



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-theses-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>

Ecole Doctorale BioSE (Biologie-Santé-Environnement)

Thèse

Présentée et soutenue publiquement pour l'obtention du titre de

DOCTEUR DE L'UNIVERSITE DE LORRAINE

Mention : « Sciences de la Vie et de la Santé »

par **Guillaume GAUCHOTTE**

**PROLIFERATION CELLULAIRE ET PROTEINE HUR DANS LES
MENINGIOMES**

4 avril 2014

Membres du jury :

Rapporteurs :	Mme Marie-Pierrette CHENARD-NEU	PU-PH, Université de Strasbourg
	M. François LABROUSSE	PU-PH, Université de Limoges
Examineurs :	M. Luc TAILLANDIER	PU-PH, Université de Poitiers
	M. Jean-Louis GUEANT	PU-PH, UMR U954 INSERM, Université de Lorraine, Nancy
	M. Jean-Michel VIGNAUD	PU-PH, UMR U954 INSERM, Université de Lorraine, Nancy, directeur de thèse
	Mme Shyue-Fang BATTAGLIA-HSU	MCU-PH, UMR U954 INSERM, Université de Lorraine, Nancy, co- directeur de thèse

Sommaire

Sommaire.....	2
Liste des illustrations et des tableaux	7
Liste des abréviations	9
Remerciements	11
Introduction	15
Avant propos	15
I. Généralités sur les méningiomes.....	16
II. Diagnostic anatomo-pathologique	17
III. Principes thérapeutiques et embolisation	18
IV. Grade histologique et prolifération dans les méningiomes	22
V. Protéine Hur (ELAV-like 1).....	24
A. Expression de HuR et cancer	26
a. Approche expérimentale	26
b. Expression de HuR dans les tissus tumoraux	27
B. Mécanismes de régulation de la protéine HuR	29
a. Localisation subcellulaire	29
b. Niveau global d'expression de HuR	29
Objectifs	31
Matériel et Méthodes	32
I. Etude clinico-pathologique.....	32
A. Population étudiée et données cliniques	32
B. Analyse histologique.....	32
C. Etude immunohistochimique	33
a. Technique d'immunohistochimie	33

b. Marqueurs de prolifération et du cycle cellulaire (Ki-67, MCM6, cycline D1, PHH3, p53).....	34
c. Niveaux d'expression de HuR et méthylHuR.....	34
D. Analyse de méthylHuR en microscopie confocale par technique Duolink	36
E. Quantification des microARNs miR16 et miR519 par qRT-PCR	37
a. Extraction d'ARN	37
b. Technique de qRT-PCR et quantification.....	38
II. Etude expérimentale	39
A. Lignée cellulaire.....	39
B. Conditions de culture	39
a. Culture standard en normoxie	39
b. Culture en hypoxie.....	40
C. Inhibition de HuR par siRNA	40
D. Croissance cellulaire	40
E. Analyse de HuR, Ki-67 et caspase 3 clivée en immunofluorescence.....	41
F. Extraction protéique et Western Blot.....	42
G. Effets de miR16 et miR519 sur l'expression de HuR et la prolifération : étude préliminaire.....	43
III. Analyse statistique.....	44
A. Etude clinico-pathologique	44
a. Grade histologique, prolifération et marqueurs du cycle cellulaire	44
b. Expression de HuR et méthylHuR.....	44
B. Etude expérimentale.....	45
Résultats	46
I. Etude clinico-pathologique.....	46
A. Caractéristiques de la population étudiée et données cliniques	46
B. Sous-types histologiques et établissement du grade	47
C. Indice mitotique et marqueurs de prolifération et du cycle cellulaire.....	50

a.	Indice mitotique	50
b.	Ki-67	50
c.	MCM6	51
d.	Phospho-histone H3	52
e.	Cycline D1	55
f.	P53	55
g.	Corrélation entre les marqueurs	55
D.	Expression de HuR et de méthylHuR	56
a.	Valeur pronostique de l'expression de HuR dans les méningiomes	56
b.	Western blot	60
c.	Expression de méthyl(R217)HuR et corrélation avec HuR	61
d.	Localisation subcellulaire de méthyl-arginine et HuR par technique Duolink	63
E.	Quantification des microARNs miR16 et miR519	65
a.	MiR16	65
b.	MiR519	66
II.	Etude expérimentale	67
A.	Expression de HuR	67
B.	Effets de l'inhibition de HuR et de l'hypoxie sur la croissance cellulaire..	69
C.	Effets de l'hypoxie et de siHuR sur l'indice prolifératif.....	71
D.	Effets de l'hypoxie et de l'inhibition de HuR sur l'apoptose	72
E.	Effets de l'hypoxie et de siHuR sur l'expression de SIRT1	74
F.	Effets de l'hypoxie et de l'inhibition de HuR sur l'expression de HIF-1 α .	77
G.	Effets de miR16 et miR519 sur la prolifération : résultats préliminaires ...	78
	Discussion.....	81
I.	Marqueurs de prolifération et du cycle cellulaire dans les méningiomes	81
A.	PHH3 et indice mitotique.....	81

B.	Valeur pronostique de Ki-67	82
C.	Valeur pronostique de MCM6	83
D.	Cycline D1	86
E.	Expression de P53	87
II.	Dérégulation de HuR dans les méningiomes.....	88
A.	Valeur pronostique de la surexpression cytoplasmique de HuR	88
B.	Intérêts de la méthode de quantification par analyse d'image	89
C.	Liens entre HuR, la prolifération et la survie cellulaire.....	90
D.	HuR et résistance à l'hypoxie	92
E.	Mécanismes de régulation post-traductionnelle de HuR et transfert nucléo- cytoplasmique.....	96
F.	HuR et microARNs.....	98
	Conclusion et perspectives	101
	Bibliographie	102
	Annexe 1 : Protocoles et composition des tampons	117
	Protocole d'immunohistochimie	117
	Evaluation du marquage immunohistochimique par analyse d'image.....	118
	Extraction des protéines totales sur lignées cellulaires	119
	Protocole de Western Blot.....	119
	Technique de Duolink	123
	Technique d'immunofluorescence	124
	Inhibition de HuR par siRNA.....	125
	Croissance cellulaire.....	126
	Tampon de migration de Western Blot	126
	Tampon de transfert de Western Blot.....	127
	Tampon de lavage TBS	127
	Annexe 2 : publications scientifiques du candidat	128

Annexe 3 : communications orales et affichées	133
Annexe 4 : publication “Expression of minichromosome maintenance MCM6 protein in meningiomas is strongly correlated with histologic grade and clinical outcome”	134
Financement du projet (appel d’offres)	135

Liste des illustrations et des tableaux

FIGURE A. Méningiome méningothélial	18
FIGURE B. Principes de prise en charge des méningiomes	19
FIGURE C. Exemple d'embolisation pré-opératoire d'un méningiome avec le produit Onyx 18.....	21
FIGURE D. Rôle des protéines MCMs dans le cycle cellulaire en phases G1 et S.....	24
FIGURE E. Cibles de HuR	25
TABLEAU A. ARNm cibles de HuR et mécanismes d'action.....	27
FIGURE F. Principaux mécanismes post-traductionnels de régulation de HuR	30
TABLEAU 1. Grade histologique et principales données clinico-pathologiques.....	47
TABLEAU 2. Concordance inter-observateur	48
FIGURE 1 Expression de Ki-67 et MCM6.....	49
TABLEAU 3. Résultats de l'immunohistochimie en fonction du grade histologique.....	51
FIGURE 2. Corrélation avec la survie sans récurrence.....	53
FIGURE 3. Modèle de Cox.....	54
TABLEAU 4. Corrélation entre les marqueurs.....	56
FIGURE 4. Surexpression cytoplasmique significative de HuR dans les méningiomes atypiques.....	57
FIGURE 5. Corrélation inverse entre l'expression cytoplasmique de HuR et la survie sans récurrence	57
FIGURE 6. Absence de différence d'expression significative entre méningiomes de grade I et II pour le score nucléaire	58
FIGURE 7. Absence de corrélation significative entre l'expression nucléaire de HuR et la survie sans récurrence	58
FIGURE 8. Expression de HuR dans les méningiomes	59
FIGURE 9. Expression de HuR en Western Blot sur extraction fractionnée	60
FIGURE 10. Expression de MéthylHuR.....	61
FIGURE 11. Corrélation significative entre les expressions cytoplasmiques de HuR et méthylHuR	62
FIGURE 12. Duolink, méningiome de grade I	63
FIGURE 13. Duolink, anti-HuR et anti-méthylarginine en microscopie confocale	64

FIGURE 14. Diminution significative de miR16 dans les méningiomes par rapport aux échantillons de méninge saine.....	66
FIGURE 15. Diminution significative de miR519 dans les méningiomes par rapport aux échantillons de méninge saine.....	67
FIGURE 16. Effets de l'hypoxie et de SiHuR	68
FIGURE 17. Western Blot : nette diminution de l'expression de HuR par l'utilisation du RNA silencer siHuR	69
FIGURE 18. Effets de l'hypoxie et de siHuR sur la croissance cellulaire.....	70
FIGURE 19. Diminution significative de la prolifération cellulaire.....	71
FIGURE 20. Diminution du taux de cellules marquées avec l'anticorps anti-Ki-67 secondaire à l'inhibition de HuR.....	72
FIGURE 21. Augmentation significative de l'apoptose avec l'anticorps anti-caspase 3 clivée par l'inhibition de HuR	73
FIGURE 22. Augmentation du nombre de cellules en apoptose exprimant la caspase 3 clivée secondaire à l'inhibition de HuR.....	74
FIGURE 23. Western Blot : diminution de l'expression de SIRT1 par l'utilisation de siHuR	75
FIGURE 24. Diminution significative de l'expression de SIRT1 secondaire à l'inhibition de HuR	76
FIGURE 25. Western blot : expression augmentée de HIF-1 α	77
FIGURE 26. Expression de HIF-1 α en Western Blot	78
FIGURE 27. Effets de la surexpression de miR16 et miR519.....	80

Liste des abréviations

ADICAP : Association pour le Développement de l'Informatique en Cytologie et Anatomopathologie

ADN : Acide désoxyribonucléique

ANOVA : Analysis of variance

ARE : AU rich elements

ARN : Acide ribonucléique

ARNm : Acide ribonucléique messenger

Bcl-2 : B-cell lymphoma 2

CARM1 : Coactivator-associated arginine methyltransferase 1

CFG : Champ au fort grossissement

COX : Cyclo-oxygénase

DMEM : Dulbecco's modified Eagle medium

ECL : Enhanced chemiluminescence

ELAV : Embryonic lethal abnormal vision

ERBB2 : v-erb-b2, erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2

GAPDH : Glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase

HIF-1 α : hypoxia-inducible factor-1 α

HNS : HuR nucleo-cytoplasmic shuttling sequence

HRP : Horseradish peroxidase

HuD : Human antigen D

HuR : Human antigen R

IC : intervalle de confiance

IRM : Imagerie par résonnance magnétique

KDa : kilodalton

MCM : