

# L'expression de microARN du locus soumis à empreinte parentale 14q32 (DLK1-MEG3) est modulée par la bêta-caténine dans le carcinome corticosurrénalien

Justine Cristante<sup>1</sup>, Josiane Denis<sup>1</sup>, Christophe Battail<sup>1</sup>, Bruno Ragazzon<sup>2</sup>, Olivier Chabre<sup>3</sup>, Laurent Guyon<sup>1</sup>, Nadia Cherradi<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Univ. Grenoble Alpes, INSERM, CEA, IRIG, Biology du Cancer et de l'Infection UMR\_S 1036

<sup>2</sup>Institut Cochin, U1016, CNRS (UMR 8104), Université Paris Descartes, Paris, France

<sup>3</sup>Centre Hospitalier Universitaire Grenoble Alpes, Service d'Endocrinologie, Grenoble, France

\* nadia.cherradi@cea.fr

## INTRODUCTION

Le carcinome corticosurrénalien (CCS) est un cancer rare, de pronostic sombre. Notre équipe a précédemment montré que l'expression des microARN (miRs) est dérégulée dans le CCS et que miR-139-5p était fortement surexprimé dans les CCS agressifs<sup>(1,2)</sup>. Les travaux de génomique intégrée<sup>(3)</sup> des réseaux COMETE et ENSAT ont montré que les CCS agressifs avaient un fort taux de mutation et que 39% des tumeurs présentaient une activation de la voie Wnt/ $\beta$ -cat.

Par ailleurs, nous avons également montré que certains microARN (miRs) du locus soumis à empreinte parentale 14q32 (DLK1-MEG3) étaient surexprimés dans les CCS agressifs (récidivants dans les 3 ans/métastatiques au diagnostic) comparés aux CCS indolents et aux adénomes. Ces données ont été confirmées par les travaux des réseaux COMETE/ENSAT.

## OBJECTIFS

Evaluer l'impact de l'activation de la voie Wnt/ $\beta$ -caténine sur l'expression des miRs dans les cellules de carcinome corticosurrénalien NCI H295R.

## MATERIELS ET METHODES

### Culture cellulaire

Les NCI H295R exprimant un shRNA- $\beta$ -caténine inducible par la Doxycycline sont incubées dans du milieu DMEM-F12 contenant 5% de NuSerum (Corning), 1% d'ITS. La sélection des cellules ayant incorporé le shRNA était effectuée grâce à l'ajout de Zéocine et Blastocidine dans le milieu. Les cellules étaient ensuite incubées dans du milieu sans Doxycycline (Dox-) ou avec de la Doxycycline à 0.4mg/mL (Dox+).

➤ Pour les analyses bioinformatiques, le transcriptome est issu de cellules lysées à J10 après incubation dans du milieu Dox- ou Dox+.

➤ Les analyses de PCR quantitatives sur les microARNs ont été réalisées sur des cellules lysées à J0, J3, J5 et J7 après incubation dans du milieu Dox- ou Dox+

### Analyses bio-informatiques

Le miRnome a été analysé par RNA-Seq (plateforme Illumina NextSeq, CNRGH, Evry). L'expression différentielle des miRs a été analysée par le logiciel Rstudio. Un miR a été considéré comme si le nombre de read par million était supérieur à 2<sup>4</sup>. Un miR a été considéré comme différentiellement exprimé entre les cellules Dox- ( $\beta$ -cat+) et les cellules Dox+ ( $\beta$ -cat-) si le Log Fold Change (LFC) était <-1 ou >1.

Le logiciel miRviz (<http://mirviz.prabi.fr/>) a été utilisé pour visualiser la position génomique des miRs.

Les miRs candidats choisis étaient à la fois différentiellement exprimés et pronostiques de la survie (p-valeur calculée sur la cohorte de Assié et al<sup>(3)</sup>, test du Log Rank)

### PCR quantitative des gènes

➤ La Rétrotranscription (RT) a été réalisée sur 1 $\mu$ g d'ARN total (iScript cDNA Synthesis Kit, Bio-Rad)

➤ La qPCR a été réalisée grâce à l'enzyme Sso Advanced (Biorad)

➤ Les gènes HPRT et RPL13A ont été utilisés comme gènes de référence.

