNC22381 et ASCLN20819 40

**Figure 11:** Mode d'action schématique des principales thérapies ciblant les lncARN 44

**Figure 12:** Schéma des principales étapes d'assemblage du splicéosome et de l'activation de l'épissage alternatif 47

**Figure 13:** Représentation schématique des structures primaires et secondaires des ARNsn composants le splicéosome 48

**Figure 14:** Biogenèse des snRNP de type Sm 48

**Figure 15:** Localisation des composants et des séquences régulatrices principales du splicéosome lors de l'épissage alternatif 48

**Figure 16:** Exemples d'évènements d'épissage alternatif contribuant à la tumorigenèse 49

**Figure 17:** La dérégulation des différents composants du splicéosome (facteurs d'épissage et snRNP associées) participe à l'oncogenèse 49

**Figure 18:** Structure des Oligonucléotides anti-sens (ASO) 55

**Figure 19:** Mode d'action des oligonucléotides anti-sens (ASO) ciblant les aberrations d'épissage alternatif 55

**Figure 20:** ARNsn modifiés utilisés comme outils thérapeutiques pour "réparer" les altérations d'EA 56

**Figure 21:** Trans-épissage thérapeutique d'un variant aberrant 57

**Figure 22:** Composés anti-tumoraux naturels et synthétiques inhibant l'assemblage du splicéosome (SF3B) 58

## INDEX DES TABLEAUX

**Tableau 1:** Fonction des altérations génétiques et moléculaires les plus fréquemment retrouvées au sein des GBM primaires et secondaires 18

**Tableau 2:** Biomarqueurs prognostiques et prédictifs dans les GBM et gliomes anaplasiques 19

**Tableau 3:** Résumé non-exhaustif des thérapies ciblées et biothérapies actuellement en cours d'essai clinique 20

**Tableau 4:** Implications thérapeutiques potentielles des cellules souches de glioblastome (CSG) 21

**Tableau 5:** MicroARN fonctionnant comme des oncogènes ou des oncosuppresseurs dans différents cancers 24

**Tableau 6:** MicroARN dérégulés au sein des GBM 25

**Tableau 7:** MicroARN les plus fréquemment identifiés au sein des GBM 27

**Tableau 8:** MicroARN dérégulés au sein des cellules souches de glioblastome (CSG) 28

**Tableau 9:** Avantages et inconvénients des techniques d'analyse des profils d'expression de microARN (et d'ARN non-codants) 29

**Tableau 10:** microARN identifiés comme biomarqueurs pronostiques et prédictifs dans les GBM 30

**Tableau 11:** Stratégies thérapeutiques modulant l'expression des microARN 34

**Tableau 12:** LncARN dérégulés au sein de différents cancers et exerçant des fonctions pro-oncogéniques ou oncosuppressives 39

**Tableau 13:** Types de lncARN présents au sein des gliomes et GBM 41

**Tableau 14:** Signature de lncARN significativement prédictifs de survie 41

**Tableau 15:** Molécules aux propriétés anti-cancéreuses ciblant le splicéosome 59

**Tableau 16:** Résumé des interactions identifiées entre les microARNs, les lncARNs et les ARNsn. 101

**Tableau 17:** Principaux ARN non-codants dont la caractérisation fonctionnelle émerge 102

## LISTES DES ABRÉVIATIONS

ADN: Acide désoxyribonucléique

ANP32A/pp32: protéine multifonctionnelle régulant la transcription, l'apoptose, la phosphorylation et la progression dans le cycle cellulaire. Action anti-oncogéniqye par association avec la protéine RB.

AP-2γ: facteur de transcription impliqué dans la différenciation et la prolifération lors du développement embryonnaire.

ARNm: Acide ribonucléique messager

ARNnc: ARN non-codants

ARNsn: Petit ARN nucléaire

ARNsno: Petit ARN nucléolaire

ARNsi: petit ARN interférent

ATP: adénosine triphosphate

ATRX: Hélicase ATP-dépendante. Protéine modifiant la chromatine, lors de l'interphase et lors de la mitose.

Bclx/Bcl-2l1: protéine 1 de la famille bcl-2 (Bcl-xL: anti-apoptotique/ Bcl-xS: pro-apoptotique).

Bim (Bcl-2): protéine pro-apoptotique de la famille Bcl-2.

CD133: Cluster de différenciation 133, glycoprotéine membranaire exprimée dans diverses cellules souches dont les CSC.

CDK6: Kinase 6 cycline-dépendante, régule la progression dans le cycle cellulaire.

ChIP: Immunoprécipitation de la chromatine. Permet l'étude des protéines interagissant avec l'ADN.

circARN: ARN circulaires (font parti des lncARNs).

CLIP: Immunoprécipitation réticulée. Permet l'étude des protéines interagissant avec l'ARN.

CRNDE: Gène différentiellement exprimé dans les néoplasies colorectales.

CSC: cellule souche cancéreuse

CSG: Cellule souche de glioblastome

CSM: cellule souche mésenchymateuse

CSN: cellule souche neurale

CTGF: facteur de croissance du tissus conjonctif.

Cx43: Connexine 43, constituant des jonctions communicantes.

EA: épissage alternatif

EGFR: Récepteur au facteur de croissance épidermique

ESE/ESS: Exonic splicing enhancer/silencer: activateur/inhibiteur d'épissage exonique

FAS: récepteur transmembranaire de mort CD95, APO-1 ou TNFRSF6.

FOXO: Facteur de transcription de la famille "Fork-head", suppresseur de tumeur par régulation de gènes impliqués dans la résistance au stress, le métabolisme, l'apoptose.

FT: facteur de transcription

GAS5: Growth arrest specific 5/ ARN non-codant bloquant la régulation positive de l'expression des gènes médiée par les récepteurs aux glucocorticoïdes.

GBM: Glioblastome multiforme

HDAC: Histone Désacétylase, enzyme catalysant la perte du groupement acétyl sur la queue N-terminale d'un histone. Rôle dans le contrôle épigénétique de l'expression des gènes.

HOTAIR: Transcrit antisens d'ARN intergénique HOX

HTS: High Throughput sequencing/ Séquençage haut-débit.

IDH1: Isocitrate déshydrogénase 1, fréquemment mutée dans les GBM secondaires.

IG20: ("death domain adaptor Insuloma-Glucagonoma Protein 20"

IGF-1R: Récepteur analogue au facteur de croissance à l'insuline 1.

iPSC: Cellules souches pluripotentes induites

ISE/ISS: Intronic splicing enhancer, silencer/ activateur, inhibiteur d'épissage intronique.

IRS2: substrat du récepteur à l'insuline 2, molécule médiant les effets de l'insuline.

LCR: Liquide céphalo-rachidien

lincARN: ARN long non-codant intergénique

lncARN: ARN long non-codant

LRRFIP1: protéine de détection des acides nucléiques cytosoliques. Active la β-caténine.

LSD1/CoREST/REST: Déméthylase spécifique des lysines modifiant les histones H3K4/ Corépresseur/ répresseur. Participe au maintien de la pluripotence des CSE par modification épigénétique.

OS: Survie Globale

PART1: Transcrit prostatique régulé par les androgènes. ARN long non-codant exerçant un rôle dans la carcinogenèse prostatique.

PFS: Survie sans progression

PHF5A: Plant-Homeodomain finger protein 5A

POLD2: sous-unité 2 de la polymérase delta.

MAPK(K): Kinase (kinase) activée par les mitogènes., promeut la prolifération et la survie cellulaire.

MDM2: E3- Ubiquitine ligase "Mouse double minute homolog" responsable de la dégradation de p53.

MEC: Matrice extracellulaire

MEG3: gène 3 d'expression maternellle

MEK1: Protéine kinase à double spécificité (famille des kinase STE7) activant les MAPKK.

MGMT: O-6-méthylguanine-ADN méthyltransférase.

MIAT: ARN long non-codant dont le polymorphisme d'un simple nucléotide favorise l'infarctus du myocarde. Exprimé dans les neurones, joue un rôle dans le destin cellulaire.

microARN/miARN/miR: courts ARN simple-brins (environ 22 nucléotides).

Msi1: protéine de liaison à l'ARN impliquée dans la tumorigenèse via sa capacité à réguler la traduction, son rôle dans le destin des cellules souches et le développement du SNC

MVIH: Microvascular Invasion in Hepatocellular carcinoma

Mxl1: Protéine interagissant avec Max. Régule négativement l'oncogène Myc, fonctionne comme un oncosuppresseur.

NAT: lncARN Transcrits anti-sens naturels

NF1: neurofibromine 1, suppresseur de l'oncogène Ras.

NGS: Séquençage dernière génération.

OMS: Organisation mondiale de la santé

$p16^{INK4A}$: Inhibiteur de kinases cycline-dépendante 2A (codé par *CDKN2A*). Suppresseur de tumeur bloquant la progression dans le cycle cellulaire (transition G1/S).

PDGF/PDGFRA: Récepteur au facteur de croissance dérivé des plaquettes A.

PEI: Polyéthylène-imine

Pg: pseudogènes (font partis des lncARNs)

PI3K/AKT/mTOR: Phosphatidyl-Inositol-3-kinase/AKT/mammalian target of rapamycin. Responsable de l'homéostasie cellulaire (apoptose, prolifération, croissance, cycle cellulaire, angiogenèse).

polyA: polyadénosine, succession de ribonucéotides de type adénosine, protège les ARN contre la dégradation et favorise le transport nucléo-cytoplasmique.

PTEN: homologue de la phosphatase et de la tensine. Gène suppresseur de tumeur antagonisant la PI3K et contrôlant ainsi la division cellulaire.

PTM: Molécule de pré-trans-épissage.

PTPμ: Protéine tyrosine Phosphatase μ. Molécule de signalisation régulant différents processus: croissance, prolifération, cycle cellulaire, transformation oncogénique.

PRC2: Polycomb repressive complex 2, possède une activité histone-méthyl-transférase permettant de réprimer la transcription de gènes cibles.

PUMA: “p53-upregulated modulator of apoptosis”, gène pro-apoptotique induit par p53.

Rap1b: Protéine 1b apparentée à l’oncogène Ras. Régule de nombreuses fonctions comme: l’adhérence, la croissance, la différenciation cellulaires.

RAS/RAF/MAPK: voie de signalisation oncogénique impliquée dans la régulation de la survie, de la prolifération, de la différenciation et de la migration cellulaire ainsi que de l’angiogenèse.

RECK: Protéine extracellulaire riche en cystéine, possédant des domaines inhibiteurs de protéases, supposée réprimer la formation de métastases.

RISC: RNA induced silencing complex/ Complexe inhibant l’ARN.

RNU6B/48: petits ARNs nucléolaire

RON: Récepteur à activité tyrosine kinase d’Origine Nantais (ou Récepteur stimulant les macrophages MST1R), stimule les macrophages et active la formation de métastases.

Smad4: ou “Mothers against decapentaplegic homolog 4” est une protéine interagissant avec le TGF-β et inhibant la croissance cellulaire.

SMARCA4: activateur de transcription BRG1/hélicase ATP-dépendente modifiant la structure de la chromatine. Régule l’expression de CD44.

SMART: Spliceosome mediated RNA trans-splicing/ Trans-épissage de l’ARN médié par le splicéosome.

SMIR: small microRNA inhibitor/ petit inhibiteur de microARN

SMRT/NCOR2: Corépresseur nucléaire transcriptionnel recrutant des HDACs

SNC: Système nerveux central

SNP: Polymorphisme d’un simple nucléotide.

snRNP: petite sous-unité nucléaire ribonucléoprotéique

SRSF3/SRp20: facteur d’épissage/protéine riche en sérine et en arginine 3

SS: Splicing site/ site d’épissage.

SSA: Splicéostatine A

TEM: Transition épithélio-mésenchymateuse.

TGFBR2: Récepteur β2 au facteur de croissance transformant. Régule la transcription de protéines impliqués dans la prolifération cellulaire.

TIMP3: Gène codant l’inhibiteur de la métalloprotéinase 3, protéase impliquée dans la dégradation de la MEC.

T-UCR: transcrits à partir de régions ultra-conservées

UTR: Untranslated region/ région non-traduite.

VEGF: Facteur de croissance de l’endothélium vasculaire.

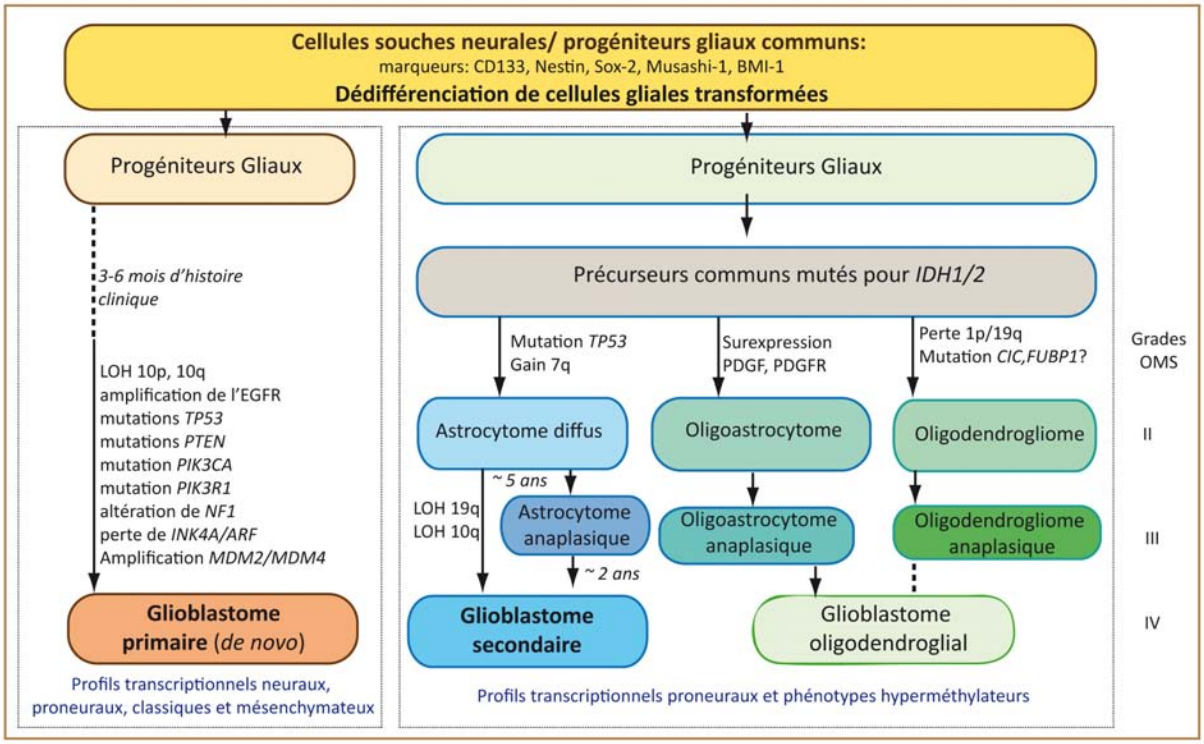



**Figure 1: Représentation schématique de l'oncogenèse des glioblastomes primaires et secondaires et voies de signalisation fréquemment altérées** d'après Ohgaki & Kleihues, 2012 et Masui *et al.,* 2012.

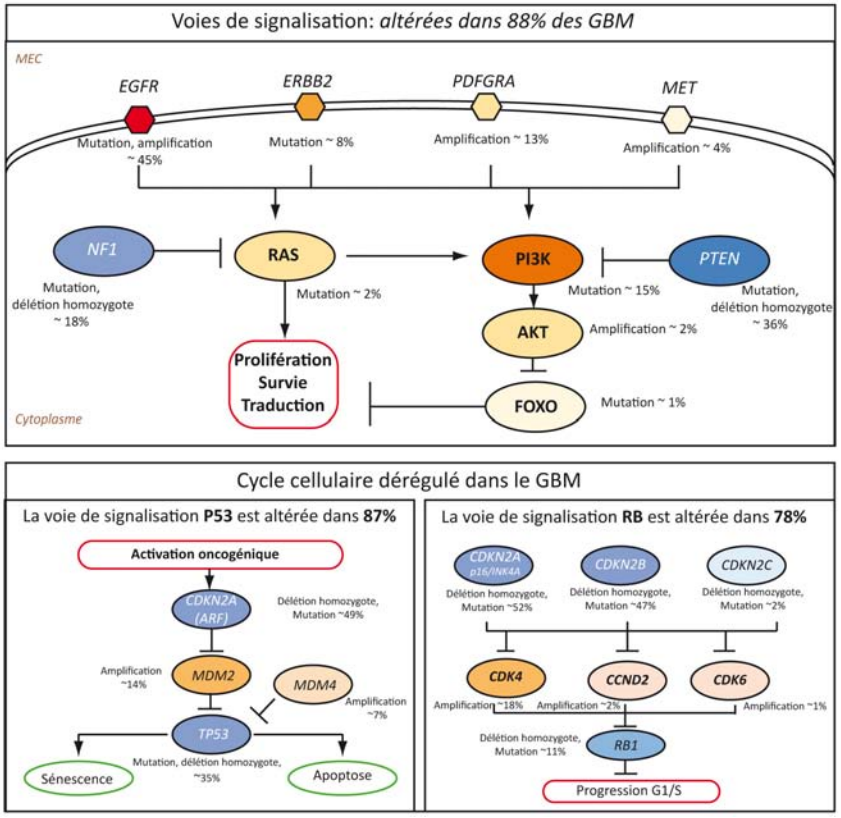



**Figure 2: Altérations génétiques et voies de signalisation les plus fréquemment identifiées dans les glioblastomes** d'après TCGA, 2008. Les mutations et altérations significatives du nombre de copies de chaque composant des voies de signalisation RTK/RAS/PI-3K, p53 et RB sont représentées. Le orange représente les altérations activatrices, le bleu, les altérations inhibitrices. Les teintes plus prononcées correspondent à un pourcentage d'altération plus important.

# 1. Introduction

## 1.1 Les glioblastomes: définition et épidémiologie

Les glioblastomes multiformes (GBM) représentent les tumeurs primitives du système nerveux central (SNC) les plus fréquentes, les plus infiltrantes et les plus létales chez l'adulte. En dépit d'un traitement agressif comprenant approches chirurgicales et radio-chimiothérapies concomitantes, la survie médiane est seulement de 14.6 mois[1]. Le GBM étant une tumeur infiltrante, la résection chirurgicale complète est très difficile. D'autre part, les cellules tumorales sont très résistantes à la fois aux radiations et aux chimiothérapies cytotoxiques[2,3]. Selon la classification de l'Organisation Mondiale de la Santé (OMS)[4], différents types histologiques sont attribués aux gliomes en fonction du type cytologique prédominant (astrocytaire, oligodendrocytaire ou mixte)[5]. Le grade est défini en fonction des signes d'anaplasie. Les GBM correspondent au grade IV, témoin de leur caractère hautement malin.

### 1.1.1 Épidémiologie

#### *1.1.1.1 Épidémiologie descriptive*

Dans les pays développés, on recense en moyenne 3,5/100 000 cas de GBM par an[6,7]. En France, chaque année, on estime à 2000 le nombre de nouveaux cas histologiques[8]. Chez l'enfant, l'incidence est très faible. À partir de 30 ans, elle augmente de manière linéaire puis diminue au-delà de 75 ans[9]. Les GBM *de novo* surviennent majoritairement chez le sujet âgé (65-74ans) avec un rapport hommes/femmes de 1,1[10]. L'amélioration de l'accès à l'imagerie, le développement des biopsies stéréotaxiques et le vieillissement de la population peuvent expliquer l'augmentation annuelle de 1 % des nouveaux diagnostics.

#### *1.1.1.2 Facteurs de risques*

Trois facteurs de risque de développement de GBM sont établis: l'existence d'une prédisposition génétique (mutation du gène *TP53, APC...*)[11], l'exposition professionnelle à des cancérogènes chimiques (caoutchouc, plomb, pesticides), une irradiation encéphalique ionisante chronique à faible dose dont les bilans odontologiques. De nombreux programmes épidémiologiques évaluant l'impact d'autres facteurs de risques sont en cours dont l'étude de l'alimentation contenant des dérivés nitrés et des champs électromagnétiques à basse fréquence.

### 1.1.2 Physiopathologie et biologie du glioblastome

Le modèle d'oncogenèse des GBM est semblable au modèle général de cancérologie. La tumeur se développe suite à l'acquisition d'altérations génétiques et épigénétiques séquentielles. Les cellules tumorales acquièrent ainsi un potentiel de prolifération et de survie accru et s'affranchissent des systèmes de sauvegarde cellulaire que constituent l'apoptose et la sénescence[12].

**Tableau 1: Fonction des altérations génétiques et moléculaires les plus fréquemment retrouvées au sein des GBM primaires et secondaires**

| | *Altérations génétiques les plus fréquentes* | GBM primaires | GBM secondaires | Fonctions/ avantage sélectif acquis suite aux altérations génétiques | *Références* |
|---|---|---|---|---|---|
| *ALTÉRATIONS GÉNÉTIQUES* | Mutations *IDH1/2* | 0-7% | 73-100% | Production d'un oncométabolite (2-HG: 2-hydroxy-glutarate): ↗ prolifération en régulant la concentration de HIF, inihibition de la différenciation par inhibition du remodelage de la chromatine par l'ADN hydroxylase TET2 | 22, 24-28 |
| | Mutations *TP53* | 17-35% | 60-88% | Perte de fonction et échappement aux systèmes de sauvegarde activés en réponse à des altérations génétiques (apoptose et sénescence), altérations de l'état de différenciation cellulaire, potentiels tumorigéniques et auto-renouvellement accrus | 13, 32,37,38 |
| | Mutations *ATRX* | 4-7% | 57-80% | Mutations affectant la voie de remodelage de la chromatine H3.3-ATRX-DAXX. ATRX et DAXX sont 2 sous-unités nécessaires pour l'incorporation de H3.3 (histone 3 variant 3.3 indépendant de la réplication) au sein de l'hétérochromatine péricentrique et des télomères. Ces mutations confèrent un profil d'expression génique particulier et une élongation des télomères propices au développement du GBM. Les mécanismes biochimiques sous-jacents sont actuellement inconnus. | 39-40 |
| | Amplification de l'*EGFR* (mutations *EGFRvIII*) | 35-45% | 0-8% | L'amplification d'EGFR ou son activation constitutive ligand-indépendante (mutant) contribue à une activation soutenue de la voie de signalisaiton PI3K/AKT/mTOR. Ces altéra--tions confèrent aux cellules un potentiel de prolifération soute--nu et une capacité de survie accrue (résistance à l'apoptose). | 31,41 |
| | Délétions de *CDKN2A* | 30-45% | 7-22% | Les inhibiteurs de kinases cycline-dépendantes (CDKN2A ou p16/INK4A) inhibent les kinases cycline-dépendantes CDK4 et CDK6 prévenant ainsi la phosphorylation de RB et la progression dans le cycle cellulaire (G1-S). CDKN2A est une protéine oncosuppressive. Sa délétion résulte en une dérégulation du cycle cellulaire au sein des cellules de GBM. | 32,37 |
| | Mutations *PTEN* | 23-26% | 0-12% | PTEN (Phosphatase and Tensin Homolog) est une protéine onco--suppressive inhibant la phosphorylation de PI3K (antagonise la voie PI3K/AKT/mTOR). La délétion de *PTEN* ou sa mutation confère aux cellules une capacité de prolifération et de survie accrue. Récemment, la perte de PTEN a été décrite comme capable d'altérer le réseau de miARN et de contribuer ainsi à la croissance tumorale. | 42,43 |
| *ALTÉRATIONS CHROMOSOMIQUES* | Perte 19q | 4-6% | 32-54% | La perte partielle ou complète de chromosomes au sein des gliomes peut avoir des conséquences opposées en terme de pronostic. L'haploinsuffisance affecterait majoritairement soit un grand nombre de gènes oncosuppresseurs soit ceux impliqués dans l'oncogenèse ou la chimiorésistance des GBM. Par exemple, le gène oncosuppresseur *CDH5* est situé en 1p36, une zone fréquemment délétée dans les gliomes. | 44-46 |
| | Perte 1p/19q | 2-8% | 0-13% | | |
| | Perte 10p | 47% | 8% | | |
| | Perte 10q | 67-70% | 63-73% | | |

On distingue les GBM primaires des GBM secondaires. Les GBM primaires constituent la majorité des GBM (environ 90 %). Ils surviennent *de novo*, sans signe précurseur de lésion[13]. Les patients atteints de GBM primaires sont globalement plus âgés: 55 ans en moyenne contre 40 ans pour les patients déclarant un GBM secondaire. Les GBM secondaires se développent à partir de gliomes de plus bas grade (grade OMS II ou III) et sont de pronostic plus favorable[5,14]. La différenciation histopathologique de ces deux sous-types de GBM est délicate. C'est pourquoi, des études ont cherché à définir leurs profils mutationnels et leurs cellules d'origine respectives[15].

Dès les années 1990, il a été démontré que les altérations génétiques à l'origine des modèles de progression tumorale primaire et secondaire étaient différentes[16–18] (Figure 1). Le GBM primaire se caractérise par une amplification du récepteur au facteur de croissance épidermique (EGFR) dans 36% des cas, une délétion de *p16*$^{INK4A}$ dans 31 %, une mutation de *PTEN* dans 25 % et la perte du chromosome 10[19–22]. Les altérations génétiques caractéristiques des GBM secondaires sont les mutations de l'isocitrate déshydrogénase-1 (*IDH1*) dans 70-100 %, les mutations de *TP53* (65% des cas), et la perte du chromosome 19q[15,20,23–28]. La mutation d'*IDH1* est utilisée comme marqueur moléculaire des GBM secondaires et permet de discriminer les deux sous-types de GBM. Avant son identification en 2008, le diagnostic était basé sur des arguments cliniques.

Les technologies de séquençage à haut débit (HTS) ont permis de réaliser des progrès considérables dans la compréhension de la biogenèse des GBM[22,29–32](Figure 2). Les lésions génétiques retrouvées dans les GBM contribuent soit à activer des voies de signalisation indispensables à l'homéostasie cellulaire (prolifération, survie, invasion et migration, métabolisme énergétique, angiogenèse) soit à déréguler directement les protéines oncosuppressives impliquées dans le contrôle du cycle cellulaire comme une mutation entraînant la perte de fonction (Tableau 1)[13,31–46].

Les voies de signalisation les plus fréquemment altérées au sein des cellules de GBM sont les voies impliquant EGFR et les kinases PI3K/Akt, les mécanismes de sauvegarde dépendants des protéines p53, RB et du TGF-β ainsi que les voies de signalisation Notch et NF-κB[32,47]. Une étude récente combinant des approches génétiques, transcriptomiques et épigénétiques à haut débit, a permis de distinguer jusqu'à 6 sous-types moléculaires de GBM[32,48]. Le GBM est donc un néoplasme très hétérogène du point de vue morphologique et de la différenciation cellulaire tant aux échelles intra-tumorales qu'inter-tumorales[13]. Cette hétérogénéité est renforcée au cours du temps car le profil moléculaire des GBM est façonné par interaction avec le microenvironnement tumoral changeant par les degrés d'hypoxie, d'inflammation ou par l'exposition à des chimiothérapies.

Bien que le GBM soit l'un des cancers les mieux caractérisés au niveau moléculaire, l'identité des cellules initiatrices des GBM (primaires et secondaires) reste controversée. On ne sait pas si ces

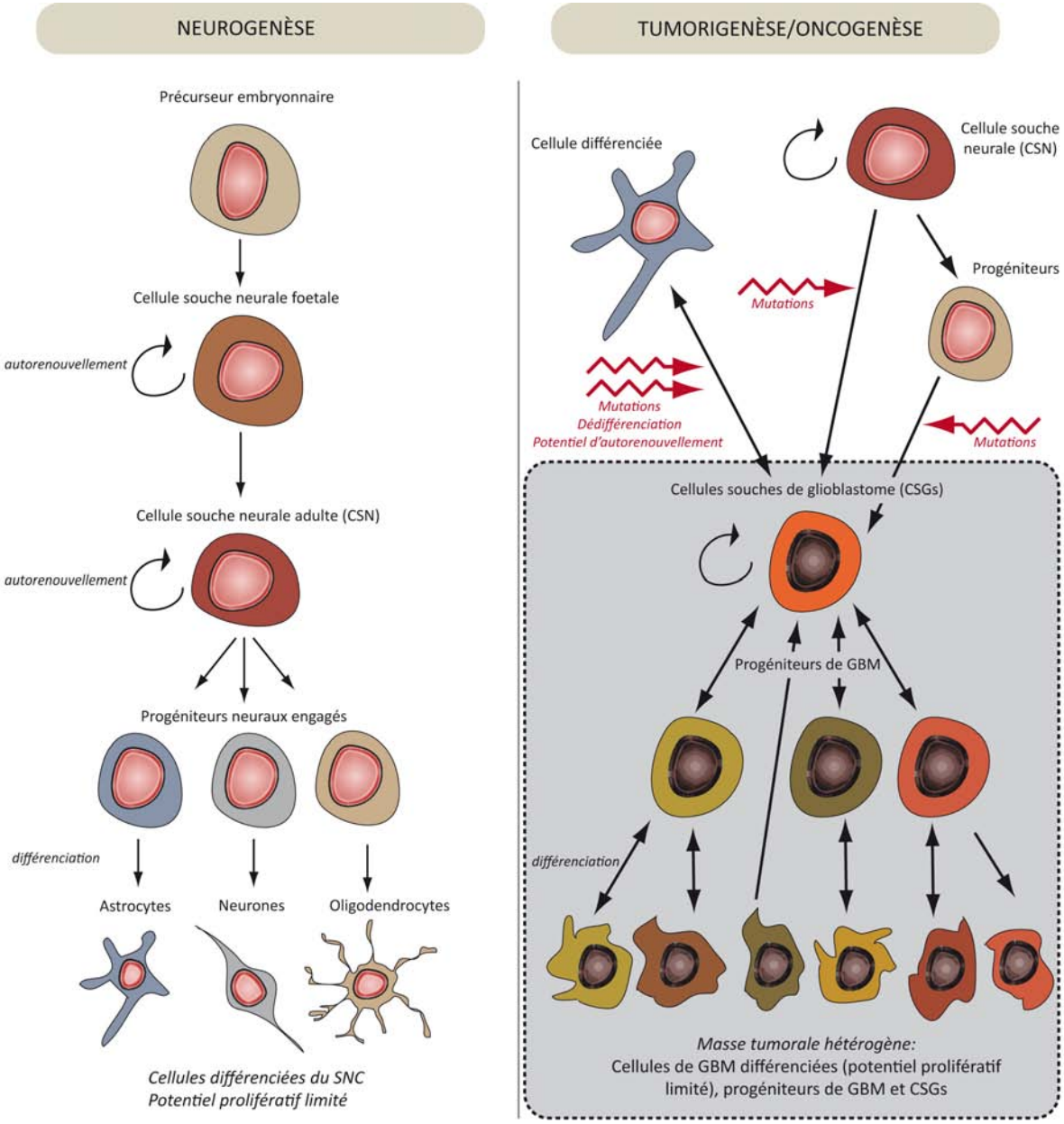



**Figure 3: Parallèle entre la hiérarchisation cellulaire au sein du SNC normal et dans le modèle du GBM** d'après O'Connor *et al.*, 2014; Pardal *et al*., 2003; SK Singh *et al*., 2004; Zhang *et al.,* 2014.

**Tableau 2: Biomarqueurs prognostiques et prédictifs dans les GBM et gliomes anaplasiques** (AO: Oligodendrogliomes anaplasique, AOA, Oligoastrocytome anaplasique, AA: astrocytome anaplasique) d'après Masui *et al.,* 2012.

| | Méthylation MGMT | Mutation *IDH1/2* | Codélétion *1p/19q* | Statut d'*EGFR* et *PI3K/AKT/mTOR* | Mutations de la voie *TP53* | Mutations de la voie *RB* | Marqueurs des cellules souches | miARN |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Gliomes anaplasiques (Grade III) | Pronostique: AA, AO, AOA | Pronostique: AA, AO | Pronostique/ Prédictif : AO | Pronostic négatif: AA | *inadapté* | *inadapté* | Pronostic négatif? | Pronostic négatif? |
| GBM (Grade IV) | Pronostique/ Prédictif | Pronostique | Pronostique? | Pronostic négatif Prédictif de l'efficacité des thérapies ciblées? | *inadapté* | *inadapté* | Pronostic négatif? | Pronostic négatif? |

tumeurs naissent de la dédifférenciation de cellules gliales matures transformées ou de la transformation de cellules souches neurales ou de progéniteurs neuraux (Figure 3)[15,49]. En revanche, de nombreuses preuves expérimentales étayent l'hypothèse de l'existence d'une sous-population de cellules souches cancéreuses au sein des GBM: les cellules souches de GBM (CSG)[50–62]. Ces cellules sont hautement tumorigènes, pluripotentes et ont la capacité de s'autorenouveller. Les CSG assureraient l'initiation et le maintien des GBM[14,49,63,64]. Des cellules souches différentes seraient à l'origine des GBM primaires et secondaires[65]. De cette théorie découle une organisation hiérarchisée des GBM dérivant de précurseurs ou de cellules souches neurales transformés.

### 1.1.3 Une classification moléculaire en renfort de la classification histopathologique de l'OMS

La classification de l'OMS est reconnue par la communauté scientifique internationale et apporte des éléments fondamentaux en terme de diagnostic et de pronostic, toutefois elle manque de reproductibilité (inter- et intra-clinicien) et d'efficacité pronostique[66]. En effet, un même sous-type histologique regroupe des GBM aux profils moléculaires très différents[46].

La progression dans la caractérisation moléculaire et génétique des GBM a permis l'identification de facteurs moléculaires diagnostiques, pronostiques et prédictifs offrant un potentiel d'objectivité et de reproductibilité plus important dont *TP53*, *IDH1*, *MGMT, EGFR* et les chromosomes 10, 19q[67,68]. L'utilisation en routine de ces données en complément des données histopronostiques actuelles permettra de guider les neuropathologistes et de rationnaliser les prescriptions, notamment celles des thérapies ciblées (Tableau 2)[3].

## 1.2 Les stratégies thérapeutiques actuelles

### 1.2.1 Gold standard

#### *1.2.1.1 Traitement de première ligne*

La prise en charge thérapeutique du GBM est guidée par la classification de l'OMS[9]. Après établissement du diagnostic, le traitement standard de première ligne consiste en une exérèse la plus large possible[69] suivie dans un délai de 4 à 6 semaines de radio-chimiothérapie concomitante[1] puis de chimiothérapie adjuvante (témozolomide/TMZ)[1,70]. Bien que les GBM ne soient pas curables par chirurgie, cette approche est importante car elle permet de confirmer histologiquement le diagnostic et elle revêt un rôle thérapeutique en diminuant la pression intracrâniale. Cette combinaison est actuellement la plus efficace et permet une survie globale de 14,6 mois. Pour l'instant, l'adjonction de bévacizumab (Avastin™) n'a pas encore reçu d'autorisation de mise sur le marché dans l'indication GBM en Europe.

**Tableau 3: Résumé non-exhaustif des thérapies ciblées et biothérapies actuellement en cours d'essai clinique** d'après Persano *et al.,* 2013; Kwiatkowska *et al.*, 2013; Wilson *et al.*, 2014 et clinicaltrials.gov

| | Mode d'action | Médicament et cible moléculaire | N° identification de l'essai clinique |
|---|---|---|---|
| Thérapies ciblées | *Inhibition des voies de signalisation des facteurs de croissance:*<br>EGFR, PDGFR, VEGFR<br>*Inhibition de l'angiogenèse:*<br>VEGF<br>*Inhibition des voies de signalisation intracellulaires:*<br>PI3K/AKT/mTOR | Bevacizumab: anticorps monoclonal anti-VEGFR<br>Vandetanib: inhibiteur de tyrosine kinase anti-VEGFR et anti-EGFR<br>Cediranib: inhibiteur de tyrosine kinase anti-VEGFR<br>(associés au témozolomide+/- radio--thérapies/ monothérapie) | NCT00621686<br>NCT00293666<br>NCT00441142<br>NCT00613223<br>NCT00821080<br>NCT00613054<br>NCT00305656<br>NCT01062425 |
| Immuno--thérapies | *Immunothérapie passive:*<br>Anticorps monoclonaux<br>Thérapies médiées par les cytokines<br>Transfert adoptif de cellules<br>*Immunothérapie active:*<br>Approches peptidiques<br>Approches cellulaires | *Nivolumab, Ipilimumab*:anticorps anti-PD1 et anti-CTLA4<br>*Indoximod*: inhibiteurs d'indoléamine-2,3 - dioxygénase (IDO)<br>*Anticorps anti-EGFRvIII conjugués:* AMG 595<br>*Rindopepimut* (CDX-110): vaccin ciblant le peptide mutant EGFRvIII<br>*DCVax-L, ICT-107*: vaccin de cellules dendritiques dirigées contre un lysat tumoral du patient. | NCT02017717<br>NCT02052648<br>NCT01475006<br>NCT01480479<br>NCT01498328<br>NCT00045968<br>NCT01280552 |
| Thérapies géniques | *Cytotoxicité conditionnelle*:<br>thérapie par activation enzymatique de pro-drogues, thérapie génique suicide<br>*Immunostimulation:*<br>*Virothérapie oncolytique*: | *Adv-TK:* Adénovirus exprimant le gène codant pour la thymidine kinase de l'HSV suivi de traitement par un anti-herpétique, Valaciclovir.<br>*AdV-hCMV-Flt3L*: transfert de gènes de lyse tumorale direct et de stimulation immune en vecteurs adénoviraux.<br>*H-1 parvovirus (ParvOryx-01):* injection intra--cérébrale ou intraveineuse.<br>*AdV-Delta-24-RGD-4C*: injection intracérébrale | NCT00589875<br>CT00870181<br>NCT01811992<br>NCT01301430<br>NCT00805376 |

#### *1.2.1.2 Traitement des récidives*

La conduite à tenir en cas de progression tumorale vraie est floue et doit être discutée en réunion de concertation pluridisciplinaire. Il n'y a pas encore de traitement standard. En fonction de l'état clinique du patient, plusieurs possibilités peuvent être envisagées: reprise neurochirurgicale[71], insertion d'implants de carmustine (GLIADEL®)[72], ré-irradiation en conditions stéréotaxiques[73,74], chimiothérapie et thérapies ciblées de 2ème ligne, au sein d'un essai clinique ou hors essais[75].

#### *1.2.1.3 Traitements symptomatiques*

Les crises d'épilepsie, les hypertensions intracrâniennes ou les confusions sont prises en charge selon les recommandations des référentiels [76].

### 1.2.2 Les thérapies ciblées et biothérapies à l'étude

Différentes sous-populations cellulaires caractérisées par des altérations génétiques diverses coexistant au sein des GBM, des stratégies thérapeutiques ciblées spécifiquement contre ces altérations sont évaluées (Tableau 3). Leurs bénéfices cliniques sont pour l'instant limités et aucune n'a reçu d'autorisation de mise sur le marché dans l'indication GBM[77–84]. L'amélioration de la compréhension de la physiopathologie des GBM, à savoir l'étude des causes et des effets des GBM, est nécessaire pour accroître l'efficacité de ces thérapies ciblées et rationnaliser leur prescription[3].

## 1.3 Les cellules souches de glioblastome: implication et potentiel thérapeutique

### 1.3.1 Découverte et définition des cellules souches de glioblastome

Un nombre de données croissant démontre l'existence d'une sous-population tumorale mineure responsable du maintien et de la tumorigénicité des GBM[49,52,53,58,85,86]. Comme dans les leucémies[59,86,87], des cellules souches cancéreuses (CSC) ont été isolées au sein des GBM. Ces cellules tumorales possèdent de nombreuses caractéristiques des cellules souches neurales (CSN) telles leur capacité d'auto-renouvellement, leur pluripotence et l'expression de marqueurs comme CD133, NESTIN et SOX2[49,63]. Les CSG sont hautement tumorigènes, par leur capacité d'échappement aux mécanismes de sauvegarde, leurs résistances multiples et leur dédifférenciation. Contrairement aux cellules tumorales différenciées, elles sont capables d'induire la formation de tumeurs similaires à celles dont elles sont issues suite à xénogreffe dans des modèles murins[49]. Le maintien des propriétés de cellules souches est directement influencé par le microenvironnement tumoral. Leur niche joue un rôle protecteur et augmente le développement de résistances aux radio- et chimiothérapies. D'autre part, les CSC possèdent des capacités accrues de réparation des lésions à l'ADN. Toutes ces caractéristiques des CSG favorisent la progression et la récidive tumorales[63,88].

### 1.3.2 Approches thérapeutiques exploitant la théorie des cellules souches de glioblastome

La présence des CSC au sein des GBM a considérablement modifié les modèles de progression et de dissémination tumorales. En effet, un grand nombre des propriétés initialement attribuées aux

**Tableau 4: Implications thérapeutiques potentielles des cellules souches de glioblastome (CSG)**

| | *CIBLES* | *THÉRAPIES CIBLÉES ANTI-CSG À L'ESSAI/ POTENTIELLES* | *RÉFÉRENCES* |
|---|---|---|---|
| Cibler le micro-environnement /la niche vasculaire des CSG | 1) Cibler l'hypervascularité des CSG *VEGF* *SDF-1* | Bevacizumab: anticorps monoclonal anti-VEGF | 80-82, 99 |
| | 2) Cibler l'hypoxie: responsable de l'hypersécrétion de VEGF | HIF2α: cible thérapeutique potentielle | 100-104, 141 |
| Cibler les mécanismes assurant le maintien/ les spécificités des CSG | 1) Cibler les marqueurs de surface spécifiques des CSG | CD15, A2B5, L1CAM | 105-110 |
| | 2) Cibler les résistances thérapeutiques des CSG | Radiorésistance: Notch, SirT1, HSP90 Chimiorésistance: Transporteurs ABC, PARP-1 | 100-104 |
| | 3) Bloquer les voies de signalisation spécifiques des CSG | RTK/Akt,Notch, BMPs/TGF-β, Hedgehog-Gli, Wnt-β-caténine, STAT3, GSK-3β | 111-138 |
| | 4) Induire la différenciation des CSG | YB-1, BMPs, mTOR, PTEN | 38, 43, 83,125-139 |
| | 5) Cibler les FT et les **ARN non-codants** assurant le maintien des CSG | c-Myc, Olig2,Bmi1, miARN | 142-146 |

cellules néoplasiques malignes semble refléter exclusivement l'activité de ces populations de CSC: la capacité d'autorenouvellement, la pluripotence et la plasticité. Les CSG constituent donc une cible thérapeutique fondamentale[46]. Il est donc primordial d'identifier des marqueurs diagnostiques et pronostiques fiables de ces cellules et de comprendre les processus moléculaires contrôlant leur maintien et leur tumorigénicité afin de développer des stratégies anti-tumorales innovantes plus ciblées et efficaces[86,87,89–96]. Plusieurs études cherchent à développer des thérapies ciblant les CSG[38,97–146](Tableau 4). Nous nous concentrerons particulièrement sur le rôle des ARN non-codants dans le maintien des CSG et des cellules de GBM non souches.

### 1.4 Implications des ARN non-codants dans la tumorigénicité du glioblastome et des cellules souches de glioblastome

La théorie du flux d'informations génétiques unidirectionnel *ADN-ARNm-protéine* a longtemps été acceptée pour expliquer la diversité biologique. Toutefois, au cours de l'évolution, l'augmentation du nombre de gènes codant des protéines n'est pas proportionnelle à l'amélioration des capacités cognitives. D'autre part, bien que 90 % des séquences d'ADN du génome humain puissent être transcrites, seulement 2 % de celles-ci codent des protéines. Ces données laissent supposer l'existence de mécanismes de régulation de la diversité génétique et transcriptomique inexplorés comme les possibilités d'épissage alternatif, d'édition de l'ARN et de synthèse d'ARN non-codants, notamment au sein du SNC, l'organe possédant le transcriptome le plus complexe[147–150].

Les recherches de ces 20 dernières années ont mis en évidence le rôle central des ARN dans la régulation de processus biologiques complexes et plus particulièrement celui des ARN non-codants (ARNnc). Ces derniers contrôlent la transcription, la synthèse protéique et les modifications de la structure de la chromatine[151–154]. Les ARNnc sont actuellement classés en 3 groupes en fonction de leur taille. Ce critère est utilisé compte-tenu du peu d'informations disponibles sur leurs fonctions moléculaires[155]. On distingue ainsi (1) les ARNnc courts de 17 à 20 nucléotides de long, regroupant les microARN, les piwiARN et les ARN assurant l'initiation de la transcription (ARNti); (2) les ARNnc intermédiaires de 20 à 200 nucléotides de long, regroupant les petits ARN nucléolaires (ARNsno) et les ARN constituant le splicéosome (ARNsn); (3) les ARN longs non-codants (lncARN) de plus de 200 nucléotides, comprennent entre autres les ARN longs non-codants intergéniques (lincARN), les pseudogènes et les ARN circulaires (circARN)[152,156].

### 1.5 Exposé des motifs de la thèse

Les mécanismes régulant l'expression et la fonction de la plupart des ARNnc restent pour l'instant inconnus. Toutefois, plusieurs études ont mis en évidence la dérégulation de certains ARNnc dans le cadre de la tumorigenèse. Ces ARNnc joueraient un rôle lors de l'initiation et de la progression tumorale du GBM[157–159]. Dans ce travail, nous étudions en détail les fonctions des microARN, des ARN

longs non-codants (lncARN) ainsi que des petits ARN nucléaires (ARNsn) et leurs applications potentielles en tant que biomarqueurs diagnostiques, pronostiques, prédictifs et comme cible thérapeutique dans la prise en charge du GBM.

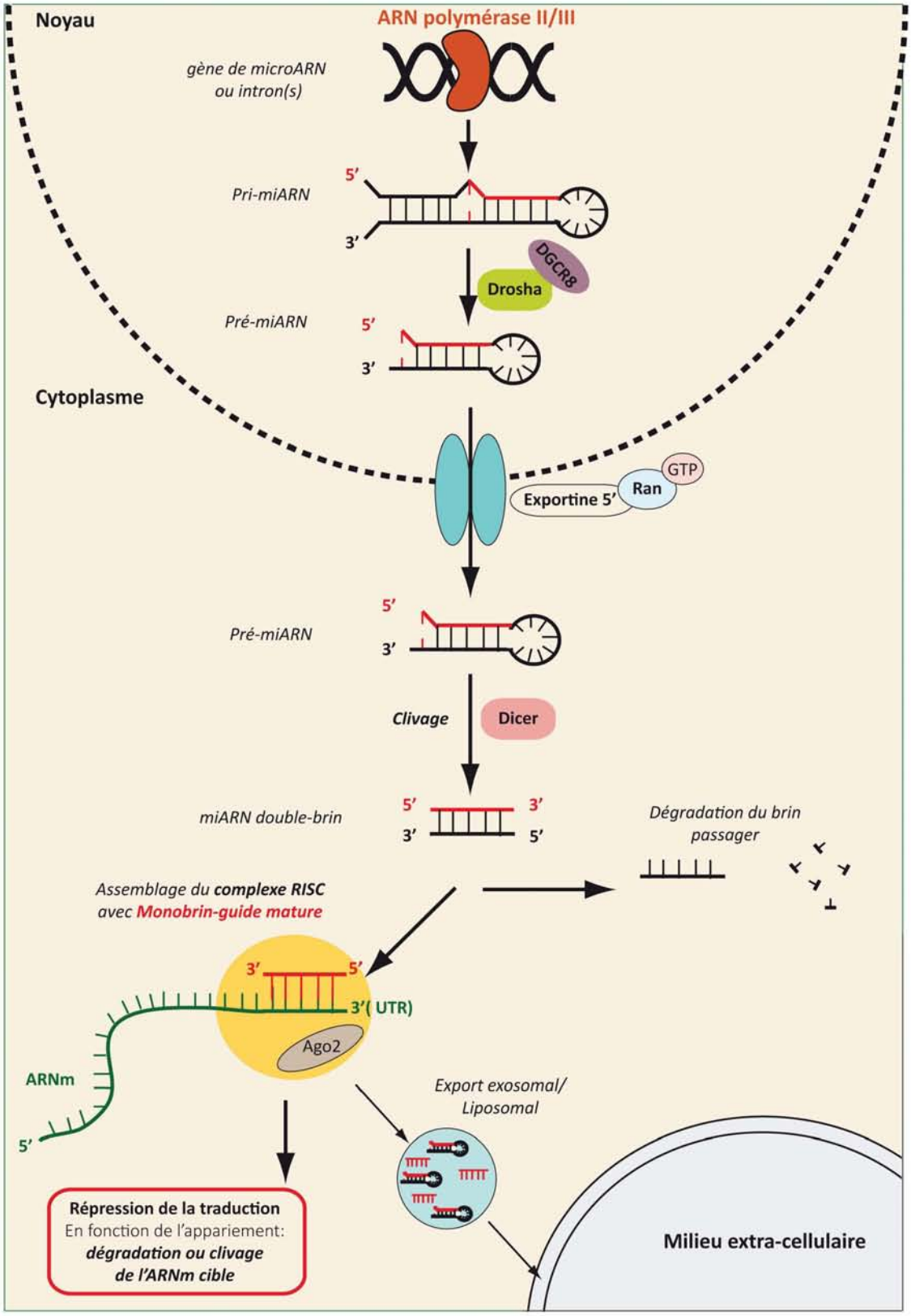



**Figure 4: La biogenèse des microARN** d'après Moller *et al*., 2012

## 2. Les microARN

### 2.1 Les microARN: généralités

#### 2.1.1 Introduction: Biogenèse et fonction des microARN

Les microARN (miARN/miR) sont constitués de monobrins d'ARN courts de 18-25 nucléotides. En se liant aux extrémités 3' non traduites (3'UTR) de leurs ARNm cibles, les microARN répriment post-transcriptionnellement l'expression des gènes (Figure 4). Toutefois, ce mécanisme n'est pas exclusif, les microARN sont également capables de se lier aux extrémités 5'UTR des ARNm induisant ainsi soit une répression soit une activation de l'ARNm cible[160]. L'expression des microARN est donc un mécanisme essentiel du contrôle de l'expression des gènes, 60% des gènes étant potentiellement ciblés par des microARN[161].

*Transcription des miARN*

Les régions du génome codant les miARN ou "gènes des miARN", peuvent se trouver au sein d'exons ou d'introns (environ ¼ des miARN[162]). Les miARN peuvent être transcrits individuellement ou en groupes dénommés "cluster"[163]. Quelle que soit la localisation du miARN, la première étape de sa biogenèse consiste en la synthèse d'un transcrit primaire (pri-miARN) par les ARN polymérases II/III au sein du noyau (Figure 4)[164,165].

*Maturation des miARN*

Comme les transcrits issus de gènes codant des protéines, les pri-miARN possèdent une coiffe en 5' et une queue de polyadénosine (polyA) en 3'[166]. Le pri-miARN forme une structure en boucle par appariement de séquences partiellement complémentaires[167]. Cette structure est reconnue et clivée par la ribonucléase nucléaire DROSHA associée à DGCR8 (protéine de liaison à l'ARN) de manière à générer un pré-miARN[168]. Le pré-miARN est exporté vers le cytoplasme et clivé par l'endoribonucléase DICER (RNase III) qui génère un fragment de microARN double-brin [169]. Seul un brin constitue le miARN fonctionnel (brin guide/mature). L'autre brin est rapidement dégradé[170].

*Assemblage du complexe RISC*

Le miARN monobrin mature s'associe ensuite avec les protéines Argonaute pour former le complexe RISC "RNA-Induced Silencing Complex". Le miARN guide le complexe vers la/les région(s) cis-régulatrice en 3'-UTR de(s) ARNm cible(s) et s'apparie avec celle(s)-ci. En fonction du degré de complémentarité de cet appariement, la liaison du miARN induit soit la dégradation de l'ARNm soit l'inhibition de la traduction[171] (Figure 4). La spécificité des microARN est faible car elle réside en une séquence de liaison à l'ARNm d'environ 7 nucléotides à leur extrémité 5'. Un même miARN peut donc se lier à plusieurs ARNm cibles[172]. Les microARN peuvent être excrétés et véhiculés par des

**Tableau 5: MicroARN fonctionnant comme des oncogènes ou des oncosuppresseurs dans différents cancers**

| microARN | Dérégulé dans: | Fonctions: | Références |
|---|---|---|---|
| miR-15a | Perte d'expression dans les Leucémie Lymphoïde Chronique (LLC) | Oncosuppresseur, induit l'apoptose et inhibe la tumorigenèse (cible *Bcl2, Wt1, Rab9B, Mage83*) | 176, 179, 382 |
| miR-16-1 | Perte d'expression dans les cancers de la prostate et les myélomes multiples | Idem que miR-15a | |
| Let-7 (a,b,c,d,e,f,g,i) | Perte d'expression dans les cancers pulmonaires et mammaires et dans d'autres tumeurs solides et hémato--poïétiques | Oncosuppresseur, induit l'apoptose et inhibe la tumorigenèse (cible *RAS, Myc, HMGA2*) | 181, 182 |
| miR-29 (a,b,c) | Perte d'expression dans les LLC agressives, les leucémies myéloïdes aigues (LMA), les cancer pulmonai--res et mammaires | Oncosuppresseur, Induit l'apoptose et inhibe la tumorigenèse Réactive gènes des oncosuppresseurs (cible *TCL1, MCL1, DNMTs*) | 183, 184 |
| miR-34 | Perte d'expression dans les carcin--omes pancréatiques, coliques, ma--mmaires et hépatiques | Oncosuppresseur, Induit l'apoptose et bloque le cycle cellulaire (cible *CDK4,CDK6 cycline E2, Met*) | 185-186 |
| miR-145 | Perte d'expression dans les carcinomes mammaires | Oncosuppresseur, Inhibe la prolifération et induit l'apoptose (cible *ERG*) | 278-280, 325, 360, 439 |
| miR-221/222 | Perte d'expression dans les leucémies erythroblastiques | Oncosuppresseur, inhibe la prolifération des erythroblastes (cible *c-Kit*) | 188-191 |
| | Surexpression dans les LLC agressi--ves,les carcinomes thyroïdiques et hépatocellulaires, les GBM | Oncogène, induit la prolifération cellulaire et inhibe l'apoptose (cible p27, p57, PTEN, TIMP-3...) | |
| miR-17-92 | Surexpression dans les lymphomes, les carcinomes coliques, mammai--res,pancréatiques, stomacaux | Oncogène, induit la prolifération cellulaire (cible *E2F1, Bim, PTEN*) | 192,246 |
| miR-21 | Surexpression dans les GBM, les carcinomes mammaires, coliques pancréatiques, de l'estomac | Oncogène, inhibe l'apoptose et augmente la tumorigénicité | 194, 224, 228, 229 |

lipoprotéines, des microvésicules, des corps apoptotiques ou des exosomes. Ces microARN constituent un moyen de communication intercellulaire[173,174].

### 2.1.2 Lien entre microARN et tumorigenèse

L'importance des miARN dans l'homéostasie de l'expression génique et le fonctionnement cellulaire: prolifération, différenciation, apoptose, angiogenèse, transition épithélio-mésenchymateuse (TEM) est décrite dans différents contextes physiologiques et pathologiques[161,175]. La première corrélation entre l'expression de miARN et la tumorigenèse date de 2002[176]. Calin *et al*. ont démontré qu'un nombre significatif de gènes codant des miARN se trouvent sur des régions instables génétiquement impliquées dans la cancérogenèse[177]. Les altérations génétiques, délétion, mutation, amplification, de ces régions provoquent un changement du niveau d'expression des miARN résultant soit en la surexpression de miARN oncogéniques/oncomirs soit en la perte de miARN oncosupresseurs[178–195]. Ces données suggèrent que les miARN peuvent-être des cibles et peuvent cibler par eux-mêmes des voies de signalisation de la tumorigenèse. Par la suite, en plus des altérations génétiques, d'autres mécanismes affectant l'expression des microARN ont été mis en évidence: modifications épigénétiques (hyperméthylation des ilôts CpG), activation aberrante de certains facteurs de transcription (c-MYC)[167] ou encore perte de l'extrémité 3'UTR par épissage (EA) et polyadénylation (APA) alternatifs abolissant le rétrocontrôle négatif des microARN[196]. Ainsi, l'implication des perturbations affectant les réseaux de miARN a été demontrée dans l'initiation et la progression de nombreux cancers: colorectaux, pancréatiques, lymphoïdes, mammaires, pulmonaires ou hépatiques[197–203] (Tableau 5).

Le lien entre microARN circulants et tumorigenèse a été établi en 2008. Ces miARN excrétés par les cellules tumorales sont véhiculés dans la circulation et captés par leurs cellules cibles déclenchant ainsi leur transformation puis la synthèse de microvésicules oncogéniques (Figure 5 p 30)[174,204]. L'activité paracrine des microARN circulants est donc une arme dont disposent les cellules tumorales pour se façonner un microenvironnement favorable[205,206]. D'autre part, certains microARN excrétés sont des agonistes de récepteurs clés de l'inflammation et participent au recrutement de cellules immunitaires, favorisant l'inflammation et un stress oxydant chronique et ainsi le processus métastatique (récepteur du type Toll-8/ TLR-8)[207].

En 2005, Chan *et al.* et Ciafrè *et al.* furent les premiers à identifier une altération de l'expression des microARN au sein des GBM[193,208]. Depuis, plusieurs études ont évalué les profils d'expression des microARN au sein des GBM et reporté différentes altérations[146,209–214](Tableau 6). Le rôle des microARN circulants, détaillé dans la section 3, a été mis en évidence en 2012 chez les patients atteints de GBM[215,216]. Les microARN constituent donc des cibles thérapeutiques

**Tableau 6: MicroARN dérégulés au sein des GBM**

| | miARN | Expression relative | Fonction | Cibles | Références |
|---|---|---|---|---|---|
| Caractérisation fonctionnelle détaillée | miR-7 | Sous-exprimé | Oncosuppresseur | inhibe la voie Akt (cible l'*EGFR* et l'*IRS-2*) et exerce une activité anti-migratoire et invasive (cible les kinases *PAK1* et *FAK*) | 31, 262-266 |
| | miR-10b | Sur-exprimé | Oncogénique | induit la prolifération et l'échappement à l'apoptose et à la sénescence (cible les protéines pro-apoptotiques *Bim* et *TFAP2C*) | 146, 208, 211, 212,, 234-236 |
| | miR-17-92 | Sur-exprimé | Oncogénique | induit l'angiogenèse, la prolifération et la réparation de l'ADN diminuant la chimiosensibilité (cible *CTGF, POLD2, TGFBRII, SMAD4*) | 212, 246-248 |
| | miR-21 | Sur-exprimé | Oncogénique | induit une prolifération accrue et l'échappement à l'apoptose ( cible *RECK, TIMP-3,APAF-1, HNPRK, DAXX, ANP32A, SMARCA4, PTEN, caspases*) | 221-232 |
| | miR-34a | Sous-exprimé | Oncosuppresseur | induit par p53, active les programmes d'intégrité cellulaire(apo--tose, sénescence) inhibe la prolifération (cible *c-Myc, Notch, c-Met, PDGFRA, CDK6, Smad4, Sirt1*) | 42,255-259 |
| | miR-100 | Sous-exprimé | Oncosuppresseur | cible le corépresseur nucléaire *SMRT/NCOR2* dont l'activité est indispensable à la croissance des cellules tumorales | 275 |
| | miR-124/137 | Sous-exprimés | Oncosuppresseur | bloque le cycle cellaire en G0/G1, induit la différenciation des CSG (ciblent *SCP1, PTB/hnRNP I, CDK6, Msi1*) | 146, 267-270 |
| | miR-128 | Sous-exprimé/ réprimé | Oncosuppresseur | bloque le cycle cellulaire, inhibe la prolifération et l'autorenou--vellement des CSG (cible *E2F3a, EGFR, PDGFRA et Bmi*1) | 209, 216 358, 359 |
| | miR-155 | Sur-exprimé | Oncogénique | induit la croissance tumorale et la prolifération (cible, FOXO3a, MXl1) | 237-239 |
| | miR-181 | Sous-exprimés | Oncosuppresseur | induit l'apoptose, réduit la prolifération cellulaire, l'invasion et la croissance de cellules non-adhérentes (cible *Rap1B, FOS, MEK, IGF-1R*) | 144, 271, 274 |
| | miR-195 | Sous-exprimé | Oncosuppresseur | bloque le cycle cellulaire et inhibe l'invasion (cible *E2F3* et *CCND3*) | 335 |
| | miR-221/222 | Sur-exprimés | Oncogéniques | permettent la survie, la prolifération et la migration cellulaire (cible *p27* et *p57, Akt, PTPμ, TIMP-3, Cx43, PUMA* et *MGMT)* | 188-191, 208, 211, 241-245 |
| Caractérisation fonctionnelle partielle | miR-19a | ND | Supposé oncogène | inhibe l'apoptose et induit la prolifération (cible *CTGF*) | 175, 295, 366 |
| | miR-26b | Sous-exprimé | Supposé oncosuppresseur | réduit la prolifération, l'invasion et l'angiogenèse (cible *EphA2*) | 286 |
| | miR-27b | Sur-exprimé | Supposé oncogénique | inhibe l'apoptose, promeut l'invasion et la prolifération | 287 |
| | miR-20a/ 106a | Sous-exprimé | Oncosuppresseur | inhibe la prolifération et l'absorption du glucose, induit l'apop--tose (cible *E2F1* ce qui indirectement induit p53, *SLC2A3, TIMP-2* ) | 288, 290, 326 |
| | miR-139 | Sous-exprimé | Oncosuppresseur | Induit l'apoptose (cible *Mcl1*, une protéine anti-apoptotique de la famille Bcl2) | 284 |
| | miR-145 | Sous-exprimé | Oncosuppresseur | diminue la prolifération et l'invasion des cellules de GBM ( cible *ROCK1, Sox9, adducin 3*) | 278-280, 325 |
| | miR-149 | Sous-exprimé | Oncosuppresseur | diminue la prolifération, l'invasion (cible *Akt1*) | 251 |
| | miR-196 | Sur-exprimé | Oncogénique | induit la prolifération (cibles ND) | 292, 293, 335 |
| | miR-205 | Sous-exprimé | Oncosuppresseur | induit l'apoptose, arrêt de la prolifération, la diminution de l'invasion (cible *VEGFA*) | 289 |
| | miR-210 | Sur-exprimé | Oncogénique | cibles moléculaires non-déterminées | 281-283, 316 |

prometteuses[158,201,211] et des biomarqueurs d'intérêt diagnostiques et pronostiques[219,220] au sein des GBM.

### 2.1.3 MicroARN candidats au maintien de la tumorigénicité du glioblastome

#### *2.1.3.1 MicroARN surexprimés au sein des GBM*

##### 2.1.3.1.1 miR-21

Plusieurs analyses de profils d'expression ont mis en évidence la surexpression de miR-21 au sein des GBM[144,193,208,211,213,221,222]. MiR-21 semble exercer une action pro-proliférative et anti-apoptotique[218] en ciblant 3 voies de signalisation principales[221]: la voie de l'apoptose mitochondriale (*APAF1, caspases*[223]) et les apoptoses TGF-β (*TGFBR2/3* et *DAXX*[224]) et p53-dépendantes. En affranchissant les cellules de l'apoptose radio/chimio-induite, miR-21 contribue au développement de résistance au sein des GBM. Plus récemment, différentes fonctions oncogéniques ont été attribuées à miR-21 (Tableau 6): invasivité accrue par dégradation de la matrice extra-cellulaire en ciblant les inhibiteurs de métalloprotéinases *RECK* et *TIMP3*[222,225], inhibition du remodelage de la chromatine en ciblant les gènes *ANP32A* et *SMARCA4*[226], dérégulation du cycle cellulaire par activation constitutive des voies de signalisation des RTK (*SPRY2,LRRFIP1*)[227 228] ou par perte de *PTEN* [229–232].

##### 2.1.3.1.2 miR-10b

La surexpression de miR-10b au sein des GBM est reportée dans de nombreuses études[146,208,211,212,233]. miR-10b exerce son activité oncogénique en favorisant l'échappement à l'apoptose et la prolifération cellulaire. MiR-10b cible directement les protéines pro-apoptotiques BIM (famille *BCL2*) et le facteur de transcription AP-2γ (*TFAP2C*) impliqués dans la mort, l'invasion et la prolifération cellulaires[234,235]. L'expression de miR-10b a également été associée à celles de facteurs pro-invasifs comme RHOC un homologue de RAS et le récepteur de l'urokinase uPAR[211]. D'autre part, la fonction oncogénique de miR-10b semble être liée à celle de miR-21. En effet, la co-inhibition de ces deux miR freine synergiquement la prolifération et la survie des cellules de GBM et pourrait représenter une stratégie d'intérêt thérapeutique[236].

##### 2.1.3.1.3 miR-155

La surexpression de miR-155 a été identifiée dans plusieurs signatures de miARN au sein des GBM[237,238]. Bien que la caractérisation fonctionnelle de ce dernier soit plus limitée, la compréhension de ces fonctions oncogéniques progresse et plusieurs de ses cibles directes ont été identifiées. Il a récemment été démontré que l'extrémité 3'UTR de *MXI1*, un antagoniste de l'oncogène c-Myc, était ciblée par miR-155[239]. En diminuant l'expression de *MXI1*, miR-155 active c-Myc et participent à l'oncogenèse du GBM. D'autre part, miR-155 cible directement le facteur de transcription FOXO3a[237]. En inhibant FOXO3a, miR-155 participerait à l'activation des effecteurs de la voie Akt et induirait ainsi la prolifération et la survie des cellules de GBM. Par ailleurs, miR-155 inhibe également l'expression

des récepteurs GABA modifiant le métabolisme calcique en faveur d'un potentiel proliératif accru. Toutefois, la compréhension des mécanismes moléculaires sous-jacents reste floue[238,240].

##### 2.1.3.1.4 miR-221/222

Les miR-221 et 222 sont surexprimés au sein des GBM[208,210,241]. Ils possèdent les mêmes cibles moléculaires et favorisent la survie, la prolifération et la migration cellulaire par les effecteurs suivants: inhibiteur du cycle cellulaire *CDKN1B* ($p27^{Kip1}$) et *CDKN1C* ($p57^{Kip2}$), gène pro-apoptotique *PUMA, Cx43, PTPμ*[191,242–245]. D'autre part, il a récemment été démontré que miR-221/222 conféraient aux cellules une capacité accrue de réparation des lésions de l'ADN radio-induites en activant Akt[245]. *A contrario*, des propriétés oncosupressives ont été attribuées à miR-221/222: augmentation de la chimiosensibilité par répression de MGMT au sein des GBM. Toutefois, l'activité oncogénique des miR-221/222 semble prédominante et revêt donc un intérêt thérapeutique potentiel.

##### 2.1.3.1.5 Le cluster miR-17-92

Le miR-17-92 est un miR polycistronique constitué de 7 miR. Ce cluster est surexprimé dans les GBM et exerce des propriétés oncogéniques. Ces cibles directes sont impliquées dans la réparation de l'ADN, le contrôle de l'angiogenèse et de la prolifération : *CTGF, POLD2, TGFBR2, SMAD4*[212,246–248].

#### *2.1.3.2 MicroARN sous-exprimés dans les GBM*

##### 2.1.3.1.6 miR-128(-1,a)

miR-128 est spécifique du SNC[249]. C'est l'un des miR les plus fréquemment sous-exprimé voire réprimé au sein des GBM[208,209]. L'activité oncosuppressive de miR-128 est liée à ces différentes cibles: le facteur de transcription E2F3a nécessaire à la progression dans le cycle cellulaire, les récepteurs aux facteurs de croisssance EGFR et PDGFRA, l'oncogène de la famille RAS, RAP1B ainsi que le facteur BMI1 nécessaire au maintien des cellules souches neurales[209,250–252]. L'absence de miR-128 au sein des GBM confère aux cellules tumorales un potentiel d'autorenouvellement accru et un avantage proliératif.

##### 2.1.3.1.7 miR-34a

La transcription des miR de la famille 34 (miR-34a ,b et c) est p53-dépendante[253]. MiR-34a exerce une activité oncosuppressive en inhibant des gènes pro-proliératifs et en activant les programmes d'intégrité cellulaire que sont l'apoptose et la sénescence : *c-Myc, Notch-1 et 2, c-Met, PDGFRA, CDK6...*[42,253–258]. MiR-34a est sous-exprimé au sein des GBM suite à différentes altérations : méthylation du promoteur du gène, délétions en 1p[167,259]. Ce miR semble être un oncosuppresseur important dans le GBM. Nous détaillerons ces fonctions dans le maintien des propriétés des CSG[257,260].

**Tableau 7: MicroARN les plus fréquemment identifiés au sein des GBM** (différentiel d'expression supérieur à 2X dans au moins trois études)

| | microARN surexprimés | | microARN sous-exprimés | |
|---|---|---|---|---|
| Études de profils d'expression (n=10) | miR-21 | 8 | miR-128 | 4 |
| | miR-10b | 5 | miR-323 | 4 |
| | miR-155 | 3 | miR-330 | 4 |
| | miR-210 | 3 | miR-124 | 3 |
| | miR-221 | 3 | miR-149 | 3 |
| | | | miR-153 | 3 |
| | | | miR-181a | 3 |
| | | | miR-181b | 3 |
| | | | miR-181c | 3 |
| | | | miR-328 | 3 |
| Études ciblées (n=18) | miR-21 | 7 | miR-124a | 5 |
| | miR-10b | 3 | miR-7 | 3 |

#### 2.1.3.1.8 miR-7

Des études ont récemment mis en évidence la sous-expression de miR-7 au sein des GBM par défaut de clivage du précurseur pri-miR-7[31,261]. MiR-7 cible les ARNm de l'*EGFR* et l'*IRS-2,* deux effecteurs en amont de la voie Akt [262]. La perte de miR-7 provoque une activation constitutive de la voie Akt par excès de signalisation en amont. MiR-7 cible également deux kinases impliquées dans le contrôle de la prolifération et de l'adhérence cellulaire : la PAK1 (p21 activating kinase 1) et la FAK (Focal Adhesion Kinase)[263,264]. Ainsi, la sous-expression de miR-7 au sein des GBM confère aux cellules un avantage de survie et un gain de propriétés migratoires[262–266]. Ce miR pourrait donc constituer une cible d'intérêt thérapeutique dans la prise en charge des GBM.

#### 2.1.3.1.9 miR-124 et miR-137

La sous-expression des miR-124/137 au sein des GBM a été mise en évidence pour la première fois en 2008[146]. Silber *et al.* ont démontré que miR-124 et miR-137 bloquaient le cycle cellulaire des cellules de GBM en phase G0-G1. MiR-124 est important au cours de la neurogenèse et induit la différenciation de CSG en ciblant la phosphatase de la voie de signalisation anti-neurale REST/SCP1 ("*small C-term domain phosphatase 1"*)[267] et une ribonucléoprotéine maintenant les programmes d'épissage alternatif des cellules non-neuronales[268]. De son côté, miR-137 exerce une activité oncosuppressive en ciblant directement la kinase *CDK6* responsable de la progression dans le cycle cellulaire (G1/S) et l'oncoprotéine Msi1 régulant la traduction et le maintien des cellules souches, et Cox2, une enzyme aux propriétés pro-prolifératives[146,267–270]. L'expression de miR-137 est déréprimée suite à un traitement par des agents déméthylants de l'ADN, suggérant la régulation de miR-137 par un promoteur situé au sein d'un ilôt CpG[146]. Nous discuterons par la suite de l'utilité thérapeutique de ces deux miR.

#### 2.1.3.1.10 miR-181

Les transcrits de la famille des miR-181 (a,b,c,d) sont sous-exprimés dans 20 à 30% des GBM. Plusieurs équipes ont démontré que l'expression des miR-181 a et b induisait l'apoptose, réduisait la prolifération cellulaire et la malignité des cellules de GBM en ciblant *Rap1B, MEK1* et *IGF-1R*[144,271] ; miR-181b en exerce l'action la plus prononcée[272–274].

#### 2.1.3.1.11 miR-100

Alrfaei *et al.* ont récemment mis en évidence la sous-expression de miR-100 au sein de lignées cellulaires de GBM et identifié certaines de ses cibles moléculaires[275]. miR-100 cible le corépresseur nucléaire SMRT/NCOR2 modulant l'expression de gènes en recrutant des complexes de modification de la chromatine (HDAC). L'activité du complexe SMRT/NCOR2 est indispensable à la croissance et à la survie des cellules tumorales *in vitro*. MiR-100 pourrait donc constituer une cible d'intérêt thérapeutique dans le traitement des GBM[275].

**Tableau 8: MicroARN dérégulés au sein des cellules souches de glioblastome (CSG)**

| miARN | Expression relative | Cibles potentielles et fonctions | Références |
|---|---|---|---|
| miR-34a | Sous exprimé | Inhibe la prolifération, la progression dans le cycle cellulaire et l'invasion, mi--gration (cible c-Met,c-Myc, Notch1, Notch2, Rictor et autres ND) | 257, 260 |
| miR-146a | Non déterminé (ND) | Inhibe la prolifération et promeut la différenciation (cible *Notch1*) | 306, 368 |
| miR-326 | Sous exprimé et ND | Réduit la tumorigénicité, la croissance, l'invasion, l'activité métabolique (cible *PKM2, Notch1, Notch2*) | 307 |
| miR-18a | Surexprimé | Augmente la tumorigénicité, la dédifférenciation(cible *DLL3*, active la voie de signalisation Notch) | 308 |
| miR-9/9* | Surexprimé | Inhibe la différenciation et maintien des propriétés «souches» (cible *CAMTA1*) | 301 |
| miR-21 | Surexprimé | Promeut la survie et la croissance cellulaire, co-exprimé avec Sox-2 (cible *SPRY1* , un régulateur négatif de la différenciation des cellules souches neurales) | 310, 352 |
| miR-23b | Sous exprimé | Induit un arrêt du cycle cellulaire et inhibe la prolifération | 311 |
| miR-125b | Surexprimé<br>Sous exprimé | Promeut l'invasion(*MMP9*) et<br>inhibe la prolifération (*E2F2, CDK6, CDC25A*) | 302-304 |
| miR-124 | Sous exprimé | Inhibe l'invasion, la tumorigénicité, l'autorenouvellement et la pluripotence des CSG (cible *STAT3*, accentue la clairance des CSG, et *SNAI2,* inhibe la TEM) | 146,305 |
| miR-128 | Sous exprimé | Inhibe la prolifération et l'autorenouvellement et promeut la différenciation ( cible *Bmi-1, EGFR, PDGFRα*) | 209, 336, 358 |
| miR-137 | Sous exprimé | Promeut la différenciation et l'arrêt du cycle cellulaire (cible *RTVP-1*) | 146,309 |
| miR-143 | Sous exprimé | Inhibe la glycolyse en ciblant l'hexokinase 2, promeut ainsi la différenciation | 312 |
| miR-145 | Sous exprimé | Inhibe la migration et l'invasion (cible *CTGF, NEDD9, ABCG2, Sox2, Oct 4*) | 278-280, 313 |
| miR-153 | Sous exprimé | Inhibe les propriétés «souches» des CSG (autorenouvellement) et induit la différenciation | 320 |
| miR-204 | Sous exprimé | Inhibe la capacité d'autorenouvellement et d'invasion (cible *Sox4, Ephrin B2*) | 314 |
| miR-210 | Surexprimé | Permet la survie/le maintien des cellules souches en condition d'hypoxie ( cible *MNT*, un antagoniste de Myc) et la radiorésistance des CSG | 316 |
| miR-211 | Sous exprimé | Inhibe la migration et l'invasion des CSG (cible *MMP9*) | 315 |
| miR-218 | Sous exprimé | Inhibe les capacités d'autorenouvellement des CSG (cible *Bmi1*) | 321 |
| miR-328 | Sous exprimé | Inhibe les propriétés «souches» des CSG et induit la chimiosensibilité (cible *ABCG2*) | 322 |
| miR-330 | Surexprimé | Promeut la malignité des CSG en activant les voies ERK et PI3K/AKT (cible SH3GL2) | 323 |
| miR-451 | Sous exprimé | Inhibe la prolifération et la formation de neurosphères (cible *PI3K/AKT, CAB39*) | 145, 324 |
| miR-452 | Sous exprimé | Impliqué dans le maintien des capacités d'autorenouvellement des CSG ( cible *Bmi1, LEF1, TCF4*) | 317 |
| miR-455-3p | Surexprimé | Promeut la progression dans le cycle cellulaire et l'invasion des CSG (cible potentiellement *Smad2*) | 318 |
| miR-1275 | Surexprimé | Promeut la croissance cellulaire et inhibe la différenciation oligodendrocytaire (cible *Claudin 11)* | 319 |

#### *2.1.3.2 microARN dérégulés dans le glioblastome dont la caractérisation fonctionnelle est limitée*

De nombreux autres microARN dont l'expression est modulée au sein des GBM ont été recensés[259,276,277]: 95 microARN sont sous-exprimés et 255 sur-exprimés. Toutefois, leur caractérisation fonctionnelle est limitée. Les études à venir permettront de hiérarchiser et de caractériser leurs fonctions pour guider le développement de thérapies efficaces dans la prise en charge du GBM (Tableau 7)[212,261,273,274,278–293].

### 2.1.4 Fonction des microARN dans le maintien des propriétés des cellules souches de glioblastome

Les microARN sont impliqués dans plusieurs aspects de l'oncogenèse des GBM: échappement aux programmes de sauvegarde, prolifération, migration, invasion ainsi que dans le maintien des cellules souches de GBM[146,209,294,295]. Plusieurs études ont confirmé les altérations d'expression de certains microARN au sein des CSG[296]. Le rétablissement du taux d'expression de ces miARN induit la différenciation et/ou diminue la prolifération des CSG[145,255,297–299 300]. Les microARN impliqués dans la biologie des CSG sont regroupés au sein du tableau 8[145,146,209,252,257,260,278,299,301–326].

La plupart des études impliquant des microARN dans le maintien des CSG présente des limitations méthodologiques comme un mode de sélection incomplet des CSG[297]. D'autre part, bien que certains microARNs identifiés au sein des CSG modifient la capacité des cellules à s'autorenouveller et/ou leur capacité à exprimer leur pluripotence, certains affectent des propriétés communes aux cellules tumorales non-souches comme la prolifération, la migration et l'invasion. La pertinence de ces microARN dans le développement de thérapies ciblées contre les CSG est controversée.

## 2.2 Les microARN: pertinence clinique dans la prise en charge du glioblastome

### 2.2.1 Méthodologies et limitations

L'identification de corrélations entre profils d'expression de microARN et évolution clinique des patients atteints de GBM est une voie de recherche prometteuse et active. On recense environ 230 articles suite à la requête suivante : "(microRNA OR miRNA) AND (glioblastoma) AND (survival OR prognosis OR progression)", recherche faite le 31 juillet 2014 sur la base de donnée PubMed. Nous nous baserons donc sur les articles compilant un grand nombre d'études pour mettre en évidence les signatures de microARN et les microARN les plus pertinents en vue du développement de biomarqueurs fiables et/ou de stratégies thérapeutiques ciblées[159,276].

D'autre part, plusieurs biais doivent être gardés à l'esprit et peuvent expliquer les divergences entre les différentes études. Les techniques d'analyse de l'expression des microARN doivent être spécifiques, reproductibles, sensibles et doivent permettre d'exploiter les données des biobanques de tumeurs incluses en paraffines (FFPE). Les avantages et les inconvénients de chaque technique sont abordés dans le tableau 9[327–329]. Les paramètres statistiques peuvent également différer et

**Tableau 9: Avantages et inconvénients des techniques d'analyse des profils d'expression de microARN (et d'ARN non-codants)**

| | Méthode | Avantages | Inconvénients | Références |
|---|---|---|---|---|
| Microarrays | Hybridation entre les microARN étudiés et les sondes complémen--taires fixées sur les biopuces (marqua-ge fluorescent des microARN hybridés, détection des intensités de fluorescence). | Haut débit: profil d'expression simultané de nombreux microARN. Reproductible et rapide. | Nécessite une quantité d'ARN importante (100-1000 ng) Coûteux. Données non-quantitatives. Analyses bio-informatiques complexes. | 327 |
| qRT-PCR (*TaqMan ou SYBR Green*) | Transcription inverse et amplification des microARN (amorces spécifiques), sondes fluorescentes spécifiques. Pendant la PCR, le clivage de la sonde provoque une émission de fluorescen--ce qui permet une quantification spécifique du microARN amplifié. | Grande sensibilité et spé--cificité, méthode quantitative. | Coûteux, lent. Efficacité fortement dépen--dante de la normalisation / contrôle interne. | 327 |
| Hybridation in situ | Hybridation d'oligonucléotides modifi--és marqués (Locked Nucleic Acid) spé--cifiques du miARN cible (marquage fluorescence ou chromogène). | Identification des compar timents cellulaires spécifi--ques. Nécessite peu d'échan--tillon: tissus FFPE, biopsies de GBM difficile--ment accessible. | Nécessite optimisation. | 328 |
| NGS: *RNA-seq ou WTSS («Whole Transcriptome Shotgun Sequencing»)* | Création d'un ensemble de fragments d'ADNc à partir d'ARN totaux ou de fragments d'ARN. Ces ADNc sont liés à des adaptateurs et servent de matrice au séquençage (40-300 pb). L'ensemble de ces séquençages fournit un profil transcriptionnel de l'échanti--llon analysé (microARN). | Identifie à la fois le niveau d'expression et le type de microARN présents dans un échantillon.Non-res--treint aux microARN connus. Précision des niveaux d'expression des transcrits et des isoformes présents (épissage alternatif...). | Coûteux, long. Analyses bio-informatiques complexes. | 329 |

entraver la comparativité des résultats. La taille ou l'origine de la cohorte, le choix du tissu contrôle, la méthode de normalisation et l'évaluation de la progression par survie globale/OS ou survie sans progression/PFS sont des exemples illustrant ces divergences.

### 2.2.2 Les microARN : biomarqueurs diagnostiques et pronostiques

#### *2.2.2.1 microARN et diagnostic*

En 2012, Baraniskin *et al*. ont démontré que certains microARN présents dans le liquide céphalo-rachidien (LCR) pouvaient être utilisés à des fins diagnostiques dans les gliomes[330]. MiR-15b et miR-21 sont surexprimés dans le LCR des patients atteints de gliomes. La combinaison de l'analyse de ces deux microARN augmente à la fois la spécificité et la sensibilité du diagnostic. Une autre équipe a mis en évidence une signature de 7 microARN au sein du LCR capable de discriminer les gliomes des métastases cérébrales secondaires et de prédire l'évolution de la maladie[215]. L'expression du miR-10b semble être corrélée à la capacité d'invasion des gliomes et leur évolution vers le phénotype des GBM[211]. Enfin, l'étude des profils d'expression de certains microARN à partir de biopsies permet de rationnaliser le diagnostic des gliomes malins en discriminant les GBM des gliomes de grade III[213,233].

#### *2.2.2.2 microARN et pronostic*

En raison des problématiques abordées ci-dessus, les études évaluant les corrélations entre la survie des patients (OS ou PFS) et les profils d'expression des microARN divergent fréquemment. Toutefois, Hermansen *et al.* ont recensé les microARN dont les variations d'expression sont significativement corrélées au pronostic des GBM dans plusieurs études (Tableau 10)[159]. Certaines équipes ont cherché à établir des signatures de plusieurs miARN, d'autres se sont concentrées sur la caractérisation de microARN isolés.

##### 2.2.2.2.1 Signatures de microARN comme biomarqueur pronostique

Les bases de données principalement utilisées sont le "*Cancer Genome Atlas*" (TCGA: http://cancergenome.nih.gov) et plus rarement le "*Chinese Glioma Genome Atlas*" (CGGA: http://www.cgga.org.cn). Les études réalisées à partir de cohortes de tissus indépendants servent généralemment à valider les données préliminaires de la littérature générées à partir de bases de données, ou d'essais basés sur une technologie non-validée. Ainsi, de nombreuses études utilisent à la fois les bases de données et les cohortes de tissus indépendants.

En 2011, Srinivasan *et al.* ont défini une signature de 7 microARN associés à un pronostic défavorable et de 3 microARN protecteurs. Toutefois, cette étude utilise des données brutes du TCGA et manque de précision[331]. Par la suite, Delfino *et al*. ont défini une signature de 45 microARN associés à un pronostic favorable chez les patients atteints de GBM[332]. Zinn *et al.* ont mis en évidence 5 microARN associés à un mauvais pronostic à court terme tandis que 3 sont associés à un pronostic favorable à

**Tableau 10: microARN identifiés comme biomarqueurs pronostiques et prédictifs dans les GBM** d'après Hermansen *et al.*, 2013.

| microARN pronostique | Pronostic et niveau d'expression | Taille de la cohorte | Contrôle/ normalisateur | Commentaires | Références |
|---|---|---|---|---|---|
| miR-10b | défavorable si surexpression | 261 (TCGA) | Non-connu | Résultats validés par qRT-PCR | Guessous et al., 2014<br>Gabriely et al., 2012 |
| miR-21 | défavorable si surexpression | 32<br>154 | miR-16<br>Aucun (ISH) | Résultats validés par qRT-PCR.<br>Résultats non-validés. | Zhi *et al.*, 2010<br>Hermansen *et al.*,2012 |
| miR-181b | favorable si surexpression | 38 | RNU6B | Résultats non validés. | Lakomy *et al.*,2011 |
| miR-181d | défavorable si surexpression | 117 | Global | Résultats validés dans le TCGA (n= 424) et dans une cohorte indépen--dante de GBM (n=35) | Zhang *et al.*, 2012 |
| | | 424 | U6 snRNA | Résultats validés par qRT-PCR | TCGA, 2009 |
| miR-195 | favorable si surexpression | 38 | RNU6B | Résultats non validés. | Lakomy *et al.*,2011 |
| miR-196a-miR-196 | défavorable si surexpression | 39 | RNU48 | Résultats non validés. | Guan *et al.*, 2010 |
| miR-196b | favorable si surexpression | 154 | Aucun (ISH) | Résultats non validés. | Hermansen *et al.*,2012 |
| | défavorable si surexpression | 198 | Non-connu | Résultats validés par qRT-PCR | Ma et al., 2012 |
| miR-328 | favorable si surexpression | 60 | RNU6B | Résultats validés. Hypothèse basée sur le TCGA et validée dans 60 GBM primaires. | Wu *et al.*, 2012 |

long terme[333]. Niyazi *et al.* ont identifié une signature de 30 microARN discriminant des patients susceptibles d'avoir un pronostic favorable[334]. Des études prospectives et des procédures d'analyses standardisées permettront de préciser la signature la plus précise.

##### 2.2.2.2.2 MicroARN isolés comme biomarqueurs pronostiques

44 microARN ont été décrits comme biomarqueurs pronostiques dans le GBM. Seulement 8 de ces microARN n'avaient pas été décrits précédemment au sein des GBM. L'étude du potentiel pronostique des microARN en clinique met en évidence des divergences avec les données fonctionnelles obtenues *in vitro* et souligne la limite des études réalisées exclusivement *in vitro*. En effet, ces modèles ne reflètent pas la progression multifactorielle des GBM.

*(i) microARNs protecteurs*

22 microARN ont été décrits comme protecteurs au cours du développement du GBM. Seuls deux n'avaient pas été décrits au préalable au sein des GBM: miR-544 et miR-1227[276]. Ainsi, miR-128, miR-181d sont les plus cités[208,212,213,251,252,335–337]. De façon surprenante, certains microARN protecteurs sont des microARN aux fonctions oncogéniques ciblant des gènes suppresseurs de tumeurs comme miR-19a et 19b, miR-106a ou miR-17-5p. Toutefois les analyses fonctionnelles de ces microARN reposent pour la plupart sur des données *in vitro.* Cela explique les divergences avec les résultats obtenus suite aux analyses *in vivo*.

*(ii) microARNs associés à un pronostic défavorable*

Parmi les 22 microARN décrits comme associés à un pronostic défavorable, 6 n'avait pas été décrit précédemment au sein des GBM. La sous-expression de miR-34a et miR-146b, tous deux oncosuppresseurs par induction de la différenciation et diminution de l'invasivité et de la migration, témoigne d'un pronostic défavorable[338–340]. La sous-expression de miR-328 corrèle avec un pronostic défavorable chez les patients atteints de GBM en déréprimant le contrôle de la prolifération cellulaire[341]. La sous-expression de miR-328 constitue un biomarqueur pronostique indépendant au sein des GBM.

L'expression de miR-196b est associée à un pronostic défavorable[293] : il confèrerait aux cellules de GBM un potentiel proliératif accru. Plusieurs équipes ont corrélé la surexpression de miR-10b – lequel est associé à miR-10a pour l'une des équipes[234]– à un pronostic clinique défavorable chez les patients atteints de GBM[211,234,236]. Plusieurs microARN ont été identifiés exclusivement à partir de cohortes de tissus indépendants. Parker *et al.* ont identifié miR-132 comme étant un biomarqueur de mauvais pronostic chez les patients traités selon le protocole de Stupp[342]. Zhang *et al.* ont démontré

que la surexpression des miR-221/222 était positivement corrélée avec le potentiel invasif des gliomes[243] et donc avec un pronostic défavorable[343].

### 2.2.3 Les microARN: biomarqueurs prédictifs de réponse au traitement

#### *2.2.3.1 MicroARN, biomarqueurs de la sensibilité des GBM au traitement*

L'identification de biomarqueurs prédictifs de réponse au traitement est indispensable à la rationnalisation de la prescription des thérapies au sein des GBM. La cytotoxicité du témozolomide (TMZ) repose sur la formation d'adduits de l'ADN par addition de groupements méthyl en $O^6$-méthyl-guanine. Ces lésions provoquent la fragmentation de l'ADN, l'arrêt de la réplication puis l'induction de l'apoptose[344]. Zhang *et al.* ont montré que seuls les patients exprimant miR-181d bénéficiaient de la chimiothérapie par TMZ. En ciblant directement la $O^6$-méthylguanine-ADN méthyltransférase (MGMT), miR-181d empêche les cellules de GBM de réparer les lésions de l'ADN induits par l'agent alkylant[345]. Par conséquent, les cellules entrent en sénescence ou en apoptose. En inhibant le fonctionnement de MGMT, miR-181d augmente la chimiosensibilité au TMZ.

Plus récemment, Berthois *et al*. ont montré que miR-200a était significativement surexprimé chez les patients répondant au TMZ et corrélait négativement avec l'activité de MGMT, suggérant que ce mécanisme soit à l'origine de la réponse thérapeutique. À noter que miR-200a est sous-exprimé au sein des GBM en comparaison des autres gliomes[346]. L'expression de miR-7 et de miR-181a augmente la radiosensibilité des cellules de GBM[347,348]. MiR-7 diminue l'activation des voies de signalisation en aval de l'EGFR et n'est donc actif que dans les cellules présentant une hyperactivation de cette voie. De son côté, miR-181a resensibilise les cellules à l'apoptose radio-induite en ciblant la protéine anti-apoptotique BCL2. Enfin, la surexpression de l'oncomiR miR-21 est largement décrite comme responsable à la fois de radio-et de chimiorésistance[232,349–352]. Parker *et al.* ont démontré que les patients surexprimant miR-132 ne répondaient pas au schéma de Stupp[342]. Toutefois, le mode d'action de ce miR n'est pas encore identifié.

Ainsi, de nombreux mécanismes responsables de la résistance des GBM restent inexpliqués. Le rôle des microARN dans le maintien des sous-populations de CSG est une piste prometteuse pour progresser dans la compréhension de ces mécanismes et diminuer la résistance des GBM.

#### *2.2.3.2 Les microARN assurant le maintien des propriétés des CSG*

Les microARN sont impliqués dans la régulation de voies de signalisation pro-oncogéniques indispensables au maintien des CSG et confèrent ainsi une chimio- et radio-résistance accrue aux GBM. L'identification de microARN discriminant cette sous-population permettrait de définir des profils de résistance aux traitements et aiderait au développement de thérapies ciblées[86,87,95,353–356]. Pour l'instant, la plupart des études évaluant le lien entre CSG et réponse aux thérapies sont basées

sur des lignées cellulaires ou des modèles murins. D'autre part, la taille des échantillons est généralement restreinte. Des études complémentaires seront nécessaires pour valider le potentiel prédictif des microARN impliqués dans le maintien des CSG *in vivo*.

Tu *et al.* ont récemment mis en évidence le rôle de miR-218 dans le maintien des capacités d'auto-renouvellement des CSG[321,357]. Par ailleurs, miR-328 exerce une activité oncosuppressive en inhibant plusieurs gènes dont le gène *BMI1* de la famille "polycomb", maintenant les propriétés des CSN et des CSG par contrôle épigénétique[209]. De même, miR-128 cible directement le gène *BMI1*, indispensable au renouvellement des cellules souches neurales et des CSG[209,358]. L'expression de miR-128 a été associée à celle de 3 autres microARN (miR-124, 137 et 7) requis lors de la différenciation neuronale[359]. La sous-expression de ces 4 microARN contribuerait au maintien des CSG et augmenterait la résistance des GBM.

MiR-328 semble également jouer un rôle clé dans le maintien de la chimiosensibilité des CSG. miR-328 agit en ciblant le transporteur membranaire ABCG2, composant du complexe MDR ou "Multi-Drug Resistance", responsable de l'élimination des molécules anti-tumorales. MiR-328 est habituellement sous-exprimé dans les GBM, ce qui résulte en une augmentation de ABCG2. Cibler ABCG2 en rétablissant l'expression de miR-328 semble donc être une stratégie prometteuse pour augmenter la chimiosensibilité des CSG[322].

Yang *et al.* ont mis en évidence une corrélation inverse entre l'expression de miR-145 et celle des facteurs de transcription OCT4 et SOX2 dans les CSG $CD133^+$. OCT4 et SOX2 sont deux facteurs de transcription maintenant les capacités d'autorenouvellement des cellules souches embryonnaires et adultes. Certaines cibles directes de miR-145 ont été identifiées (ABCG2, NEDD9). La perte de ce microARN confèrerait aux CSG une capacité à résister aux chimiothérapies cytotoxiques accrue [278,313,360].

Rathod *et al.* ont démontré que miR-34a prévenait la prolifération et la survie cellulaires et activait la différenciation des CSG en inhibant l'activation des voies de signalisation Akt/mTOR, Wnt et Notch. miR-34a constitue une cible thérapeutique d'intérêt pour diminuer la résistance des GBM. Asuthkar *et al.* ont démontré que miR-211, en supprimant l'expression de MMP9 et celle de pompes à efflux, augmentait la radio-et chimio-sensibilité des CSG[315]. Récemment, différents miR -miR-455-3p, miR-210, miR-139, miR-132, miR-143- ont été décrits comme potentiellement impliqués dans la chimio-et/ou radio-résistance des patients présentant des CSG[284,312,316,318,342]. Toutefois, ces données sont préliminaires et la caractérisation fonctionnelle des microARN doit être validée par des études prospectives sur des cohortes importantes.

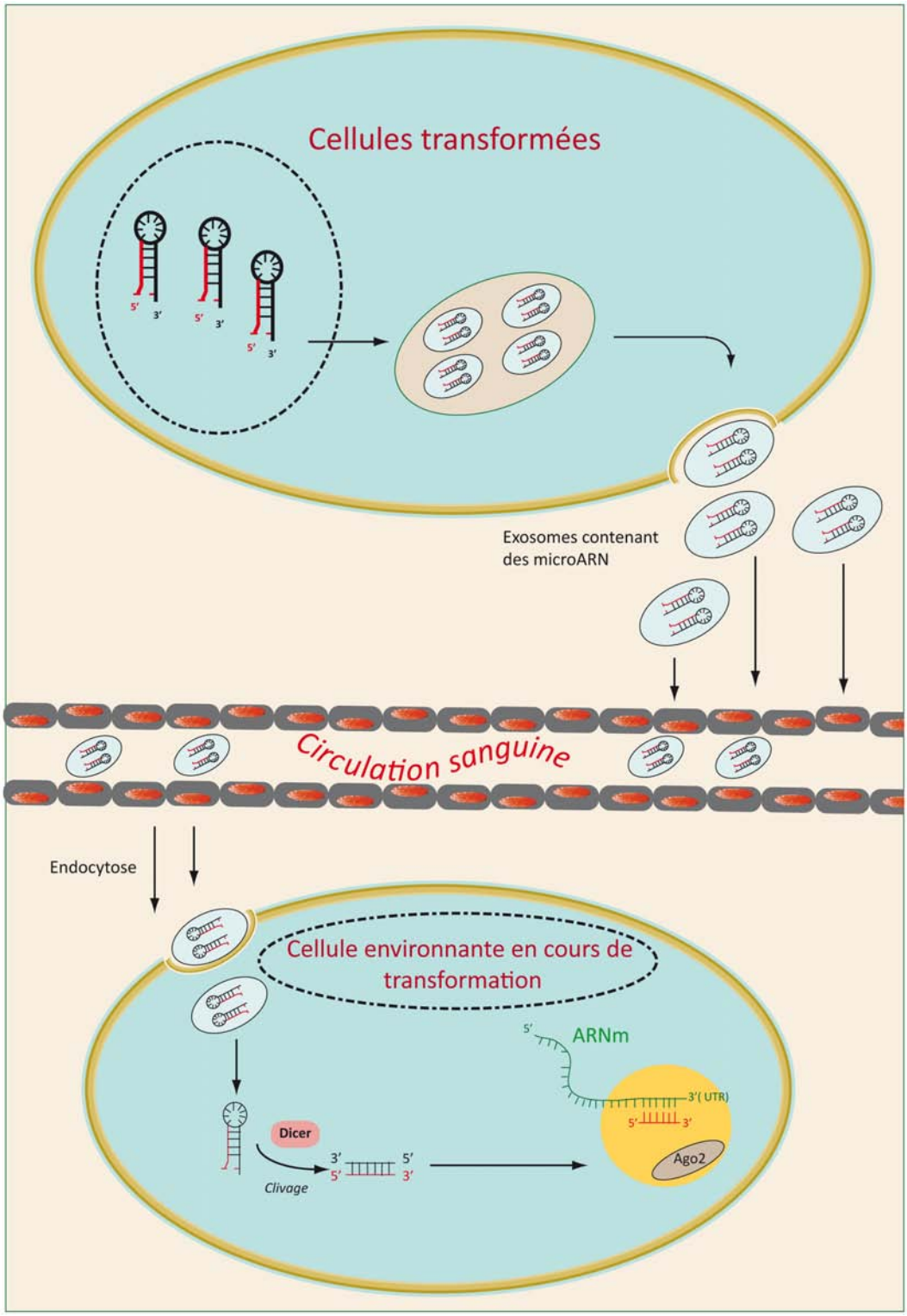



**Figure 5: Fonction paracrine des microARN sécrétés par les cellules tumorales**

### 2.2.4 Les microARN circulants

La présence d'acides nucléiques libres dans la circulation et leur potentiel dans le développement de biomarqueurs est reconnu depuis plusieurs années[361–364]. L'accès à ces microARN est peu invasif et leur dosage est aisé dans le plasma. La majorité des microARN circulants (90 à 95 %) sont associés aux protéines Argonaute (Ago2), les 5-10 % restant sont inclus dans différentes structures[365]: exosomes (40-100 nm), microvésicules plus grandes (0,1-1 µm), corps apoptotiques ou lipoprotéines comme les HDL et LDL[362]. Les microARN sont présents dans différents fluides biologiques: liquide amniotique, LCR, salive, plasma. Concernant le GBM, nous ne décrivons que les microARN circulants détectés dans le plasma et le LCR.

De récentes études soulignent la pertinence biologique des microARN circulants au sein des GBM[216,366]. Wang *et al.* ont démontré que les concentrations plasmatiques de miR-21, miR-128 et miR-342-3p étaient altérées au sein des GBM et constituaient des biomarqueurs diagnostiques sensibles et spécifiques[216]. D'autre part, les concentrations de ces microARN semblent suivre l'évolution de la maladie. La concentration de miR-128 et miR-342-3p est inversement corrélée au grade histopronostique des gliomes[216,336].

Bien que le LCR soit plus difficile d'accès, des équipes ont cherché à définir des profils d'expression de microARN dans le LCR de patients atteints de GBM[215,330]. Teplyuk *et al.* ont démontré que les concentrations de miR-21 et miR-10b reflètaient l'activité des tumeurs. D'autre part, les microARN de la famille miR-200 semble être des biomarqueurs discriminant les métastases cérébrales des GBM. Toutefois, avant d'être intégrés en pratique clinique, ces résultats devront être validés par des études prospectives sur des cohortes plus importantes et la reproductibilité des tests et les procédures techniques devront être standardisées.

### 2.2.5 Altérations génétiques affectant les gènes codant des microARN

En raison de la petite taille des microARN, peu de mutations ou d'amplifications de gènes codant les microARN ont été reportées. Par exemple, l'amplification de miR-26a est associée à un pronostic défavorable. MiR-26a transforme les cellules et favorise la croissance des GBM[367]. L'existence d'un polymorphisme d'un nucléotide unique (SNP ou "*Single Nucleotide Polymorphism*") dans le gène du pré-miR-146a modifie les cibles de celui-ci, promouvant ainsi le développement et la progression maligne des gliomes[368].

### 2.2.6 Les microARNs comme cible thérapeutique

#### *2.2.6.1 Thérapies ciblant les microARN*

Les recherches de ces dernières années ont permis de corréler les profils d'expression des microARN au diagnostic et au pronostic des GBM. De nombreux microARN oncogéniques ou oncosuppresseurs

**Tableau 11: Stratégies thérapeutiques modulant l'expression des microARN**

| Agent | Type d'ARN ciblé | Description | Mode d'action | Phase de développement clinique |
|---|---|---|---|---|
| Rétablissement de l'expression | | | | |
| Agents chimiques de petites tailles | miARN | Agents chimiques activant la synthèse des microARNs, agents hypométhylants (déci--tabine, 5-azacytidine), énoxacine. | Induction aspécifique de l'expression des microARN. | Études précliniques |
| Analogues mimant les microARN | miARN | ARN double-brins synthétiques mimant les ARN endogènes. | Restaure l'expression d'un miARN, mode d' action similaire. | Phase I |
| Vecteurs d'expre--ssionde miARN | miARN | Vecteurs d'expression lipidiques (liposomes exosomes) ou viraux d'un miARN spécifique | Restaure l'expression d'un miARN, mode d' action similaire. | Études précliniques |
| Extinction de l'expression | | | | |
| Oligonucléotides anti-sens (ASO) | Tous les ARN | molécules simples brins analogues à l'ADN modifiées chimiquement de 13-25 nucléo--tides. les ASO sont complémentaires des extrémités UTR (3' ou 5') des ARN cibles. Les anti-miR LNA et les antagomirs sont des ASO. | Formation d'un complexe ARN-ASO par com--plémentarité entre paires de bases ce qui conduit à la dégradation de l'ARN ciblé par la RNase H. Le mode d'action des antagomirs n'est pas encore identifié. | Étude préclinique et de Phase I et IIa pour les anti-miR LNA. |
| Petits ARN interférents | Tous les ARN | ARN double-brin complémentaire de l'ARN ciblés (ARNm ou autres ARNnc) | le ARNsi est incorporé dans le complexe RISC et guide celui-ci vers la séquence com--plémentaire de leur cible puis est dégradé par la RNase H. | Études précliniques |
| anti-miR LNA et petits anti-miR LNA | miARN | ASO partiellement modifié de 13-22 nucléotides (8 pour les petits): homologues d'ARN bicycliques avec un anneau de ribose bloqué en conformation C3' endo par l'introduction d'un pont 2'-O-4'-C méthylène.Les petits anti-miR ciblent spécifiquement les régions 5' des ARN cibles. | Formation d'un complexe ARN-ASO par complémentarité des paires de bases puis clivage par la Rnase H de l'ARN cible. | Études précliniques |
| Antagomirs | miARN | ARN monobrin de 23 nucléotides, complémentaire de son miARN cible, modifié pour être stable et empêcher sa dégradation (squelette phosphorothionate et groupement 2'-O-methoxyéthyl). | Mode d'action non connu. Le complexe antagomir-miARN induit la dégradation du miARN et le recyclage de l'antagomir. | Études précliniques |
| «Éponges» de miARN | miARN | ARN contenant de multiples sites de liaisons d'un miARN. Ils sont transcrits à partir d'un vecteur d'expression. | Entre en compétition avec les miARNs endogènes et diminue leur expression. Augmentation de l'expression des cibles des miARN. | Études précliniques |
| Molécules thérapeutiques de petite taille | miARN | Petit composé chimique interférant avec les miARN. | Blocage spécifique de l'activité des miARN par perturbation structurelle du précurseur ou du miARN mature. | Études précliniques |

ont été identifiés. Le développement d'applications cliniques basées sur ces recherches constitue donc une suite logique, toutefois, ces applications sont à des phases de développement très précoces dans le GBM[369]. Plusieurs stratégies thérapeutiques ciblant les microARN peuvent être envisagées (Tableau 11 et Figure 6).

(1) La première approche consiste à inhiber les microARN oncogéniques.

Des outils basés sur la complementarité entre paires de bases ont été mis au point: les oligonucléotides anti-sens synthétiques (ASO) se lient aux microARN sous forme d'hétéroduplex et inhibent ainsi leur action. Les ASO sont modifiés par différents groupements chimiques améliorant leur stabilité et leur efficacité comme les oligonucléotides anti-microARN/AMO, les "antagomirs", les analogues d'acides nucléiques verrouillés/LNA ou "*Locked Nucleic Acid*")[370]. Les cellules cancéreuses présentant de multiples altérations, des ASO capables de cibler simultanément plusieurs miARN ont été développés: les "*Multitargeted-AMO"*(MTg-AMO)[371]. Ces MTg-AMO ciblent simultanément des microARN indispensables au maintien des différentes voies de signalisation pro-tumorigéniques dont EGFR, PI3K/Akt/mTOR, Notch, Wnt. D'autre part, des vecteurs contenant des sites de liaisons artificiels d'un microARN spécifique ont été développés : les "éponges de microARN"[155]. Ces vecteurs inhibent compétitivement la liaison des microARN endogènes à leurs cibles.

Certaines équipes ont développé des agents chimiques thérapeutiques de petite taille modulant spécifiquement l'activité des microARN (SMIR). Par exemple, le diazobenzène et ces dérivés inhibent spécifiquement la formation du pri-miR-21. Des études complémentaires sont nécessaires pour valider ces relations structure/activité issues du criblage de substances à haut-débit[372,373].

(2) la seconde stratégie consiste à rétablir l'expression de microARN oncosuppresseurs sous-exprimés au sein des GBM.

L'hyperméthylation des ilôts CpG des promoteurs de gènes codant les microARN est l'une des principales causes de la sous-expression de certains microARN au sein des tumeurs[374–376]. Des agents rétablissant l'expression de ces gènes peuvent être envisagés : agents déméthylants (azacytidine, décytabine) ou inhibiteurs d'histone déacétylase (HDAC).

La concentration globale des microARN étant réduite au sein des tumeurs, une approche stimulant aspécifiquement leur synthèse a été envisagée: le miARNome. Des agents comme l'énoxacine, un antibiotique de la famille des fluoroquinolones activent la synthèse des microARN en liant une protéine de liaison de l'ARN[377].

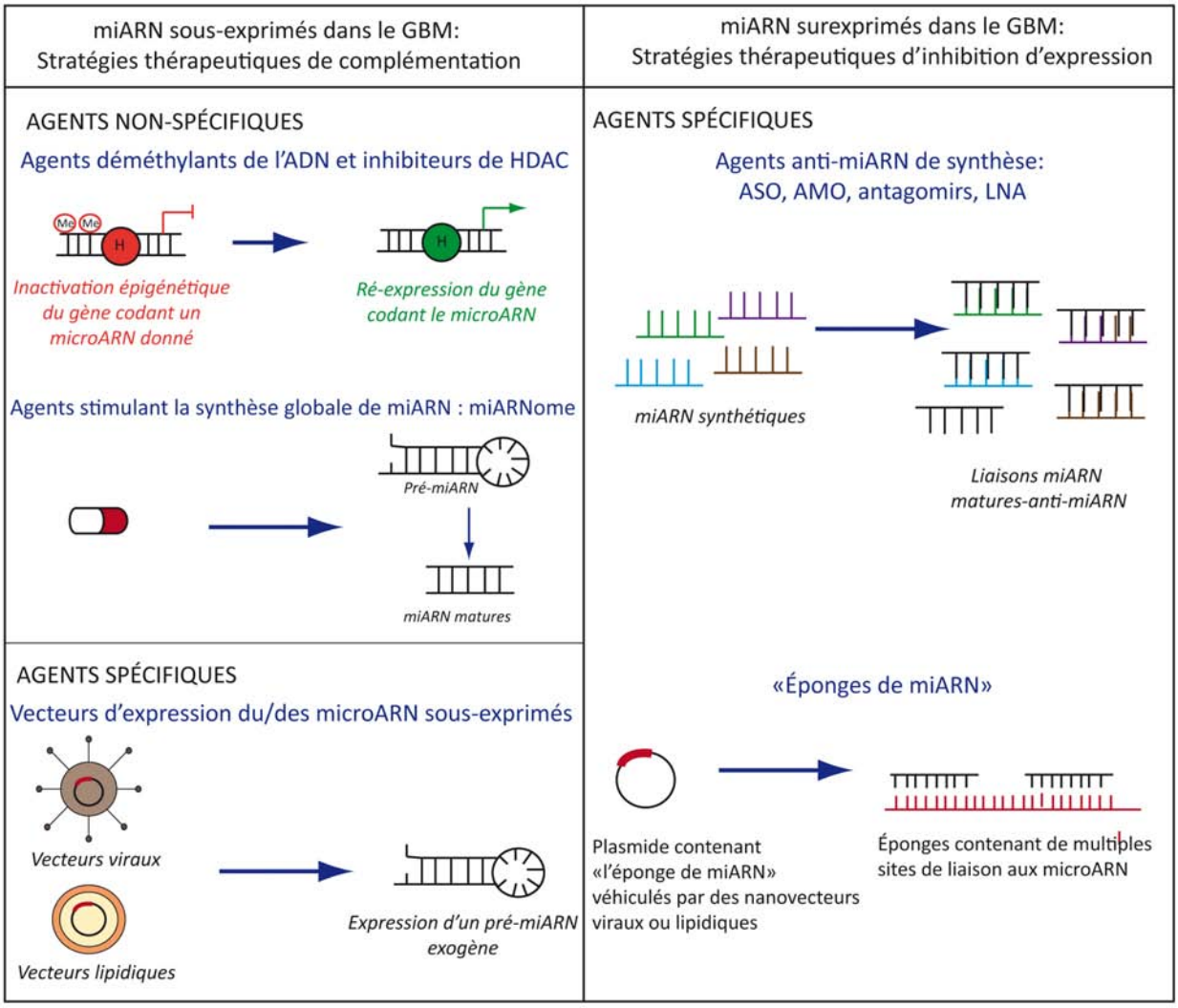



**Figure 6: Mode d'action schématique des principales stratégies thérapeutiques ciblant l'expression des microARN**

Enfin, l'expression de gènes codant les microARN déficients peut être rétablie par l'administration de nanovecteurs viraux ou lipidiques contenant des oligonucléotides mimant les microARN. L'expression de ces gènes est placée sous le contrôle de promoteurs tumeur ou tissu-spécifiques.

(3) Une approche récente consiste à perturber la fonction paracrine des microARN sécrétés

Les microARN circulants peuvent être excrétés dans la matrice extracellulaire ou dans la circulation sanguine au moyen de microvésicules. Ces microARN exercent une activité paracrine permettant aux cellules tumorales de se façonner un microenvironnement favorable[158]. Des molécules inhibant la formation de ces microvésicules ont été développées comme des inhibiteurs de sphingomyélinase neutre, GW4869[207,378].

(4) Combinaison de thérapies ciblant les microARN et de thérapies conventionnelles

Plusieurs études *in vitro* ont démontré la pertinence de combiner les agents ciblant les microARN aux chimiothérapies conventionnelles dans le GBM[379,380]. Toutefois, ces données doivent être confirmées par des données *in vivo*[381]. Des stratégies comme l'"inhibition de l'ARN en sandwich" ciblant par différents agents une altération génétique tumeur-spécifique[382] ou la "stratégie d'inhibition d'ARN multiplex" ciblant différentes altérations présentes au sein d'une même voie de signalisation ont pour but de resensibiliser les cellules de GBM à l'apoptose[158].

#### *2.2.6.2 Candidats dans la prise en charge du GBM*

##### 2.2.6.2.1 miR-7

Wang *et al.* ont évalué le potentiel thérapeutique du miR-7 oncosuppresseur *in vivo*. L'administration systémique du miR-7 plasmidique encapsulé dans un liposome cationique permet la diminution du volume tumoral dans un modèle de xénogreffe de GBM murin par inhibition des oncogènes suivants : *EGFR, PI3K/Akt, STAT3*[383].

##### 2.2.6.2.2 miR-21

Des agents inhibant l'oncomiR-21 ont été développés par Griveau *et al*: des LNA inclus en nanocapsules lipidiques[349]. Cette approche *in vitro* a permis d'augmenter la radiosensibilité d'une lignée cellulaire de GBM.

##### 2.2.6.2.3 miR-9 et miR-146: intérêt de la voie exosomale

Plusieurs études ont récemment mis en évidence l'intérêt de la voie exosomale dans l'administration de microARN à travers la barrière hémato-encéphalique dans le traitement du GBM[204,384–386]. MiR-9 est un oncomiR surexprimé au sein des cellules de GBM résistantes au TMZ. MiR-9 permet une augmentation de l'expression des glycoprotéines membranaires d'efflux (glycoprotéine-P). Munoz *et al.* ont démontré que les lignées cellulaires de GBM insensibles au traitement directe par des anti-

miR, pouvaient être resensibilisées dans un modèle de co-culture avec des cellules souches mésenchymateuses (CSM) sécrétant des vecteurs anti-miR-9 (exosomes). La sensibilisation au TMZ est induite par la diminution de l'expression de miR-9 au sein des cellules de GBM[204]. Une approche similaire a été développée par Katakowski *et al.*[384] : des exosomes sécrétés par des cellules stromales contenant miR-146b ont été administrés dans des modèles de xénogreffe de GBM et ont permis de réduire significativement le volume tumoral. Ces données sont pour l'instant très préliminaires et des résultats contradictoires coexistent au sein de la littérature[331].

Ainsi, l'utilisation d'exosomes délivrant des microARN est une stratégie prometteuse dans le traitement des GBM. Toutefois, plusieurs problématiques devront être abordées avant d'envisager un développement clinique : choix du ou des microARN délivrés, développement d'exosomes spécifiques des CSG et/ou des cellules de GBM non-souches, compatibilité avec une administration systémique.

##### 2.2.6.2.4 microARN nécessaires au maintien des CSG

MiR-145 cible entre autres les régions 3'UTR de facteurs de transcription critiques au maintien des capacités d'autorenouvellement des cellules souches embryonnaires (*OCT4, SOX2)*[280,313,387]. L'administration de miR-145 dans un nanovecteur polymérique permettrait de perturber les voies de signalisation critiques au maintien des CSG[388,389] et donc d'améliorer l'efficacité des thérapies actuelles tout en s'affranchissant du potentiel immunogénique des vecteurs viraux[318].

La standardisation des technologies d'analyse, des méthodes statistiques et la mise en place d'étude prospective basées sur des cohortes plus larges permettra de valider ces candidats biomarqueurs et cibles thérapeutiques. D'autre part, l'amélioration de la biodisponibilité et de la spécificité des thérapies anti-microARN permettra de cibler les aberrations d'expression assurant le maintien des GBM.

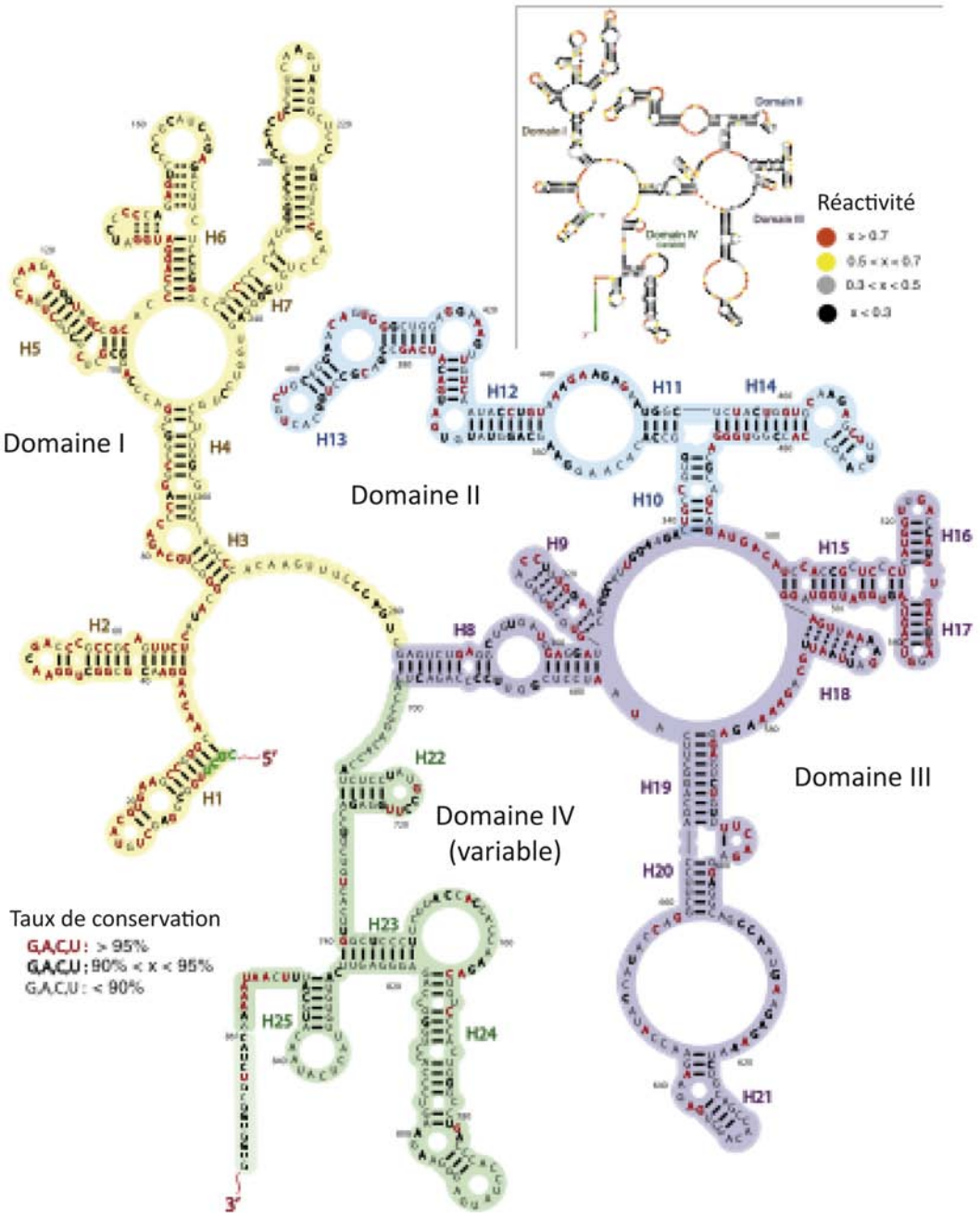



**Figure 7: Première structure de lncARN eucaryotes isolés expérimentalement de Novikova *et al.,* 2013**

## 3. Les ARN longs non-codants

### 3.1 Les ARN longs non-codants: généralités

#### 3.1.1 Introduction: biogenèse et fonction des lncARN

La définition des ARN longs non-codants (lncARN), jusqu'alors décrits comme les ARN de plus de 200 nucléotides non traduits en protéines [152,390], a été récemment modifiée par Spizzo *et al*[391] : les lncARN correspondent à tous les ARN n'appartenant à aucune classe connue d'ARN non-codants régulant l'expression des gènes sous leur structure primaire, secondaire ou sous forme de complexes tertiaires[392]. Les lncARN constituent donc un groupe très hétérogène tant au niveau structurel que fonctionnel. On distingue ainsi différents sous-types au mode d'action distinct: les ARN longs non-codants activateurs "long-enhancer ncRNA", les ARN longs non-codants intergéniques "lincARN", les pseudogènes ou "Pg", les transcrits anti-sens naturels ou "NAT", les ARN circulaires ou "circARN" ou encore les lncARN transcrits à partir de régions ultra-conservées ou "T-UCR"[155,158,392–396]. À l'heure actuelle, ni la biogenèse ni le mode d'action de la majorité des lncARN n'est résolu. La plupart des lncARN sont transcrits par l'ARN polymérase II. Ils peuvent être polyadénylés et leur maturation peut être assurée par diverses protéines : RNase-P/Z, facteurs d'épissage ou complexe Drosha-DGCR8. Des études récentes ont montré que les lncARN étaient principalement présents au sein du noyau, toutefois, une fraction d'entre-eux est cytoplasmique[397].

Récemment, l'équipe de Novikova *et al.* ont isolé un lncARN et révélé la présence d'une structure secondaire très spécialisée en différents sous-domaines : hélicoïdaux, boucles, structures en forme de trèfle, régions de jonction simple brin riches en purines, similaires à celle des sous-unités ribosomiques (Figure 7)[392]. Les profils d'expression de lncARN sont tissu-spécifiques[398]. Comme les microARN , les lncARN peuvent être transcrits à partir d'exons ou d'introns chevauchant ou inclus dans ces gènes (Figure 8)[399].

Différentes catégories de lncARN ont été établies à partir de leur mode de régulation de l'expression des gènes. On distingue ainsi (1) les lncARN liant et guidant des complexes protéiques de modification de la structure de la chromatine à des *loci* spécifiques. Ces lncARN peuvent cibler des gènes situés à proximité (régulation en *cis*) ou plus éloigné (régulation en *trans*)[300,400,401]; (2) les lncARN servant de leurres moléculaires : en liant des séquences d'ADN spécifiques, les lncARN inhibent l'intéraction de facteurs de transcription avec leurs cibles[402]; (3) les lncARN inhibant compétitivement la liaison de microARN à leurs cibles d'où leur appelation d'"éponges" de miARN[403]; (4) enfin, les lncARN se liant à des complexes protéiques impliqués dans différents mécanismes de régulation de l'expression des gènes comme les ribonucléoprotéines assurant l'épissage alternatif, la traduction ou la stabilité des ARN[167,395,396,400,404–407] (Figure 9).

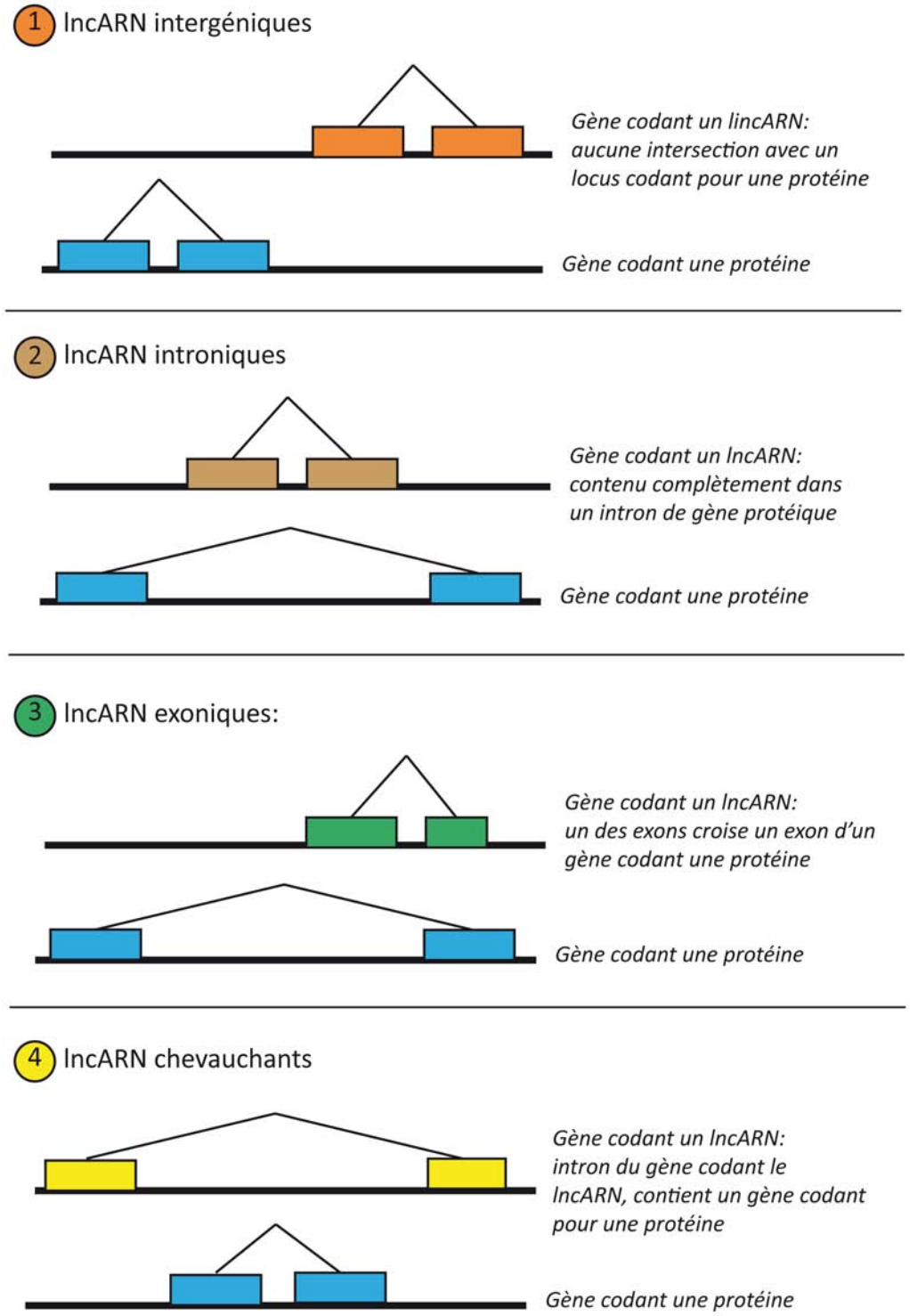



**Figure 8: Localisation des gènes codant les lncARN d'après Shi *et al.,* 2013.**

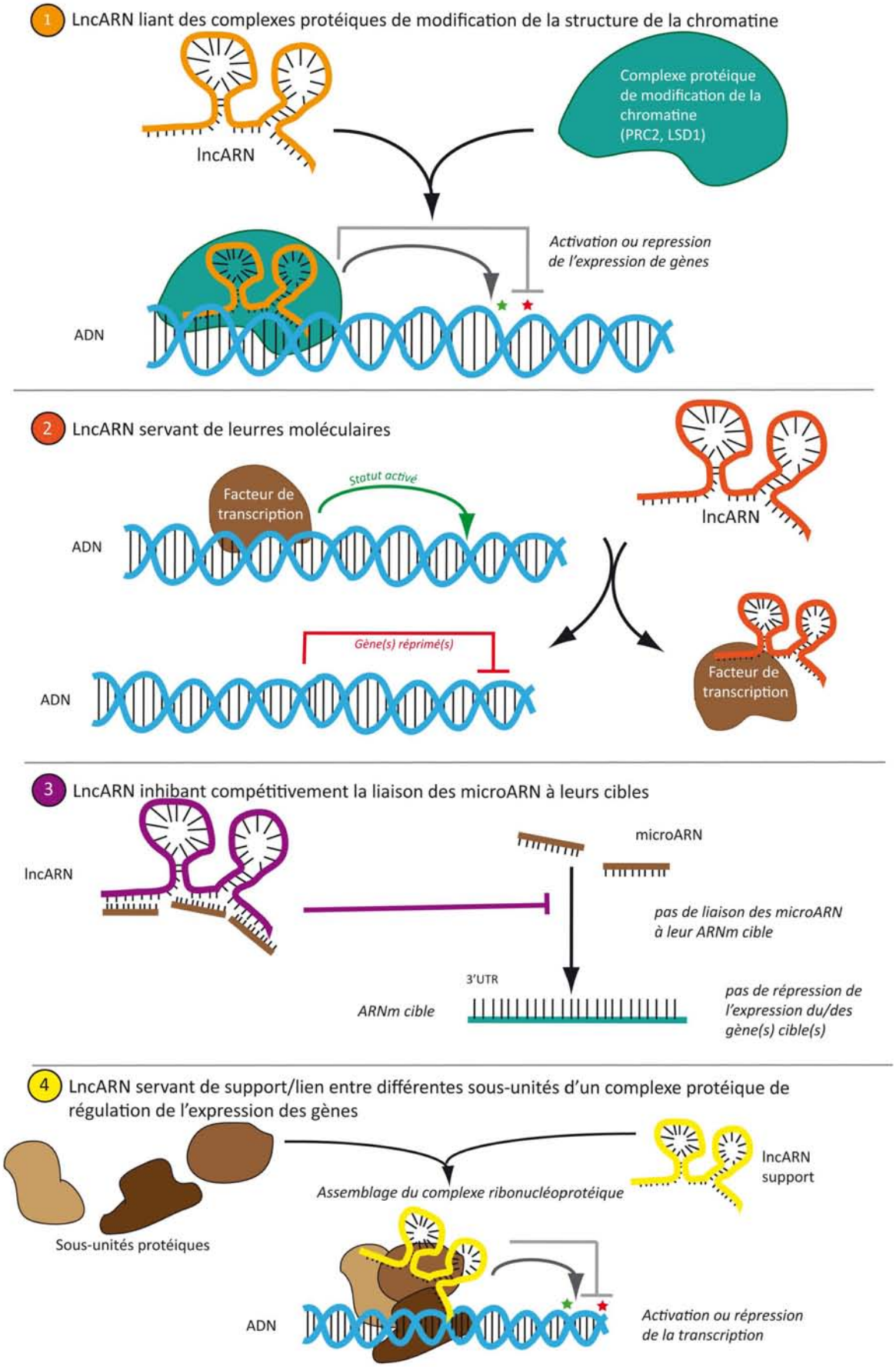



**Figure 9: Représentation schématique du mode d'action des principaux lncARN connus** adaptée d'après Park *et al.,* 2014.

Il existe environ 10 000 *loci* de gènes codants des lncARN à l'origine de plus de 15 000 transcrits potentiels comme cela est suggéré par les données du consortium GENCODE et le projet ENCODE[408]. Les lncARN constituent une nouvelle échelle de régulation de l'expression de gènes[392,393]. C'est pourquoi, de nombreuses équipes cherchent à élucider leurs fonctions et leurs modes d'action[409]. Le cerveau étant l'un des organes les plus riches en lncARN et certains d'entre-eux ayant été impliqués dans l'oncogenèse et le maintien des cellules souches, ces lncARN constituent de futurs outils pertinents dans la prise en charge du GBM.

### 3.1.2 Lien entre lncARN et tumorigenèse

Des altérations de l'expression des lncARN ont été reportées dans plusieurs pathologies et notamment dans les cancers[395,401,404,410,411] (Tableau 12).

#### *3.1.2.1 lncARN suppresseurs de tumeurs*

Plusieurs lncARN agissant comme des suppresseurs de tumeurs sont décrits[412–414]: Huarte *et al*. ont démontré que p53 activait un ARN long non-codant intergénique "lincARN-p21". LincARN-p21 agit comme un effecteur de p53 en s'associant aux ribonucléoprotéines hnRNP-K[413]. Par ailleurs, les fonctions oncosuppressives du lncARN *MEG3* ("*Maternally expressed gene 3*") au sein des gliomes seront détaillées dans la section 3.1.3.2[412,415,416].

#### *3.1.2.2 lncARN oncogènes et reprogrammation épigénétique*

L'altération de l'expression de lncARN oncogéniques a été reportée dans différents cancers[400,417–419] et notamment dans les gliomes[418–420]. *HOTAIR* ("*HOX Antisense Intergenic RNA*") est l'un de ces lncARN[400,421]. *HOTAIR* réprime transcriptionnellement l'expression de nombreux gènes en recrutant des complexes de modifications de la chromatine: complexe à activité méthyl-transférase PRC2 "*Polycomb Repressive complex 2*" et complexe *LSD1/CoREST/REST*[422]. *HOTAIR* réprime notamment l'expression de *PTEN* au cours de la tumorigenèse[400]. Ainsi, la surexpression de *HOTAIR* active la progression dans le cycle cellulaire et accroît l'invasivité des tumeurs.

#### *3.1.2.3 Invasion microvasculaire et angiogenèse*

Plusieurs lncARN impliqués dans la régulation du switch angiogénique et la réponse à l'hypoxie sont altérés dans les cancers[423,424]. Le lncARN *MVIH* par exemple est associé à l'invasion microvasculaire de carcinomes hépatocellulaires via l'inhibition de la sécrétion de la phosphoglycérate kinase 1[423].

#### *3.1.2.4 Déséquilibre métabolique*

Certains lncARN contribueraient à la tumorigenèse en induisant un déséquilibre métabolique[425,426]. Le lncARN *ANRIL* par exemple, réprime l'expression de gènes des métabolismes lipidiques et glucidiques impliqués dans les processus anti-inflammatoires, notamment les récepteurs nucléaires de la famille PPAR[426,427]. *ANRIL* a été décrit comme un facteur de risque dans le carcinome mammaire. Toutefois, la plupart de ces données sont très préliminaires.

**Tableau 12: LncARN dérégulés au sein de différents cancers et exerçant des fonctions pro-oncogéniques ou oncosuppressives,** d'après Katsushima et Kondo, 2014

| lncARN | Dérégulés dans: | Fonctions: | Références |
|---|---|---|---|
| *Oncogènes* | | | |
| *HOTAIR* | Carcinomes mammaires, hépatocellulaires, colorectaux, pancréatiques, GIST | promeut l'invasion et la formation de métastases par modifications épigénétiques (interaction avec PRC2, LSD1; guide pour régulation en *trans*) | Gupta et al., 2010; Yang et al., 2011 |
| *ANRIL* | Carcinomes prostatiques, leucémies, mélanomes | Inhibition de la sénescence par répression de *p16INK4A* et modifications épigénétiques (interaction avec PRC2, LSD1; guide pour régulation en *cis)* | Tano et al., 2012; Yap et al., 2011 |
| *MALAT1* | Carcinomes pulmonaires, prostatiques, mammaires, colorectaux, hépatocellulaires | Régule l'épissage alternatif des pré-ARNm | Bergmann et al., 2014 |
| *SPRY4-IT1* | Mélanomes | promeut la prolifération cellulaire, l'invasion et inhibe l'apoptose | Khaitan et al., 2011 |
| *CRNDE* | Carcinomes colorectaux | promeut la pluripotence et la dédifférenciation des cellules tumorales | Graham et al., 2011, Ellis et al., 2012 |
| *H19* | Carcinomes hépatocellulaires et mammaires, gliomes | fonctions oncogéniques et oncosuppressives reportées, promeut la prolifération cellulaire | Tsang et al., 2010; Shi et al., 2014 |
| *Oncosuppresseurs* | | | |
| *GAS5* | Carcinomes mammaires | inhibe la croissance cellulaire et induit l'apoptose, agit comme un leurre (récepteur glucocorticoïdes) | Pickard et al., 2014 |
| *MEG3* | Gliomes, méningiomes, leucémies, adénomes hypophysaires | effecteur de la voie p53, inhibition de la prolifération cellulaire | Zhou et al., 2013 |
| *PTENP1* | Carcinomes prostatiques, coliques | Inhibe la prolifération cellulaire (pseudogène inhibe la dégradation de PTEN en captant les microARN ciblant celui-ci) | Poliseno et al., 2011 |
| *LincARN-p21* | Modèles murins d'adénocarcinomes pulmonaires, de sarcomes, de lymphomes | Activé par p53, Induit l'apoptose en réprimant transcriptionnellement des gènes cibles de p53 (interaction physique avec hnRNP-K, régulation en *trans*) | Huarte et al., 2011 |

#### *3.1.2.5 Rôle potentiel dans le remodelage de la matrice extra-cellulaire et du microenvironnement tumoral*

Le rôle des lncARN dans le remodelage de la matrice extracellulaire (MEC) et du microenvironnement au cours de la progression tumorale est mal connu. Le lncARN *HOTAIR* semble jouer un rôle dans la MEC d'adénocarcinome pulmonaire[428]; le lncARN *H19* a été décrit comme capable de réprimer la synthèse du TGF-β1 dans une lignée cellulaire de carcinome prostatique[429]. D'autre part, certains lncARN sont indispensables à l'homéostasie des cellules immunes, endothéliales, des adipocytes et des cellules souches mésenchymateuses[430–434].

#### *3.1.2.6 lncARN assurant le maintien des cellules souches cancéreuses*

Plusieurs études ont mis en évidence l'importance des lncARN dans le maintien des propriétés des cellules souches embryonnaires par l'intermédiaire de boucles de rétro-contrôle impliquant les facteurs de transcription OCT4, SOX2, KLF4[395,435–438]. La dérégulation des réseaux de lncARN contribue donc probablement au développement ou au maintien des cellules souches cancéreuses[439]. Ainsi, certains lncARN participent au maintien des CSC en inhibant compétitivement l'action de microARN ("éponges de miARN")[439]. Une compréhension approfondie des fonctions des lncARN au sein des CSG permettra l'identification de nouvelles cibles thérapeutiques.

### 3.1.3 lncARN candidats impliqués dans le maintien des propriétés tumorigènes du glioblastome

Plusieurs équipes ont évalué les profils d'expression de différents lncARN au sein des GBM et tenté de caractériser leur fonction au cours de l'oncogenèse (Tableau 13)[157,300,420,440–442].

#### *3.1.3.1 ARN longs non-codants aux propriétés oncogéniques*

##### 3.1.3.1.1 CRNDE

*CRNDE* ou "Colorectal neoplasia differentially expressed" est un lncARN sur-exprimé au sein des GBM[440,443]. Son expression est corrélée à un haut grade tumoral ainsi qu'à la pluripotence et à la dédifférenciation des cellules de GBM[440]. Les transcrits de *CRNDE* agissent sur des protéines de modification de la structure de la chromatine (PRC2 et CoREST) et contribueraient ainsi au maintien des CSN et des CSG[440]. Toutefois, la caractérisation fonctionnelle de *CRNDE* n'est pas encore établie au sein des GBM[300,396].

##### 3.1.3.1.2 H19

L'expression de *H19* (lincARN-H19) est positivement corrélée au grade des gliomes[444]. *H19* est un précurseur du microARN-675, libéré en réponse à des stress cellulaires ou oncogéniques pour ralentir la croissance et la prolifération des cellules altérées. MiR-675 cible notamment l'*IGFR1*[445]. De façon contradictoire, il a été démontré que miR-675 ciblait une cadhérine participant ainsi à l'invasivité des gliomes[444]. Les données divergeant au sujet du potentiel pro- ou anti- oncogénique de

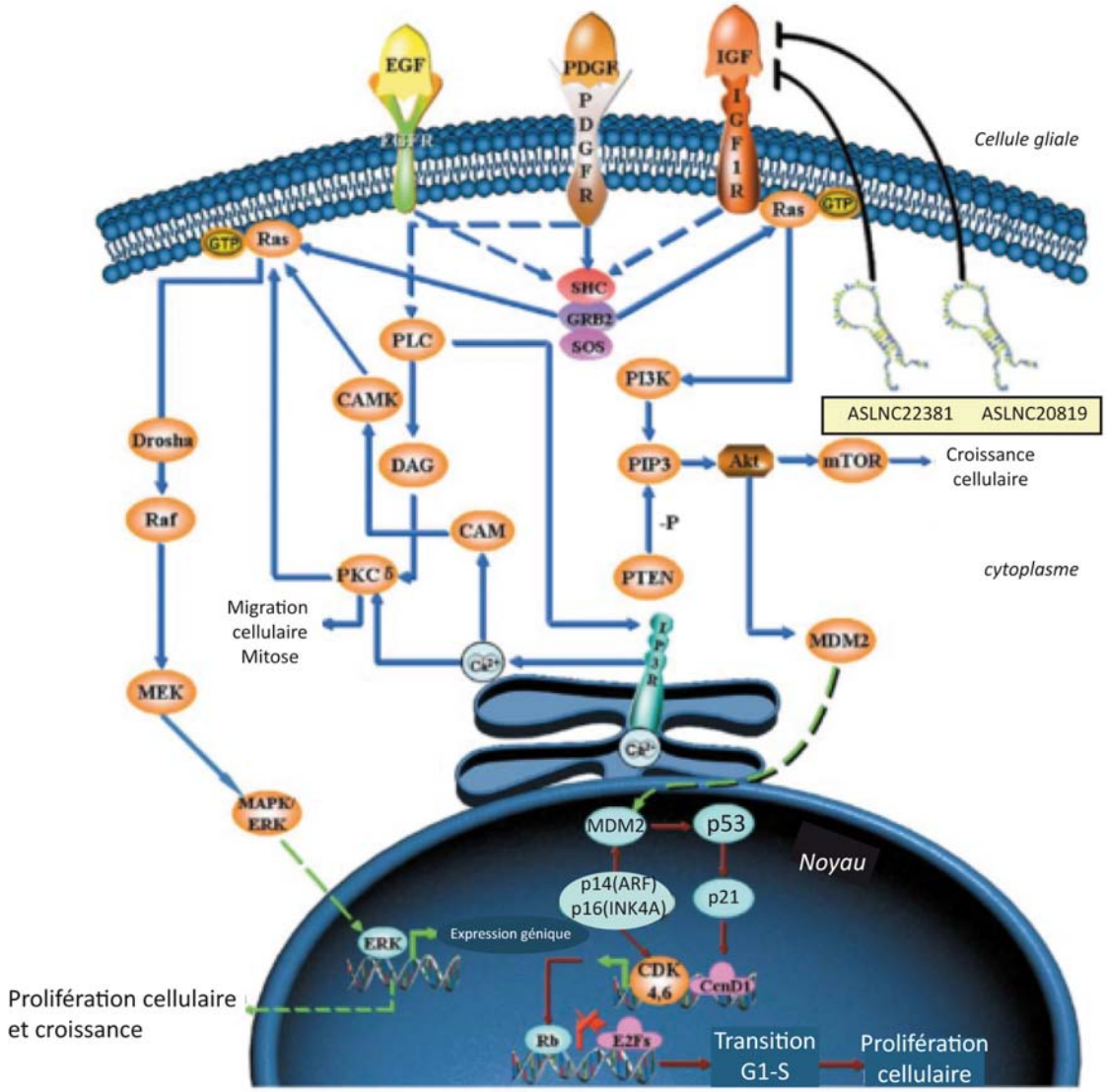



**Figure 10: Mode d'action schématique des deux lncARN oncogéniques: *ASCLNC22381 et ASCLN20819*** d'après Han *et al.,* 2012.

lincARN H19/miR-675, des études fonctionnelles approfondies seront nécessaires pour déterminer la fonction et le potentiel thérapeutique de ce lncARN au sein des GBM.

##### 3.1.3.1.3 HOTAIR

La fonction pro-oncogénique du lincARN *HOTAIR* a été identifiée en 2010 par Gupta *et al.* Des études cliniques sont venues appuyer sa significativité dans les carcinomes mammaires, coliques, hépatocellulaires et récemment dans les gliomes[400,410,418,420,446]. *HOTAIR* confère aux tumeurs une invasivité et une motilité accrue et semble être une cible thérapeutique d'intérêt dans la prise en charge du GBM[447–449].

##### 3.1.3.1.4 ASLNC22381 et ASLNC20819

Deux lncARN potentiellement impliqués dans l'oncogenèse ont été identifiés comme différentiellement exprimés au sein des GBM : *ASLNC22381* et *ASLNC20819*[157]. Ces lncARN ciblent des effecteurs des voies de signalisation des récepteurs nucléaires PPAR et de l'IGF (*IGF* et *IGFR1*)[450] (Figure 10). Des études fonctionnelles approfondies sont nécessaires pour confirmer le lien de causalité entre l'expression de ces lncARN et la progression des GBM[157].

##### 3.1.3.1.5 ANRIL

*ANRIL* est l'un des lncARN anti-sens naturels (NAT) les plus fréquemment altérés au sein des cancers, délété dans 40% des cas[451]. *ANRIL* exerce son activité oncogénique en réprimant le locus *INK4b/ARF/INK4a.* Il permet ainsi aux cellules de s'affranchir des programmes d'intégrité cellulaire RB-dépendant et de maintenir la croissance cellulaire[452,453]. Des polymorphismes (SNPs) affectant l'expression et la fonction de *ANRIL* ont été décrits au sein des gliomes[454]. Cibler les variants altérés de ce lncARN par des thérapies anti-sens est donc une approche envisageable pour rétablir la sensibilité des cellules de GBM à l'apoptose et à la sénescence radio- et/ou chimio-induites[455].

#### *3.1.3.2 ARN longs non-codants aux propriétés oncosuppressives*

- MEG3

Le lncARN *MEG3* est sous-exprimé au sein des gliomes suite à des délétions ou altérations épigénétiques[415]. *MEG3* inhibe la prolifération cellulaire et induit l'apoptose en stabilisant p53, activant ainsi la transcription de ces gènes cibles[412,456]. Le rétablissement de l'expression de *MEG3* pourrait être une stratégie thérapeutique d'intérêt au sein des GBM.

#### *3.1.3.3 Le rôle émergeant des lncARN dans le maintien des cellules souches de GBM*

De nombreuses études ont mis en évidence le rôle des lncARN au sein des cellules souches embryonnaires et adultes, des iPSC et des cellules souches neurales[300,395,457]. Les lncARN sont essentiels lors du développement du système nerveux central. D'autre part, les lncARN régulent l'état de différenciation des CSG[300,396,457]. Ainsi, l'identification des lncARN indispensables au maintien

**Tableau 13: Types de lncARN présents au sein des gliomes et GBM**

| ARN longs non-codants | Localisation | Nombre | Fonctions | Exemple |
|---|---|---|---|---|
| lincARN | Nombreux loci | > 1000 | interagit avec des complexes protéiques de modification de la chromatine | *HOTAIR, ANRIL, H19, lincARN-p21, CRDE* |
| Pseudogènes | Non-déterminé | Non-déterminé | Régule les niveaux d'expression des microARN et des ARNm. | *PTEN-P1, OCT4-pg* |
| Autres lncARN (T-UCR, NAT) | Nombreux loci | > 3000 | Modes d'action variés | *MEG3, lncARN circulants, circARN* |

**Tableau 14: Signature de lncARN significativement prédictifs de survie (n=107)** d'après Zhang *et al.,* 2013

| Gènes | Valeur-p | Coefficient de corrélation | Fonction décrite |
|---|---|---|---|
| *KIAA0495* | <0.001 | 0.375 | Suppresseur de tumeur |
| *PART1* | 0.003 | -0.254 | Carcinogenèse prostatique |
| *MGC21881* | 0.006 | -0.230 | Non-déterminé |
| *MIAT* | 0.007 | -0.132 | Différenciation cellulaire |
| *GAS5* | 0.008 | -0.175 | Apoptose |
| *PAR5* | PAR5 | 0.01 | Syndrôme de Prader-Willi |

des CSG et leur caractérisation fonctionnelle permettra le développement de thérapies ciblées dans le GBM[395,402,457,458].

Les pseudogènes, par exemple, sont des lncARN dérivant de la rétrotransposition ou de la duplication d'un ARNm au sein du génome ayant acquis de nombreuses mutations. Les pseudogènes régulent l'expression génique par différents moyens : génération d'ARNsi, fonction de transcrits anti-sens ou comme des "éponges de microARN"[403,446,459]. Les pseudogènes ont été impliqués dans la progression des cancers et le maintien des propriétés des cellules souches cancéreuses[460]. Le pseudogène *OCT4-pg* par exemple, a été impliqué dans la gliomagenèse et dans le maintien des réseaux transcriptionnels des cellules souches. *OCT4-pg* possède les mêmes sites de liaison aux microARN que le facteur de transcription OCT4 et agit comme une "éponge de microARN". En captant miR-145, *OCT4-pg* protége OCT4 de la dégradation. Ainsi, la surexpression de *OCT4-pg* conduit à la surexpression de OCT4, et au maintien des CSC[461]. *OCT4-pg* constitue donc une cible thérapeutique pertinente pour perturber les CSG. Toutefois, une caractérisation fonctionnelle et structurelle approfondie est nécessaire pour cibler au mieux ce lncARN[446].

## 3.2 Les ARN longs non-codants : intérêt dans la prise en charge du glioblastome

### 3.2.1 Méthodologies et limitations

Les limitations pour l'étude des lncARN sont identiques à celles décrites dans la partie des microARN (techniques d'analyse, outils statistiques, OS et PFS...). Toutefois, en comparaison des microARN, les données sont bien plus limitées pour les lncARN. Ainsi, on recense seulement 14 articles sur la base de données PubMed suite à la requête suivante: (long-non-coding-RNA OR lncRNA) AND (glioblastoma OR glioma) AND (survival OR progression OR prognosis), recherche faite le 27 août 2014. La plupart de ces études apportent des informations fonctionnelles restreintes et n'explorent que partiellement la population des lncARN présents. Par conséquent, elles ne reflètent pas pleinement la biologie des GBM. Nous détaillerons les lncARN et les signatures de lncARN corrélés à l'évolution clinique des GBM et présentant un intérêt thérapeutique potentiel[157,462].

### 3.2.2 Les lncARN: biomarqueurs diagnostiques, pronostiques et prédictifs

#### *3.2.2.1 lncARN et diagnostic*

Les lncARN représentent une source de biomarqueurs largement sous-exploitée. Plusieurs études ont récemment démontré leur potentiel diagnostique[462]. En 2012, Zhang *et al.* ont démontré pour la première fois que les profils d'expression de lncARN permettaient de discriminer le grade OMS, le niveau de différenciation et le type histologique des gliomes[443,463]. Parmi ces lncARN, *CRNDE* et *HOTAIRM1* sont significativement sur-exprimés au sein des GBM alors que *MEG3*, lncARN

oncosuppresseur, est sous-exprimé. Les profils d'expression de lncARN permettent donc de préciser le phénotype des gliomes en réduisant les variabilités et les biais dépendants de l'opérateur.

#### *3.2.2.2 lncARN, biomarqueurs pronostiques et prédictifs*

En 2013, Zhang *et al.* ont été les premiers à identifier une signature de 6 lncARN prédictive de la survie globale (OS) des patients atteints de GBM[441]. Parmi ces lncARN, on trouve des lncARN décrits comme oncogéniques dans les carcinomes prostatiques (*PART1*), un lncARN suppresseur de tumeur (*KIAAO495*) et des lncARN impliqués dans la différenciation ou l'apoptose : *MIAT, GAS5, PAR5, MGC21881*(Tableau 14). Cette signature de lncARN prédit la survie indépendemment de l'âge des patients et de la méthylation du promoteur du gène codant MGMT. Des études fonctionnelles de ces lncARN dans des modèles de xénogreffe et des études prospectives permettront de valider le rôle de ces derniers dans l'évolution des GBM.

L'expression du lincARN oncogénique *HOTAIR* a récemment été corrélée à un pronostic défavorable et à une survie plus courte[420]. Zhang *et al.* ont utilisé 3 cohortes de patients atteints de gliomes pour établir ces corrélations. *HOTAIR* semble être un biomarqueur pertinent pour l'évaluation du grade histopronostique des patients atteints de gliomes.

#### *3.2.2.3 lncARN circulants*

Peu de données relatives au potentiel diagnostique et/ou pronostique des lncARN circulants (plasmatiques, LCR) sont disponibles dans le GBM et en cancérologie. Toutefois, deux études récentes dans des cancers solides et hématologiques, ont démontré la pertinence de ces molécules comme biomarqueurs tissu et cancer-spécifique et potentiellement comme biomarqueur prédictif[464,465]. Il est donc probable que ces lncARN constituent des biomarqueurs d'intérêt dans le GBM.

### 3.2.3 Les ARN longs non-codants: biomarqueurs et cibles thérapeutiques potentielles

Différentes stratégies thérapeutiques sont développées pour cibler les lncARN[158,446]. Toutefois, la caractérisation fonctionnelle et structurelle de la majorité des lncARN oncogéniques émergeant seulement, il est difficile de déterminer la façon la plus appropriée de cibler ces lncARN. La plupart des stratégies visent à diminuer les concentrations intracellulaires des lncARN oncogéniques surexprimés[446]. Il est en effet plus aisé d'induire un effet anti-cancéreux en inhibant l'expression de lncARN oncogéniques surexprimés que de réactiver l'expression de lncARN oncosuppresseurs réprimés par exemple *MEG3* dans les gliomes. Par conséquent, nous décrirons les principaux lncARN impliqués dans l'oncogenèse des GBM et les stratégies thérapeutiques visant à réprimer leur expression [466].

#### *3.2.3.1 H19*

*H19* est le précurseur du microARN oncogénique miR-675. L'activité pro-oncogénique de miR-675 serait médiée via l'inhibition d'une cadhérine (*CDH13*) et de la protéine RB. Toutefois, les données concernant spécifiquement l'oncogenèse des GBM sont absentes au sein de la littérature[217,444,467,468]. Des études fonctionnelles de *H19* sont donc nécessaires dans des modèles *in vivo* pour déterminer la stratégie thérapeutique la plus pertinente pour perturber l'axe *H19/miR-675/CDH13* et *RB* au sein des GBM.

#### *3.2.3.2 HOTAIR*

*HOTAIR* est l'un des lncARN oncogéniques les mieux caractérisés. La répression de *HOTAIR* induit des effets anti-cancéreux, anti-prolifératifs et pro-apoptotiques *in vivo*[469,470]. Ainsi, cibler les intéractions physiques entre *HOTAIR* et les complexes PRC2 et LSD1 semblent être une stratégie pertinente pour paralyser les fonctions oncogéniques du lncARN[471,472].

#### *3.2.3.3 ANRIL*

De même que *HOTAIR*, *ANRIL* exerce son activité pro-oncogénique en recrutant des complexes modifiant la structure de la chromatine (complexes PRC2 et PRC1) et réprime ainsi l'expression de gènes oncosuppresseurs ($p16^{INK4A}$). *ANRIL* est également impliqué dans la réparation de l'ADN dans la voie de signalisation ATM/E2F1/ANRIL. Ainsi, perturber l'interaction entre *ANRIL* et les complexes PRC2 et LSD1 constitue une option thérapeutique d'intérêt pour rétablir la sensibilité des cellules de GBM à l'apoptose chimio- et radio-induites en maintenant $p16^{INK4A}$. Plusieurs stratégies ont été développées comme des thérapies anti-sens réprimant l'expression des variants oncogéniques de *ANRIL*(voir section 3.2.5 pour description des thérapies anti-sens)[427,446,454,455].

### 3.2.4 Altérations génétiques affectant les gènes codant les lncARN

Plusieurs altérations génétiques affectant les gènes codant les lncARN sont reportées au sein de la littérature. Les translocations chromosomiques modifient les niveaux d'expression de différents lncARN et participent ainsi à l'initiation du processus oncogénique. D'autre part, des mutations affectant un nombre de nucléotides restreints altèrent la fonction des lncARN et contribuent à la transformation maligne des cellules[473,474]. L'impact de ces altérations sur les structures secondaires/tertiaires et donc sur la fonction des lncARN est pour l'instant peu décrit[404].

### 3.2.5 Stratégies thérapeutiques ciblant les ARN longs non-codants

#### *3.2.5.1 Petits ARN interférents*

Les petits ARN interférents (ARNsi "small interfering RNA") sont des ARN doubles-brins de 19 à 30 nucléotides s'hybridant à des molécules d'ARN (ARNm, microARN, lncARN) cibles sous la forme du complexe RISC, et conduisent à la dégradation de cet ARN par ARN interférence : le mode d'action est identique à celui des microARN, mais il s'agit d'ARN synthétique. L'ARNsi double brin doit être

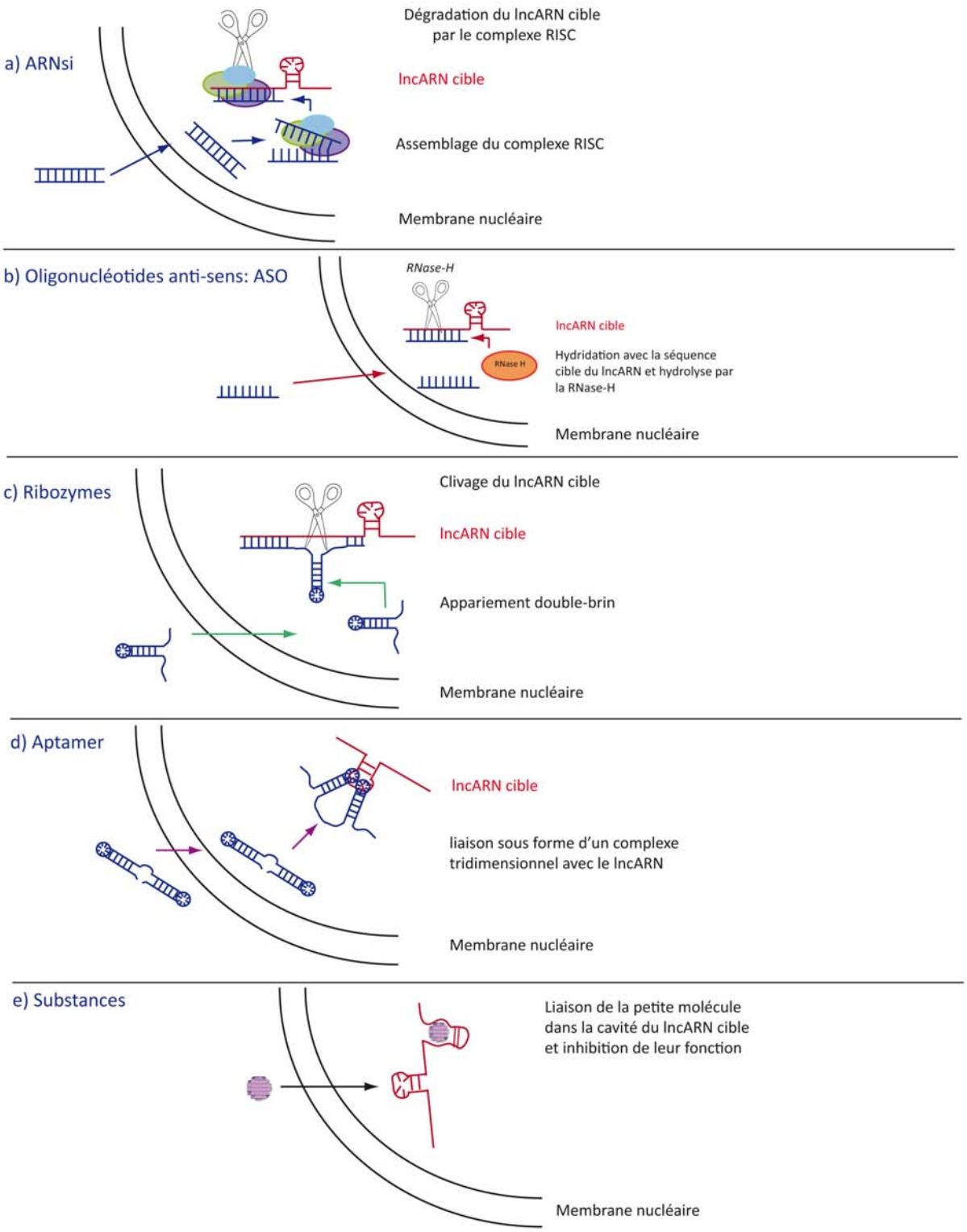



**Figure 11: Mode d'action schématique des principales thérapies ciblant les lncARN** d'après Chi Han Li *et al.,* 2013

clivé en simple brin pour être incorporé au complexe RISC. Le brin non-incorporé peut être à l'origine de liaisons hors cibles non-spécifiques pouvant perturber les réseaux de microARN ou la traduction des ARNm[475]. Des études *in vitro* et *in vivo* ont montré que les ARNsi constituent un moyen efficace de réprimer l'expression de lncARN oncogéniques[400,470,476]. Toutefois, bien que différentes formulations d'ARNsi soient en cours d'essais cliniques, par exemple les essais de phase I et II dans les carcinomes pancréatiques[477,478], nous sommes seulement à l'aube du développement de ces thérapies anti-lncARN. La principale limitation des ARNsi tient à leur mode d'administration et à leur biodisponibilité faible dues à des propriétés pharmacocinétiques médiocres et à leur dégradation par les nucléases. Plusieurs approches ont été mises en œuvre pour permettre leur administration systémique et améliorer leur capture intracellulaire : *(i)* modifications biochimiques par remplacement de squelettes phosphodiester par des phosphorothionate ou modifications du ribose, *(ii)* vectorisation des ARNsi par des nanoparticules virales et lipidiques (Figure 11)[446,479–481].

#### *3.2.5.2 Oligonucléotides antisens (ASO)*

Les oligonucléotides antisens (ASO) sont des ADN ou ARN simple-brin de 8 à 50 nucléotides de long spécifiques de leur ARN cible à un nucléotide près[482]. La formation d'hétéroduplex ASO/lncARN entraîne le recrutement de la RNase H1 et le clivage du lncARN ciblé[446]. Les ASO présentent plusieurs avantages comparés aux ARNsi: mécanisme d'inhibition des lncARN indépendant du complexe RISC donc moins de toxicité liée aux effets non-spécifiques, une biodisponibilité nucléaire supérieure, une immunogénicité plus faible et production plus aisée[446]. Les ASO ont été modifiés chimiquement de manière à augmenter leur stabilité et leur sélectivité par l'action de squelette phosphorothionate et riboses modifiés. Les "gapmers" ont ainsi été développés : la partie centrale de ces ASO est constituée de monomères d'ADN entourés de nucléotides modifiés. Cette structure synthétique est plus résistante aux nucléases, elle augmente l'affinité pour le lncARN cible et permet de le cliver en son centre. D'autre part, contrairement aux ARNsi, les "gapmers" sont captés par les cellules sans vecteur par absorption gymnotique(Figure 11)[483,484].

#### *3.2.5.3 Ribozyme*

Les ribozymes sont des molécules d'ARN endogènes capables de catalyser la dégradation des ARN. Des ribozymes synthétiques ont été élaborés au point pour dégrader les lncARN oncogéniques et ont démontré une activité anti-cancéreuse significative. Le ribozyme "*hammerhead*" ou marteau (HamRz) est l'un des ribozymes les plus prometteurs. En effet, bien qu'il soit constitué d'un petit motif endoribonucléolytique, ce dernier possède une forte capacité à inhiber sa cible, indépendemment du complexe RISC et en l'absence d'ions métalliques . D'autre part, la dégradation induite par HamRz est très spécifique car elle dépend de la séquence de deux bras d'ARN différents

non-voisins[485–488]. Ainsi, les ribozymes représentent une alternative aux ARNsi et ASO pour cibler les lncARN.

#### *3.2.5.4 Aptamer*

La complexité des structures secondaires des lncARN fait obstable à l'efficacité des ARNsi, ASO et ribozymes. Les aptamers sont des oligonucléotides d'ADN/ARN ou des peptides ayant une structure tridimensionnelle stable *in vivo*. Ils ciblent et dégradent spécifiquement différentes classes moléculaires dont les lncARN sans se soucier de leur structure. L'intégration de séquences codant des aptamers dans le génome des cellules cancéreuses permettrait de cibler des lncARN oncogéniques et ainsi d'induire l'apoptose par ré-expression de $p16^{INK4A}$ en ciblant *ANRIL* par exemple (Figure 11)[489,490].

#### *3.2.5.5 Petites molécules*

De petites molécules synthétiques non-nucléotidiques sont utilisées pour cibler les ARN de cellules humaines dans différentes pathologies (VHC, VIH). Certains antibiotiques (aminoglycosides, tétracyclines) par exemple sont capables de perturber spécifiquement la structure des ARNr bactériens. L'utilisation des bases de données recensant les structures d'ARN et leurs ligands et la caractérisation des structures secondaires des lncARN oncogéniques permettra peut-être l'identification de motifs spécifiques pouvant servir de cibles thérapeutiques (Figure 11).

#### *3.2.5.6 Voies de signalisation post-transcriptionnelles*

La fonction des lncARN est déterminée par leur structure ribonucléotidique primaire et par leur structure secondaire générée suite à des mécanismes post-transcriptionnels complexes comme l'épissage alternatif (EA)[491,492]. Des aberrations de l'EA des lncARN ont été décrites en conditions pathologiques. Ainsi, l'identification de variants de lncARN issus de techniques de "*Next Generation Sequencing*"/"NGS" combinée à des méthodes de modulation de l'EA par des ASO commutant l'épissage alternatif, pourraient perturber le maintien des lncARN oncogéniques altérés au sein les tumeurs[329,474,493,494].

#### *3.2.5.7 microARN ciblant les lncARN*

Une alternative théorique pour induire la dégradation des lncARN seraient de les cibler par des microARN synthétiques. Toutefois, bien que plusieurs pistes étayent le rôle des microARN dans la régulation des lncARN et les interactions et intrications des ces ARNnc (pseudogènes agissant comme des "éponges de microARN", lncARN précurseurs de microARN, proximité entre les extrémités 3'UTR des ARNm et des lncARN), à l'heure actuelle, aucune étude fonctionnelle n'a permis de valider cette hypothèse chez l'homme. Des bases de données annotant les sites d'interactions entre microARN et lncARN ont récemment été développées[495]. La recherche de sites de liaisons de microARN au sein

des lncARN oncogéniques constitue une perspective thérapeutique pertinente dans le traitement des GBM[429,446,461,495–497].

La progression dans la caractérisation structurelle et fonctionnelle des lncARN dérégulés dans les GBM et les CSG permettra de valider les candidats biomarqueurs jusqu'alors décrits et guidera le développement de stratégies thérapeutiques ciblées contre ces lncARN. D'autre part, des études basées sur les technologies de séquençage nouvelles générations permettront d'explorer l'ensemble de la population des lncARN exprimés au sein des GBM et ainsi d'identifier de nouveaux candidats.

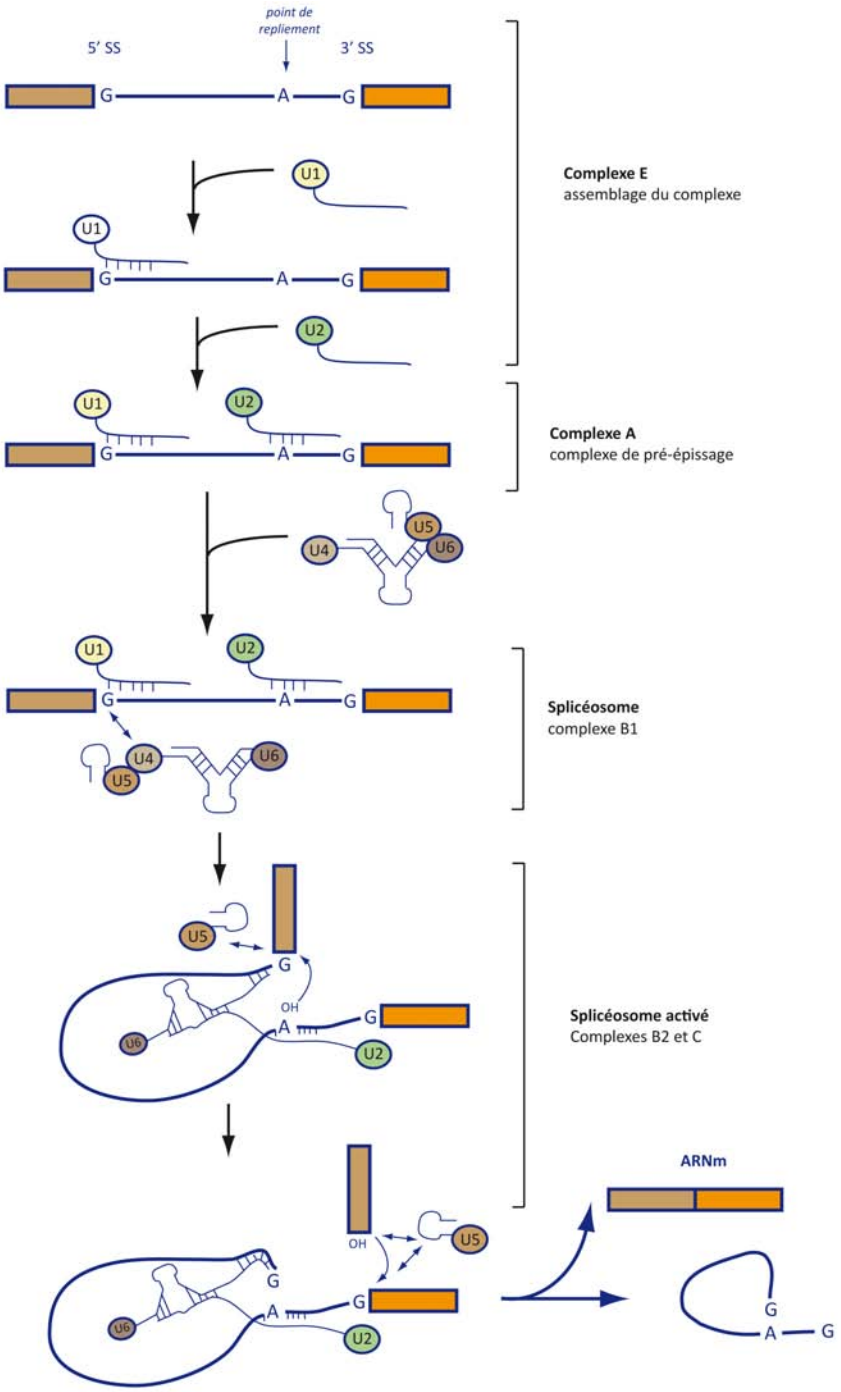



**Figure 12: Schéma des principales étapes d'assemblage du splicéosome et de l'activation de l'épissage alternatif.**

L'assemblage du splicéosome est initiée par la liaison de U1-ARNsn (complexe U1-snRNP) au niveau du site d'épissage en 5' (5'SS) par complémentarité en les paires de bases. Ensuite, la zone de repliement est reconnue par le complexe U2-snRNP (Complexe A/Complexe de pré-épissage). Cette interaction modifie la conformation de l'adénosine présente dans cette zone de repliement. Puis, pour activer le splicéosome, 3 snRNP (U4/U6, U5) viennent se lier au complexe A pour former le complexe B1 (U4 et U6 sont principalement appariées au complexe A). La formation du complexe B1 induit de nombreux réarrangements ARN-ARN déstabilisant les sous-unités U1 et U4 qui sont libérées. On parle alors d'un complexe B2, le splicéosome est activé. La première étape de l'épissage consiste en l'attaque électronégative de l'extrémité 5'SS par le groupement 2'OH ce qui résulte en la formation du complexe C (libération extamporanée de l'exon en 5'). La seconde étape de l'épissage consiste en plusieurs modifications conformationnelles et permet la libération d'un ARNm mature. Les différentes sous-unités ribonucléoprotéiques (U2, U5 et U6) sont libérées et réutilisées dans d'autre cycles d'EA.

## 4. Les petits ARN nucléaires: les ARNsn

### 4.1 Les ARNsn : composants clés du splicéosome

#### 4.1.1 L'épissage alternatif

##### *4.1.1.1 Fonction et mécanisme général*

L'épissage alternatif (EA) est un mécanisme de maturation des ARNm essentiel à la régulation de l'expression des gènes. L'EA génère plusieurs isoformes d'ARNm à partir d'un même gène et contribue ainsi à la complexité et à la plasticité du transcriptome et du protéome de chaque type cellulaire. L'EA affecte plus de 90 % des gènes humains et est orchestré de façon cellule-spécifique par un complexe nucléaire ribonucléoprotéique dynamique: le splicéosome[498,499]. Le splicéosome coordonne la reconnaissance des sites d'épissage puis catalyse les réactions d'élimination des introns/exons et de religation des exons (réactions de transestérifications)[500]. Le splicéosome est recruté au niveau de séquences *cis*-régulatrices sur le pré-ARNm et est associé à des facteurs protéiques en *trans* assurant sa stabilité et orientant son activité enzymatique: les facteurs d'épissage. Par exemple, les protéines SR "Serine-Arginine rich protein" inhibent l'exclusion d'exons alors que les hnRNP "heterogeneous ribonucleoprotein" l'activent[501–503]. C'est par un processus co-transcriptionnel séquentiel complexe que le splicéosome catalyse l'EA des pré-ARNm (Figure 12)[504,505].

##### *4.1.1.2 Rôle des ARNsn dans le splicéosome et la régulation de l'épissage alternatif*

Le splicéosome est une machine macromoléculaire complexe composée de petits ARN nucléaires riches en uridine "Uridine-rich small-nuclear RNA" ou "ARNsn" d'environ 150 nucléotides. Les ARNsn sont transcrits par l'ARN polymérase II (ou III pour U6-snRNP)[506]. Les ARNsn possèdent une coiffe mono/triméthyl-guanosine en 5' et une structure tige-boucle en 3'. Les ARNsn sont assemblés en 5 particules ribonucléoprotéiques (snRNP)[504,507,508]: U1, U2, U4/U6 et U5. Leur nomenclature correspond à leur contenu en uridine. Chaque snRNP est donc constituée d'un ARNsn (deux dans le cas de U4/U6), de 7 protéines spécifiques (protéines Sm ou apparentées Lsm pour U6), de protéines associées : facteurs d'épissage SR, hnRNP, PTB (Figure 13)[498] ainsi que d'autres protéines auxiliaires non-snRNP dont environ 200 ont été recensées[504].

La biogenèse des snRNP se déroule en 4 étapes majeures: (1) synthèse d'un précurseur d'ARNsn (pré-ARNsn) et export vers le cytoplasme, (2) maturation cytoplasmique du pré-ARNsn en ARNsn, (3) modifications covalentes de nucléotides à des sites spécifiques, (4) assemblage des ARNsn avec les ribonucléoprotéines (RNP) et ré-import vers le nucléoplasme[500,506]. Les snRNP sont stockées dans les régions interchromatiniennes dans des structures appelées "*splicing speckles*"(Figure 14).

Les ARNsn permettent la reconnaissance des sites d'épissage (séquences consensus en *cis* des introns/exons) et l'hybridation du splicéosome au pré-ARNm. Les protéines associées en *trans*

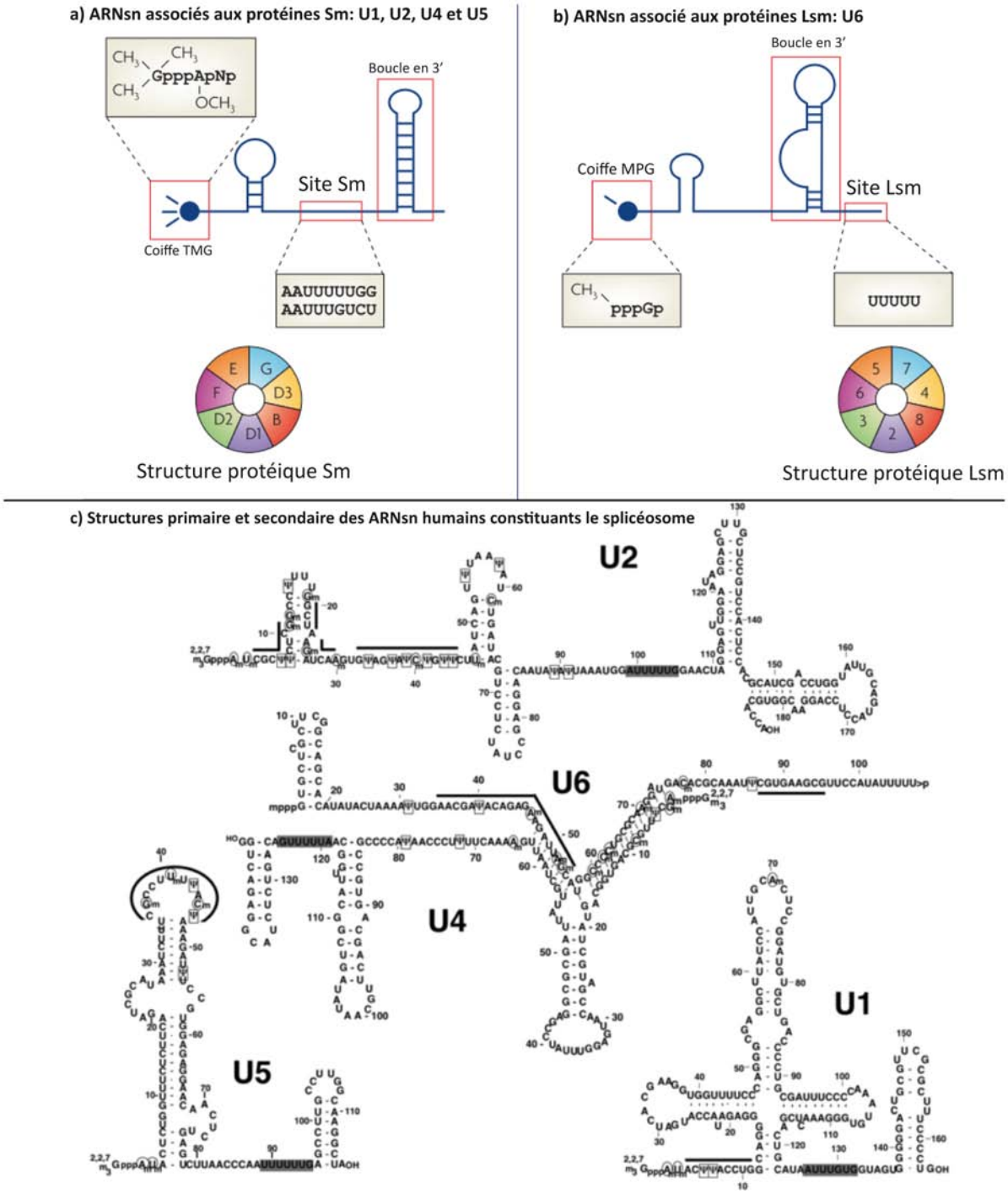



**Figure 13: Représentation schématique des structures primaires et secondaires des ARNsn composants le splicéosome, d'après Matera *et al*., 2007 et Karijolivh *et al.,* 2010.** Au sein des complexes ribonucléoprotéiques U1, U2, U4, U5 et U6 a) et b) et structures plus détaillées de chaque ARNsn: les pseudouridines sont représentées par des ψ entourés de rectangles transparents, les résidus 2'-O-méthylés sont encerclés, les lignes en gras représentent les zones d'interactions ARN-ARN impliquées dans l'épissage des pré-ARNm, les rectangles gris pleins représentent les zones de liaions des protéines Sm.

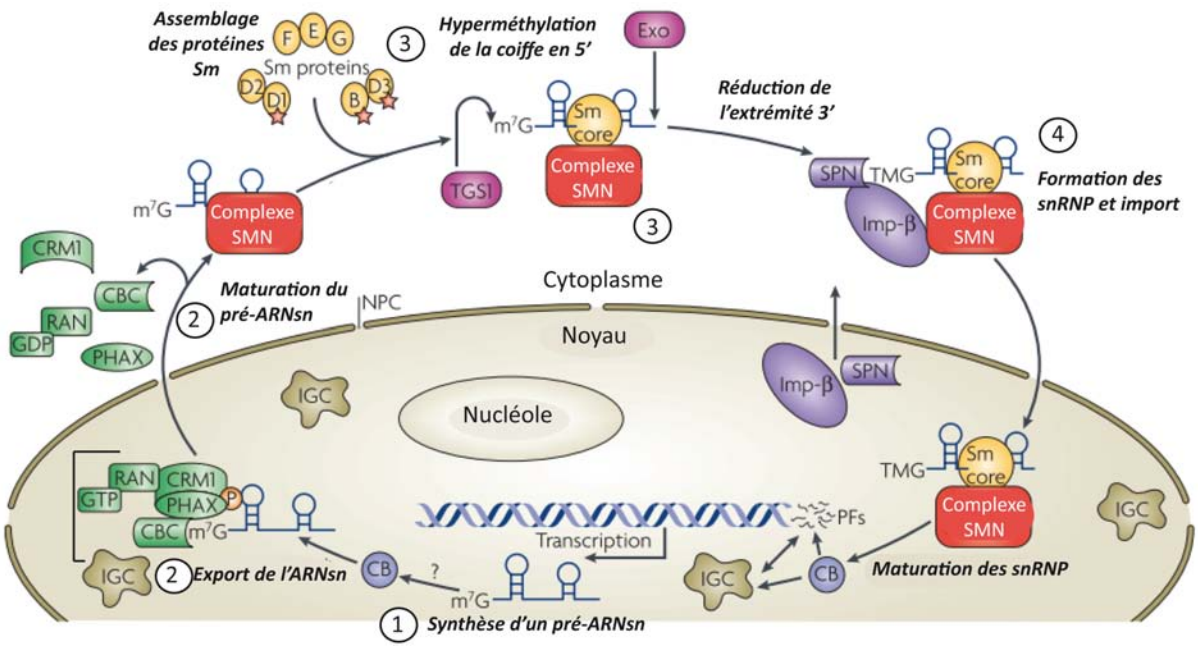



**Figure 14: Biogenèse des snRNP de type Sm,** d'après Matera et al., 2007. La biogenèse des snRNP de type Sm (U1, U2, U4 et U5) se déroule en 4 étapes principales. CRM1 "Chromosome Region Maintenance-1", CBC "Cap-Binding Complex", Complexe SMN "Survival Motor neuron complex", TGS1 "Triméthylguanosine synthase-1", TMG coiffe "2,2,7-triméthylguanosine", Exo "exonucléase", SPN adapteur d'import "Snuportin-1", Imp-β "importin-β", CB "Cajal Bodies", IGC "Interchromatin granule clusters"'.

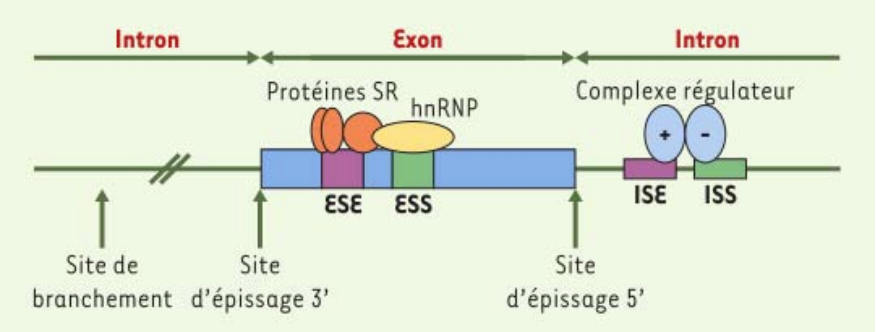



**Figure 15: Localisation des composants et des séquences régulatrices principales du splicéosome lors de l'épissage alternatif,** d'après Corcos & Solier, 2005. Les protéines SR (riche en sérine et arginine) en orange sont recrutées au sein du splicéosome au niveau de sites d'épissage pour activer l'inclusion d'exons (ESE: "Exon Splicing Enhancer"). Leur activité est régulée par épissage alternatif, par phosphorylation-déphosphorylation de manière tissu ou stade-spécifique. Les protéines hnRNP ("heterogeneous nuclear ribonucleoproteins") en jaune sont recrutées au sein du splicéosome au niveau de séquences d'épissage pour activer l'exclusion d'exons (ESS: "Exon Splicing Silencer"). Les hnRNP exercent donc des fonctions opposées à celles des protéines SR. La liaison de facteurs d'épissage aux séquences ISE et ISS ("Intronic Splicing Enhancer/Silencer") régulent l'inclusion relative de séquences introniques de la même façon que les séquences ESE et ESS.

(protéines SR, hnRNP)[509,510] jouent un rôle de support en stabilisant le complexe et participent à l'activation séquentielle du splicéosome en modifiant la conformation des ARNsn par des interactions ARN-ARN, ARN-protéines (Figure 14). Certaines exercent une activité catalytique par elles-même[504]. Ainsi, les séquences en *trans* du pré-ARNm, sur lesquelles se lient les protéines SR et hnRNP, contribuent à la spécificité et à la fidélité de reconnaissance des sites d'EA. Elles modulent l'EA d'exons/introns[505]. On parle de séquences "activatrices/inhibitrices d'épissage" ("ESE/ESS, ISE/ISS"). En se liant aux séquences ESE, les protéines SR créent un encombrement stérique qui inhibe le "saut d'exons". L'exon est donc inclut au sein de l'ARNm mature. Les hnRNPs ont une fonction antagoniste: leur liaison aux séquences ESS active le "saut d'exons", c'est à dire leur exclusion de l'ARNm (Figure 15). Les protéines SR et hnRNP ont une organisation modulaire. Elles possèdent un domaine d'interaction avec l'ARN ("*RNA recognition motif*" ou "RRM") et avec les protéines[511,512]. La teneur intracellulaire relative des protéines SR et hnRNP influence le devenir du/des exon(s)[512]. Une méthode bioinformatique prédictive des profils d'épissage de chaque tissus a été développée en combinant les différents motifs de liaisons (*cis* et *trans)*. On parle de "code d'épissage"[509].

En plus du code basé sur les séquences d'ARNm, l'ARN polymérase II et la structure de la chromatine constituent deux autres mécanismes de régulation de l'EA[508,513–517]. D'autre part, des études récentes semblent impliquer les ARNsn à d'autres niveaux de la biogenèse des ARN: transcription, polyadénylation alternative et maintien de la stabilité des ARN[518–520].

Peu de données fonctionnelles sont disponibles sur les ARNsn pour l'instant. Les liens entre ARNsn et tumorigenèse étant transposables à leurs snRNP associées, nous utilisons les données parues sur les complexes ribonucléoprotéiques (snRNP) pour évaluer le rôle des altérations d'expression des ARNsn dans l'oncogenèse des GBM[155,517].

### 4.1.2 Implication de l'épissage alternatif en cancérologie

#### *4.1.2.1 Altérations des profils d'épissage et cancer*

L'implication de l'EA dans l'oncogenèse a été reportée par plusieurs auteurs[521,522]. En modifiant des réseaux d'ARNm liés fonctionnellement, l'altération de l'EA (snRNP, protéines SR et hnRNP) suffirait à initier la cancérogenèse par sur-expression d'oncogènes, échappement aux programmes de sauvegarde, prolifération et dédifférenciation des cellules tumorales[511,523–527]. Ces altérations d'épissage peuvent résulter de modifications des séquences d'épissage en *cis* ou de certaines prédispositions génétiques, par exemple des mutations des gènes *BRCA1/2* remodelant les profils d'épissage à l'échelle du génome[528,529]. Toutefois, la majorité des profils d'épissage tumoraux résulte d'une altération du niveau d'expression ou de l'activité des facteurs d'épissage (mutation, délétion,

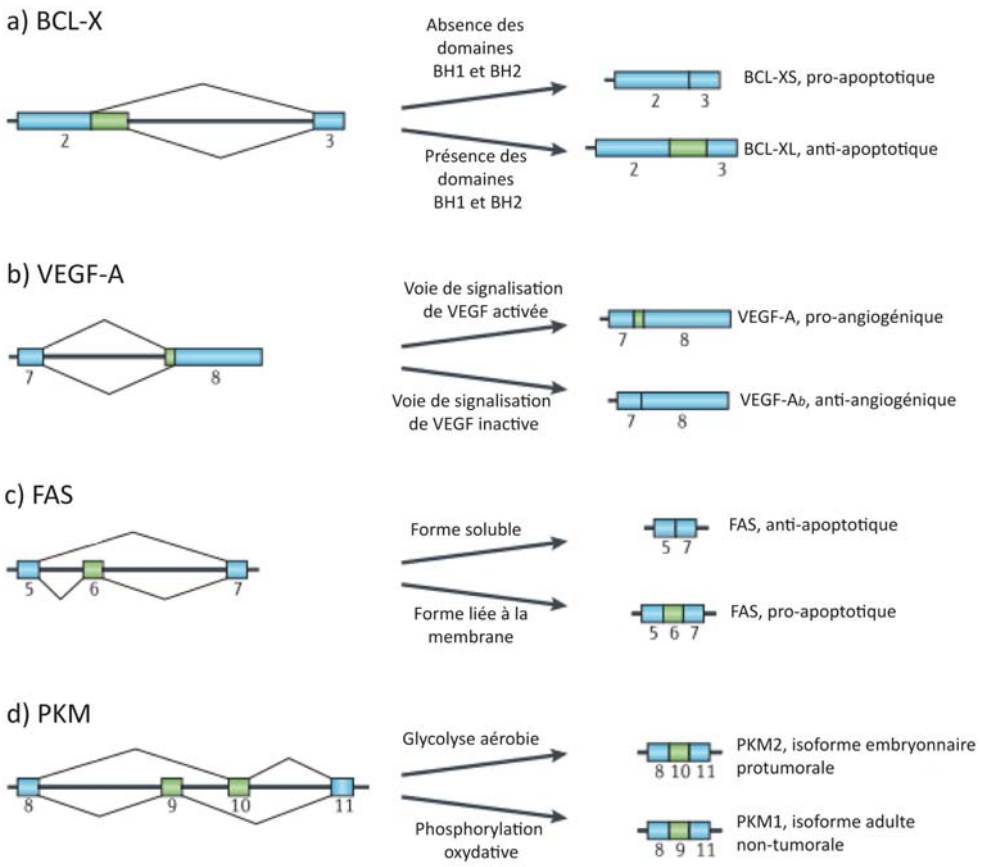



**Figure 16: Exemples d'évènements d'épissage alternatif contribuant à la tumorigenèse** d'après Bonnal et al., 2012. a et b) utilisation de site d'épissage alternatif en 5' et 3', c) exons alternatifs mutuellement exclusifs, d) exclusion d'exons complexe.

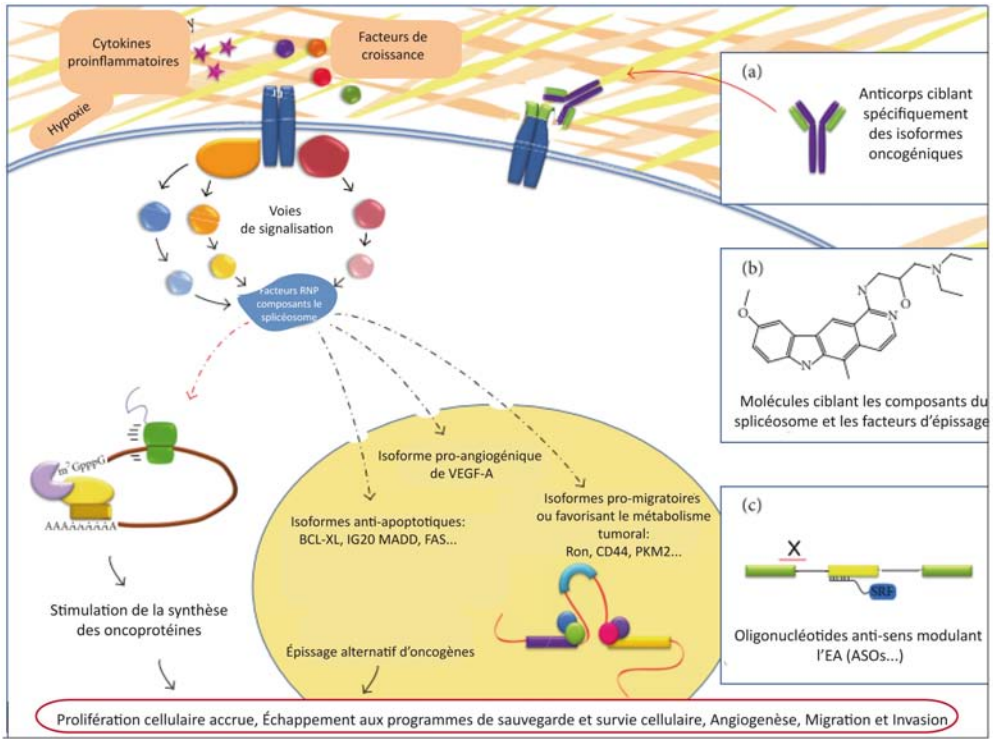



**Figure 17: La dérégulation des différents composants du splicéosome (facteurs d'épissage et snRNP associées) participe à l'oncogenèse. Les facteurs constituent des cibles thérapeutiques pertinentes** d'après Bonomi *et al.,* 2013.

modification épigénétique). Les altérations d'EA jouent principalement un rôle lors de la progression et de la dissémination tumorale. Nous détaillerons ces mécanismes ci-dessous (Figure 16 et 17).

#### *4.1.2.2 Angiogenèse et isoformes du facteur de croissance VEGF-A*

VEGF-A a longtemps été décrit comme un facteur de croissance exclusivement pro-angiogénique. Il existe en réalité deux isoformes de VEGF-A: l'un exerce une activité pro-angiogénique, l'autre est anti-angiogénique. Dans les tumeurs, la balance entre ces isoformes est perturbée en faveur d'une surexpression de l'isoforme pro-angiogénique de VEGF-A. Le rétablissement de l'équilibre physiologique entre ces deux isoformes et la compréhension de(s) étiologie(s) moléculaires de cette dérégulation de l'EA permettra d'identifier des cibles thérapeutiques pertinentes[530].

#### *4.1.2.3 Dérégulation du cycle cellulaire et mutations de la sous-unité U2-snRNP*

Le gène codant la sous-unité SF3B1 ("Splicing factor 3B subunit 1") du complexe U2-snRNP est fréquemment muté dans les hémopathies malignes[531,532]. En fonction du contexte cellulaire, la mutation de *SF3B1* est associée à un pronostic favorable ou délétère[511]. De façon intéressante, il a été démontré qu'un agent antinéoplasique ("Splicéostatine A") inhibait l'interaction entre SF3B1 et le pré-ARNm et modifiait ainsi spécifiquement l'épissage de protéines régulant le cycle cellulaire, exerçant ainsi un effet anti-prolifératif[533–536].

#### *4.1.2.4 Échappement à l'apoptose et à la sénescence et isoformes p53β, FAS et BCL-X*

##### 4.1.2.4.1 Isoforme p53β

L'EA du transcrit du gène suppresseur de tumeur *TP53* est à l'origine de 12 isoformes différentes. Le déséquilibre entre ces isoformes contribue à l'activation de l'oncogenèse et au développement de résistance par échappement à la sénescence et à l'apoptose induit en réponse à des lésions de l'ADN[537]. L'isoforme p53β, par exemple, est indispensable à l'induction de la sénescence. Sa synthèse étant contrôlée par différents facteurs d'épissage (SRSF3, SRSF2), une dérégulation de ces facteurs induit une sous-expression de p53β et l'échappement à la sénescence[538–540].

##### 4.1.2.4.2 Isoformes de BCL-X

La rupture de l'équilibre entre deux isoformes issues de l'EA de la protéine BCLX/BCL-2L1 pour "Bcl-2-like protein 1" a été impliquée dans la cancérogenèse pulmonaire : la surexpression de l'isoforme long BCL-Xl inhibe l'apoptose alors que BCL-Xs l'active. Cette altération de l'EA serait provoquée par l'expression anormale de ribonucléoprotéines du splicéosome (ASF/SF2 ou hnRNPs)[541,542].

##### 4.1.2.4.3 Isoforme du récepteur transmembranaire FAS

L'EA du récepteur transmembranaire FAS conduit à la formation de deux isoformes différentes: l'une transmembranaire, active une voie de signalisation pro-apoptotique, l'autre soluble, protège de l'apoptose. Les variants solubles du récepteur préviennent l'apparition de toxicités radio-induites[543–545].

#### *4.1.2.5 Transition épithélio-mésenchymateuse (TEM), invasion, dissémination, métastases et EA*

L'altération de l'EA de plusieurs ARNm impliqués dans des voies de signalisation contrôlant la migration, la dissémination et l'invasivité cellulaires active un processus complexe conduisant à l'invasion locale puis à la dissémination métastatique: la transition épithélio-mésenchymateuse (TEM)[546]. Les molécules impliquées dans la TEM dont l'EA est altéré sont : le récepteur à activité tyrosine kinase RON, la GTPase PAC1, le facteur de transcription KLF6, la molécule d'adhésion cellulaire L1CAM, la glycoprotéine de surface CD44 etc[524]. L'origine moléculaire de ces altérations d'EA n'est pas encore élucidée. Toutefois, une méta-analyse bioinformatique de données de "*microarrays*" archivées a récemment impliqué différents composants du splicéosome dans le processus métastatique[547]. Plusieurs gènes codant les sous-unités des 5 snRNP (U1, U2, U4, U5 et U6) et certains facteurs d'épissage sont différentiellement exprimés au sein des cellules tumorales: hnRNPA1P2, hnRNPC, hnRNPK, SFRS1/3/5/7/9. Cela corrobore le rôle du splicéosome dans le processus métastatique[500,547].

#### *4.1.2.6 Changement métabolique favorisant la progression tumorale et altération de l'EA*

Christofk *et al.* ont démontré que l'altération de l'épissage alternatif de la pyruvate kinase (isoforme adulte PKM1 et embryonnaire PKM2) entrainait une modification du métabolisme cellulaire en faveur de la progression tumorale. En exprimant l'isoforme embryonnaire M2, les cellules tumorales s'orientent de façon réversible vers un métabolisme de glycolyse aérobie avec production accrue de lactate. Ce métabolisme confère aux cellules tumorales un avantage sélectif *in vivo*. On parle d'effet Warburg[548].

#### *4.1.2.7 snRNP et maintien des réseaux géniques des CSC*

L'EA est impliqué dans le maintien des circuits géniques contrôlant la pluripotence des cellules souches embryonnaires (CSE) ainsi que dans la reprogrammation des cellules souches pluripotentes induites (iPSC)[549,550]. Il est donc fortement probable que l'EA joue un rôle dans le maintien des CSC à l'origine de la résistance et de la récidive de nombreuses tumeurs[511,523].

### 4.1.3 Altérations de l'activité du splicéosome dans le maintien de la tumorigénicité du glioblastome et des cellules souches de glioblastome

#### *4.1.3.1 Sous-unités ribonucléoprotéiques du splicéosome différentiellement exprimées dans le glioblastome*

Plusieurs sous-unités ribonucléoprotéiques du splicéosome ont été impliquées dans l'initiation et la progression du GBM.

##### 4.1.3.1.1 PTBP1

Ferrarese *et al.* ont récemment démontré que la ribonucléoprotéine PTBP1, réprimée lors du développement neuronal, était surexprimée au sein des GBM[551]. Sa surexpression altère l'épissage de l'annexine 7 (ANXA7), une protéine membranaire oncosuppressive. Cette altération conduit à une

stimulation accrue de la voie de signalisation de l'EGFR par diminution de son ciblage endosomal[552,553]. La surexpression de PTPB1 contribue donc à la progression du GBM. Cette surexpression peut résulter de l'amplification du gène *PTBP1* ou de la perte d'un microARN enrichi au sein du cerveau (microARN-124). L'intérêt thérapeutique du rétablissement de l'expression de la ribonucléoprotéine PTBP1 dans le GBM sera discuté dans la partie 4.2.

##### 4.1.3.1.2 hnRNP

- **hnRNPH**

Lefave *et al.* ont démontré que la surexpression de hnRNPH au sein des gliomes et des GBM contrôlait un évènement d'épissage permettant aux cellules d'acquérir des propriétés oncogéniques[554]. hnRNPH conduit à la formation d'une isoforme antagoniste de la protéine pro-apoptotique IG20 favorisant ainsi la survie et la prolifération en altérant le signal de mort de la voie du TNF-$\alpha$/TRAIL. D'autre part, la surexpression de hnRNPH confère aux cellules des capacités migratoires et invasives accrues en induisant la formation d'une isoforme constitutivement active du récepteur à activité tyrosine kinase RON. Ainsi, hnRNPH contrôle l'EA de différentes isoformes oncogéniques et favorise la progression maligne des gliomes et l'acquisition de propriétés type "cellules souches" (dédifférenciation, échappement à l'apoptose, migration) responsables de l'agressivité des GBM et des échecs thérapeutiques[554–556].

- **hnRNPA2/B1**

Golan-Gertsl *et al.* ont mis en évidence la surexpression de hnRNPA2/B1 au sein des GBM. Cette sur-expression permet la transformation de lignées cellulaires. Le "knock-down" de *hnRNPA2/B1* dans des lignées cellulaires de GBM inhibe la formation de tumeur dans des modèles de xénogreffes murins. Les oncosuppresseurs ou oncogènes dont l'expression est régulée par hnRNPA2/B1 sont respectivement *BIN1, WWOX* et *c-FLIP,RON*. Le récepteur à activité tyrosine kinase RON semble être un effecteur essentiel à la transformation médiée par hnRNPA2/B1. Nous détaillerons l'intérêt de *hnRBPA2/B1* comme biomarqueur pronostique et comme cible thérapeutique dans le GBM dans la partie 4.2[557–562].

- **hnRNPA1 et hnRNPA2**

Comme décrit ci-dessus, l'altération de l'équilibre entre les deux isoformes de la pyruvate kinase permet l'acquisition d'un métabolisme favorisant la tumorigenèse par élévation du rapport PKM2/PKM1 : l'isoforme adulte PKM1 correspondant à l'inclusion de l'exon 9 et l'isoforme embryonnaire PKM2 à celle de l'exon 10[548]. En 2010, différentes équipes ont démontré que l'oncogène c-MYC en induisant la surexpression de 3 hnRNP (PTB, hnRNPA1, hnRNPA2) permettait l'inclusion préférentielle de l'exon 10 et ainsi la formation de l'isoforme oncogénique PKM2. D'autre

part, une corrélation entre la surexpression de c-MYC/PTB, hnRNPA1 et A2 et l'isoforme PKM2 a été établie au sein des GBM[563]. Par ailleurs, la diminution de l'expression de ces ribonucléoprotéines suffit à rétablir l'expression de l'isoforme PKM1, à diminuer la production de lactate et ainsi à abolir l'avantage sélectif conféré par PKM2[564].

Plus récemment, au sein des GBM, Babic *et al.* ont identifié une mutation de *EGFR* (*EGFRvIII*) capable d'induire des modifications de l'EA altérant le métabolisme cellulaire d'une manière similaire (glycolyse aérobie, rapport élevé de PKM2/PKM1)[565]. Le mutant EGFRvIII provoque la surexpression du facteur d'épissage hnRNPA1. Ce dernier génère une isoforme de Max (Delta-Max), une protéine effectrice du métabolisme pro-tumoral MYC-dépendant.

Ces différentes études soulignent le rôle central de la dérégulation de l'EA induit par hnRNP A1 et A2 dans l'initiation et le maintien du GBM. Nous détaillerons les applications potentielles de ces ribonucléoprotéines en clinique.

#### *4.1.3.2 Rôle du splicéosome dans le maintien des cellules souches de glioblastome*

##### 4.1.3.2.1 PHF5A

Des études ont récemment mis en évidence une protéine nécessaire au maintien des CSG impliquée dans la régulation de l'EA. PHF5A (Plant-Homeodomain/PHD-finger protein 5A) facilite l'interaction entre la ribonucléoprotéine U2-snRNP et les hélicases ATP-dépendantes et permet ainsi l'EA d'exons possédant des sites d'épissage riches en cytosine dans de nombreux gènes. L'inhibition pharmacologique de U2-snRNP mime l'inhibition de PHF5A et conduit à l'arrêt du cycle cellulaire et à la perturbation des réseaux géniques assurant le maintien des CSG. Ainsi, l'interaction entre la PHF5A et U2-snRNP est indispensable au maintien des CSC initiatrices des GBM. Par conséquent, PHF5A et U2-snRNP constituent des cibles thérapeutiques anti-GBM pertinentes[566,567].

##### 4.1.3.2.2 SRSF3 ou SRp20

Les facteurs d'épissage SR (riche en sérine et arginine) sont l'une des familles de protéines associées au splicéosome les plus conservées (avec les protéines hnRNP)[568]. Les protéines SR exercent plusieurs fonctions: inhibition de l'EA d'exons en antagonisant l'activité des hnRNP et sélection des sites d'épissage. Une étude a récemment identifié le facteur d'épissage SRSF3 (ou SRp20) comme surexprimé au sein des CSG comparé aux cellules souches neurales et aux cellules de la masse tumorale[569]. D'autre part, la sur-expression de SRSF3 a été impliquée dans la tumorigénicité de cellules souches de carcinomes coliques ainsi que dans différents mécanismes de maintien des tumeurs : échappement à la sénescence, prolifération, invasivité[540,570–573]. De plus un lien entre la surexpression de SRSF3 et la voie Wnt/β-caténine a récemment été établi dans les CSC. La voie Wnt/β-caténine étant impliquée dans le devenir des cellules souches et des progéniteurs neuronaux,

SRSF3 exerce probablement un rôle dans le maintien des CSG. Des études sont nécessaires pour préciser les fonctions moléculaires de SRSF3 au sein des GBM, identifier des biomarqueurs pertinents et potentiellement des stratégies thérapeutiques ciblant spécifiquement les CSG[523,570,574,575].

## 4.2 ARNsn, snRNP et facteurs d'épissage: intérêt dans la prise en charge du glioblastome

La pertinence de la dérégulation de l'EA et des altérations des ARNsn, des snRNP et des facteurs d'épissage dans l'oncogenèse est maintenant largement acceptée. Pourtant, les données étant pour la plupart relativement préliminaires, leur potentiel thérapeutique, diagnostique et pronostique est pour l'instant sous-exploité.

L'utilisation des technologies génomiques, transcriptomiques et protéomiques de nouvelles générations combinées à des outils bioinformatiques puissants (RNAseq, microarrays, spectrométrie de masse) a permis l'identification d'altérations de profils d'expression de nombreux gènes au sein des GBM et des CSG[576,577]. Nous décrivons les candidats biomarqueurs diagnostiques et/ou pronostiques pertinents composants le splicéosome et régulant l'EA. D'autre part, nous détaillons les stratégies thérapeutiques émergentes développées pour rétablir et orienter l'EA des cellules cancéreuses : oligonucléotides anti-sens, ciblage des composants du splicéosome par des substances de faible masse moléculaire[578,579]. La plupart des cellules cancéreuses présentant de multiples altérations d'EA, nous ne détaillons pas la stratégie consistant à cibler un variant oncogénique par un anticorps monoclonal spécifique (Figure 17 p49).

### 4.2.1 Composants du splicéosome: biomarqueurs diagnostiques, pronostiques et cibles thérapeutiques potentielles

#### *4.2.1.1 Les composants du splicéosome dont l'expression est altérée dans le glioblastome: biomarqueurs potentiels*

##### 4.2.1.1.1 PTBP1

La formation d'un variant d'épissage perte de fonction de l'annexine 7 (ANXA7) conduit à une stimulation accrue de la voie EGFR par diminution de l'adressage endosomal du récepteur oncogénique. Cette aberration d'EA est provoquée par amplification de la ribonucléoprotéine PTBP1 pouvant elle-même résulter de la perte d'un microARN enrichi au sein du cerveau (miR-124). Bredel *et al.* ont démontré que la perte de l'annexine 7 était corrélée à un pronostic défavorable chez les patients atteint de GBM[552,553]. Ainsi, la surexpression de PTBP1 constitue potentiellement un biomarqueur de pronostic défavorable chez les patients atteints de GBM.

Récemment, Yadav *et al.* ont démontré que l'inhibition de l'activité de la glycogène synthase kinase-3β (GSK-3β) par AR-A014418 diminuait significativement l'expression de plusieurs gènes codant des

facteurs d'épissage (*SRSF1, SRSF5, PTPB1, hnRNP*) et de gènes anti-apoptotiques (*Bcl-2, Bcl-xL, Survivine, BMI1*) surexprimés dans les GBM, induisant par conséquent l'apoptose de ces cellules[580]. D'autre part, le traitement par AR-A014418 permet de rétablir l'expression du variant oncosuppresseur de l'annexine 7. Ainsi, l'inhibition de la GSK-3β par AR-A014418 semble être une stratégie thérapeutique prometteuse pour inhiber la surexpression de facteurs d'épissage et prévenir la formation de variants oncogéniques[563,580].

##### 4.2.1.1.2 hnRNP-A1

Babic *et al.* ont identifié une mutation d'*EGFR* (EGFRvIII) contribuant à la sur-expression de hnRNP-A1 et responsable d'un changement métabolique favorisant la croissance des GBM *in vitro* et *in vivo*[563,565]. Cette équipe a également mis en évidence la pertinence clinique de la sur-expression de hnRNP-A1 chez les patients atteints de GBM primaires. Il existe en effet une corrélation forte entre la surexpression de hnRNP-A1 et une survie globale courte. La ribonucléoprotéine hnRNP-A1 semble être un biomarqueur pronostique pertinent dans le GBM[565].

##### 4.2.1.1.3 hnRNPA2/B1

La ribonucléoprotéine hnRNP-A2/B1 est sur-exprimée au sein des GBM et agit comme un oncogène. En régulant l'EA de nombreux oncogènes et gènes suppresseurs de tumeurs, il favorise la transformation cellulaire et la tumorigénicité[557]. La surexpression de hnRNPA2/B1 est corrélée négativement au pronostic des patients[581]. À l'inverse, les patients présentant une délétion du gène codant hnRNPA2/B1 présentent un pronostic plus favorable. Ainsi, hnRNPA2/B1 constitue un biomarqueur de pronostic défavorable au sein des GBM et une cible thérapeutique potentielle chez patients présentant une sur-expression.

##### 4.2.1.1.4 hnRNPH

hnRNPH est significativement surexprimé au sein des GBM et contrôle un évènement d'épissage responsable de la formation de variants oncogéniques dont l'isoforme anti-apoptotique MADD et le récepteur à activité tyrosine kinase RON constitutivement actif. L'activité de hnRNP-H est également impliquée dans le maintien des propriétés type "souches" des CSG. D'autre part, LeFave *et al.* ont démontré que l'activité de hnRNP-H était corrélée au grade tumoral. Ainsi, hnRNP-H constitue un biomarqueur diagnostic pertinent chez les patients atteints des GBM[554].

##### 4.2.1.1.5 PHF5A

PHF5A a récemment été identifié comme un facteur d'épissage indispensable au maintien des CSG Cette sous-population étant au coeur des échecs thérapeutiques, PHF5A constitue potentiellement un biomarqueur prédictif de réponse au traitement ainsi qu'une cible thérapeutique pertinente dans la prise en charge du GBM[566,567].

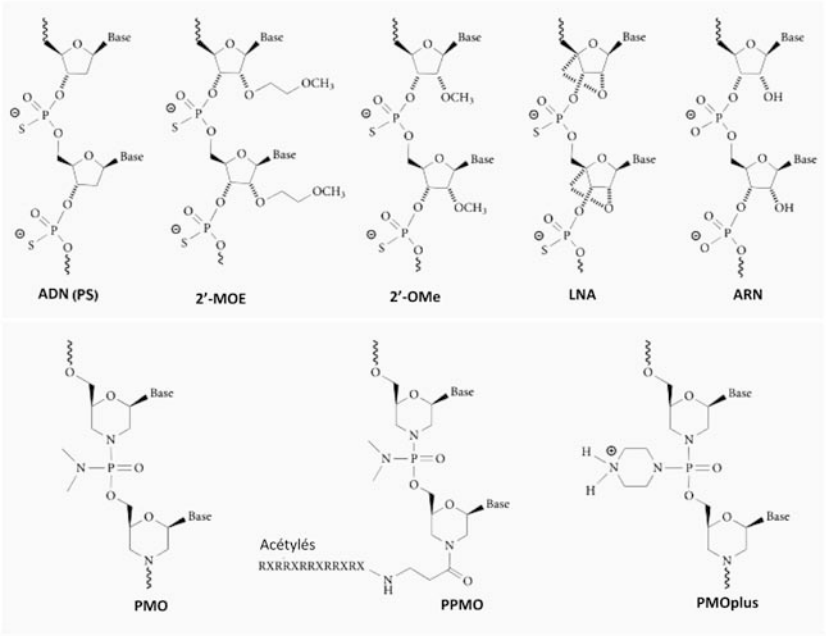



**Figure 18: Structure des Oligonucléotides anti-sens (ASO).** Tous sont chargés négativement. Les radicaux phosphorothionate (PS) , 2'-O-méthoxyéthyl (2'-MOE) et 2'-O-méthyl (2'-OMe) confèrent une résistance accrue à la dégradation et facilitent la liaison des protéines à l'ARN. Les acides nucléiques verouillés (LNA) améliore la liaison des ASO au pré-ARNm. Dans les oligomers morpholino-phosphorodiamidate (PMO) le ribose/désoxyribose est substitué par un cycle morpholine et le phosphodiester/phosphorothionate par un groupement phosphorodiamidate non-chargé. Les PMO sont ainsi neutres et très résistants à la dégradation. Les PPMO (PMO chargés positivement) ont été développés pour améliorer la captation intracellulaire de ces ASO (pipérazines chargés positivement).

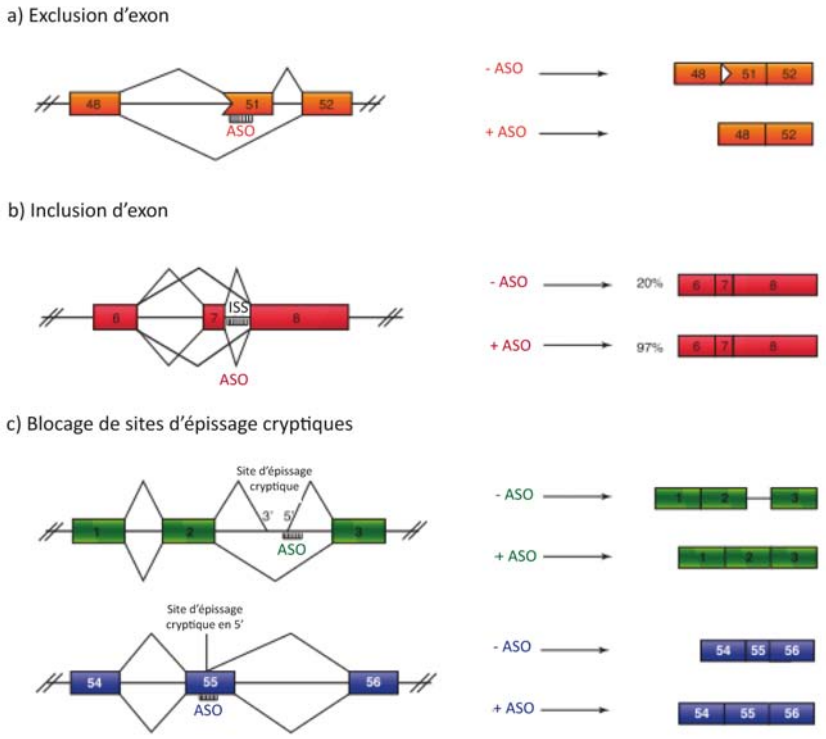



**Figure 19: Mode d'action des oligonucléotides anti-sens (ASO) ciblant les aberrations d'épissage alternatif,** d'après Hammond & Wood, 2011. a) un ASO ciblant une séquence activant l'épissage d'exon ESE mutée conduit à l'exclusion et à la formation du transcrit correct. b) un ASO ciblant une séquence intronique inhibant l'inclusion de l'exon 7 ISS permet la ré-inclusion de celui-ci et la formation d'une protéine fonctionnelle. c) la présence de sites d'épissage cryptique provoque l'inclusion d'introns ou la délétion partielle d'exons. Un ASO dirigé contre ces sites cryptiques inhibe l'assemblage du splicéosome et restaure l'épissage correct du transcrit (exclusion de l'intron et inclusion de l'exon).

#### *4.2.1.2 Dérégulation de l'épissage alternatif et prédiction de la chimiorésistance* [582]

Les facteurs d'épissage décrits ci-dessus confèrent aux cellules des propriétés comme l'échappement à l'apoptose, une adaptabilité métabolique accrue et un potentiel d'autorenouvellement et de dédifférenciation proche de celui des cellules souches. Toutes ces caractéristiques contribuent à accroître la chimiorésistance des GBM[582].

### 4.2.2 Thérapies anti-tumorales ciblant les anomalies d'épissage

#### *4.2.2.1 Thérapies perturbant l'EA par encombrement stérique*

##### 4.2.2.1.1 Oligonucléotides anti-sens

Les Oligonucléotides Anti-Sens (ASO) représentent à l'heure actuelle la stratégie la plus aboutie pour modifier/corriger l'EA des pré-ARNm. Les ASO sont générés de manière à dissimuler les séquences régulatrices de l'EA au sein des pré-ARNm et ainsi à inhiber la liaison en *trans* des co-facteurs d'épissage[583,584]. La liaison des ASO sur les séquences régulatrices (ESS, ESE, ISS, ISE) ou sur une séquence mutée du pré-ARNm perturbe l'inclusion ou l'exclusion d'exons ou d'introns spécifiques de variants oncogéniques. Des modifications chimiques ont permis d'améliorer la pharmacocinétique et la biodisponibilité des ASO pour qu'ils puissent entrer en compétition avec les facteurs d'épissage endogènes lors de la liaison au pré-ARNm : squelette phosphorothionate, oligomers morpholino phosphorodiamidate, acide nucléique peptidique(Figure 18)[585].

- **Saut/exclusion d'exons**

Certains ASO peuvent favoriser l'exclusion d'exon(s) excédentaire(s) d'un variant oncogénique. Toutefois, plusieurs conditions sont requises à l'application de cette stratégie: la suppression de l'exon ne doit modifier ni le cadre de lecture, ni la structure/fonction de la protéine. La plupart des néoplasmes présentant des altérations d'EA multiples, une stratégie d'exclusion d'exons multiples semble plus adaptée. Ces outils sont actuellement en cours de développement (Figure 19)[584].

- **Inclusion d'exons**

Les ASO peuvent à l'inverse favoriser l'inclusion d'exons exclus au sein de pré-ARNm oncogéniques. Cette stratégie a été développée initialement dans un modèle d'amyotrophie spinale et n'a pas été adaptée en cancérologie pour l'instant (Figure 19)[586–588].

- **Blocage de sites d'épissage cryptiques**

Lorsqu'une mutation affecte des sites d'épissages vrais, le machinerie d'épissage utilise des sites d'épissage cryptiques cachés situés jusqu'à 400 nucléotides au delà ou en deçà du site d'épissage original. Ces sites d'épissage peuvent provoquer l'inclusion/l'exclusion aberrante d'un exon ou d'un

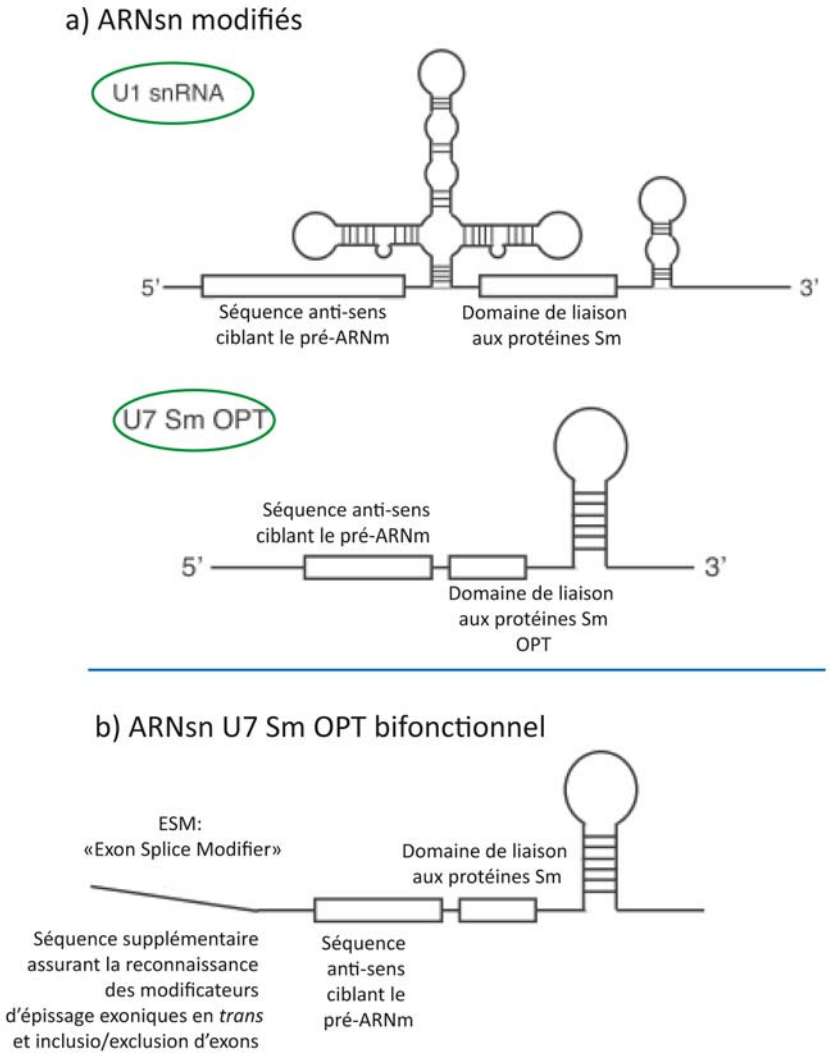



**Figure 20: ARNsn modifiés utilisés comme outils thérapeutiques pour "réparer" les altérations d'EA** d'après Hammond & Wood, 2011. a) les ARNsn U1 et U7 se lient en *cis* au niveau de leur séquence cible sur le pré-ARNm et induisent un encombrement stérique inhibant l'assemblage du splicéosome. b) les ARNsn bifonctionnels U7 Sm OPT contiennent une séquence additionnelle en 5' ("queue" ou "ESM") grâce à laquelle ils recrutent des facteurs modifiant l'épissage (inhibiteurs ou inducteurs). La séquence anti-sens cible le pré-ARNm.

intron. Cela résulte la plupart du temps en l'apparition de codons stop prématurés et en la formation de protéines tronquées[589,590]. Des oligonucléotides ciblant ces sites d'épissage cryptiques ont permis de rétablir en partie l'EA dans des modèles *in vitro* et *in vivo* mutant pour la protéine ATM en rétablissant l'activité centrale de cette protéine dans la voie de signalisation de réparation des cassures double-brin de l'ADN(Figure 19) [590].

##### 4.2.2.1.2 ARNsn-U1 et U7

Les ARNsn modifiés, ARNsn-U1 et U7 peuvent être associés aux ASO pour rétablir les altérations d'EA[591,592]. Les ARNsn modifiés se lient sur une séquence d'épissage altérée du pré-ARNm et induisent un encombrement stérique qui inhibe l'assemblage du splicéosome. La combinaison d'ARNsn et d'ASO a une efficacité supérieure à celle des ASO seuls. Les ARNsn permettent en effet de cibler les pré-ARNm au sein du noyau.

L'ARNsn-U1 est un composant essentiel du splicéosome. Il s'apparie à l'extrémité 5'SS des introns au sein des pré-ARNm et permet l'assemblage de la machinerie d'épissage. La modification de la séquence de liaison de l'ARNsn-U1 suffit à son appariement avec le pré-ARNm ciblé. L'ARNsn-U7, lui, n'est pas impliqué au sein du splicéosome. C'est un facteur assurant la modification de l'extrémité 3' du pré-ARNm des histones. L'ARNsn-U7 doit par conséquent être modifié pour moduler l'EA par augmentation de son accumulation nucléaire et annihilation de son potentiel de modification des histones. On parle alors de U7 Sm OPT (Figure 20)[593,594].

#### *4.2.2.2 Thérapies perturbant l'EA par liaison compétitive des facteurs d'épissage (inducteurs ou inhibiteurs): les ARN bifonctionnels*

Les ARN-bifonctionnels peuvent être formés d'ASO ou d'ARNsn-U1 et U7 modifiés. Les ARN-bifonctionnels sont constitués d'une séquence complémentaire à leur pré-ARNm cible et d'une séquence inhibitrice/inductrice d'épissage exonique (ESS/ESE) à leur extrémité. Cette extrémité leur permet d'attirer et de capter les facteurs inducteurs/inhibiteurs d'épissage et ainsi d'empêcher l'assemblage du splicéosome par inhibition compétitive de leur liaison aux séquences ESS et ESE endogènes (Figure 20.b)[595]. Une approche utilisant un oligonucléotide bifonctionnel liant la protéine hnRNP-A1 a été développée pour augmenter le rapport des transcrits Bcl-xS/Bcl-xL et activer l'apoptose[596,597]. Toutefois, ces études sont pour l'instant limitées car basées exclusivement sur des données *in vitro*.

#### *4.2.2.3 Thérapies perturbant l'EA par trans-épissage*

Le trans-épissage (ou *SMART "Spliceosome-mediated RNA trans-splicing"*), c'est à dire l'échange d'une séquence d'un pré-ARNm altéré par celle d'une molécule thérapeutique dite de "pré-trans-épissage" (PTM) est une stratégie alternative pour corriger des aberrations d'EA (Figure 21)[598]. Ce mécanisme, proche de l'EA conventionnel (formation d'un intermédiaire en forme de Y), se produit à

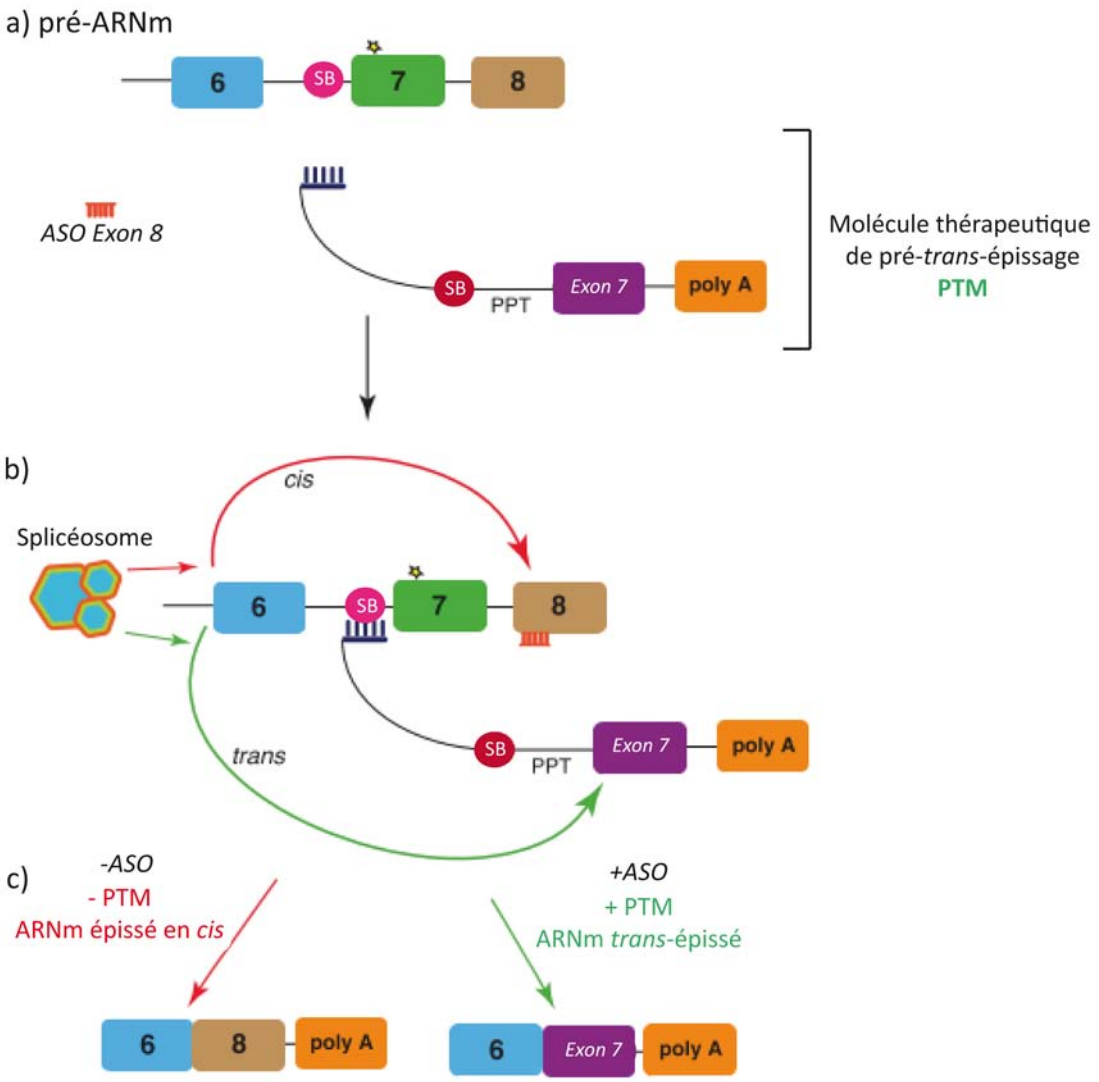



**Figure 21: Trans-épissage thérapeutique d'un variant aberrant** d'après Hammond & Wood, 2011. Dans cet exemple, le pré-ARNm contient 3 exons, dont l'exon 7 muté au niveau d'un site d'épissage (étoile) et l'exon 8 normalement exclu de l'ARNm mature. a) La molécule thérapeutique de trans-épissage (PTM) se lie au pré-ARNm cible au niveau du site de branchement (SB), remplace l'exon 7 muté par un exon 7 dépourvu de cette altération. La PTM contient des éléments introniques d'épissage comme le site de branchement (SB) ou les polypyrimidines (PPT pour "PolyPyrimidine Tract") et une extrémité 3' modifiée pour se lier à la séquence du transcrit cible. De façon à modifier davantage l'EA, un oligonucléotide anti-sens peut également être introduit pour inhiber l'inclusion de l'exon 8 par induction d'un encombrement stérique bloquant sa reconnaissance. L'oligonucléotide antisens (ASO) induit l'épissage de l'exon 8 excédant. La PTM et l'ASO peuvent être véhiculés par un même plasmide b) Le splicéosome reconnait l'exon 7 introduit par la PTM ou l'exon 8. c) Deux ARNm sont produits l'un incluant l'exon 8 (sans PTM ni ASO) l'autre ayant rétabli l'expression de l'exon 7 contre l'exon 8 (PTM et ASO).

l'état naturel dans différents organismes (Trypanosomes, *C.elegans*) et permet le remplacement d'une extrémité 3' mutée ou délétée d'un pré-ARNm par une extrémité fonctionnelle. Des vecteurs développés dans un modèle d'atrophie musculaire spinale ont démontré la capacité de vecteurs de trans-épissage (PTM) à corriger des aberrations d'épissage affectant plus d'un exon. Les applications potentielles du trans-épissage en cancérologie et au sein des GBM sont donc prometteuses[599,600]. Toutefois, l'efficacité de ce procédé n'est pas avérée pour l'instant.

#### *4.2.2.4 Modulation du fonctionnement des U1-snRNP: une cible thérapeutique potentielle dans le traitement du GBM*

Comme détaillé ci-dessus, U1-snRNP est une sous-unité du splicéosome assurant la reconnaissance et la liaison au niveau des sites d'épissage en 5'. U1-snRNP exerce également une fonction indépendante de l'EA: U1-snRNP protège et maintient l'intégrité des pré-ARNm. En effet, U1-snRNP prévient la liaison prématurée de la machinerie de polyadénylation aux signaux introniques en 3' du pré-ARNm qui pourrait conduire à des ARNm tronqués[601]. La dérégulation de cette fonction alternative de U1-snRNP ("APA" "*Alternative PolyAdenylation"*) a été impliquée dans le développement de cancers[196,602–604]. La polyadénylation alternative peut générer des oncogènes par perte des extrémités 3'UTR. En effet, en perdant leur site de liaison aux microARN, ces variants tronqués ne sont plus dégradés.

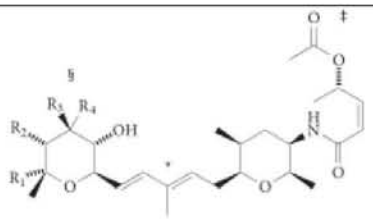
U1-snRNP étant nécessaire à l'intégrité des pré-ARNm et de l'ARNm, des stratégies thérapeutiques anti-cancéreuses modulant les fonctions de la ribonucléoprotéine ont été développées: dégradation de transcrits oncogéniques par *U1-small-nuclear interference "U1i"* ou *adaptateurs-U1* par inhibition de la polyadénylation en 3' puis dégradation endosomale du transcrit, ou activation d'isoformes oncosuppressives par U1-snRNP par formation de variants antagonistes des oncoprotéines[605,606].

Ainsi, Weirauch *et al.* ont développé un adaptateur-U1 ciblant spécifiquement l'oncogène PIM-1 au sein des GBM. PIM-1 est une sérine-thréonine kinase impliquée dans le contrôle du cycle cellulaire, la transcription et l'apoptose[607]. La dégradation de PIM-1 par des adaptateurs-U1 véhiculés par des nanovecteurs Polyéthylènimine (PEI) , a démontré un effet anti-prolifératif et pro-apoptotique à la fois *in vitro* et *in vivo*. Ces nanocomplexes PEI/adaptateurs-U1 sont biocompatibles par absence d'immunogénicité et d'hépatotoxicité et représentent une approche thérapeutique alternative dans le traitement des GBM.

#### *4.2.2.5 Substances perturbant l'EA*

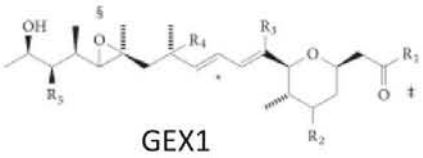
Le criblage de banques de données spécifiques a permis l'identification de molécules de classes pharmacologiques différentes exerçant une activité anti-tumorale en modifiant l'activité de composants du splicéosome[500,579].

## Composés naturels

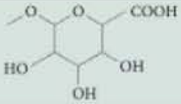


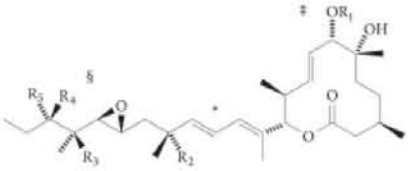
FR901463, FR901464 et FR901465

| Molecule | Formula | $R_1$ | $R_2$ | $R_3$ | $R_4$ |
|---|---|---|---|---|---|
| FR901463 | $C_{27}H_{42}ClNO_8$ | OH | H | $CH_2Cl$ | OH |
| FR901464 | $C_{27}H_{41}NO_8$ | OH | H | Epoxide | |
| FR901465 | $C_{27}H_{41}NO_9$ | OH | OH | Epoxide | |



GEX1

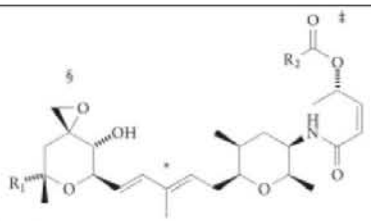
| Molecule | Formula | $R_1$ | $R_2$ | $R_3$ | $R_4$ | $R_5$ |
|---|---|---|---|---|---|---|
| GEX1A | $C_{25}H_{42}O_6$ | OH | H | $CH_3$ | H | $OCH_3$ |
| GEX1Q1 | $C_{25}H_{42}O_7$ | OH | OH | $CH_3$ | H | $OCH_3$ |
| GEX1Q2 | $C_{25}H_{42}O_7$ | OH | H | $CH_3$ | OH | $OCH_3$ |
| GEX1Q3 | $C_{31}H_{50}O_{12}$ |  | H | $CH_3$ | H | $OCH_3$ |
| GEX1Q4 | $C_{25}H_{42}O_7$ | OH | H | $CH_2OH$ | H | $OCH_3$ |
| GEX1Q5 | $C_{24}H_{40}O_6$ | OH | H | $CH_3$ | H | OH |



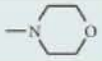
Pladienolides

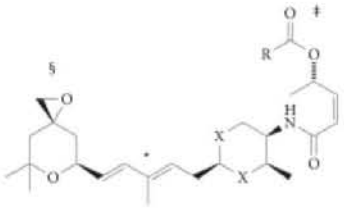
| Molecule | Formula | $R_1$ | $R_2$ | $R_3$ | $R_4$ | $R_5$ |
|---|---|---|---|---|---|---|
| Pladienolide A | $C_{28}H_{46}O_7$ | H | H | H | H | OH |
| Pladienolide B | $C_{30}H_{48}O_8$ | $COCH_3$ | H | H | H | OH |
| Pladienolide C | $C_{30}H_{46}O_8$ | $COCH_3$ | H | H | =O | |
| Pladienolide D | $C_{30}H_{48}O_9$ | $COCH_3$ | OH | H | H | OH |
| Pladienolide E | $C_{30}H_{48}O_9$ | $COCH_3$ | H | OH | H | OH |
| Pladienolide F | $C_{28}H_{46}O_8$ | H | OH | H | H | OH |
| Pladienolide G | $C_{28}H_{46}O_8$ | H | H | OH | H | OH |

## Analogues synthétiques



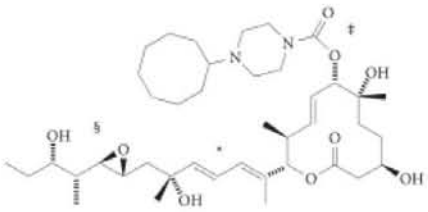
Splicéostatine A et meyamycines

| Molecule | Formula | $R_1$ | $R_2$ |
|---|---|---|---|
| Spliceostatin A | $C_{28}H_{43}NO_8$ | $OCH_3$ | $CH_3$ |
| Meayamycin | $C_{28}H_{43}NO_7$ | $CH_3$ | $CH_3$ |
| Meayamycin B | $C_{30}H_{46}N_2O_8$ | $CH_3$ |  |



Sudemycines

| Molecule | Formula | R | X |
|---|---|---|---|
| Sudemycin C1 | $C_{29}H_{42}NO_5$ | $CH(CH_3)_2$ | $CH_2$ |
| Sudemycin E | $C_{27}H_{43}NO_7$ | $CH(CH_3)_2$ | O |
| Sudemycin F | $C_{26}H_{42}N_2O_7$ | $N(CH_3)_2$ | O |



E7107

**Figure 22: Composés anti-tumoraux naturels et synthétiques inhibant l'assemblage du splicéosome (SF3B)** d'après Bonnal *et al.* 2012.

#### 4.2.2.5.1 Molécules ciblant le splicéosome

Des molécules ciblant le facteur d'épissage SF3B du complexe U2-snRNP ont été identifiées : les pladiénolides et les GEX1. Par la suite, des analogues synthétiques ont été développés pour améliorer leur stabilité, leur solubilité et/ou leur activité (Splicéostatine SSA, Meayamycine, E7107, Sudemycines) (Figure 22)[579]. Le mode d'action de certains de ces composants est aujourd'hui élucidé: la splicéostatine A par exemple, en liant SF3B, déstabilise les complexes U2-snRNP et inhibe l'assemblage du splicéosome[535,579]. Elle induit un changement conformationnel qui perturbe l'assemblage de U2-snRNP à l'extrémité 3' des sites d'épissage. À concentration thérapeutique, sa cytotoxicité est plus importante dans les cellules tumorales que dans les cellules saines probablement car elle affecte l'EA de gènes essentiels à la progression tumorale.

#### 4.2.2.5.2 Inhibition de la phosphorylation des facteurs d'épissage SR

La capacité d'un dérivé indolocarbazole (NR-506) à moduler l'EA et à exercer des fonctions cytotoxiques sur des cellules tumorales a été reportée dans un modèle *in vitro*[608]. En inhibant spécifiquement l'activité de la topoisomérase I, NR-506 inhibe la phosphorylation des protéines SR (ASF/SF2) et perturbe l'épissage des pré-ARNm ciblés par ce facteur d'épissage. Le traitement par NR-506 exerce une activité anti-tumorale en altérant l'expression de plusieurs gènes impliqués dans l'oncogenèse (*BCL-X*). De même, deux autres agents anti-néoplasiques largement utilisés en clinique inhibent les topoisomérases I (camptothécine) et II (étoposide) et modifient l'EA de nombreux gènes et notamment celui de la pro-caspase-2 pro-apoptotique[609,610]. Toutefois, pour l'instant, ces données restent limitées à des modèles *in vitro*.

#### 4.2.2.5.3 Recrutement de la machinerie d'épissage par les composés synthétiques de type PNA

Cartegni *et al.* ont développé des composés synthétiques de type PNA (Acides Nucléiques Peptidiques) capables de mimer la fonction des protéines SR et de rétablir spécifiquement l'EA altéré d'un pré-ARNm (par exemple le transcrit de *BRCA1*). Au delà de leur intérêt dans la compréhension mécanistique de l'EA, ces molécules pourraient constituer des outils thérapeutiques pour corriger les altérations d'EA au sein des tumeurs[597]. D'autres molécules ciblant le splicéosome ont été décrites et sont regroupées dans le tableau 15 (non-exhaustif)[526,579,608,611–617].

La validation des données préliminaires et la progression dans la caractérisation fonctionnelle des ARNsn et des snRNP indispensables à la viabilité des GBM et CSG permettra de déterminer les stratégies thérapeutiques les plus pertinentes pour perturber ou rétablir l'EA.

**Tableau 15: Molécules aux propriétés anti-cancéreuses ciblant le splicéosome**

| Médicament/ Classe Pharmacologique | Fonction et cible au sein du splicéosome | Références |
|---|---|---|
| Isoginkgétine : *Biflavonoïde* | Inhibition de l'EA des pré-ARNm *in vitro* en empêchant la transition du splicéosome du complexe A au complexe B. Des propriétés anti-tumorales sont attribuées à l'isoginkgétine (inhibition de la synthèse des MMP-9, et de la voie PI3K/Akt/NF-κB), toutefois, aucun lien de causalité avec son activité sur l'EA n'a été établi pour l'instant. | O'Brien et al., 2008, Yoon et al., 2006 |
| Stéroïdes cardiotoniques: | Utilisés dans le traitement de l'insuffisance cardiaque, ils modifient l'EA de différents pré-ARNm *in vitro* en partie en diminuant l'expression du facteur d'épissage SRSF3 et de son homologue TRA2B («Transformer-2 protein homologue-β»). | Anderson et al., 2012 |
| Dérivés de l'Indole : | Se lie directement et spécifiquement aux facteurs d'épissage SR et inhibe ainsi l'EA d'introns dépendants de séquences ESE. Cela comprend notamment des isoformes pro-métastatiques. | Ghigna et al., 2010 |
| NB-506 : *Dérivé indolocarbazole glycosylé* | Inhibe la phosphorylation des facteurs d'épissage SR par la topoisomérase-I et perturbe ainsi l'EA de gènes essentiels lors de la tumorigenèse. | Pilch et al., 2001 |
| TG003 : *dérivé du benzothiazole* | Perturbe l'EA en inhibant l'activité des facteurs d'épissage SR (CLK1 et CLK4). Pas d'étude dans un modèle tumoral. | Muraki et al., 2004 |
| Amiloride : *dérivé de la guanidine* | Utilisé pour ses propriétés diurétiques dans le traitement de l'hypertension (inhibe la réabsorption du sodium au niveau du tube distal du rein) et altère l'EA d'oncogènes par diminution de la phosphorylation de SRSF1. | Chang et al., 2011 |
| 1,4-naphtoquinones et *quinones 1,4-hétérocy-cliques* | Composés aux propriétés anti-néoplasiques inhibant la seconde étape de l'assemblage du splicéosome. | Berg et al., 2012 |

## 5. Conclusion et perspectives

Tous les ARN non-codants n'étant pas identifiés, il est probable que les fonctions et interactions entre ces ARN non-codants soient plus vastes que prévues. Ainsi, différentes interactions entre les ARN non-codants décrits ci-dessus ont été récemment mises en évidence et sont venues complexifier les réseaux jusqu'alors acceptés (voir annexe, Tableau 16). D'autre part, de nouvelles classes d'ARN non-codants régulant l'expression des gènes émergent (voir annexe, Tableau 17). La progression dans la compréhension de leurs fonctions et de leurs impacts sur le transcriptome et le protéome des cellules souches cancéreuses accroît la possibilité d'isoler des candidats biomarqueurs et d'identifier des cibles thérapeutiques pertinentes dans le glioblastome[156,196,268,394,403,429,444,496,551,601,602,607,618–639].

Le cerveau est l'un des organes dans lequel la complexité du transcriptome et du protéome est la plus importante[634,640,641]. Les ARN non-codants interagissent de manière coordonnée voire stochastique au sein d'un réseau complexe pour permettre le développement et le fonctionnement neuronal en condition physiologique. Les technologies nouvelles générations (séquençage à haut débit, RNA-seq, analyses CHIP et CLIP, "microarrays") ont permis de réaliser des progrès considérables dans la compréhension de la fonction et de la régulation des réseaux d'ARN non-codants (établissement de profils d'épissage à l'échelle du génome, signatures de microARN, de lncARN).

L'expression aberrante de ces ARN s'est révélée conférer aux cellules des propriétés favorisant le développement des glioblastomes. Plusieurs équipes ont démontré l'importance de ces réseaux d'ARN non-codants dans le maintien de la sous-population des cellules souches de glioblastome et de la tumorigénicité des glioblastomes. Des études sont en cours pour identifier des candidats biomarqueurs ou signatures d'ARN non-codants guidant le diagnostic, le pronostic et permettant de prédire la réponse au traitement. Par ailleurs plusieurs équipes cherchent à développer et à optimiser des stratégies thérapeutiques ciblant ces ARN non-codants dans le glioblastome. Pour l'instant, peu d'ARN non-codants sont validés en tant que biomarqueurs ou cible thérapeutique dans la prise en charge du glioblastome. Toutefois, des études prometteuses apportent constamment des informations sur la coordination et l'interaction des réseaux d'ARN non-codants (microARN, lncARN ou ARNsn) ou leur défaillance suite à des modifications génétiques ou épigénétiques dans les glioblastomes. La standardisation des techniques analytiques et la validation des différents candidats dans des essais cliniques adaptés permettrait d'utiliser ces ARN non-codants en routine clinique. Le défi thérapeutique majeur consiste en la réversion du phénotype tumoral par l'action d'ARN non-codants naturels ou synthétiques ou de substances modulant l'épissage.

## Bibliographie


1. Stupp, R. *et al.* Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N. Engl. J. Med.* **352,** 987–96 (2005).

2. Dunn, G. P. *et al.* Emerging insights into the molecular and cellular basis of glioblastoma. 756–784 (2012).

3. Masui, K., Cloughesy, T. F. & Mischel, P. S. Review: molecular pathology in adult high-grade gliomas: from molecular diagnostics to target therapies. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* **38,** 271–91 (2012).

4. Louis, D. N. *et al.* The 2007 WHO classification of tumours of the central nervous system. *Acta Neuropathol.* **114,** 97–109 (2007).

5. Figarella-Branger, D. *et al.* [Histological and molecular classification of gliomas]. *Rev. Neurol. (Paris).* **164,** 505–15 (2008).

6. Baldi, I., Huchet, A., Bauchet, L. & Loiseau, H. [Epidemiology of glioblastoma]. *Neurochirurgie.* **56,** 433–40 (2010).

7. Ohgaki, H. & Kleihues, P. Population-based studies on incidence, survival rates, and genetic alterations in astrocytic and oligodendroglial gliomas. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **64,** 479–89 (2005).

8. Zouaoui, S. *et al.* [French brain tumor database: general results on 40,000 cases, main current applications and future prospects]. *Neurochirurgie.* **58,** 4–13 (2012).

9. Chauffert, P. B. REFERENTIEL de l ' ANOCE F pour les GLIOMES de L ' ADULTE. 1–59 (2012).

10. Chatel, M., Frenay, M., Lebrun, C., Bourg, V. & Fauchon, F. Gliomes de haut grade : astrocytomes anaplasiques et glioblastomes. *EMC - Neurol.* **2,** 257–278 (2005).

11. Lebrun, C. *et al.* Turcot syndrome confirmed with molecular analysis. *Eur. J. Neurol.* **14,** 470–2 (2007).

12. Hanahan, D. & Weinberg, R. a. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144,** 646–74 (2011).

13. Ohgaki, H. & Kleihues, P. The definition of primary and secondary glioblastoma. *Clin. Cancer Res.* **19,** 764–72 (2013).

14. Wilson, T. a, Karajannis, M. a & Harter, D. H. Glioblastoma multiforme: State of the art and future therapeutics. *Surg. Neurol. Int.* **5,** 64 (2014).

15. Furnari, F. B. *et al.* Malignant astrocytic glioma : genetics , biology , and paths to treatment. 2683–2710 (2007).

16. Von Deimling, A. *et al.* Subsets of glioblastoma multiforme defined by molecular genetic analysis. *Brain Pathol.* **3,** 19–26 (1993).

17. Lang, F. F., Miller, D. C., Koslow, M. & Newcomb, E. W. Pathways leading to glioblastoma multiforme: a molecular analysis of genetic alterations in 65 astrocytic tumors. *J. Neurosurg.* **81,** 427–36 (1994).

18. Watanabe, K. *et al.* Overexpression of the EGF receptor and p53 mutations are mutually exclusive in the evolution of primary and secondary glioblastomas. *Brain Pathol.* **6,** 217–23; discussion 23–4 (1996).

19. Fujisawa, H. *et al.* Loss of heterozygosity on chromosome 10 is more extensive in primary (de novo) than in secondary glioblastomas. *Lab. Invest.* **80,** 65–72 (2000).

20. Ohgaki, H. *et al.* Genetic Pathways to Glioblastoma : A Population-Based Study Genetic Pathways to Glioblastoma : A Population-Based Study. 6892–6899 (2004).

21. Ohgaki, H. & Kleihues, P. Genetic pathways to primary and secondary glioblastoma. *Am. J. Pathol.* **170,** 1445–53 (2007).

22. Verhaak, R. G. W. *et al.* An integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR and NF1. **17,** 1–25 (2011).

23. Arjona, D., Rey, J. A. & Taylor, S. M. Early genetic changes involved in low-grade astrocytic tumor development. *Curr. Mol. Med.* **6,** 645–50 (2006).

24. Balss, J. *et al.* Analysis of the IDH1 codon 132 mutation in brain tumors. *Acta Neuropathol.* **116,** 597–602 (2008).

25. Hai Yan, M.D., Ph.D., D. Williams Parsons, M.D., Ph.D., Genglin Jin, Ph.D., Roger McLendon, M.D., B. Ahmed Rasheed, Ph.D., Weishi Yuan, Ph.D., Ivan Kos, Ph.D., Ines Batinic-Haberle, Ph.D., Siân Jones, Ph.D., Gregory J. Riggins, M.D., Ph.D., Henry Friedman, P. D. IDH1 and IDH2 Mutations in Gliomas. *N Engl J Med* **360,** 765–773 (2010).

26. Kleihues, P. & Ohgaki, H. Primary and secondary glioblastomas: from concept to clinical diagnosis. *Neuro. Oncol.* **1,** 44–51 (1999).

27. Nakamura, M. *et al.* Loss of heterozygosity on chromosome 19 in secondary glioblastomas. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **59,** 539–43 (2000).

28. Watanabe, T., Nobusawa, S., Kleihues, P. & Ohgaki, H. IDH1 mutations are early events in the development of astrocytomas and oligodendrogliomas. *Am. J. Pathol.* **174,** 1149–53 (2009).

29. Beroukhim, R. *et al.* Assessing the significance of chromosomal aberrations in cancer: methodology and application to glioma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104,** 20007–12 (2007).

30. Markus Bredel, M.D., Ph.D., Denise M. Scholtens, Ph.D., Ajay K. Yadav, Ph.D., Angel A. Alvarez, B.Sc., Jaclyn J. Renfrow, M.A., James P. Chandler, M.D., Irene L.Y. Yu, M.Sc., Maria S. Carro, Ph.D., Fangping Dai, M.D., Michael J. Tagge, B.Sc., Roberto Ferr, M. D. NFKBIA Deletion in Glioblastomas. **364,** 627–637 (2013).

31. Parsons, D. W. *et al.* An Integrated Genomic Analysis of Human Glioblastoma Multiforme. *Science (80-. ).* **321,** (2010).

32. The Cancer Genome Atlas (TCGA). Comprehensive genomic characterization defines human glioblastoma genes and core pathways. **455,** 1061–1068 (2009).

33. Dang, L. *et al.* Cancer-associated IDH1 mutations produce 2-hydroxyglutarate. *Nature* **462,** 1–18 (2010).

34. Figueroa, M. E. *et al.* Leukemic IDH1 and IDH2 mutations result in a hypermethylation phenotype, disrupt TET2 function, and impair hematopoietic differentiation. *Cancer Cell* **18,** 553–67 (2010).

35. Ward, P. S. *et al.* The common feature of leukemia-associated IDH1 and IDH2 mutations is a neomorphic enzymatic activity that converts α- ketoglutarate to 2-hydroxyglutarate. *Cancer Cell* **17,** 225–234 (2011).

36. Koivunen, P. *et al.* Transformation by the R Enantiomer of 2-Hydroxyglutarate Linked to EglN Activation. *Nature* **483,** 484–488 (2013).

37. Cloughesy, T. F., Cavenee, W. K. & Mischel, P. S. Glioblastoma: from molecular pathology to targeted treatment. *Annu. Rev. Pathol.* **9,** 1–25 (2014).

38. Zheng, H. *et al.* P53 and Pten control neural and glioma stem/progenitor cell renewal and differentiation Hongwu. *Nature* **455,** 1129–1133 (2008).

39. Schwartzentruber, J. *et al.* Driver mutations in histone H3.3 and chromatin remodelling genes in paediatric glioblastoma. *Nature* **482,** 226–31 (2012).

40. Conte, D. *et al.* Loss of Atrx sensitizes cells to DNA damaging agents through p53-mediated death pathways. *PLoS One* **7,** (2012).

41. Huang, P. H., Xu, A. M. & White, F. M. Oncogenic EGFR signaling networks in glioma. *Sci. Signal.* **2,** (2009).

42. Genovese, G. *et al.* microRNA regulatory network inference identifies miR-34a as a novel regulator of TGFβ signaling in GBM. *Cancer Discov.* **2,** 736–749 (2014).

43. Fenton, T. R. *et al.* Resistance to EGF receptor inhibitors in glioblastoma mediated by phosphorylation of the PTEN tumor suppressor at tyrosine 240. 1–6 (2012).

44. Kaneshiro, D., Kobayashi, T., Chao, S. T., Suh, J. & Prayson, R. A. Chromosome 1p and 19q deletions in glioblastoma multiforme. *Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.* **17,** 512–6 (2009).

45. Sanson, M., Thillet, J. & Hoang-Xuan, K. Molecular changes in gliomas. *Curr. Opin. Oncol.* **16,** 607–13 (2004).

46. Ducray, F. [Biology of gliomas]. *Cancer Radiother.* **12,** 663–8 (2008).

47. Sahdeo Prasad, Jayaraj Ravindran, and B. B. A. NF-κB and cancer: how intimate is this relationship. *Mol Cell Biochem.* **336,** 25–37 (2011).

48. Sturm, D. *et al.* Hotspot mutations in H3F3A and IDH1 define distinct epigenetic and biological subgroups of glioblastoma. *Cancer Cell* **22,** 425–37 (2012).

49. Singh, S. K., Clarke, I. D., Hide, T. & Dirks, P. B. Cancer stem cells in nervous system tumors. *Oncogene* **23,** 7267–73 (2004).

50. Al-Hajj, M., Wicha, M. S., Benito-Hernandez, A., Morrison, S. J. & Clarke, M. F. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100,** 3983–8 (2003).

51. E., B. D. D. J. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat. Med.* **3,** 730–737 (1997).

52. Galli, R. *et al.* Isolation and characterization of tumorigenic, stem-like neural precursors from human glioblastoma. *Cancer Res.* **64,** 7011–21 (2004).

53. Hemmati, H. D. *et al.* Cancerous stem cells can arise from pediatric brain tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100,** 15178–83 (2003).

54. Lapidot T, Sirard C, Vormoor J, Murdoch B, Hoang T, Caceres-Cortes J, et al. A. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature* **367,** 645–8 (1994).

55. O'Brien, C. a, Pollett, A., Gallinger, S. & Dick, J. E. A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. *Nature* **445,** 106–10 (2007).

56. Prince, M. E. *et al.* Identification of a subpopulation of cells with cancer stem cell properties in head and neck squamous cell carcinoma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104,** 973–8 (2007).

57. Ricci-Vitiani, L. *et al.* Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. *Nature* **445,** 111–5 (2007).

58. Singh, S. K. *et al.* Identification of a Cancer Stem Cell in Human Brain Tumors Identification of a Cancer Stem Cell in Human Brain Tumors. 5821–5828 (2003).

59. Sheila K. Singh, Cynthia Hawkins, Ian D. Clarke, Jeremy A. Squire, Jane Bayani, Takuichiro Hide, R. Mark Henkelman, M. D. C. & P. B. Di & 1The. Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature* **432,** (2004).

60. Dalerba, P. *et al.* Phenotypic characterization of human colorectal cancer stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104,** 10158–63 (2007).

61. Kelly, P. N., Dakic, A., Adams, J. M., Nutt, S. L. & Strasser, A. Tumor Growth Need Not Be Driven by Rare Cancer Stem Cells. *Science (80-. ).* **317,** 337 (2007).

62. Gasser, M., Zhan, Q., Jordan, S. & Duncan, L. M. Identification of cells initiating human melanomas. **451,** 345–349 (2008).

63. Jian Chen, Yanjiao Li, Tzong-Shiue Yu, Renée M. McKay1, Dennis K. Burns, S. & G. Kernie, and L. F. P. A restricted cell population propagates glioblastoma growth following chemotherapy. *Nature* **488,** 522–526 (2012).

64. Pardal, R., Clarke, M. F. & Morrison, S. J. Applying the principles of stem-cell biology to cancer. *Nat. Rev. Cancer* **3,** 895–902 (2003).

65. Beier, D. *et al.* CD133(+) and CD133(-) glioblastoma-derived cancer stem cells show differential growth characteristics and molecular profiles. *Cancer Res.* **67,** 4010–5 (2007).

66. Louis, D. N., Holland, E. C. & Cairncross, J. G. Glioma classification: a molecular reappraisal. *Am. J. Pathol.* **159,** 779–86 (2001).

67. Weathers, S.-P. & Gilbert, M. R. Advances in treating glioblastoma. *F1000Prime Rep.* **6,** 46 (2014).

68. David N. Louis, M. D. The next step in brain tumor classification: "Let us now praise famous men"…or molecules? **124,** 761–762 (2013).

69. Stummer, W., van den Bent, M. J. & Westphal, M. Cytoreductive surgery of glioblastoma as the key to successful adjuvant therapies: new arguments in an old discussion. *Acta Neurochir. (Wien).* **153,** 1211–8 (2011).

70. Stupp, R. *et al.* Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis of the EORTC-NCIC trial. *Lancet Oncol.* **10,** 459–66 (2009).

71. Lonjon, N. *et al.* [Second surgery for glioblastoma. A 4-year retrospective study conducted in both the Montpellier and Nice Departments of Neurosurgery. A literature review]. *Neurochirurgie.* **56,** 36–42 (2010).

72. Brem, H. *et al.* Placebo-controlled trial of safety and efficacy of intraoperative controlled delivery by biodegradable polymers of chemotherapy for recurrent gliomas. The Polymer-brain Tumor Treatment Group. *Lancet* **345,** 1008–12 (1995).

73. Noël, G. *et al.* Résultats de l'irradiation en conditions stéréotaxiques de rattrapage de 14 patients atteints d'un gliome de grade III ou IV. *Rev. Neurol. (Paris).* **160,** 539–545 (2004).

74. Fogh, S. E. *et al.* Hypofractionated stereotactic radiation therapy: an effective therapy for recurrent high-grade gliomas. *J. Clin. Oncol.* **28,** 3048–53 (2010).

75. Wen, P. Y. *et al.* Il est temps d ' inclure des patients atteints de tumeurs cérébrales dans les essais de phase I en cancérologie. 249–251 (2011).

76. AFSOS. L'AFSOS, Association Francophone pour les Soins Oncologiques de Support - Soins de support - Hématologie, Oncologie, Cancérologie – Afsos. at <http://www.afsos.org/>

77. Kesavabhotla, K. *et al.* Phase I/II study of oral erlotinib for treatment of relapsed/refractory glioblastoma multiforme and anaplastic astrocytoma. *J. Exp. Ther. Oncol.* **10,** 71–81 (2012).

78. Yung, W. K. A. *et al.* Safety and efficacy of erlotinib in first-relapse. **12,** 1061–1070 (2010).

79. Raizer, J. J. *et al.* N E U RO - O N CO LO GY with recurrent malignant gliomas and nonprogressive glioblastoma multiforme postradiation therapy. **12,** 95–103 (2010).

80. Franceschi, E. *et al.* Gefitinib in patients with progressive high-grade gliomas: a multicentre phase II study by Gruppo Italiano Cooperativo di Neuro-Oncologia (GICNO). *Br. J. Cancer* **96,** 1047–51 (2007).

81. Van den Bent, M. J. *et al.* Randomized phase II trial of erlotinib versus temozolomide or carmustine in recurrent glioblastoma: EORTC brain tumor group study 26034. *J. Clin. Oncol.* **27,** 1268–74 (2009).

82. Lassen, U., Sorensen, M., Gaziel, T. B., Hasselbalch, B. & Poulsen, H. S. Phase II study of bevacizumab and temsirolimus combination therapy for recurrent glioblastoma multiforme. *Anticancer Res.* **33,** 1657–60 (2013).

83. Cloughesy, T. F. *et al.* Antitumor activity of rapamycin in a Phase I trial for patients with recurrent PTEN-deficient glioblastoma. *PLoS Med.* **5,** (2008).

84. Lee, E. Q. *et al.* Phase I/II study of sorafenib in combination with temsirolimus for recurrent glioblastoma or gliosarcoma: North American Brain Tumor Consortium study 05-02. *Neuro. Oncol.* **14,** 1511–8 (2012).

85. Cheng, L. *et al.* Glioblastoma stem cells generate vascular pericytes to support vessel function and tumor growth. *Cell* **153,** 139–52 (2013).

86. Bao, S. *et al.* Glioma stem cells promote radioresistance by preferential activation of the DNA damage response. *Nature* **444,** 756–60 (2006).

87. Liu, G. *et al.* Analysis of gene expression and chemoresistance of CD133+ cancer stem cells in glioblastoma. *Mol. Cancer* **5,** 67 (2006).

88. Elshamy, W. M. & Duhé, R. J. Overview: cellular plasticity, cancer stem cells and metastasis. *Cancer Lett.* **341,** 2–8 (2013).

89. Li, S. C. *et al.* Cancer stem cells from a rare form of glioblastoma multiforme involving the neurogenic ventricular wall. *Cancer Cell Int.* **12,** 41 (2012).

90. Clarke, M. F. *et al.* Cancer stem cells--perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells. *Cancer Res.* **66,** 9339–44 (2006).

91. Deleyrolle, L. P. *et al.* Evidence for label-retaining tumour-initiating cells in human glioblastoma. *Brain* **134,** 1331–43 (2011).

92. Murat, A. *et al.* Stem cell-related “self-renewal” signature and high epidermal growth factor receptor expression associated with resistance to concomitant chemoradiotherapy in glioblastoma. *J. Clin. Oncol.* **26,** 3015–24 (2008).

93. Pallini, R. *et al.* Cancer stem cell analysis and clinical outcome in patients with glioblastoma multiforme. *Clin. Cancer Res.* **14,** 8205–12 (2008).

94. Zhang, M. *et al.* Nestin and CD133: valuable stem cell-specific markers for determining clinical outcome of glioma patients. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **27,** 85 (2008).

95. Zeppernick, F. *et al.* Stem cell marker CD133 affects clinical outcome in glioma patients. *Clin. Cancer Res.* **14,** 123–9 (2008).

96. Mangiola, A. *et al.* Stem cell marker nestin and c-Jun NH2-terminal kinases in tumor and peritumor areas of glioblastoma multiforme: possible prognostic implications. *Clin. Cancer Res.* **13,** 6970–7 (2007).

97. Plate, K. H. & Risau, W. Angiogenesis in malignant gliomas. *Glia* **15,** 339–47 (1995).

98. Bao, S. *et al.* Stem cell-like glioma cells promote tumor angiogenesis through vascular endothelial growth factor. *Cancer Res.* **66,** 7843–8 (2006).

99. Chris Folkins, Yuval Shaked, Shan Man, Terence Tang, Christina R. Lee, Z. & Zhu, Robert M. Hoffman5, and Robert S. Kerbel. Glioma Tumor Stem-Like Cells Promote Tumor Angiogenesis and Vasculogenesis via Vascular Endothelial Growth Factor and Stromal-Derived Factor 1. **69,** 7243–7251 (2012).

100. Heddleston, J. M., Li, Z., Hjelmeland, A. B. & Rich, J. N. The Hypoxic Microenvironment Maintains Glioblastoma Stem Cells and Promotes Reprogramming towards a Cancer Stem Cell Phenotype. **8,** 3274–3284 (2010).

101. McCord, A. M. *et al.* Physiologic oxygen concentration enhances the stem-like properties of CD133+ human glioblastoma cells in vitro. *Mol. Cancer Res.* **7,** 489–97 (2009).

102. Soeda, a *et al.* Hypoxia promotes expansion of the CD133-positive glioma stem cells through activation of HIF-1alpha. *Oncogene* **28,** 3949–59 (2009).

103. Gisselsson, D. *et al.* HIF-2α maintains an undifferentiated state in neural crest-like human neuroblastoma tumor-initiating cells. **106,** 16805–16810 (2009).

104. Pietras, A. *et al.* High levels of HIF-2 α highlight an immature neural crest-like neuroblastoma cell cohort located in a perivascular niche. 482–488 (2008).

105. Read, T. *et al.* Identification of CD15 as a Marker for Tumor-Propagating Cells in a Mouse Model of Medulloblastoma. *Cancer Cell* **15,** 135–147 (2010).

106. Son, M. J., Woolard, K., Nam, D.-H., Lee, J. & Fine, H. a. SSEA-1 is an enrichment marker for tumor-initiating cells in human glioblastoma. *Cell Stem Cell* **4,** 440–52 (2009).

107. Ward, R. J. *et al.* Multipotent CD15+ cancer stem cells in patched-1-deficient mouse medulloblastoma. *Cancer Res.* **69,** 4682–90 (2009).

108. Ogden, A. T. *et al.* Identification of A2B5+CD133- tumor-initiating cells in adult human gliomas. *Neurosurgery* **62,** 505–14 (2008).

109. Tchoghandjian, A. *et al.* A2B5 cells from human glioblastoma have cancer stem cell properties. *Brain Pathol.* **20,** 211–21 (2010).

110. Bao, S. *et al.* Targeting Cancer Stem Cells through L1CAM Suppresses Glioma Growth. **68,** 6043–6048 (2009).

111. Wang, J. *et al.* Notch Promotes Radioresistance of Glioma Stem Cells Jialiang. **28,** 17–28 (2011).

112. Chang, C.-J. *et al.* Enhanced radiosensitivity and radiation-induced apoptosis in glioma CD133-positive cells by knockdown of SirT1 expression. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **380,** 236–42 (2009).

113. Sauvageot, C. M.-E. *et al.* Efficacy of the HSP90 inhibitor 17-AAG in human glioma cell lines and tumorigenic glioma stem cells. *Neuro. Oncol.* **11,** 109–21 (2009).

114. Russo, A. L. *et al.* In vitro and in vivo radiosensitization of glioblastoma cells by the poly (ADP-ribose) polymerase inhibitor E7016. *Clin. Cancer Res.* **15,** 607–12 (2009).

115. Hirschmann-Jax, C. *et al.* A distinct "side population" of cells with high drug efflux capacity in human tumor cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101,** 14228–33 (2004).

116. Choe, G. *et al.* Analysis of the Phosphatidylinositol 3 ' -Kinase Signaling Pathway in Glioblastoma Patients in Vivo Advances in Brief Patients in Vivo 1. 2742–2746 (2003).

117. Moscatello, D. K., Holgado-Madruga, M., Emlet, D. R., Montgomery, R. B. & Wong, a. J. Constitutive Activation of Phosphatidylinositol 3-Kinase by a Naturally Occurring Mutant Epidermal Growth Factor Receptor. *J. Biol. Chem.* **273,** 200–206 (1998).

118. Griffero, F. *et al.* Different response of human glioma tumor-initiating cells to epidermal growth factor receptor kinase inhibitors. *J. Biol. Chem.* **284,** 7138–48 (2009).

119. Soeda, A. *et al.* Epidermal growth factor plays a crucial role in mitogenic regulation of human brain tumor stem cells. *J. Biol. Chem.* **283,** 10958–66 (2008).

120. Lathia, J. D., Mattson, M. P. & Cheng, A. Notch: from neural development to neurological disorders. *J. Neurochem.* **107,** 1471–81 (2008).

121. Kanamori, M. *et al.* Contribution of Notch signaling activation to human glioblastoma multiforme. *J. Neurosurg.* **106,** 417–27 (2007).

122. Purow, B. W. *et al.* Expression of Notch-1 and Its Ligands , Delta-Like-1 and Jagged-1 , Is Critical for Glioma Cell Survival and Proliferation Is Critical for Glioma Cell Survival and Proliferation. 2353–2363 (2005).

123. Xing Fana, Leila Khakic, Thant S. Zhua, Mary E. Soulesa, Caroline E. Talsmaa, Naheed Gulc, Cheryl Kohc, Jiangyang Zhangd, Yue-Ming Lih, Jarek Maciaczyki, G. N. & Francesco DiMecog, j, Sara Piccirillok, Angelo L. Vescovik, and C. G. E. NOTCH Pathway Blockade Depletes CD133-Positive Glioblastoma Cells and Inhibits Growth of Tumor Neurospheres and Xenografts. *Stem Cells* **28,** 5–16 (2010).

124. Wick, W., Naumann, U. & Weller, M. Transforming growth factor-beta: a molecular target for the future therapy of glioblastoma. *Curr. Pharm. Des.* **12,** 341–9 (2006).

125. Piccirillo, S. G. M. *et al.* Bone morphogenetic proteins inhibit the tumorigenic potential of human brain tumour-initiating cells. *Nature* **444,** 761–5 (2006).

126. Virginie Clement, Pilar Sanchez, Nicolas de Tribolet, Ivan Radovanovic, and A. R. i A. HEDGEHOG-GLI1 signaling regulates human glioma growth, cancer stem cell self-renewal and tumorigenicity. *Curr. Biol.* **17,** 165–172 (2007).

127. Shahi, M. H., Lorente, A. & Castresana, J. S. Hedgehog signalling in medulloblastoma, glioblastoma and neuroblastoma. *Oncol. Rep.* **19,** 681–8 (2008).

128. Xu, Q., Yuan, X., Liu, G., Black, K. L. & Yu, J. S. Hedgehog signaling regulates brain tumor-initiating cell proliferation and portends shorter survival for patients with PTEN-coexpressing glioblastomas. *Stem Cells* **26,** 3018–26 (2008).

129. Rudin, C. M. *et al.* Treatment of medulloblastoma with hedgehog pathway inhibitor GDC-0449. *N. Engl. J. Med.* **361,** 1173–8 (2009).

130. Eli E. Bara, Aneeka Chaudhrya, Alex Lina, Xing Fana, Karisa Schreckb, William Matsuic, Sara Piccirillod, Angelo L. Vescovid, Francesco Dimecoe, Alessandro Olivib, c, and Charles G. Eberharta, cEli E. Bara, Aneeka Chaudhrya, Alex Lina, Xing Fana, Karisa Sc, C. Cyclopamine-Mediated Hedgehog Pathway Inhibition Depletes Stem-Like Cancer Cells in Glioblastoma. *Stem Cells* **25,** 2524–2533 (2008).

131. Grigoryan, T., Wend, P., Klaus, A. & Birchmeier, W. Deciphering the function of canonical Wnt signals in development and disease : conditional loss- and gain-of-function mutations of NL -catenin in mice. **1,** 2308–2341 (2008).

132. Roeben N. Munji, Youngshik Choe, Guangnan Li, Julie A. Siegenthaler, and S. J. P. Wnt signaling regulates neuronal differentiation of cortical intermediate progenitors Roeben. *J Neurosci.* **31,** 1676–1687 (2011).

133. Núria de la Iglesia, Sidharth V. Puram, and A. B. STAT3 Regulation of Glioblastoma Pathogenesis. *Curr. Mol. Med.* **9,** 580–590 (2009).

134. Wei, J. *et al.* Glioblastoma cancer-initiating cells inhibit T cell proliferation and effector responses by the STAT3 pathway. *Mol. Cancer Ther.* **9,** 67–78 (2010).

135. Ashizawa, T. *et al.* Effect of the STAT3 inhibitor STX-0119 on the proliferation of a temozolomide-resistant glioblastoma cell line. *Int. J. Oncol.* **45,** 411–8 (2014).

136. MAUREEN M. SHERRY,ANDREW REEVES, JULIAN K. WU, B. H. C. STAT3 Is Required for Proliferation and Maintenance of Multipotency in Glioblastoma Stem Cells. *Stem Cells* **27,** 928–41 (2009).

137. Korur, S. *et al.* GSK3beta regulates differentiation and growth arrest in glioblastoma. *PLoS One* **4,** (2009).

138. Kim, W.-Y. *et al.* GSK-3 is a master regulator of neural progenitor homeostasis. *Nat. Neurosci.* **12,** 1390–7 (2009).

139. Fotovati, A. *et al.* YB-1 bridges neural stem cells and brain tumor-initiating cells via its roles in differentiation and cell growth. *Cancer Res.* **71,** 5569–78 (2011).

140. Zhuang, W. *et al.* Induction of autophagy promotes differentiation of glioma-initiating cells and their radiosensitivity. *Int. J. Cancer* **129,** 2720–31 (2011).

141. Yoshida, Y., Takahashi, K., Okita, K., Ichisaka, T. & Yamanaka, S. Hypoxia enhances the generation of induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* **5,** 237–41 (2009).

142. Wang, J. *et al.* c-Myc is required for maintenance of glioma cancer stem cells. *PLoS One* **3,** (2008).

143. Abdouh, M. *et al.* BMI1 sustains human glioblastoma multiforme stem cell renewal. *J. Neurosci.* **29,** 8884–96 (2009).

144. Conti, A. *et al.* miR-21 and 221 upregulation and miR-181b downregulation in human grade II–IV astrocytic tumors. *J. Neurooncol.* **93,** 325–332 (2009).

145. Gal, H. *et al.* MIR-451 and Imatinib mesylate inhibit tumor growth of Glioblastoma stem cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **376,** 86–90 (2008).

146. Silber, J. *et al.* miR-124 and miR-137 inhibit proliferation of glioblastoma multiforme cells and induce differentiation of brain tumor stem cells. *BMC Med.* **17,** 1–17 (2008).

147. Bertone, P. *et al.* Global identification of human transcribed sequences with genome tiling arrays. *Science* **306,** 2242–6 (2004).

148. The ENCODE Project Consortium Abstract. Identification and analysis of functional elements in 1% of the human genome by the ENCODE pilot project. *Nature* **447,** 799–816 (2007).

149. Kapranov, P. *et al.* RNA maps reveal new RNA classes and a possible function for pervasive transcription. *Science* **316,** 1484–8 (2007).

150. Ramsköld, D., Wang, E. T., Burge, C. B. & Sandberg, R. An abundance of ubiquitously expressed genes revealed by tissue transcriptome sequence data. *PLoS Comput. Biol.* **5,** (2009).

151. Wilusz, J. E., Sunwoo, H. & Spector, D. L. Long noncoding RNAs : functional surprises from the RNA world. 1494–1504 (2009).

152. Tim R. Mercer, M. E. D. and J. S. M. Long non-coding RNAs: insights into functions. *Nat. Rev. Genet.* **10,** 155–159 (2009).

153. Shalgi, R., Brosh, R., Oren, M., Pilpel, Y. & Rotter, V. Coupling transcriptional and post-transcriptional miRNA regulation in the control of cell fate. *Aging (Albany. NY).* **1,** 762–70 (2009).

154. Erson, A. E. & Petty, E. M. miRNAs and cancer: New research developments and potential clinical applications. *Cancer Biol. Ther.* **8,** 2317–22 (2009).

155. Esteller, M. Non-coding RNAs in human disease. *Nat. Rev. Genet.* **12,** 861–74 (2011).

156. Memczak, S. *et al.* Circular RNAs are a large class of animal RNAs with regulatory potency. *Nature* **495,** 333–8 (2013).

157. Han, L. *et al.* LncRNA profile of glioblastoma reveals the potential role of lncRNAs in contributing to glioblastoma pathogenesis. *Int. J. Oncol.* **40,** 2004–12 (2012).

158. Ling, H., Fabbri, M. & Calin, G. a. MicroRNAs and other non-coding RNAs as targets for anticancer drug development. *Nat. Rev. Drug Discov.* **12,** 847–65 (2013).

159. Hermansen, S. K. & Kristensen, B. W. MicroRNA biomarkers in glioblastoma. *J. Neurooncol.* **114,** 13–23 (2013).

160. Da Sacco, L. & Masotti, A. Recent Insights and Novel Bioinformatics Tools to Understand the Role of MicroRNAs Binding to 5' Untranslated Region. *Int. J. Mol. Sci.* **14,** 480–95 (2012).

161. Friedman, R. C., Farh, K. K., Burge, C. B. & Bartel, D. P. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. 92–105 (2009).

162. Kim, V. N., Han, J. & Siomi, M. C. Biogenesis of small RNAs in animals. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **10,** 126–39 (2009).

163. Lim, L. P., Glasner, M. E., Yekta, S., Burge, C. B. & Bartel, D. P. Vertebrate microRNA genes. *Science* **299,** 1540 (2003).

164. Lagos-Quintana, M., Rauhut, R., Lendeckel, W. & Tuschl, T. Identification of novel genes coding for small expressed RNAs. *Science* **294,** 853–8 (2001).

165. Bartel, D. P., Lee, R. & Feinbaum, R. MicroRNAs : Genomics , Biogenesis , Mechanism , and Function Genomics : The miRNA Genes. **116,** 281–297 (2004).

166. Kim, V. N. MicroRNA biogenesis: coordinated cropping and dicing. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **6,** 376–85 (2005).

167. Deng, G. & Sui, G. Noncoding RNA in oncogenesis: a new era of identifying key players. *Int. J. Mol. Sci.* **14,** 18319–49 (2013).

168. Lee, Y. *et al.* The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* **425,** 415–9 (2003).

169. Yi, R., Qin, Y., Macara, I. G. & Cullen, B. R. Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs. 3011–3016 (2003).

170. Guo, L. & Lu, Z. The fate of miRNA* strand through evolutionary analysis: implication for degradation as merely carrier strand or potential regulatory molecule? *PLoS One* **5,** (2010).

171. Kiriakidou, M., Nelson, P., Lamprinaki, S., Sharma, A. & Mourelatos, Z. Detection of microRNAs and assays to monitor microRNA activities in vivo and in vitro. *Methods Mol. Biol.* **309,** 295–310 (2005).

172. Lewis, B. P., Burge, C. B. & Bartel, D. P. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* **120,** 15–20 (2005).

173. Chen, X., Liang, H., Zhang, J., Zen, K. & Zhang, C.-Y. Horizontal transfer of microRNAs: molecular mechanisms and clinical applications. *Protein Cell* **3,** 28–37 (2012).

174. Stoorvogel, W. Functional transfer of microRNA by exosomes. *Blood* **119,** 646–8 (2012).

175. Carlo M. Croce, M. D. Causes and consequences of microRNA dysregulation in cancer. *Nat. Rev. Genet.* **10,** 704–714 (2009).

176. Calin, G. A. *et al.* Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99,** 15524–9 (2002).

177. Calin, G. A. *et al.* Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101,** 2999–3004 (2004).

178. Wang, D. *et al.* Human microRNA oncogenes and tumor suppressors show significantly different biological patterns: from functions to targets. *PLoS One* **5,** (2010).

179. Cimmino, A. *et al.* miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102,** 13944–9 (2005).

180. Calin, G. A. *et al.* A MicroRNA signature associated with prognosis and progression in chronic lymphocytic leukemia. *N. Engl. J. Med.* **353,** 1793–801 (2005).

181. Johnson, S. M. *et al.* RAS is regulated by the let-7 microRNA family. *Cell* **120,** 635–47 (2005).

182. Lee, Y. S. & Dutta, A. The tumor suppressor microRNA let-7 represses the HMGA2 oncogene. *Genes Dev.* **21,** 1025–1030 (2007).

183. Justin L. Mott, Shogo Kobayashi, Steven F. Bronk, and G. J. G. mir-29 Regulates Mcl-1 Protein Expression and Apoptosis. *Oncogene* **26,** 6133–6140 (2008).

184. Pekarsky, Y. *et al.* Tcl1 expression in chronic lymphocytic leukemia is regulated by miR-29 and miR-181. *Cancer Res.* **66,** 11590–3 (2006).

185. Chang, T. *et al.* Transactivation of miR-34a by p53 broadly influences gene expression and promotes apoptosis. *Mol Cell.* **26,** 745–752 (2008).

186. Raver-Shapira, N. *et al.* Transcriptional activation of miR-34a contributes to p53-mediated apoptosis. *Mol. Cell* **26,** 731–43 (2007).

187. Iorio, M. V *et al.* MicroRNA gene expression deregulation in human breast cancer. *Cancer Res.* **65,** 7065–70 (2005).

188. Fornari, F. *et al.* MiR-221 controls CDKN1C/p57 and CDKN1B/p27 expression in human hepatocellular carcinoma. *Oncogene* **27,** 5651–61 (2008).

189. Felli, N. *et al.* MicroRNAs 221 and 222 inhibit normal erythropoiesis and erythroleukemic cell growth via kit receptor down-modulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102,** 18081–6 (2005).

190. Garofalo, M. *et al.* MiR-221&222 regulate TRAIL-resistance and enhance tumorigenicity through PTEN and TIMP3 down-regulation. **16,** 498–509 (2010).

191. Quintavalle, C. *et al.* miR-221/222 overexpression in human glioblastoma increases invasiveness by targeting the protein phosphate PTPμ. *Oncogene* **31,** 858–68 (2012).

192. Mendell, J. T. miRiad roles for the miR-17-92 cluster in development and disease. *Cell* **133,** 217–222 (2009).

193. Chan, J. A., Krichevsky, A. M. & Kosik, K. S. MicroRNA-21 Is an Antiapoptotic Factor in Human Glioblastoma Cells. *Cancer Res.* **65,** 6029–6033 (2005).

194. Frankel, L. B. *et al.* Programmed cell death 4 (PDCD4) is an important functional target of the microRNA miR-21 in breast cancer cells. *J. Biol. Chem.* **283,** 1026–33 (2008).

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

196. Christine Mayr, D. P. B. Widespread shortening of 3'UTRs by alternative cleavage and polyadenylation activates oncogenes in cancer cells Christine. *Cell* **138,** 1–23 (2009).

197. Aaron J. Schetter and Curtis C. Harris, M. . Alterations of microRNAs contribute to colon carcinogenesis Aaron. *Semin. Oncol.* **38,** 734–742 (2012).

198. Muller Fabbri and Carlo Maria Croce. Role of microRNAs in Lymphoid Biology and Disease. *Curr. Opin. Hematol.* **18,** 266–272 (2011).

199. Murakami, Y. *et al.* Comprehensive analysis of microRNA expression patterns in hepatocellular carcinoma and non-tumorous tissues. *Oncogene* **25,** 2537–45 (2006).

200. Yanaihara, N. *et al.* Unique microRNA molecular profiles in lung cancer diagnosis and prognosis. *Cancer Cell* **9,** 189–98 (2006).

201. Guan, P., Yin, Z., Li, X., Wu, W. & Zhou, B. Meta-analysis of human lung cancer microRNA expression profiling studies comparing cancer tissues with normal tissues. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **31,** 54 (2012).

202. Le Quesne, J. & Caldas, C. Micro-RNAs and breast cancer. *Mol. Oncol.* **4,** 230–41 (2010).

203. Lee, E. J. *et al.* Expression profiling identifies microRNA signature in pancreatic cancer. *Int. J. Cancer* **120,** 1046–1054 (2007).

204. Munoz, J. L. *et al.* Delivery of Functional Anti-miR-9 by Mesenchymal Stem Cell-derived Exosomes to Glioblastoma Multiforme Cells Conferred Chemosensitivity. *Mol. Ther. Nucleic Acids* **2,** (2013).

205. Al-nedawi, K., Meehan, B. & Rak, J. Microvesicles, Messengers and mediators of tumor progression. *Cell Cycle* **8,** 2014–2018 (2014).

206. Valiunas, V. *et al.* Connexin-specific cell-to-cell transfer of short interfering RNA by gap junctions. *J. Physiol.* **568,** 459–68 (2005).

207. Fabbri, M. *et al.* MicroRNAs bind to Toll-like receptors to induce prometastatic in fl ammatory response. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **109,** 2110–2116 (2012).

208. Ciafrè, S. a *et al.* Extensive modulation of a set of microRNAs in primary glioblastoma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **334,** 1351–8 (2005).

209. Godlewski, J. *et al.* Targeting of the Bmi-1 oncogene/stem cell renewal factor by microRNA-128 inhibits glioma proliferation and self-renewal. *Cancer Res.* **68,** 9125–30 (2008).

210. Lukiw, W. J., Cui, J. G., Li, Y. Y. & Culicchia, F. Up-regulation of micro-RNA-221 (miRNA-221; chr Xp11.3) and caspase-3 accompanies down-regulation of the survivin-1 homolog BIRC1 (NAIP) in glioblastoma multiforme (GBM). *J. Neurooncol.* **91,** 27–32 (2009).

211. Sasayama, T., Nishihara, M., Kondoh, T., Hosoda, K. & Kohmura, E. MicroRNA-10b is overexpressed in malignant glioma and associated with tumor invasive factors, uPAR and RhoC. *Int. J. Cancer* **125,** 1407–13 (2009).

212. Lavon, I. *et al.* Gliomas display a microRNA expression profile reminiscent of neural precursor cells. *Neuro. Oncol.* **12,** 422–33 (2010).

213. Lages, E. *et al.* MicroRNA and target protein patterns reveal physiopathological features of glioma subtypes. *PLoS One* **6,** (2011).

214. Lang, M.-F. *et al.* Genome-wide profiling identified a set of miRNAs that are differentially expressed in glioblastoma stem cells and normal neural stem cells. *PLoS One* **7,** (2012).

215. Teplyuk, N. M. *et al.* MicroRNAs in cerebrospinal fluid identify glioblastoma and metastatic brain cancers and reflect disease activity. *Neuro. Oncol.* **14,** 689–700 (2012).

216. Wang, Q. *et al.* Plasma specific miRNAs as predictive biomarkers for diagnosis and prognosis of glioma. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **31,** 97 (2012).

217. Volinia, S. *et al.* A microRNA expression signature of human solid tumors defines cancer gene targets. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **103,** 2257–61 (2006).

218. Novakova, J., Slaby, O., Vyzula, R. & Michalek, J. MicroRNA involvement in glioblastoma pathogenesis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **386,** 1–5 (2009).

219. Rosenfeld, N. *et al.* MicroRNAs accurately identify cancer tissue origin. *Nat. Biotechnol.* **26,** 462–9 (2008).

220. Lu, J. *et al.* MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* **435,** 834–8 (2005).

221. Papagiannakopoulos, T., Shapiro, A. & Kosik, K. S. MicroRNA-21 targets a network of key tumor-suppressive pathways in glioblastoma cells. *Cancer Res.* **68,** 8164–72 (2008).

222. Gabriely, G. *et al.* MicroRNA 21 promotes glioma invasion by targeting matrix metalloproteinase regulators. *Mol. Cell. Biol.* **28,** 5369–80 (2008).

223. Vachon, P. H. Survie cellulaire : différences et différenciation. *Médecine/Sciences* **22,** 423–429 (2006).

224. Zeng, J. *et al.* MiR-21 is overexpressed in response to high glucose and protects endothelial cells from apoptosis. *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* **121,** 425–30 (2013).

225. Han, L. *et al.* MicroRNA-21 expression is regulated by β-catenin/STAT3 pathway and promotes glioma cell invasion by direct targeting RECK. *CNS Neurosci. Ther.* **18,** 573–83 (2012).

226. Pfeifer, G., La, J., Rosolowski, M., Tomm, J. M. & Bergen, M. Von. MicroRNA-21 targets tumor suppressor genes ANP32A and SMARCA4. 2975–2985 (2011). doi:10.1038/onc.2011.15

227. Frank, M. J. *et al.* Expression of sprouty2 inhibits B-cell proliferation and is epigenetically silenced in mouse and human B-cell lymphomas. *Blood* **113,** 2478–2487 (2009).

228. Zhou, X. *et al.* Downregulation of miR-21 inhibits EGFR pathway and suppresses the growth of human glioblastoma cells independent of PTEN status. *Lab. Invest.* **90,** 144–55 (2010).

229. Gaur, A. B., Holbeck, S. L., Colburn, N. H. & Israel, M. a. Downregulation of Pdcd4 by mir-21 facilitates glioblastoma proliferation in vivo. *Neuro. Oncol.* **13,** 580–90 (2011).

230. Chen, Y. *et al.* MicroRNA-21 down-regulates the expression of tumor suppressor PDCD4 in human glioblastoma cell T98G. *Cancer Lett.* **272,** 197–205 (2008).

231. Barth, P., Schmidt, A. & Samans, B. Programmed cell death protein 4 suppresses CDK1/cdc2 via induction of p21. *Am. J. Physiol. Transl. Physiol.* **287,** 1541–1546 (2004).

232. Li, Y. *et al.* MicroRNA-21 targets LRRFIP1 and contributes to VM-26 resistance in glioblastoma multiforme. *Brain Res.* **1286,** 13–8 (2009).

233. Rao, S. a M., Santosh, V. & Somasundaram, K. Genome-wide expression profiling identifies deregulated miRNAs in malignant astrocytoma. *Mod. Pathol.* **23,** 1404–17 (2010).

234. Gabriely, G. *et al.* Human Glioma Growth is Controlled by MicroRNA-10b. *Cancer Res.* **71,** 3563–3572 (2012).

235. Gabriely, G., Teplyuk, N. M. & Krichevsky, A. M. microRNA-10b in cancer cell proliferation, spread and death. *Autophagy* **7,** 1384–1386 (2011).

236. Dong, C. G. *et al.* Co-inhibition of microRNA-10b and microRNA-21 exerts synergistic inhibition on the proliferation and invasion of human glioma cells. *Int. J. Oncol.* **41,** 1005–12 (2012).

237. Ling, N. *et al.* microRNA-155 regulates cell proliferation and invasion by targeting FOXO3a in glioma. *Oncol. Rep.* **30,** 2111–8 (2013).

238. D'Urso, P. I. *et al.* miR-155 is up-regulated in primary and secondary glioblastoma and promotes tumour growth by inhibiting GABA receptors. *Int. J. Oncol.* **41,** 228–34 (2012).

239. Zhou, J. *et al.* MicroRNA-155 promotes glioma cell proliferation via the regulation of MXI1. *PLoS One* **8,** (2013).

240. Labrakakis, C., Patt, S., Hartmann, J. & Kettenmann, H. Functional GABA(A) receptors on human glioma cells. *Eur. J. Neurosci.* **10,** 231–8 (1998).

241. Conti, J. & Thomas, G. The role of tumour stroma in colorectal cancer invasion and metastasis. *Cancers (Basel).* **3,** 2160–8 (2011).

242. Lu, X. *et al.* Analysis of miR-221 and p27 expression in human gliomas. *Mol. Med. Rep.* **2,** 651–6 (2009).

243. Zhang, C. *et al.* High level of miR-221/222 confers increased cell invasion and poor prognosis in glioma. *J. Transl. Med.* **10,** 119 (2012).

244. Hao, J. *et al.* miR-221/222 is the regulator of Cx43 expression in human glioblastoma cells. *Oncol. Rep.* **27,** 1504–10 (2012).

245. Li, W., Guo, F., Wang, P., Hong, S. & Zhang, C. miR-221/222 confers radioresistance in glioblastoma cells through activating Akt independent of PTEN status. *Curr. Mol. Med.* **14,** 185–95 (2014).

246. Ernst, A. *et al.* De-repression of CTGF via the miR-17-92 cluster upon differentiation of human glioblastoma spheroid cultures. *Oncogene* **29,** 3411–22 (2010).

247. Malzkorn, B. *et al.* Identification and functional characterization of microRNAs involved in the malignant progression of gliomas. *Brain Pathol.* **20,** 539–50 (2010).

248. Liu, Y. Y., Furth, E., Enders, G. H., El-deiry, W. & Janell, M. Myc - miR-17~92 axis blunts TGFβ signaling and production of multiple TGFβ-dependent anti-angiogenic factors. *Cancer Res.* **70,** 8233–8246 (2011).

249. Sempere, L. F. *et al.* Expression profiling of mammalian microRNAs uncovers a subset of brain-expressed microRNAs with possible roles in murine and human neuronal differentiation. *Genome Biol.* **5,** R13 (2004).

250. Zhang, Y. *et al.* MicroRNA-128 inhibits glioma cells proliferation by targeting transcription factor E2F3a. *J. Mol. Med. (Berl).* **87,** 43–51 (2009).

251. She, X. *et al.* miR-128 and miR-149 enhance the chemosensitivity of temozolomide by Rap1B-mediated cytoskeletal remodeling in glioblastoma. *Oncol. Rep.* (2014).

252. Papagiannakopoulos, T. *et al.* Pro-neural miR-128 is a glioma tumor suppressor that targets mitogenic kinases. *Oncogene* **31,** 1884–95 (2012).

253. Hermeking, H. The miR-34 family in cancer and apoptosis. *Cell Death Differ.* **17,** 193–9 (2010).

254. Yamamura, S. *et al.* MicroRNA-34a suppresses malignant transformation by targeting c-Myc transcriptional complexes in human renal cell carcinoma. *Carcinogenesis* **33,** 294–300 (2012).

255. Silber, J. *et al.* miR-34a repression in proneural malignant gliomas upregulates expression of its target PDGFRA and promotes tumorigenesis. *PLoS One* **7,** (2012).

256. Li, Y. *et al.* microRNA-34a inhibits glioblastoma growth by targeting multiple oncogenes. **69,** 7569–7576 (2010).

257. Guessous, F. *et al.* microRNA-34a is tumor suppressive in brain tumors and glioma stem cells. *Cell Cycle* **9,** 1031–1036 (2012).

258. Luan, S., Sun, L. & Huang, F. MicroRNA-34a: a novel tumor suppressor in p53-mutant glioma cell line U251. *Arch. Med. Res.* **41,** 67–74 (2010).

259. Brower, J., Clark, P. a, Lyon, W. & Kuo, J. S. MicroRNAs in cancer: Glioblastoma and glioblastoma cancer stem cells. *Neurochem. Int.* (2014).

260. Rathod, S. S., Rani, S. B., Khan, M., Muzumdar, D. & Shiras, A. Tumor suppressive miRNA-34a suppresses cell proliferation and tumor growth of glioma stem cells by targeting Akt and Wnt signaling pathways. *FEBS Open Bio* **4,** 485–95 (2014).

261. Wuchty, S. *et al.* Prediction of Associations between microRNAs and Gene Expression in Glioma Biology. *PLoS One* **6,** (2011).

262. Kefas, B. *et al.* microRNA-7 inhibits the epidermal growth factor receptor and the Akt pathway and is down-regulated in glioblastoma. *Cancer Res.* **68,** 3566–72 (2008).

263. Sirigiri Divijendra Natha Reddy, Kazufumi Ohshiro, Suresh K. Rayala, and R. & Kumar. MicroRNA-7, a Homeobox D10 Target, Inhibits the p21- Activated Kinase 1 and Regulates its Functions. *Cancer Res.* **68,** 8195–8200 (2013).

264. De-gang, W. U. *et al.* MicroRNA-7 regulates glioblastoma cell invasion via targeting focal adhesion kinase expression. *Chin. Med. J. (Engl).* **124,** 2616–2621 (2011).

265. Kong, X. *et al.* MicroRNA-7 inhibits epithelial-to-mesenchymal transition and metastasis of breast cancer cells via targeting FAK expression. *PLoS One* **7,** e41523 (2012).

266. Aoki, H. *et al.* Phosphorylated Pak1 level in the cytoplasm correlates with shorter survival time in patients with glioblastoma. *Clin. Cancer Res.* **13,** 6603–9 (2007).

267. Visvanathan, J., Lee, S., Lee, B., Lee, J. W. & Lee, S. The microRNA miR-124 antagonizes the anti-neural REST / SCP1 pathway during embryonic CNS development. *Genes Dev.* **21,** 744–749 (2007).

268. Eugene V. Makeyev, Jiangwen Zhang, Monica A. Carrasco, and T. M. The MicroRNA miR-124 Promotes Neuronal Differentiation by Triggering Brain-Specific Alternative Pre-mRNA Splicing. *Mol. Cell* **27,** 435–448 (2011).

269. Vo, D. T. *et al.* The oncogenic RNA-binding protein Musashi1 is regulated by tumor suppressor miRNAs. *RNA Biol.* **8,** 817–28 (2011).

270. Chen, L. *et al.* miR-137 is frequently down-regulated in glioblastoma and is a negative regulator of Cox-2. *Eur. J. Cancer* **48,** 3104–11 (2012).

271. Shi, L. *et al.* Hsa-Mir-181a and Hsa-Mir-181B Function As Tumor Suppressors in Human Glioma Cells. *Brain Res.* **1236,** 185–93 (2008).

272. She, X. *et al.* miR-181 subunits enhance the chemosensitivity of temozolomide by Rap1B-mediated cytoskeleton remodeling in glioblastoma cells. *Med. Oncol.* **31,** 892 (2014).

273. Shi, Z. *et al.* MiRNA-181b suppresses IGF-1R and functions as a tumor suppressor gene in gliomas. *RNA* **19,** 552–560 (2013).

274. Wang, J., Sai, K., Chen, F. & Chen, Z. miR-181b modulates glioma cell sensitivity to temozolomide by targeting MEK1. *Cancer Chemother. Pharmacol.* **72,** 147–58 (2013).

275. Alrfaei, B. M., Vemuganti, R. & Kuo, J. S. microRNA-100 targets SMRT/NCOR2, reduces proliferation, and improves survival in glioblastoma animal models. *PLoS One* **8,** (2013).

276. Henriksen, M., Johnsen, K. B., Andersen, H. H., Pilgaard, L. & Duroux, M. MicroRNA Expression Signatures Determine Prognosis and Survival in Glioblastoma Multiforme-a Systematic Overview. *Mol. Neurobiol.* (2014).

277. Møller, H. G. *et al.* A systematic review of microRNA in glioblastoma multiforme: micro-modulators in the mesenchymal mode of migration and invasion. *Mol. Neurobiol.* **47,** 131–44 (2013).

278. Speranza, M. C. *et al.* NEDD9 , a novel target of miR-145 , increases the invasiveness of glioblastoma. *Impact journals* **3,** 723–734 (2012).

279. Wan, X. *et al.* ROCK1, a novel target of miR-145, promotes glioma cell invasion. *Mol. Med. Rep.* **9,** 1877–82 (2014).

280. Rani, S. B. *et al.* MiR-145 functions as a tumor-suppressive RNA by targeting Sox9 and adducin 3 in human glioma cells. *Neuro. Oncol.* **15,** 1302–16 (2013).

281. Lai, N. *et al.* Original article Differential expression of microRNA-210 in gliomas of variable cell origin and correlation between increased expression levels and disease progression in astrocytic tumours. *Folia Neuropathol.* **1,** 79–85 (2014).

282. Lai, N.-S., Dong, Q.-S., Ding, H., Miao, Z.-L. & Lin, Y.-C. MicroRNA-210 overexpression predicts poorer prognosis in glioma patients. *J. Clin. Neurosci.* **21,** 755–60 (2014).

283. Wang, J. *et al.* Elevated expression of miR-210 predicts poor survival of cancer patients: a systematic review and meta-analysis. *PLoS One* **9,** (2014).

284. Li, R.-Y. *et al.* MiR-139 inhibits Mcl-1 expression and potentiates TMZ-induced apoptosis in glioma. *CNS Neurosci. Ther.* **19,** 477–83 (2013).

285. Pan, S.-J. *et al.* MicroRNA-149 inhibits proliferation and invasion of glioma cells via blockade of AKT1 signaling. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* **25,** 871–81 (2012).

286. Wu, N. *et al.* Role of microRNA-26b in glioma development and its mediated regulation on EphA2. *PLoS One* **6,** (2011).

287. Chen, L. *et al.* Expression and function of miR-27b in human glioma. *Oncol. Rep.* **26,** 1617–21 (2011).

288. Yang, G. *et al.* MiR-106a inhibits glioma cell growth by targeting E2F1 independent of p53 status. *J. Mol. Med. (Berl).* **89,** 1037–50 (2011).

289. Yue, X. *et al.* MicroRNA-205 functions as a tumor suppressor in human glioblastoma cells by targeting VEGF-A. *Oncol. Rep.* **27,** 1200–6 (2012).

290. Dai, D.-W. *et al.* Decreased miR-106a inhibits glioma cell glucose uptake and proliferation by targeting SLC2A3 in GBM. *BMC Cancer* **13,** 478 (2013).

291. Zhang, Q.-Q. *et al.* MicroRNA-195 plays a tumor-suppressor role in human glioblastoma cells by targeting signaling pathways involved in cellular proliferation and invasion. *Neuro. Oncol.* **14,** 278–87 (2012).

292. Guan, Y. *et al.* MiRNA-196 is upregulated in glioblastoma but not in anaplastic astrocytoma and has prognostic significance. *Clin. Cancer Res.* **16,** 4289–97 (2010).

293. Ma, R. *et al.* Upregulation of miR-196b confers a poor prognosis in glioblastoma patients via inducing a proliferative phenotype. *PLoS One* **7,** (2012).

294. Kawase-Koga, Y. *et al.* RNAase-III enzyme Dicer maintains signaling pathways for differentiation and survival in mouse cortical neural stem cells. *J. Cell Sci.* **123,** 586–94 (2010).

295. Bartel, D. P. MicroRNA Target Recognition and Regulatory Functions. *Cell* **136,** 215–233 (2009).

296. Godlewski, J., Newton, H. B., Chiocca, E. a & Lawler, S. E. MicroRNAs and glioblastoma; the stem cell connection. *Cell Death Differ.* **17,** 221–8 (2010).

297. Chu, P. *et al.* Review Deregulated MicroRNAs Identified in Isolated Glioblastoma Stem Cells : An Overview. **22,** 741–753 (2013).

298. Yan, K., Yang, K. & Rich, J. N. The evolving landscape of glioblastoma stem cells. *Curr. Opin. Neurol.* **26,** 701–7 (2013).

299. Aldaz, B. *et al.* Involvement of miRNAs in the differentiation of human glioblastoma multiforme stem-like cells. *PLoS One* **8,** e77098 (2013).

300. Katsushima, K. & Kondo, Y. Non-coding RNAs as epigenetic regulator of glioma stem-like cell differentiation. *Front. Genet.* **5,** 14 (2014).

301. Schraivogel, D. *et al.* CAMTA1 is a novel tumour suppressor regulated by miR-9/9* in glioblastoma stem cells. *EMBO J.* **30,** 4309–22 (2011).

302. Wu, N. *et al.* miR-125b regulates the proliferation of glioblastoma stem cells by targeting E2F2. *FEBS Lett.* **586,** 3831–9 (2012).

303. Wan, Y. *et al.* Expression of miR-125b in the new, highly invasive glima stem cell and progenitor cell line SU3. *Chinese* **31,** 207–214 (2012).

304. Shi, L. *et al.* MiR-125b is critical for the suppression of human U251 glioma stem cell proliferation. *Brain Res.* **1312,** 120–6 (2010).

305. Xia, H. *et al.* Loss of brain-enriched miR-124 microRNA enhances stem-like traits and invasiveness of glioma cells. *J. Biol. Chem.* **287,** 9962–71 (2012).

306. Mei, J., Bachoo, R. & Zhang, C.-L. MicroRNA-146a inhibits glioma development by targeting Notch1. *Mol. Cell. Biol.* **31,** 3584–92 (2011).

307. Kefas, B. *et al.* The neuronal microRNA miR-326 acts in a feedback loop with Notch and has therapeutic potential against brain tumors. *J. Neurosci.* **29,** (2010).

308. Turchi, L. *et al.* Tumorigenic potential of miR-18A* in glioma initiating cells requires NOTCH-1 signaling. *Stem Cells* **31,** 1252–65 (2013).

309. Bier, A. *et al.* MicroRNA-137 is downregulated in glioblastoma and inhibits the stemness of glioma stem cells by targeting RTVP-1. *Impact journals* **4,** 665–676 (2013).

310. Põlajeva, J. *et al.* miRNA-21 is developmentally regulated in mouse brain and is co-expressed with SOX2 in glioma. *BMC Cancer* **12,** 378 (2012).

311. Geng, J. *et al.* Methylation mediated silencing of miR-23b expression and its role in glioma stem cells. *Neurosci. Lett.* **528,** 185–9 (2012).

312. Zhao, S. *et al.* miR-143 inhibits glycolysis and depletes stemness of glioblastoma stem-like cells. *Cancer Lett.* **333,** 253–60 (2013).

313. Shi, L. *et al.* miR-145 inhibits migration and invasion of glioma stem cells by targeting ABCG2. *Neuromolecular Med.* **16,** 517–28 (2014).

314. Zhe Ying, Yun Li, Jueheng Wu, Xun Zhu, Yi Yang, Han Tian, Wei Li, B. & Hu, Shi-Yuan Cheng, and M. L. Loss of miR-204 Expression Enhances Glioma Migration and Stem Cell-Like Phenotype. *Cancer Res.* **73,** 990–999 (2014).

315. Asuthkar, S., Velpula, K. K., Chetty, C. & Gorantla, B. Epigenetic Regulation of miRNA-211 by MMP-9 Governs Glioma Cell Apoptosis, Chemosensitivity and Radiosensitivity. *Oncotarget* **3,** 1439–1454 (2012).

316. Yang, W., Wei, J., Guo, T., Shen, Y. & Liu, F. Knockdown of miR-210 decreases hypoxic glioma stem cells stemness and radioresistance. *Exp. Cell Res.* 1–14 (2014). doi:10.1016/j.yexcr.2014.05.022

317. Liping Liu, Kun Chen, Jueheng Wu, Ling Shi, Bo Hu, Shiyuan Cheng, M. & Li, and L. S. Downregulation of miR-452 Promotes Stem-like Traits and Tumorigenicity of Gliomas. *Clin. cancer Res.* **19,** 3429–3438 (2014).

318. Tezcan, G. *et al.* microRNA expression pattern modulates temozolomide response in GBM tumors with cancer stem cells. *Cell. Mol. Neurobiol.* **34,** 679–92 (2014).

319. Katsushima, K. *et al.* Contribution of microRNA-1275 to Claudin11 protein suppression via a polycomb-mediated silencing mechanism in human glioma stem-like cells. *J. Biol. Chem.* **287,** 27396–406 (2012).

320. Zhao, S. *et al.* MicroRNA-153 is tumor suppressive in glioblastoma stem cells. *Mol. Biol. Rep.* **40,** 2789–98 (2013).

321. Gao, X. & Jin, W. The emerging role of tumor-suppressive microRNA-218 in targeting glioblastoma stemness. *Cancer Lett.* (2014).

322. Li, W.-Q. *et al.* Downregulation of ABCG2 expression in glioblastoma cancer stem cells with miRNA-328 may decrease their chemoresistance. *Med. Sci. Monit.* **16,** HY27–30 (2010).

323. Yao, Y. *et al.* MiR-330-mediated regulation of SH3GL2 expression enhances malignant behaviors of glioblastoma stem cells by activating ERK and PI3K/AKT signaling pathways. *PLoS One* **9,** e95060 (2014).

324. Tian, Y. *et al.* MicroRNA miR-451 downregulates the PI3K/AKT pathway through CAB39 in human glioma. *Int. J. Oncol.* **40,** 1105–12 (2012).

325. Lee, H. K. *et al.* MicroRNA-145 is downregulated in glial tumors and regulates glioma cell migration by targeting connective tissue growth factor. *PLoS One* **8,** e54652 (2013).

326. Wang, Z. *et al.* Oncogenic miR-20a and miR-106a enhance the invasiveness of human glioma stem cells by directly targeting TIMP-2. *Oncogene* (2014). doi:10.1038/onc.2014.75

327. Git, A. *et al.* Systematic comparison of microarray profiling , real-time PCR , and next-generation sequencing technologies for measuring differential microRNA expression. *RNA* **16,** 991–1006 (2010).

328. Jørgensen, S., Baker, A., Møller, S. & Nielsen, B. S. Robust one-day in situ hybridization protocol for detection of microRNAs in paraffin samples using LNA probes. *Methods* **52,** 375–81 (2010).

329. Wang, Z., Gerstein, M. & Snyder, M. RNA-Seq : a revolutionary tool for transcriptomics. *Nat. Rev. Genet.* **10,** 57–63 (2010).

330. Baraniskin, A. *et al.* Identification of microRNAs in the cerebrospinal fluid as biomarker for the diagnosis of glioma. *Neuro. Oncol.* **14,** 29–33 (2012).

331. Srinivasan, S., Patric, I. R. P. & Somasundaram, K. A ten-microRNA expression signature predicts survival in glioblastoma. *PLoS One* **6,** (2011).

332. K.R. Delfino, N.V.L. Serão, B.R. Southey, and S. L. R.-Z. Therapy-, Gender- and Race-specific microRNA Markers, Target Genes and Networks Related to Glioblastoma Recurrence and Survival. *Cancer Genomics Proteomics* **8,** 173–183 (2012).

333. Zinn, P. O. *et al.* A novel volume-age-KPS (VAK) glioblastoma classification identifies a prognostic cognate microRNA-gene signature. *PLoS One* **7,** (2012).

334. Niyazi, M. *et al.* MiRNA expression patterns predict survival in glioblastoma. *Radiat. Oncol.* **6,** 153 (2011).

335. Lakomy, R. *et al.* MiR-195, miR-196b, miR-181c, miR-21 expression levels and O-6-methylguanine-DNA methyltransferase methylation status are associated with clinical outcome in glioblastoma patients. *Cancer Sci.* **102,** 2186–90 (2011).

336. Cui, J. G. *et al.* Micro-RNA-128 (miRNA-128) down-regulation in glioblastoma targets ARP5 (ANGPTL6), Bmi-1 and E2F-3a, key regulators of brain cell proliferation. *J. Neurooncol.* **98,** 297–304 (2010).

337. Shi, Z. *et al.* MiR-128 inhibits tumor growth and angiogenesis by targeting p70S6K1. *PLoS One* **7,** (2012).

338. D Yin, S Ogawa, N Kawamata, A Leiter, M Ham, D Li, NB Doan, JW Said5, K. & Black, and H. P. K. miR-34a functions as a tumor suppressor modulating EGFR in glioblastoma multiforme. *Oncogene* **32,** 1155–1163 (2014).

339. Xia, H. *et al.* microRNA-146b inhibits glioma cell migration and invasion by targeting MMPs. *Brain Res.* **1269,** 158–65 (2009).

340. Gao, H., Zhao, H. & Xiang, W. Expression level of human miR-34a correlates with glioma grade and prognosis. *J. Neurooncol.* **113,** 221–8 (2013).

341. Wu, Z. *et al.* MiR-328 expression is decreased in high-grade gliomas and is associated with worse survival in primary glioblastoma. *PLoS One* **7,** (2012).

342. Parker, N. R. *et al.* Correlation of MicroRNA 132 Up-regulation with an Unfavorable Clinical Outcome in Patients with Primary Glioblastoma Multiforme Treated with Radiotherapy Plus Concomitant and Adjuvant Temozolomide Chemotherapy. *Transl. Oncol.* **6,** 742–IN34 (2013).

343. Zhang, C.-Z. *et al.* MiR-221 and miR-222 target PUMA to induce cell survival in glioblastoma. *Mol. Cancer* **9,** 229 (2010).

344. Zhang, J., Stevens, M. F. G. & Bradshaw, T. D. Temozolomide: mechanisms of action, repair and resistance. *Curr. Mol. Pharmacol.* **5,** 102–14 (2012).

345. Zhang, W. *et al.* miR-181d : a predictive glioblastoma MGMT expression. *Neuro. Oncol.* **14,** 712–719 (2012).

346. Berthois, Y. *et al.* Differential expression of miR200a-3p and miR21 in grade II–III and grade IV gliomas: Evidence that miR200a-3p is regulated by O6-methylguanine methyltransferase and promotes temozolomide responsiveness. *Cancer Biol. Ther.* **15,** 1299 (2014).

347. Min, K., Jung, E. & Ah, I. microRNA-7 increases radiosensitivity of human cancer cells with activated EGFR-associated signaling. *Radiother. Oncol.* **101,** 171–176 (2011).

348. Chen, G. *et al.* MicroRNA-181a sensitizes human malignant glioma U87MG cells to radiation by targeting Bcl-2. *Oncol. Rep.* **23,** 997–1003 (2010).

349. Griveau, a *et al.* Silencing of miR-21 by locked nucleic acid-lipid nanocapsule complexes sensitize human glioblastoma cells to radiation-induced cell death. *Int. J. Pharm.* **454,** 765–74 (2013).

350. Li, Y. *et al.* A miR-21 inhibitor enhances apoptosis and reduces G(2)-M accumulation induced by ionizing radiation in human glioblastoma U251 cells. *Brain Tumor Pathol.* **28,** 209–14 (2011).

351. Ren, Y. *et al.* MicroRNA-21 inhibitor sensitizes human glioblastoma cells U251 (PTEN-mutant) and LN229 (PTEN-wild type) to taxol. *BMC Cancer* **10,** 27 (2010).

352. Shi, L. *et al.* MiR-21 protected human glioblastoma U87MG cells from chemotherapeutic drug temozolomide induced apoptosis by decreasing Bax/Bcl-2 ratio and caspase-3 activity. *Brain Res.* **1352,** 255–64 (2010).

353. Koshkin, P. a, Chistiakov, D. a & Chekhonin, V. P. Role of microRNAs in mechanisms of glioblastoma resistance to radio- and chemotherapy. *Biochem. Biokhimiia* **78,** 325–34 (2013).

354. Reya, T., Morrison, S. J., Clarke, M. F. & Weissman, I. L. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* **414,** 105–11 (2001).

355. Günther, H. S. *et al.* Glioblastoma-derived stem cell-enriched cultures form distinct subgroups according to molecular and phenotypic criteria. *Oncogene* **27,** 2897–909 (2008).

356. Eramo, a *et al.* Chemotherapy resistance of glioblastoma stem cells. *Cell Death Differ.* **13,** 1238–41 (2006).

357. Tu, Y. *et al.* MicroRNA-218 inhibits glioma invasion, migration, proliferation, and cancer stem-like cell self-renewal by targeting the polycomb group gene Bmi1. *Cancer Res.* **73,** 6046–55 (2013).

358. Peruzzi, P. *et al.* MicroRNA-128 coordinately targets Polycomb Repressor Complexes in glioma stem cells. *Neuro. Oncol.* **15,** 1212–24 (2013).

359. Tamim, S. *et al.* Genomic analyses reveal broad impact of miR-137 on genes associated with malignant transformation and neuronal differentiation in glioblastoma cells. *PLoS One* **9,** (2014).

360. Yang, Y.-P. *et al.* Inhibition of cancer stem cell-like properties and reduced chemoradioresistance of glioblastoma using microRNA145 with cationic polyurethane-short branch PEI. *Biomaterials* **33,** 1462–76 (2012).

361. Swarup, V. & Rajeswari, M. R. Circulating (cell-free) nucleic acids--a promising, non-invasive tool for early detection of several human diseases. *FEBS Lett.* **581,** 795–9 (2007).

362. Baulande, S., Criqui, A. & Duthieuw, M. Les microARN circulants , une nouvelle classe de biomarqueurs pour la médecine. *Médecine/Sciences* **30,** 289–96 (2014).

363. Gilad, S. *et al.* Serum microRNAs are promising novel biomarkers. *PLoS One* **3,** e3148 (2008).

364. Mitchell, P. S. *et al.* Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105,** 10513–8 (2008).

365. Arroyo, J. D. *et al.* Argonaute2 complexes carry a population of circulating microRNAs independent of vesicles in human plasma. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108,** 5003–8 (2011).

366. Roth, P. *et al.* A specific miRNA signature in the peripheral blood of glioblastoma patients. *J. Neurochem.* **118,** 449–57 (2011).

367. Kim, H. *et al.* Integrative genome analysis reveals an oncomir/oncogene cluster regulating glioblastoma survivorship. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107,** 2183–8 (2010).

368. Permuth-wey, J., Thompson, R. C., Nabors, L. B., Olson, J. J. & Egan, K. M. A functional polymorphism in the pre-miR-146a gene is associated with risk and prognosis in adult glioma. *J. Neurooncol.* **105,** 639–646 (2012).

369. Tivnan, A. & McDonald, K. L. Current progress for the use of miRNAs in glioblastoma treatment. *Mol. Neurobiol.* **48,** 757–68 (2013).

370. Dias, N. & Stein, C. A. Antisense Oligonucleotides : Basic Concepts and Mechanisms Minireview Antisense Oligonucleotides : Basic Concepts and Mechanisms. *Mol. Cancer Ther.* **1,** 347–355 (2002).

371. Lu, Y. *et al.* A single anti-microRNA antisense oligodeoxyribonucleotide (AMO) targeting multiple microRNAs offers an improved approach for microRNA interference. *Nucleic Acids Res.* **37,** (2009).

372. Kiranmai Gumireddy, Young Douglas D, X. X. Small Molecule Inhibitors of MicroRNA miR-21 Function. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* **47,** 7482–7484 (2012).

373. Shuxing Zhang, Lu Chen, Eun Jung Jung, and G. A. C. Targeting microRNAs with small molecules: Between Dream and Reality. *Clin. Pharmacol.* **87,** 754–758 (2014).

374. Krol, J., Loedige, I. & Filipowicz, W. The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay. *Nat. Rev. Genet.* **11,** 597–610 (2010).

375. Kudo-Saito, C., Shirako, H., Takeuchi, T. & Kawakami, Y. Cancer metastasis is accelerated through immunosuppression during Snail-induced EMT of cancer cells. *Cancer Cell* **15,** 195–206 (2009).

376. Lujambio, A. *et al.* Genetic unmasking of an epigenetically silenced microRNA in human cancer cells. *Cancer Res.* **67,** 1424–9 (2007).

377. Melo, S. *et al.* Small molecule enoxacin is a cancer-speci fi c growth inhibitor that acts by enhancing TAR RNA-binding protein 2-mediated microRNA processing. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **108,** 4394–4399 (2011).

378. Kosaka, N. *et al.* Neutral sphingomyelinase 2 (nSMase2)-dependent exosomal transfer of angiogenic microRNAs regulate cancer cell metastasis. *J. Biol. Chem.* **288,** 10849–59 (2013).

379. Wan, Y., Sun, G., Zhang, S., Wang, Z. & Shi, L. MicroRNA-125b inhibitor sensitizes human primary glioblastoma cells to chemotherapeutic drug temozolomide on invasion. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Anim.* **49,** 599–607 (2013).

380. Wong, S. T. S. *et al.* MicroRNA-21 inhibition enhances in vitro chemosensitivity of temozolomide-resistant glioblastoma cells. *Anticancer Res.* **32,** 2835–41 (2012).

381. Corsten, M. F. *et al.* MicroRNA-21 knockdown disrupts glioma growth in vivo and displays synergistic cytotoxicity with neural precursor cell delivered S-TRAIL in human gliomas. *Cancer Res.* **67,** 8994–9000 (2007).

382. Ding, L. *et al.* Combined transfection of Bcl-2 siRNA and miR-15a oligonucleotides enhanced methotrexate-induced apoptosis in Raji cells. *Cancer Biol. Med.* **10,** 16–21 (2013).

383. Wang, W. *et al.* Regulation of epidermal growth factor receptor signaling by plasmid-based MicroRNA-7 inhibits human malignant gliomas growth and metastasis in vivo. *Neoplasma* **60,** 274–283 (2013).

384. Mark Katakowski, Ben Buller, Xuguang Zheng, Yong Lu, T. R. & Oyinkansola Osobamiro, Wayne Shu, Feng Jiang, and M. C. Exosomes from marrow stromal cells expressing miR-146b inhibit glioma growth. *Cancer Lett.* **335,** 201–204 (2014).

385. Alvarez-Erviti, L. *et al.* Delivery of siRNA to the mouse brain by systemic injection of targeted exosomes. *Nat. Biotechnol.* **29,** 341–5 (2011).

386. Dissoki, S., Hagooly, A., Elmachily, S. & Mishani, E. Labeling approaches for the GE11 peptide, an epidermal growth factor receptor biomarker. *J. Label. Compd. Radiopharm.* **54,** 693–701 (2011).

387. Wang, K., Wu, X., Wang, J. & Huang, J. Cancer stem cell theory: therapeutic implications for nanomedicine. *Int. J. Nanomedicine* **8,** 899–908 (2013).

388. Cherng, J. Y., Hung, W. C. & Kao, H. C. Blending of polyethylenimine with a cationic polyurethane greatly enhances both DNA delivery efficacy and reduces the overall cytotoxicity. *Curr. Pharm. Biotechnol.* **12,** 839–46 (2011).

389. Lo, W.-L. *et al.* Nuclear localization signal-enhanced RNA interference of EZH2 and Oct4 in the eradication of head and neck squamous cell carcinoma-derived cancer stem cells. *Biomaterials* **33,** 3693–709 (2012).

390. Goodrich, J. A. & Kugel, J. F. Non-coding-RNA regulators of RNA polymerase II transcription. *Perspectives (Montclair).* **7,** 612–616 (2006).

391. Spizzo R, Almeida MI, Colombatti A, and C. G. Long non-coding RNAs and cancer: a new frontier of translational research? *Oncogene* **31,** 4577–4587 (2012).

392. Novikova, I. V, Hennelly, S. P., Tung, C.-S. & Sanbonmatsu, K. Y. Rise of the RNA machines: exploring the structure of long non-coding RNAs. *J. Mol. Biol.* **425,** 3731–46 (2013).

393. Schaukowitch, K. & Kim, T.-K. Emerging epigenetic mechanisms of long non-coding RNAs. *Neuroscience* **264,** 25–38 (2014).

394. Zhang, Y., Yang, L. & Chen, L.-L. Life without A tail: New formats of long noncoding RNAs. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* (2013). doi:10.1016/j.biocel.2013.10.009

395. Eades, G. *et al.* Long non-coding RNAs in stem cells and cancer. *World J. Clin. Oncol.* **5,** 134–141 (2014).

396. Park, J. Y. *et al.* Roles of Long Non-Coding RNAs on Tumorigenesis and Glioma Development. *Brain tumor Res. Treat.* **2,** 1–6 (2014).

397. Ponting, C. P., Oliver, P. L. & Reik, W. Evolution and functions of long noncoding RNAs. *Cell* **136,** 629–41 (2009).

398. Bánfai, B. *et al.* Long noncoding RNAs are rarely translated in two human cell lines. *Genome Res.* **22,** 1646–57 (2012).

399. Derrien, T. *et al.* The GENCODE v7 catalog of human long noncoding RNAs: analysis of their gene structure, evolution, and expression. *Genome Res.* **22,** 1775–89 (2012).

400. Gupta, R. A. *et al.* Long noncoding RNA HOTAIR reprograms chromatin state to promote cancer metastasis. *Nature* **464,** 1071–1076 (2011).

401. Huarte, M. & Rinn, J. L. Large non-coding RNAs: missing links in cancer? *Hum. Mol. Genet.* **19,** R152–61 (2010).

402. Ng, S.-Y., Johnson, R. & Stanton, L. W. Human long non-coding RNAs promote pluripotency and neuronal differentiation by association with chromatin modifiers and transcription factors. *EMBO J.* **31,** 522–33 (2012).

403. Laura Poliseno, Leonardo Salmena, Jiangwen Zhang, Brett Carver, W. J. & Haveman, and P. P. P. A coding-independent function of gene and pseudogene mRNAs regulates tumour biology. *Nature* **465,** 1033–1038 (2011).

404. Shi, X., Sun, M., Liu, H., Yao, Y. & Song, Y. Long non-coding RNAs: a new frontier in the study of human diseases. *Cancer Lett.* **339,** 159–66 (2013).

405. Wang, K. C. & Chang, H. Y. Molecular mechanisms of long noncoding RNAs Kevin. *Mol Cell.* **43,** 904–914 (2012).

406. Yang, L. *et al.* LncRNA-Dependent Mechanisms of Androgen Receptor- regulated Gene Activation Programs. *Nature* **500,** 598–602 (2014).

407. Rinn, J. L. & Chang, H. Y. Genome regulation by long noncoding RNAs. *Annu. Rev. Biochem.* **81,** 145–66 (2012).

408. Harrow, J. *et al.* GENCODE: the reference human genome annotation for The ENCODE Project. *Genome Res.* **22,** 1760–74 (2012).

409. Bai, Y., Dai, X., Harrison, A. P. & Chen, M. RNA regulatory networks in animals and plants: a long noncoding RNA perspective. *Brief. Funct. Genomics* (2014). doi:10.1093/bfgp/elu017

410. Gibb, E. a, Brown, C. J. & Lam, W. L. The functional role of long non-coding RNA in human carcinomas. *Mol. Cancer* **10,** 38 (2011).

411. Moran, V. a, Perera, R. J. & Khalil, A. M. Emerging functional and mechanistic paradigms of mammalian long non-coding RNAs. *Nucleic Acids Res.* **40,** 6391–400 (2012).

412. Zhou, Y. *et al.* Activation of p53 by MEG3 non-coding RNA. *J. Biol. Chem.* **282,** 24731–42 (2007).

413. Huarte, M. *et al.* A large intergenic non-coding RNA induced by p53 mediates global gene repression in the p53 response. *Cell* **142,** 409–419 (2011).

414. Yildirim, E. *et al.* Xist RNA is a potent suppressor of hematologic cancer in mice. *Cell* **152,** 727–42 (2013).

415. Wang, P., Ren, Z. & Sun, P. Overexpression of the long non-coding RNA MEG3 impairs in vitro glioma cell proliferation. *J. Cell. Biochem.* **113,** 1868–74 (2012).

416. Zhang, X. *et al.* A pituitary-derived MEG3 isoform functions as a growth suppressor in tumor cells. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **88,** 5119–26 (2003).

417. John R. Prensner, Matthew K. Iyer, O. Alejandro Balbin, Saravana M. Dhanasekaran, Qi Cao1, J. Chad Brenner, Bharathi Laxman, Irfan Asangani1, Catherine Grasso, Hal D. Kominsky, Xuhong Cao1, Xiaojun Jing, Xiaoju Wang, Javed Siddiqui, John T. Wei, Daniel Ro, C. A. & Maher, and A. M. C. Transcriptome Sequencing Identifies PCAT-1, a Novel lincRNA Implicated in Prostate Cancer Progression. *Nat. Biotechnol.* **29,** 742–749 (2012).

418. Geng, Y., Xie, S., Li, Q., Ma, J. & Wang, G. Large Intervening Non-Coding RNA HOTAIR is Associated with Hepatocellular Carcinoma Progression. *J. Int. Med. Res.* **39,** 2119–2128 (2011).

419. Yang, Z. *et al.* Overexpression of long non-coding RNA HOTAIR predicts tumor recurrence in hepatocellular carcinoma patients following liver transplantation. *Ann. Surg. Oncol.* **18,** 1243–50 (2011).

420. Zhang, J.-X. *et al.* HOTAIR, a cell cycle-associated long noncoding RNA and a strong predictor of survival, is preferentially expressed in classical and mesenchymal glioma. *Neuro. Oncol.* **15,** 1595–603 (2013).

421. Rinn, J. L. *et al.* Functional Demarcation of Active and Silent Chromatin Domains in Human HOX Loci by Non-Coding RNAs. *Cell* **129,** 1311–1323 (2007).

422. Tsai, M. *et al.* Long Noncoding RNA as Modular Scaffold of Histone Modification Complexes. *Science (80-. ).* **329,** 689–693 (2010).

423. Yuan, S.-X. *et al.* Long noncoding RNA associated with microvascular invasion in hepatocellular carcinoma promotes angiogenesis and serves as a predictor for hepatocellular carcinoma patients' poor recurrence-free survival after hepatectomy. *Hepatology* **56,** 2231–41 (2012).

424. Gordon, F. E. *et al.* Increased expression of angiogenic genes in the brains of mouse meg3-null embryos. *Endocrinology* **151,** 2443–52 (2010).

425. Powell, W. T. *et al.* A Prader-Willi locus lncRNA cloud modulates diurnal genes and energy expenditure. *Hum. Mol. Genet.* **22,** 4318–28 (2013).

426. Bochenek, G. *et al.* The large non-coding RNA ANRIL, which is associated with atherosclerosis, periodontitis and several forms of cancer, regulates ADIPOR1, VAMP3 and C11ORF10. *Hum. Mol. Genet.* **22,** 4516–27 (2013).

427. Yap, K. L. *et al.* Molecular Interplay of the Non-coding RNA ANRIL and Methylated Histone H3 Lysine 27 by Polycomb CBX7 in Transcriptional Silencing of INK4a. *Mol Cell.* **38,** 662–674 (2011).

428. Zhuang, Y. *et al.* Induction of long intergenic non-coding RNA HOTAIR in lung cancer cells by type I collagen. *J. Hematol. Oncol.* **6,** 35 (2013).

429. Zhu, M. *et al.* lncRNA H19/miR-675 axis represses prostate cancer metastasis by targeting TGFBI. *FEBS J.* **281,** 3766–75 (2014).

430. Carpenter, S. *et al.* A long noncoding RNA mediates both activation and repression of immune response genes. *Science* **341,** 789–92 (2013).

431. Gomez, J. A. *et al.* NeST, a long noncoding RNA, controls microbial susceptibility and epigenetic activation of the Ifng locus. *Cell* **152,** 743–754 (2013).

432. Li, K. *et al.* A noncoding antisense RNA in tie-1 locus regulates tie-1 function in vivo. *Blood* **115,** 133–9 (2010).

433. Sun, L. *et al.* Long noncoding RNAs regulate adipogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110,** 3387–92 (2013).

434. Zuo, C. *et al.* Expression profiling of lncRNAs in C3H10T1/2 mesenchymal stem cells undergoing early osteoblast differentiation. *Mol. Med. Rep.* **8,** 463–7 (2013).

435. Flynn, R. a & Chang, H. Y. Long Noncoding RNAs in Cell-Fate Programming and Reprogramming. *Cell Stem Cell* **14,** 752–761 (2014).

436. Lin, N. *et al.* An evolutionarily conserved long noncoding RNA TUNA controls pluripotency and neural lineage commitment. *Mol. Cell* **53,** 1005–19 (2014).

437. Yang, Y. W. *et al.* Essential role of lncRNA binding for WDR5 maintenance of active chromatin and embryonic stem cell pluripotency. *Elife* **3,** (2014).

438. Wang, Y. *et al.* Endogenous miRNA sponge lincRNA-RoR regulates Oct4, Nanog, and Sox2 in human embryonic stem cell self-renewal. *Dev. Cell* **25,** 69–80 (2013).

439. Zhou, X. *et al.* Linc-RNA-RoR acts as a “sponge” against mediation of the differentiation of endometrial cancer stem cells by microRNA-145. *Gynecol. Oncol.* **133,** 333–9 (2014).

440. Ellis, B. C., Molloy, P. L. & Graham, L. D. CRNDE: A Long Non-Coding RNA Involved in CanceR, Neurobiology, and DEvelopment. *Front. Genet.* **3,** 270 (2012).

441. Zhang, X.-Q. *et al.* A long non-coding RNA signature in glioblastoma multiforme predicts survival. *Neurobiol. Dis.* **58,** 123–31 (2013).

442. Khachane, A. N. & Harrison, P. M. Mining mammalian transcript data for functional long non-coding RNAs. *PLoS One* **5,** (2010).

443. Zhang, X. *et al.* Long non-coding RNA expression profiles predict clinical phenotypes in glioma. *Neurobiol. Dis.* **48,** 1–8 (2012).

444. Shi, Y. *et al.* Long non-coding RNA H19 promotes glioma cell invasion by deriving miR-675. *PLoS One* **9,** (2014).

445. Keniry, A., Oxley, D., Monnier, P., Kyba, M. & Dandolo, L. Europe PMC Funders Group The H19 lincRNA is a developmental reservoir of miR-675 which suppresses growth and Igf1r. *Nat. Cell Biol.* **14,** 659–665 (2013).

446. Li, C. H. & Chen, Y. Targeting long non-coding RNAs in cancers: progress and prospects. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **45,** 1895–910 (2013).

447. Emadi-Andani, E., Nikpour, P., Emadi-Baygi, M. & Bidmeshkipour, A. Association of HOTAIR expression in gastric carcinoma with invasion and distant metastasis. *Adv. Biomed. Res.* **3,** 135 (2014).

448. Lee, N. K. *et al.* Long non-coding RNA HOTAIR promotes carcinogenesis and invasion of gastric adenocarcinoma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **451,** 171–178 (2014).

449. Zhao, W., An, Y., Liang, Y. & Xie, X.-W. Role of HOTAIR long noncoding RNA in metastatic progression of lung cancer. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* **18,** 1930–6 (2014).

450. Baritaki, S. *et al.* YY1 Over-expression in human brain gliomas and meningiomas correlates with TGF-beta1, IGF-1 and FGF-2 mRNA levels. *Cancer Invest.* **27,** 184–92 (2009).

451. Tano, K. & Akimitsu, N. Long non-coding RNAs in cancer progression. *Front. Genet.* **3,** 219 (2012).

452. Yu, W. *et al.* Epigenetic silencing of tumour suppressor gene p15 by its antisense RNA. *Nature* **451,** 202–206 (2009).

453. Francesca Aguilo, Ming-Ming Zhou, and M. J. W. Long Noncoding RNA, Polycomb, and the Ghosts Haunting INK4b-ARF-INK4a Expression. *Cancer Res.* **71,** 5365–5369 (2012).

454. Cunnington, M. S., Santibanez Koref, M., Mayosi, B. M., Burn, J. & Keavney, B. Chromosome 9p21 SNPs Associated with Multiple Disease Phenotypes Correlate with ANRIL Expression. *PLoS Genet.* **6,** (2010).

455. Guohui Wan, Rohit Mathur, Xiaoxiao Hu, Yunhua Liu, Xinna Zhang, G. P. & Lu, and X. Long non-coding RNA ANRIL (CDKN2B-AS) is induced by the ATM-E2F1 signaling pathway. *Cell Signal.* **25,** 1086–1095 (2014).

456. Lu, K. *et al.* Long non-coding RNA MEG3 inhibits NSCLC cells proliferation and induces apoptosis by affecting p53 expression. *BMC Cancer* **13,** 461 (2013).

457. Ernst, C. & Morton, C. C. Identification and function of long non-coding RNA. *Front. Cell. Neurosci.* **7,** 168 (2013).

458. Niland, C. N., Merry, C. R. & Khalil, A. M. Emerging Roles for Long Non-Coding RNAs in Cancer and Neurological Disorders. *Front. Genet.* **3,** 25 (2012).

459. Zhou, B., Beidler, D. R., Cheng, Y. & Pseudogene, I. Identification of Antisense RNA Transcripts from a Human DNA Topoisomerase I Pseudogene. *Cancer Res.* **52,** 4280–4285 (1992).

460. Kalyana-sundaram, S. *et al.* Expressed Pseudogenes in the Transcriptional Landscape of Human Cancers. *Cell* **149,** 1622–1634 (2013).

461. Zhao, S. *et al.* Expression of OCT4 pseudogenes in human tumours: lessons from glioma and breast carcinoma. *J. Pathol.* **223,** 672–82 (2011).

462. Qi, P. & Du, X. The long non-coding RNAs, a new cancer diagnostic and therapeutic gold mine. *Mod. Pathol.* **26,** 155–65 (2013).

463. Li, R., Qian, J., Wang, Y.-Y., Zhang, J.-X. & You, Y.-P. Long noncoding RNA profiles reveal three molecular subtypes in glioma. *CNS Neurosci. Ther.* **20,** 339–43 (2014).

464. Isin, M. *et al.* Investigation of circulating lncRNAs in B-cell neoplasms. *Clin. Chim. Acta.* **431,** 255–9 (2014).

465. Arita, T. *et al.* Circulating long non-coding RNAs in plasma of patients with gastric cancer. *Anticancer Res.* **33,** 3185–93 (2013).

466. Sun, Y., Wang, Z. & Zhou, D. Long non-coding RNAs as potential biomarkers and therapeutic targets for gliomas. *Med. Hypotheses* **81,** 319–21 (2013).

467. Cai, X. & Cullen, B. R. The imprinted H19 noncoding RNA is a primary microRNA precursor. *RNA* **13,** 313–6 (2007).

468. Tsang, W. P. *et al.* Oncofetal H19-derived miR-675 regulates tumor suppressor RB in human colorectal cancer. *Carcinogenesis* **31,** 350–8 (2010).

469. Li, D. *et al.* Long intergenic noncoding RNA HOTAIR is overexpressed and regulates PTEN methylation in laryngeal squamous cell carcinoma. *Am. J. Pathol.* **182,** 64–70 (2013).

470. Burghardt, R., Kim, S. & Safe, S. HOTAIR IS A NEGATIVE PROGNOSTIC FACTOR AND EXHIBITS PRO-ONCOGENIC ACTIVITY IN PANCREATIC CANCER. *Oncogene* **32,** 1616–1625 (2013).

471. Lynch, J. T., Harris, W. J. & Somervaille, T. C. P. LSD1 inhibition: a therapeutic strategy in cancer? *Expert Opin. Ther. Targets* **16,** 1239–49 (2012).

472. Tsai, M.-C., Spitale, R. C. & Chang, H. Y. Long intergenic noncoding RNAs: new links in cancer progression. *Cancer Res.* **71,** 3–7 (2011).

473. Nakamura, Y. *et al.* The GAS5 (growth arrest-specific transcript 5) gene fuses to BCL6 as a result of t(1;3)(q25;q27) in a patient with B-cell lymphoma. *Cancer Genet. Cytogenet.* **182,** 144–9 (2008).

474. Roberts, K. a, Abraira, V. E., Tucker, A. F., Goodrich, L. V & Andrews, N. C. Mutation of Rubie, a novel long non-coding RNA located upstream of Bmp4, causes vestibular malformation in mice. *PLoS One* **7,** (2012).

475. Jackson, A. L. *et al.* Widespread siRNA off-target transcript silencing mediated by seed region sequence complementarity Widespread siRNA ‘‘ off-target“’ transcript silencing mediated by seed region sequence complementarity.”1179–1187 (2006).

476. Robb, G. B., Brown, K. M., Khurana, J. & Rana, T. M. Specific and potent RNAi in the nucleus of human cells. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **12,** 133–7 (2005).

477. A Study to Determine Safety, Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Intravenous TKM 080301 in Neuroendocrine Tumors (NET) and Adrenocortical Carcinoma (ACC) Patients - Full Text View - ClinicalTrials.gov. at <http://clinicaltrials.gov/show/NCT01262235>

478. A Phase II Study of siG12D LODER in Combination With Chemotherapy in Patients With Unresectable Locally Advanced Pancreatic Cancer - Full Text View - ClinicalTrials.gov. at <http://clinicaltrials.gov/show/NCT01676259>

479. Morrissey, D. V *et al.* Potent and persistent in vivo anti-HBV activity of chemically modified siRNAs. *Nat. Biotechnol.* **23,** 1002–7 (2005).

480. Lorenz, C., Hadwiger, P., John, M., Vornlocher, H.-P. & Unverzagt, C. Steroid and lipid conjugates of siRNAs to enhance cellular uptake and gene silencing in liver cells. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **14,** 4975–7 (2004).

481. Bartlett, D. W., Su, H., Hildebrandt, I. J., Weber, W. a & Davis, M. E. Impact of tumor-specific targeting on the biodistribution and efficacy of siRNA nanoparticles measured by multimodality in vivo imaging. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104,** 15549–54 (2007).

482. Bennett, C. F. & Swayze, E. E. RNA targeting therapeutics: molecular mechanisms of antisense oligonucleotides as a therapeutic platform. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **50,** 259–93 (2010).

483. Soifer, H. S. *et al.* Silencing of gene expression by gymnotic delivery of antisense oligonucleotides. *Methods Mol. Biol.* **815,** 333–46 (2012).

484. Souleimanian, N. *et al.* Antisense 2’-Deoxy, 2'-Fluoroarabino Nucleic Acids (2'F-ANAs) Oligonucleotides: In Vitro Gymnotic Silencers of Gene Expression Whose Potency Is Enhanced by Fatty Acids. *Mol. Ther. Nucleic Acids* **1,** e43 (2012).

485. Pavco, P. A. *et al.* Antitumor and Antimetastatic Activity of Ribozymes Targeting the Messenger RNA of Vascular Endothelial Growth Factor Receptors Antitumor and Antimetastatic Activity of Ribozymes Targeting the Messenger RNA of Vascular Endothelial Growth Factor Receptors. 2094–2103 (2000).

486. Citti, L. & Rainaldi, G. Synthetic hammerhead ribozymes as therapeutic tools to control disease genes. *Curr. Gene Ther.* **5,** 11–24 (2005).

487. Tedeschi, L., Lande, C., Cecchettini, A. & Citti, L. Hammerhead ribozymes in therapeutic target discovery and validation. *Drug Discov. Today* **14,** 776–83 (2009).

488. Johnson, I. M. RNA as a drug target: recent patents on the catalytic activity of trans-splicing ribozymes derived from group I intron RNA. *Recent Pat. DNA Gene Seq.* **4,** 17–28 (2010).

489. Gredell, J. A., Berger, A. K. & Walton, S. P. Impact of target mRNA structure on siRNA silencing efficiency: a large-scale study. *Biotechnol. Bioeng.* **100,** 744–755 (2009).

490. Darfeuille, F. *et al.* Aptamers targeted to an RNA hairpin show improved specificity compared to that of complementary oligonucleotides. *Biochemistry* **45,** 12076–82 (2006).

491. Russell, R. RNA misfolding and the action of chaperones. *Front. Biosci. (Schol. Ed).* **13,** 1–20 (2008).

492. Zhang, H. & Zhu, J.-K. Emerging roles of RNA processing factors in regulating long non-coding RNAs. *RNA Biol.* **11,** (2014).

493. Kinali, M. *et al.* Local restoration of dystrophin expression with the morpholino oligomer AVI-4658 in Duchenne muscular dystrophy: a single-blind, placebo-controlled, dose-escalation, proof-of-concept study. *Lancet. Neurol.* **8,** 918–28 (2009).

494. Mimura, N. *et al.* Blockade of XBP1 splicing by inhibition of IRE1α is a promising therapeutic option in multiple myeloma. *Blood* **119,** 5772–81 (2012).

495. Jeggari, A., Marks, D. S. & Larsson, E. miRcode: a map of putative microRNA target sites in the long non-coding transcriptome. *Bioinformatics* **28,** 2062–3 (2012).

496. Kallen, A. N. *et al.* The imprinted H19 lncRNA antagonizes let-7 microRNAs. *Mol. Cell* **52,** 101–12 (2013).

497. Suo, G. *et al.* Oct4 pseudogenes are transcribed in cancers. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **337,** 1047–51 (2005).

498. Nilsen, T. W. The spliceosome: the most complex macromolecular machine in the cell? *Bioessays* **25,** 1147–9 (2003).

499. Timothy W. Nilsen and Brenton R. Graveley. Expansion of the eukaryotic proteome by alternative splicing. *Nature* **463,** 457–463 (2012).

500. Corcos, L. S. S. Épissage alternatif, pathologie et thérapeutique moléculaire. (2005).

501. Cáceres, J. F., Stamm, S., Helfman, D. M. & Krainer, A. R. Regulation of alternative splicing in vivo by overexpression of antagonistic splicing factors. *Science* **265,** 1706–9 (1994).

502. Zhu, J., Mayeda, A. & Krainer, A. R. Exon identity established through differential antagonism between exonic splicing silencer-bound hnRNP A1 and enhancer-bound SR proteins. *Mol. Cell* **8,** 1351–61 (2001).

503. Black, D. L. Mechanisms of alternative pre-messenger RNA splicing. *Annu. Rev. Biochem.* **72,** 291–336 (2003).

504. Wahl, M. C., Will, C. L. & Lührmann, R. The spliceosome: design principles of a dynamic RNP machine. *Cell* **136,** 701–18 (2009).

505. Matlin, A. J., Clark, F. & Smith, C. W. J. Understanding alternative splicing: towards a cellular code. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **6,** 386–98 (2005).

506. Kiss, T. Biogenesis of small nuclear RNPs. *J. Cell Sci.* **117,** 5949–51 (2004).

507. Hoskins, A. a & Moore, M. J. The spliceosome: a flexible, reversible macromolecular machine. *Trends Biochem. Sci.* **37,** 179–88 (2012).

508. Matera, a G. & Wang, Z. A day in the life of the spliceosome. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **15,** 108–21 (2014).

509. Barash, Y. *et al.* Deciphering the splicing code. *Nature* **465,** 53–9 (2010).

510. Black, D. L. Mechanisms of alternative pre-messenger RNA splicing. *Annu. Rev. Biochem.* **72,** 291–336 (2003).

511. Biamonti, G., Catillo, M., Pignataro, D., Montecucco, A. & Ghigna, C. The alternative splicing side of cancer. *Semin. Cell Dev. Biol.* (2014).

512. Smith, C. W. & Valcárcel, J. Alternative pre-mRNA splicing: the logic of combinatorial control. *Trends Biochem. Sci.* **25,** 381–8 (2000).

513. Luco, R. F. & Misteli, T. More than a splicing code: integrating the role of RNA, chromatin and non-coding RNA in alternative splicing regulation. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **21,** 366–72 (2011).

514. Luco, R. F., Allo, M., Schor, I. E., Kornblihtt, A. R. & Misteli, T. Epigenetics in alternative pre-mRNA splicing. *Cell* **144,** 16–26 (2011).

515. Vargas, D. Y. *et al.* Single-Molecule Imaging of Transcriptionally Coupled and Uncoupled Splicing. *Cell* **147,** 1054–1065 (2012).

516. Valadkhan, S. & Gunawardane, L. S. Role of small nuclear RNAs in eukaryotic gene expression. *Essays Biochem.* **54,** 79–90 (2013).

517. Karijolich, J. & Yu, Y.-T. Spliceosomal snRNA modifications and their function. *RNA Biol.* **7,** 192–204 (2010).

518. Koga, M. *et al.* U2 snRNP is required for expression of the 3' end of genes. *PLoS One* **9,** e98015 (2014).

519. O'Reilly, D. *et al.* Human snRNA genes use polyadenylation factors to promote efficient transcription termination. *Nucleic Acids Res.* **42,** 264–75 (2014).

520. Maquat, L. E. & Carmichael, G. G. Quality control of mRNA function. *Cell* **104,** 173–6 (2001).

521. Van Alphen, R. J., Wiemer, E. a C., Burger, H. & Eskens, F. a L. M. The spliceosome as target for anticancer treatment. *Br. J. Cancer* **100,** 228–32 (2009).

522. Ward, A. J. & Cooper, T. A. The Pathobiology of Splicing. *J. Pathol.* **220,** 152–163 (2011).

523. Ladomery, M. Aberrant Alternative Splicing Is Another Hallmark of Cancer. *Int. J. Cell Biol.* **2013,** 463786 (2013).

524. Bonomi, S. *et al.* Oncogenic alternative splicing switches: role in cancer progression and prospects for therapy. *Int. J. Cell Biol.* **2013,** 962038 (2013).

525. Biamonti, G., Bonomi, S., Gallo, S. & Ghigna, C. Making alternative splicing decisions during epithelial-to-mesenchymal transition (EMT). *Cell. Mol. Life Sci.* **69,** 2515–26 (2012).

526. Ghigna, C. *et al.* Pro-metastatic splicing of Ron proto-oncogene mRNA can be reversed: Therapeutic potential of bifunctional oligonucleotides and indole derivatives Pro-metastatic splicing of Ron proto-oncogene mRNA can be reversed : 495–503 (2010).

527. Ghigna, C. *et al.* Altered Expression of Heterogeneous Nuclear Ribonucleoproteins and SR Factors in Human Colon Adenocarcinomas. *Cancer Res.* 5818–5824 (1998).

528. Mucaki, E. J., Ainsworth, P. & Rogan, P. K. Comprehensive prediction of mRNA splicing effects of BRCA1 and BRCA2 variants. *Hum. Mutat.* **32,** 735–42 (2011).

529. Whiley, P. J. *et al.* Splicing and multifactorial analysis of intronic BRCA1 and BRCA2 sequence variants identifies clinically significant splicing aberrations up to 12 nucleotides from the intron/exon boundary. *Hum. Mutat.* **32,** 678–87 (2011).

530. Harper, S. J. & Bates, D. O. VEGF-A splicing: the key to anti-angiogenic therapeutics? *Nat. Rev. Cancer* **8,** 880–887 (2009).

531. Przychodzen, B. *et al.* Patterns of missplicing due to somatic U2AF1 mutations in myeloid neoplasms. *Blood* **122,** 999–1006 (2013).

532. Papaemmanuil, E. *et al.* Somatic SF3B1 Mutation in Myelodysplasia with Ring Sideroblasts. *N Engl J Med* **365,** 1384–1395 (2012).

533. Cazzola, M., Rossi, M. & Malcovati, L. Biologic and clinical significance of somatic mutations of SF3B1 in myeloid and lymphoid neoplasms. *Blood* **121,** 260–9 (2013).

534. Webb, T. R., Joyner, A. S. & Potter, P. M. The development and application of small molecule modulators of SF3b as therapeutic agents for cancer. *Drug Discov. Today* **18,** 43–9 (2013).

535. Corrionero, A., Miñana, B. & Valcárcel, J. Reduced fidelity of branch point recognition and alternative splicing induced by the anti-tumor drug spliceostatin A. *Genes Dev.* **25,** 445–59 (2011).

536. Roybal, G. a & Jurica, M. S. Spliceostatin A inhibits spliceosome assembly subsequent to prespliceosome formation. *Nucleic Acids Res.* **38,** 6664–72 (2010).

537. Wei, J., Zaika, E. & Zaika, A. p53 Family: Role of Protein Isoforms in Human Cancer. *J. Nucleic Acids* **2012,** 687359 (2012).

538. Fu, Z. Z. and X.-D. Regulation of Splicing by SR proteins and SR Protein-Specific Kinases. *Chromosoma* **122,** 191–207 (2014).

539. Lu, G.-Y. *et al.* Caffeine induces tumor cytotoxicity via the regulation of alternative splicing in subsets of cancer-associated genes. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **47,** 83–92 (2014).

540. Tang, Y. *et al.* Downregulation of splicing factor SRSF3 induces p53β, an alternatively spliced isoform of p53 that promotes cellular senescence. *Oncogene* **32,** 2792–8 (2013).

541. Boise, L. H. *et al.* Bcl-X, a Bcl-2-Related Gene That Functions As a Dominant Regulator of Apoptotic Cell Death. *Cell* **74,** 597–608 (1993).

542. Pio, R. & Montuenga, L. M. Alternative splicing in lung cancer. *J. Thorac. Oncol.* **4,** 674–8 (2009).

543. Cheng, J. *et al.* Protection from Fas-mediated apoptosis by a soluble form of the Fas molecule. *Science* **263,** 1759–62 (1994).

544. Xu, L. *et al.* FASL rs763110 polymorphism contributes to cancer risk: an updated meta-analysis involving 43,295 subjects. *PLoS One* **8,** (2013).

545. Thurner, E.-M. *et al.* Association of genetic variants in apoptosis genes FAS and FASL with radiation-induced late toxicity after prostate cancer radiotherapy. *Strahlenther. Onkol.* **190,** 304–9 (2014).

546. De Craene, B. & Berx, G. Regulatory networks defining EMT during cancer initiation and progression. *Nat. Rev. Cancer* **13,** 97–110 (2013).

547. De Meulder, B. *et al.* Meta-analysis and gene set analysis of archived microarrays suggest implication of the spliceosome in metastatic and hypoxic phenotypes. *PLoS One* **9,** e86699 (2014).

548. Christofk, H. R. *et al.* The M2 splice isoform of pyruvate kinase is important for cancer metabolism and tumour growth. *Nature* **452,** 230–3 (2008).

549. Gabut, M. *et al.* An alternative splicing switch regulates embryonic stem cell pluripotency and reprogramming. *Cell* **147,** 132–46 (2011).

550. Han, H. *et al.* MBNL proteins repress ES-cell-specific alternative splicing and reprogramming. *Nature* **498,** 241–5 (2013).

551. Ferrarese, R. *et al.* Lineage-specific splicing of a brain-enriched alternative exon promotes glioblastoma progression. *J. Clin. Invest.* **7,** 2861–2876 (2014).

552. Yadav, A. K. *et al.* Monosomy of Chromosome 10 Associated With Dysregulation of Epidermal Growth Factor Signaling in Glioblastomas. *JAMA* **302,** 276–289 (2011).

553. Bredel, M. *et al.* A network model of a cooperative genetic landscape in brain tumors. *JAMA* **302,** 261–75 (2009).

554. Lefave, C. V *et al.* Splicing factor hnRNPH drives an oncogenic splicing switch in gliomas. *EMBO J.* **30,** 4084–97 (2011).

555. Al-Zoubi, a M. *et al.* Contrasting effects of IG20 and its splice isoforms, MADD and DENN-SV, on tumor necrosis factor alpha-induced apoptosis and activation of caspase-8 and -3. *J. Biol. Chem.* **276,** 47202–11 (2001).

556. Zhang, Y. *et al.* Identification of a novel recepteur d'origine nantais/c-met small-molecule kinase inhibitor with antitumor activity in vivo. *Cancer Res.* **68,** 6680–7 (2008).

557. Golan-Gerstl, R. *et al.* Splicing factor hnRNP A2/B1 regulates tumor suppressor gene splicing and is an oncogenic driver in glioblastoma. *Cancer Res.* **71,** 4464–72 (2011).

558. Yang, J. & Zhang, W. WWOX tumor suppressor gene. *Histol. Histopathol.* **23,** 877–82 (2008).

559. Pan, K. *et al.* Characterization of bridging integrator 1 (BIN1) as a potential tumor suppressor and prognostic marker in hepatocellular carcinoma. *Mol. Med.* **18,** 507–18 (2012).

560. Ahmed, K. M., Rodrigue, A., Kihara, D. & Carol, B. Identification of a novel effector domain of BIN1 for cancer suppression. *J. Cell. Biochem.* **112,** 2992–3001 (2012).

561. Wang, M.-H., Zhang, R., Zhou, Y.-Q. & Yao, H.-P. Pathogenesis of RON receptor tyrosine kinase in cancer cells: activation mechanism, functional crosstalk, and signaling addiction. *J. Biomed. Res.* **27,** 345–56 (2013).

562. Safa, a R. c-FLIP, a master anti-apoptotic regulator. *Exp. Oncol.* **34,** 176–84 (2012).

563. David, C. J., Chen, M., Assanah, M., Canoll, P. & Manley, J. L. HnRNP proteins controlled by c-Myc deregulate pyruvate kinase mRNA splicing in cancer. **463,** 364–368 (2010).

564. Clower, C. V *et al.* The alternative splicing repressors hnRNP A1/A2 and PTB influence pyruvate kinase isoform expression and cell metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107,** 1894–9 (2010).

565. Babic, I. *et al.* EGFR mutation-induced alternative splicing of Max contributes to growth of glycolytic tumors in brain cancer. *Cell Metab.* **17,** 1000–8 (2013).

566. A spliceosome protein is essential for glioma stem cell viability. *Cancer Discov.* **3,** OF22 (2013).

567. Hubert, C. G. *et al.* Genome-wide RNAi screens in human brain tumor isolates reveal a novel viability requirement for PHF5A. 1032–1045 (2013). doi:10.1101/gad.212548.112.die

568. Corbo, C., Orrù, S. & Salvatore, F. SRp20: an overview of its role in human diseases. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **436,** 1–5 (2013).

569. Thirant, C. *et al.* Differential proteomic analysis of human glioblastoma and neural stem cells reveals HDGF as a novel angiogenic secreted factor. *Stem Cells* **30,** 845–53 (2012).

570. Corbo, C. *et al.* Protein cross-talk in CD133+ colon cancer cells indicates activation of the Wnt pathway and upregulation of SRp20 that is potentially involved in tumorigenicity. *Proteomics* **12,** 2045–59 (2012).

571. He, X. *et al.* Knockdown of splicing factor SRp20 causes apoptosis in ovarian cancer cells and its expression is associated with malignancy of epithelial ovarian cancer. *Oncogene* **30,** 356–365 (2011).

572. Kim, J., Park, R. Y., Chen, J.-K., Jeong, S. & Ohn, T. Splicing factor SRSF3 represses the translation of programmed cell death 4 mRNA by associating with the 5'-UTR region. *Cell Death Differ.* **21,** 481–90 (2014).

573. He, X., Ee, P. L. R., Coon, J. S. & Beck, W. T. Alternative Splicing of the Multidrug Resistance Protein 1 / ATP Binding Cassette Transporter Subfamily Gene in Ovarian Cancer Creates Functional Splice Variants and Is Associated with Increased Expression of the Splicing Factors PTB and SRp20. *Clin. cancer Res.* **10,** 4652–4660 (2004).

574. Draganova, K. *et al.* Wnt/β-catenin signaling regulates sequential fate decisions of murine cortical precursor cells. *Stem Cells* (2014).

575. Kühl, S. J. & Kühl, M. On the role of Wnt/β-catenin signaling in stem cells. *Biochim. Biophys. Acta* **1830,** 2297–306 (2013).

576. Feng, H., Qin, Z. & Zhang, X. Opportunities and methods for studying alternative splicing in cancer with RNA-Seq. *Cancer Lett.* **340,** 179–91 (2013).

577. Sánchez-Pla, A., Reverter, F., Ruíz de Villa, M. C. & Comabella, M. Transcriptomics: mRNA and alternative splicing. *J. Neuroimmunol.* **248,** 23–31 (2012).

578. Kole, R., Krainer, A. R. & Altman, S. RNA therapeutics: beyond RNA interference and antisense oligonucleotides. *Nat. Rev. Drug Discov.* **11,** 125–40 (2012).

579. Bonnal, S., Vigevani, L. & Valcárcel, J. The spliceosome as a target of novel antitumour drugs. *Nat. Rev. Drug Discov.* **11,** 847–59 (2012).

580. Yadav, A. K., Vashishta, V., Joshi, N. & Taneja, P. AR-A 014418 Used against GSK3beta Downregulates Expression of hnRNPA1 and SF2/ASF Splicing Factors. *J. Oncol.* **2014,** 695325 (2014).

581. Rhodes, D. R., Yu, J., Shanker, K., Deshpande, N. & Varambally, R. ONCOMINE : A Cancer Microarray Database and. **6,** 1–6 (2004).

582. Eblen, S. T. Regulation of chemoresistance via alternative messenger RNA splicing. *Biochem. Pharmacol.* **83,** 1063–72 (2012).

583. Dominski, Z. & Kole, R. Restoration of correct splicing in thalassemic pre-mRNA by antisense oligonucleotides. *Biochemistry* **90,** 8673–8677 (1993).

584. Hammond, S. M. & Wood, M. J. a. Genetic therapies for RNA mis-splicing diseases. *Trends Genet.* **27,** 196–205 (2011).

585. Novotny, I., Huranova, M., Wen, X., Sapra, A. K. & Neugebauer, K. M. Spliceosomal Small Nuclear Ribonucleoprotein Particles Repeatedly Cycle through Cajal Bodies. *Mol. Biol. Cell* **19,** 2534–2543 (2008).

586. Hua, Y. *et al.* Antisense correction of SMN2 splicing in the CNS rescues necrosis in a type III SMA mouse model. *Genes Dev.* **24,** 1634–44 (2010).

587. Yokota, T. *et al.* Efficacy of systemic morpholino exon-skipping in Duchenne dystrophy dogs. *Ann. Neurol.* **65,** 667–76 (2009).

588. Lefebvre, S. *et al.* Identification and characterization of a spinal muscular atrophy-determining gene. *Cell* **80,** 155–65 (1995).

589. Teraoka, S. N. *et al.* Splicing Defects in the Ataxia-Telangiectasia Gene , ATM : Underlying. 1617–1631 (1999).

590. Du, L., Pollard, J. M. & Gatti, R. a. Correction of prototypic ATM splicing mutations and aberrant ATM function with antisense morpholino oligonucleotides. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104,** 6007–12 (2007).

591. Gorman, L., Mercatante, D. R. & Kole, R. Restoration of correct splicing of thalassemic beta-globin pre-mRNA by modified U1 snRNAs. *J. Biol. Chem.* **275,** 35914–9 (2000).

592. Gorman, L., Suter, D., Emerick, V., Schümperli, D. & Kole, R. Stable alteration of pre-mRNA splicing patterns by modified U7 small nuclear RNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95,** 4929–34 (1998).

593. Zhuang, Y. & Weiner, a M. A compensatory base change in U1 snRNA suppresses a 5' splice site mutation. *Cell* **46,** 827–35 (1986).

594. Stefanovic, B., Hackl, W., Lührmann, R. & Schümperli, D. Assembly, nuclear import and function of U7 snRNPs studied by microinjection of synthetic U7 RNA into Xenopus oocytes. *Nucleic Acids Res.* **23,** 3141–51 (1995).

595. Skordis, L. a, Dunckley, M. G., Yue, B., Eperon, I. C. & Muntoni, F. Bifunctional antisense oligonucleotides provide a trans-acting splicing enhancer that stimulates SMN2 gene expression in patient fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100,** 4114–9 (2003).

596. Jonathan Villemaire, Isabelle Dion, S. A. E. and B. C. Reprogramming Alternative Pre-messenger RNA Splicing through the Use of Protein-binding Antisense Oligonucleotides. *J. Biol. Chem.* **12,** 50031–50039 (2003).

597. Cartegni, L. & Krainer, A. R. Correction of disease-associated exon skipping by synthetic exon-specific activators. *Nat. Struct. Biol.* **10,** 120–5 (2003).

598. Puttaraju, M., Jamison, S. F., Mansfield, S. G., Garcia-Blanco, M. a & Mitchell, L. G. Spliceosome-mediated RNA trans-splicing as a tool for gene therapy. *Nat. Biotechnol.* **17,** 246–52 (1999).

599. Coady, T. H., Baughan, T. D., Shababi, M., Passini, M. a & Lorson, C. L. Development of a single vector system that enhances trans-splicing of SMN2 transcripts. *PLoS One* **3,** e3468 (2008).

600. Coady, T. H. & Lorson, C. L. Trans-splicing-mediated improvement in a severe mouse model of spinal muscular atrophy Tristan. *J. Neurosci.* **30,** 126–130 (2010).

601. Spraggon, L. & Cartegni, L. U1 snRNP-Dependent Suppression of Polyadenylation : Physiological Role and Therapeutic Opportunities in Cancer A Harbinger of Spliceosome Assembly. *Int. J. Cell Biol.* **2013,** (2013).

602. Sandberg, R., Neilson, J. R., Sarma, A., Sharp, P. A. & Burge, B. Proliferating cells express mRNAs with shortened 3' UTRs and fewer microRNA target sites. *Science (80-. ).* **320,** 1643–1647 (2008).

603. Fu, Y. *et al.* Differential genome-wide profiling of tandem 3' UTRs among human breast cancer and normal cells by high-throughput sequencing. *Genome Res.* **21,** 741–7 (2011).

604. Morris, A. R. *et al.* Alternative cleavage and polyadenylation during colorectal cancer development. *Clin. Cancer Res.* **18,** 5256–66 (2012).

605. Vorlová, S. *et al.* Induction of Antagonistic Soluble Decoy Receptor Tyrosine Kinases by Intronic PolyA Activation. *Mol. Cell* **43,** 927–939 (2013).

606. Spraggon, L. & Cartegni, L. Antisense modulation of RNA processing as a therapeutic approach in cancer therapy. *Drug Discov. Today Ther. Strateg.* (2013).

607. Weirauch, U., Grünweller, A., Cuellar, L., Hartmann, R. K. & Aigner, A. U1 adaptors for the therapeutic knockdown of the oncogene pim-1 kinase in glioblastoma. *Nucleic Acid Ther.* **23,** 264–72 (2013).

608. Pilch, B. *et al.* Specific Inhibition of Serine- and Arginine-rich Splicing Factors Phosphorylation , Spliceosome Assembly , and Splicing by the Antitumor Drug NB-506 Specific Inhibition of Serine- and Arginine-rich Splicing Factors Phosphorylation , Spliceosome Assembly ,. *Cancer Res.* **61,** 6876–6884 (2001).

609. Wotawa, A., Solier, S., Logette, E., Solary, E. & Corcos, L. Differential influence of etoposide on two caspase-2 mRNA isoforms in leukemic cells. *Cancer Lett.* **185,** 181–9 (2002).

610. Stéphanie Solier, Amélie Lansiaux, Emmanuelle Logette, et al. Topoisomerase I and II Inhibitors Control Caspase-2 Pre-Messenger RNA Splicing in Human Cells. *Mol. Cancer Res.* **2,** 53–61 (2004).

611. Zaharieva, E., Chipman, J. K. & Soller, M. Alternative splicing interference by xenobiotics. *Toxicology* **296,** 1–12 (2012).

612. O'Brien, K., Matlin, A. J., Lowell, A. M. & Moore, M. J. The biflavonoid isoginkgetin is a general inhibitor of Pre-mRNA splicing. *J. Biol. Chem.* **283,** 33147–54 (2008).

613. Yoon, S.-O., Shin, S., Lee, H.-J., Chun, H.-K. & Chung, A.-S. Isoginkgetin inhibits tumor cell invasion by regulating phosphatidylinositol 3-kinase/Akt-dependent matrix metalloproteinase-9 expression. *Mol. Cancer Ther.* **5,** 2666–75 (2006).

614. Anderson, E. S. *et al.* The cardiotonic steroid digitoxin regulates alternative splicing through depletion of the splicing factors SRSF3 and TRA2B. *RNA* **18,** 1041–9 (2012).

615. Muraki, M. *et al.* Manipulation of alternative splicing by a newly developed inhibitor of Clks. *J. Biol. Chem.* **279,** 24246–54 (2004).

616. Chang, J.-G. *et al.* Small molecule amiloride modulates oncogenic RNA alternative splicing to devitalize human cancer cells. *PLoS One* **6,** (2011).

617. Berg, M. G. *et al.* A quantitative high-throughput in vitro splicing assay identifies inhibitors of spliceosome catalysis. *Mol. Cell. Biol.* **32,** 1271–83 (2012).

618. Leucci, E. *et al.* microRNA-9 targets the long non-coding RNA MALAT1 for degradation in the nucleus. *Sci. Rep.* **3,** 2535 (2013).

619. Salmena, L., Poliseno, L., Tay, Y., Kats, L. & Pandolfi, P. P. A ceRNA hypothesis: the Rosetta stone of a hidden RNA language? *Cell* **146,** 353–358 (2012).

620. Franklin, J. L. *et al.* Malignant transformation of colonic epithelial cells by a colon-derived long noncoding RNA. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **440,** 99–104 (2013).

621. Liz, J. *et al.* Regulation of pri-miRNA Processing by a Long Noncoding RNA Transcribed from an Ultraconserved Region. *Mol. Cell* **55,** 138–47 (2014).

622. Plosky, B. S. An Ultraconserved lnc to miRNA Processing. *Mol. Cell* **55,** 3–4 (2014).

623. Verduci, L. *et al.* MicroRNA (miRNA)-mediated interaction between leukemia/lymphoma-related factor (LRF) and alternative splicing factor/splicing factor 2 (ASF/SF2) affects mouse embryonic fibroblast senescence and apoptosis. *J. Biol. Chem.* **285,** 39551–63 (2010).

624. Meseguer, S., Mudduluru, G., Escamilla, J. M., Allgayer, H. & Barettino, D. MicroRNAs-10a and -10b contribute to retinoic acid-induced differentiation of neuroblastoma cells and target the alternative splicing regulatory factor SFRS1 (SF2/ASF). *J. Biol. Chem.* **286,** 4150–64 (2011).

625. Kelemen, O. *et al.* Function of alternative splicing. *Gene* **514,** 1–30 (2013).

626. Tripathi, V. *et al.* The Nuclear-Retained Noncoding RNA MALAT1 Regulates Alternative Splicing by Modulating SR Splicing Factor Phosphorylation. *Mol. Cell* **39,** 925–938 (2014).

627. Bardou, F. *et al.* Long Noncoding RNA Modulates Alternative Splicing Regulators in Arabidopsis. *Dev. Cell* **30,** 166–176 (2014).

628. Rajan, K. S. & Ramasamy, S. Retrotransposons and piRNA: The missing link in central nervous system. *Neurochem. Int.* (2014).

629. Sarkar, A., Maji, R. K., Saha, S. & Ghosh, Z. piRNAQuest: searching the piRNAome for silencers. *BMC Genomics* **15,** 555 (2014).

630. Ross, R. J., Weiner, M. M. & Lin, H. PIWI proteins and PIWI-interacting RNAs in the soma. *Nature* **505,** 353–9 (2014).

631. Abel, Y., Clerget, G., Bourguignon-igel, V. & Salone, V. Les petits ARN nucléolaires nous surprennent encore ! 297–302 (2014).

632. Matera, a G., Terns, R. M. & Terns, M. P. Non-coding RNAs: lessons from the small nuclear and small nucleolar RNAs. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **8,** 209–20 (2007).

633. Mannoor, K., Shen, J., Liao, J., Liu, Z. & Jiang, F. Small nucleolar RNA signatures of lung tumor-initiating cells. *Mol. Cancer* **13,** 104 (2014).

634. Huse, J. T. & Aldape, K. D. The molecular landscape of diffuse glioma and prospects for biomarker development. *Expert Opin. Med. Diagn.* **7,** 573–87 (2013).

635. Su, H. *et al.* Elevated snoRNA biogenesis is essential in breast cancer. *Oncogene* **33,** 1348–58 (2014).

636. Sadeque, A., Serão, N. V., Southey, B. R., Delfino, K. R. & Rodriguez-Zas, S. L. Identification and characterization of alternative exon usage linked glioblastoma multiforme survival. *BMC Med. Genomics* **5,** 59 (2012).

637. Hentze, M. W. & Preiss, T. Circular RNAs: splicing's enigma variations. *EMBO J.* **32,** 923–5 (2013).

638. Babae, N. *et al.* Systemic miRNA-7 delivery inhibits tumor angiogenesis and growth in murine xenograft glioblastoma. *Oncotarget* **5,** 6687–6700 (2014).

639. Martens-Uzunova, E. S., Olvedy, M. & Jenster, G. Beyond microRNA--novel RNAs derived from small non-coding RNA and their implication in cancer. *Cancer Lett.* **340,** 201–11 (2013).

640. Dillman, A. A. & Cookson, M. R. Transcriptomic changes in brain development. *Int. Rev. Neurobiol.* **116,** 233–50 (2014).

641. Johnson, M. B. *et al.* Functional and Evolutionary Insights Into Human Brain Development Through Global Transcriptome Analysis. *Neuron.* **62,** 494–509 (2010).

## ANNEXES

**Tableau 16: Résumé des interactions identifiées entre les microARNs, les lncARNs et les ARNsn**

| Intéraction | Type d'intéraction | Rôle et exemple lors de la tumorigenèse ou la gliomagenèse : | Références |
|---|---|---|---|
| microARN/ lncARN | - microARN provoquant la dégradation des lncARN | Plusieurs lncARN sont ciblés par des microARN puis dégradés. miR-9 par exemple cible le lncARN MALAT1 et conduit à sa dégradation (au sein du noyau) dans une lignée cellulaire de GBM (U87MG). H19 possède lui 4 sites de liaison à let7. | Leucci et al., 2013; Kallen et al., 2013. |
| | -lncARN piègeant les miARN | Les lncARN sont à l'inverse capables de réguler la concentration des microARN. Les lncARN seraient des «senseurs» de microARN. Le pseudogène *PTENP1* contrôle l'expression de *PTEN* en bloquant les microARN ciblant l'ARNm de *PTEN*. Le locus *PTENP1* est perdu dans de nombreux cancers. | Poliseno et al., 2010; Salmena et al., 2010. |
| | -lncARN entrant en compétition avec les miARN pour la liaison à l'ARNm | En se liant à l'ARNm cible des microARN, certains lncARN peuvent inhiber compétitivement la fonction des miR («ARN endogènes compétitifs» ou ARNce).Par exemple le lncARN oncosuppresseur ncNRFR (non-coding NRAS functional RNA) contient une séquence identique à celle de let-7a. | Franklin et al., 2013. |
| | -lncARN générant des microARN | Certains lncARN sont fractionnés de manière à générer plusieurs microARN. Par exemple lncARN H19 sert de précurseur au miR-675. En fonction du contexte cellulaire le couple H19/miR-675 a été décrit comme un pro-(gliome) ou anti-(carcinome prostatique) oncogène. | Zhu et al., 2014; Shi et al., 2014. |
| | - lncARN inhibant la maturation des pri-miARN en pré-miARN | Un lncARN issu de régions ultraconservées du génome (Uc.283+A) a récemment été décrit comme inhibant la maturation du pri-miR-195 (inhibition du clivage par Drosha par interaction ARN/ARN). | Liz et al., 2014, Plosky et al., 2014. |
| microARN/ ARNsn | -microARN ciblant directement l'ARNm des facteurs d'épissage. | miR-124, en ciblant l'ARNm du facteur d'épissage PTBP1 (PTB/hnRNP1) contribue indirectement à augmenter l'expression d'un homologue de PTBP1 (PTBP2). PTBP2 permet la mise en place de programmes d'EA spécifique du système nerveux. L'amplification de PTBP1 par perte de miR-124 a récemment été impliquée dans la progression du GBM: l'EA aberrante de l'oncosuppresseur ANXA7 par PTBP1 induit une surexpression de l'EGFR (diminution de sa dégradation endosomale). | Eugène et al., 2011; Ferrarese et al., 2014. |
| | | D'autre part, plusieurs microARN (miR-10a/10b, miR-28, miR-505) en ciblant directement SRSF1 (SF2/ASF) jouent un rôle central dans le maintien de l'homéostasie cellulaire du SNC (différenciation, apoptose-sénescence, prolifération). L'importance de ces boucles de rétrocontrôle suggère un rôle important dans le développement du GBM. | Verduci et al., 2010; Meseguer et al., 2011. |
| | - génération de transcrits dépourvu d'extrémité 3'UTR par les U1-snRNP(APA) et inhibition de la liaison de microARN | U1-snRNP exerce une fonction indépendamment de son rôle lors de l'EA. U1-snRNP garantit l'intégrité des pré-ARNm en inhibant l'utilisation de sites de polyadénylation prématurés et la formation de variants tronqués. L'altération des fonctions de U1-snRNP affecte directement l'expression de gènes et est associée à la prolifération et à la transformation cellulaire (variants oncogéniques dépourvus d'extrémité 3'UTR). La pertinence de ce processus a été récemment démontrée dans le GBM. | Spraggon et Cartegni., 2013; Sandberg et al., 2008; Mayr et Bartel., 2009; Weirauch et al.,2013. |
| | - autres modes de régulation non-identifiés. | | |
| lncARN/ ARNsn | -lncARN régulant la phosphorylation des facteurs d'épissage SR | MALAT1 a été impliqué dans la régulation de l'EA par sa capacité à modifier la phosphorylation des facteurs d'épissage SR et ainsi leur activité. MALAT1 a été impliqué dans l'oncogenèse et la progression du GBM. | Kelemen et al., 2013; Tripathi et al., 2014, Bardou et al., 2014, Almeidea et al., |
| | -lncARN entrant en compétition avec les ARNsn pour la liaison à l'ARNm. | | |
| | -autres hypothèses: modification de la chromatine par les lncARN qui impacte l'EA. | D'autre part, certains modèles eucaryotes ont récemment permis la mise en évidence d'un modèle de régulation par compétition entre les lncARN et les ARNsn. | |

**Tableau 17: Principaux ARN non-codants dont la caractérisation fonctionnelle émerge**

| Type d'ARN non-codants | Définition | Fonction(s) | Références |
|---|---|---|---|
| Les piARN | - petits ARN de 24-32 nucléotides interagissant avec les protéines de la sous-famille de protéines Argonaute PIWI (PIWI, MIWI, MILI, HIWI, HILI).<br>- les piARN ont été décrits comme présents principalement au sein des cellules germinales et souches. Toutefois, des études ont démontré leur présence dans les cellules somatiques.<br>-Le mécanisme exact de leur biogenèse n'est pas élucidé.<br>-Les piARN sont à l'interface de la biologie des cellules souches et de celle des petits ARN non-codants. | - Les piARN interviennent dans des processus biologiques variés lors du développement embryonnaire et notamment le maintien des capacités l'autorenouvellement des cellules souches.<br>- Les piARN exercent également des propriétés dans les cellules somatiques en protégeant le génome des transposons (inhibition de l'insertion d'acides nucléiques parasites), en réarrangeant le génome par reprogrammation épigénétique notamment. La démonstration de la régulation des rétrotransposons par les piARN a été faite au sein du CNS.<br>-le mode d'action des piARN dépend de leur localisation au sein du génome. Il est donc primordial de les cartographier<br>- les piARN sont présents dans différents cancers. Leur rôle dans la tumorigenèse est controversé: Confère-t-il aux cellules un avantage sélectif en permettant leur dédifférenciation? ou en inhibant les transposons? Quelle est la fonction des piARN exprimés dans les cellules (souches) cancéreuses? Sont-ils indispensables à leur maintien?<br>- les piARN peuvent-ils servir de biomarqueurs ou de cible thérapeutique au sein de certaines tumeurs? | Sakar et al., 2014; Ross et al., 2014; Rajan et al., 2014. |
| Les snoARN | -Les snoARN «small nucleolar» sont de petits ARN nucléolaires non-polyadénylés exerçant leur fonction dans le nucléoplasme.<br>- On distingue 2 familles de snoARNs aux structures différentes: les snoARN C/D et les H/ACA.<br>-Plus de 300 snoARN différents sont recensés.<br>- La plupart des snoARN sont codés à partir de régions introniques et ciblent les ARNr et les ARNsn.<br>- Les snoARN ne possèdent pas d'activité catalytique propre, mais fonctionnent en s'associant à des protéines catalytiques «aveugles» qu'ils guident vers leur ARN cible.<br>- Les snoARN dont aucune séquence cible complémentaire n'a été identifié sont qualifiés de snoARN orphelins. La caractérisation de leur fonction revêt un intérêt scientifique majeur. | - la première fonction identifiée des snoARN est leur capacité à modifier post-transcriptionnellement les ARN ribosomiques (ARNr) et les petits ARN nucléaires (ARNsn) par clivages, méthylations de nucléotides sur les riboses ou isomérisation des uridines (pseudouridylations).<br>- Les snoARN peuvent servir de «précurseurs à d'autres ARN non-codants» impliqués dans l'extinction de l'expression de gènes: les ARNsd «snoRNA-derived small RNA» ou petits ARN dérivées de snoARN. Ainsi, certains microARN «dériveraient» de snoARN modifiés au cours de l'évolution.<br>- Une étude récente semble impliquer certains snoARN orphelins dans la régulation de l'édition et de l'épissage alternatif par liaison au pré-ARNm (SNORD115).<br>- De nouvelles études tendent à impliquer les snoARN dans l'initiation et la progression tumorale. La perte de snoARN lors de la gliomagenèse a été démontrée. Plusieurs hypothèses coexistent pour expliquer leur implication: défaut de maturation des ARN ribosomiques cibles des snoARN production de microARN à partir de précurseurs snoARN.<br>- D'autre part, les snoARN se sont révélés être des biomarqueurs circulants pertinents dans la progression du GBM. | Abel et al., 2014; Matera et al., 2007; Zhang et al., 2014; Mannoor et al., 2014; Huse et al., 2013; Su et al., 2014; Sadeque et al., 2012. |
| Les circARN | -les ARN circulaires sont des ARN longs non-codants formés par l'épissage en «tête à queue/circulaire» de deux exons ou dérivés de l'exclusion inefficace d'introns en lasso. | Bien que la biogenèse et la fonction de la majorité des circARN restent floues, de récentes études ont commencé à élucider leur implication dans la régulation de l'expression des gènes. Certains circARN fonctionnent comme des «éponges de microARN» et inhibent leur fonctionnement en les séquestrant et en inhibant la liaison à leur ARNm cible. L'ARN circulaire *CDR1as* (transcrit anti-sens apparenté à la protéine de la dégénérescence cérébelleuse), de 1,5 kb est majoritairement exprimé dans le cerveau et possède plus de 70 sites de liaisons au miR-7 et a la capacité de lier plus de 20 000 miR-7, prévenant ainsi le fonctionnement de miR-7. La sous-expression de miR-7 a été impliquée dans le développement de différents cancers dont le GBM. | Zhang et al., 2014; Hentze et al., 2013; Memczak et al., 2013; Babae et al., 2014. |
| Les ARNt | Les petits ARNt sont des fragments de molécules d'ARNt (ARN de transfert) classés selon leur taille. On distingue 2 sous-types principaux: les demi-ARNt de 30 à 35 nucléotides et les petits fragment d'ARNt d'environ 20 nucléotides. Les mécanismes de la biogenèse de ces petits ARNt ne sont pas entièrement élucidés. | Bien que les fragments dérivés des ARNt soient abondants, leur fonction reste pour l'instant inconnue. Néanmoins, plusieurs études suggèrent que ces ARNt puissent être des effecteurs de voies de signalisation du stress oxydant et réguler l'expression génique par des mécanismes alternatifs impliquant des voies de signalisation anciennes. La compréhension du rôle des ARNt dans la tumorigenèse permettra de développer des biomarqueurs et des stratégies thérapeutiques ciblant les ARNt oncogéniques ou rétablissant l'expression d'ARNt protecteurs perdus. | Martens-Uzunova et al., 2013 |

**N° d'identification :**

**TITRE:**

# ARN non-codants et glioblastome : futurs outils diagnostiques, pronostiques et thérapeutiques.

**Thèse soutenue le 1 décembre 2014**

**par Marion BRUELLE**

**RÉSUMÉ :**

Les glioblastomes multiformes représentent les tumeurs cérébrales primitives les plus fréquentes et les plus graves de l'adulte. En France, on estime à 2000 le nombre de nouveaux cas histologiques par an. Les patients atteints de glioblastome ont une survie médiane d'environ un an et un taux de survie sans progression à 5 ans de seulement 2 % malgré un traitement lourd associant chirurgie, radio-et/ou chimiothérapie. De nombreuses données suggèrent que ces tumeurs primitives sont organisées de manière hiérarchique. L'initiation et le maintien des glioblastomes seraient assurés par une sous-population de cellules souches cancéreuses, les cellules souches de glioblastome. L'activité des cellules souches de glioblastome étant au cœur des échecs thérapeutiques et des récidives tumorales, il est primordial d'identifier des marqueurs fiables de ces cellules et de définir les processus moléculaires contrôlant leur maintien et leur survie, afin de développer des stratégies anti-tumorales innovantes plus ciblées et efficaces. Dans ce contexte, l'utilisation de technologies génomiques, transcriptomiques ou protéomiques a permis l'identification d'aberrations génomiques et d'altérations des profils d'expression de nombreux gènes dans les glioblastomes et dans les cellules souches de glioblastome. Ainsi, de récentes études ont mis en évidence l'implication des ARN non-codants dans le maintien des circuits géniques indispensables à la progression et au maintien des glioblastomes. La fonction des principaux ARN non-codants (microARN, ARN longs non-codants, petits ARN nucléaires) ainsi que les altérations d'expression rencontrées au sein des glioblastomes sont décrites. Enfin, nous évaluons le potentiel de ces ARN non-codants comme biomarqueurs diagnostiques, pronostiques et/ou prédictifs ainsi que les stratégies thérapeutiques développées pour rétablir les taux d'expression de ces ARN et enrayer la progression des glioblastomes.

**MOTS CLES :** ARN Non-codants, Glioblastome, Biomarqueurs, Diagnostique, Pronostique

| Directeur de thèse | Intitulé du laboratoire | Nature |
|---|---|---|
| **Bertrand RIHN** | **Biochimie, Biologie moléculaire** | **Expérimentale** ☐<br>**Bibliographique** ☒<br>**Thème** ☐ |

**Thèmes**

**1 – Sciences fondamentales**
**2 – Hygiène/Environnement**
**3 – Médicament**
**4 – Alimentation – Nutrition**
**5 - Biologie**
**6 – Pratique professionnelle**

FACULTE DE PHARMACIE UNIVERSITE DE LORRAINE

# DEMANDE D'IMPRIMATUR

Date de soutenance : 01/12/2014

**DIPLOME D'ETAT DE DOCTEUR EN PHARMACIE**

présenté par : Marion BRUELLE

Sujet : ARN non-codants et glioblastome: futurs outils diagnostiques, pronostiques et thérapeutiques

Jury :

Président : Pr Jean-Louis Merlin
Directeur : Pr Bertrand Rihn
Juges : Dr Alexandre Harlé
Dr Olivier Joubert
Dr Mohamed Zaiou
Dr Alain Le Faou

Vu,

Nancy, le 05 XI 14

Le Président du Jury Directeur de Thèse

Pr Jean-Louis MERLIN
Biologie cellulaire oncologique
Faculté de Pharmacie
5 rue Albert Lebrun
54001 NANCY CEDEX FRANCE

Professeur B. RIHN
Université de Lorraine

Vu et approuvé,

Nancy, le 17.11.2014

Doyen de la Faculté de Pharmacie de l'Université de Lorraine,

UNIVERSITE DE LORRAINE
*Francine PAULUS*
FACULTE DE PHARMACIE

Vu,

Nancy, le

Le Président de l'Université de Lorraine,

Pour le Président et par délégation
Le Vice-Président
Martial DELIGNON
*Pierre MUTZENHARDT*

N° d'enregistrement : 6773