### Western Blot

L'expression de la  $\beta$ -caténine a été analysée par western blot à l'aide d'un anticorps monoclonal anti- $\beta$ -caténine (2 $\mu$ g/mL, Cell Signalling) puis un anticorps monoclonal anti- $\beta$ -actine (1/5000, Sigma Aldrich)

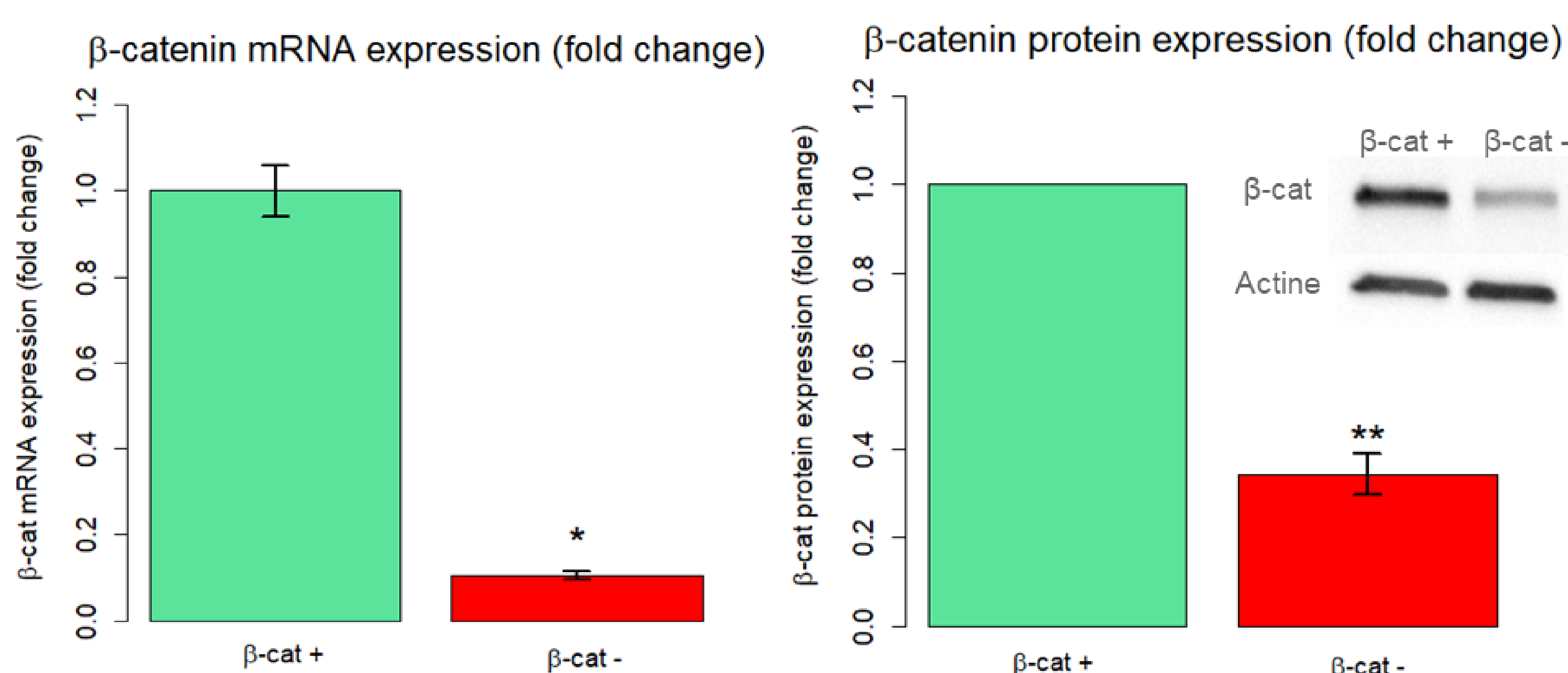
### PCR quantitative des miRs

➤ La RT-PCR a été réalisée à l'aide de sondes Taqman (Taqman miRNA assays, Universal Master Mix II, Applied Biosystem)

➤ RNU48 a été utilisé comme gène de référence

## RESULTATS (1)

### 1. Diminution de l'expression de la $\beta$ -caténine dans les cellules induites par la Doxycycline, au niveau transcriptionnel et au niveau protéique



➤ L'expression de l'ARNm et de la protéine  $\beta$ -cat diminue d'environ 90% et 66%, respectivement, après 48h d'induction des shRNA par la doxycycline

➤ Ces résultats confirment ceux de Gaujoux et al<sup>(4)</sup>, rapportant une diminution de l'expression au niveau transcriptionnel et au niveau protéique dès 48h et maintenue jusqu'à J10 dans ce modèle cellulaire

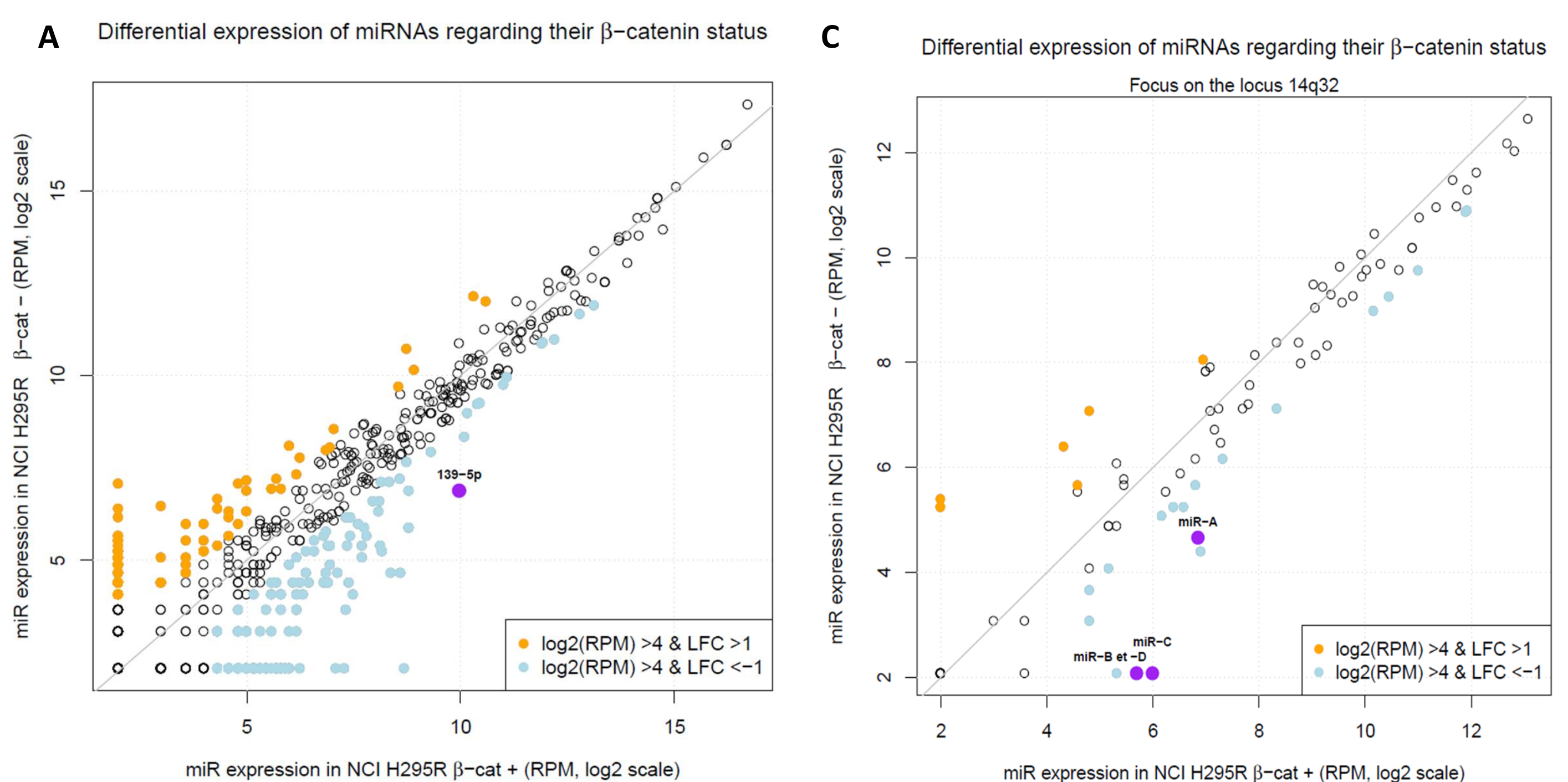
## RESULTATS (2)

### 2. Analyses bio-informatiques

➤ L'analyse bio-informatique a permis de mettre en évidence les miRs différentiellement exprimés entre les cellules exprimant ou non la  $\beta$ -cat (figure A).

➤ L'analyse de la position génomique par miRviz a permis de mettre en évidence un cluster de miRs sous-exprimés (en vert, figure B) dans le locus 14q32. Sur les 97 miRs de ce locus, 78 sont exprimés : 20 sont sous-exprimés et 7 sont sur-exprimés lorsque l'on inhibe l'expression de la  $\beta$ -cat.

➤ Une analyse plus fine de ce cluster (figure C) a permis de sélectionner 4 miRs candidats (miRs-A, B, C et D), qui étaient à la fois sous-exprimés lors de l'extinction de la  $\beta$ -cat et pronostiques d'une moins bonne survie.

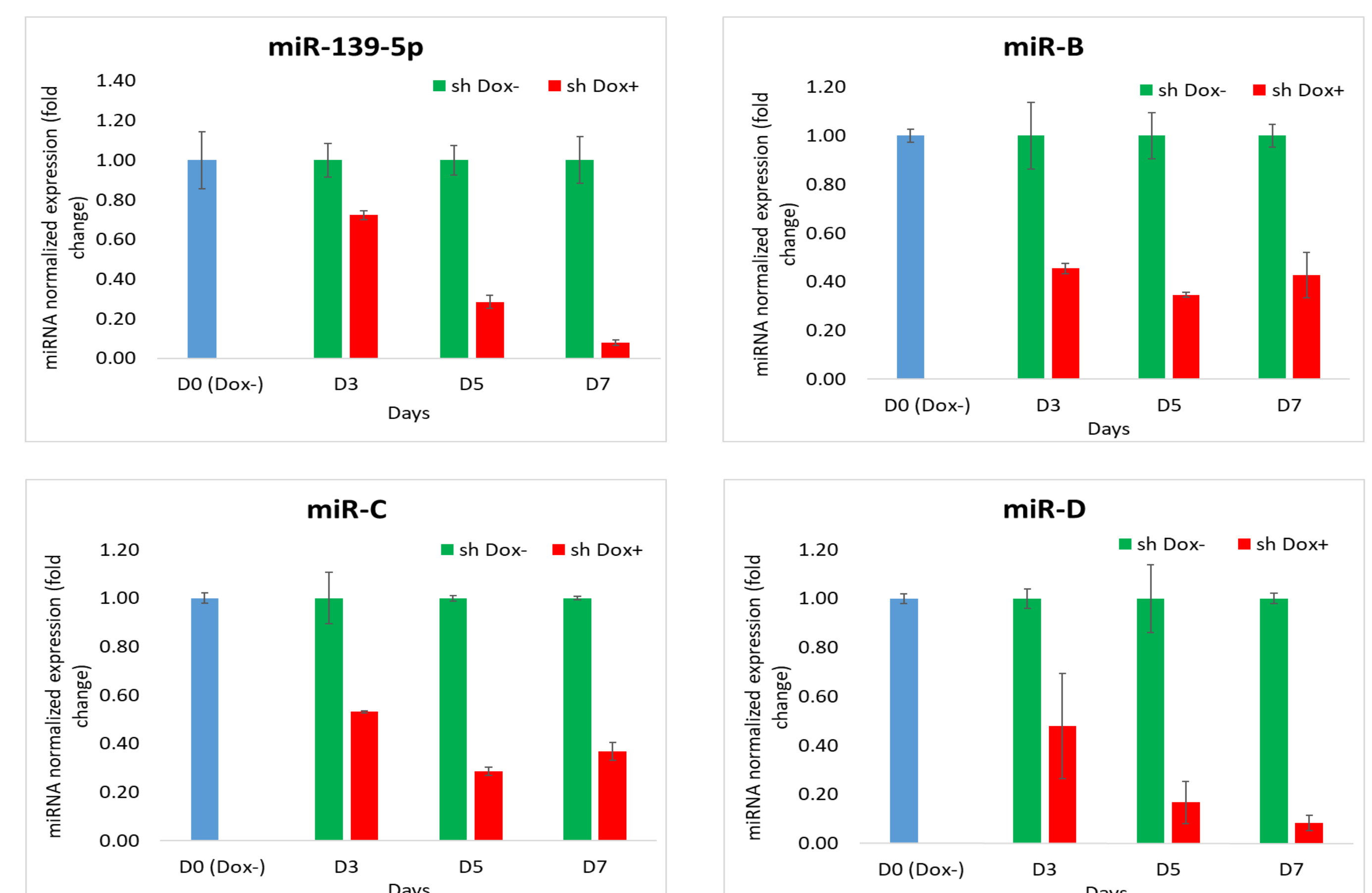


### 3. PCR quantitative

➤ L'expression de miR-139-5p diminue progressivement jusqu'à 90% de l'expression initiale à J7

➤ MiRs candidats du locus 14q32

- miR-A est très peu exprimé dans nos cellules (Ct > 35)
- L'expression de miR-B et C diminue dès J3 et cette diminution est stable jusqu'à J7
- L'expression de miR-D diminue de manière progressive



## CONCLUSION

○ Le niveau d'expression de la  $\beta$ -caténine module le niveau d'expression de certains microARNs dans le CCS, et la diminution de l'expression de la  $\beta$ -caténine semble corrélée à la baisse d'expression d'une grande partie des miRs du locus 14q32.

○ Les premiers résultats de PCR quantitative semblent confirmer cette hypothèse. Des expériences additionnelles sont en cours.

○ Les mécanismes moléculaires mis en jeu par la  $\beta$ -caténine dans ces régulations ainsi que le rôle des miRs candidats dans le phénotype agressif du CCS sont en cours d'investigation

### Références

- (1) Chabre et al, *Endocrine Related Cancer*, 2013
- (2) Agosta et al, *International Journal of Cancer*, 2018
- (3) Assié et al, *Nature Genetics*, 2014
- (4) Gaujoux et al, *Plos One*, 2013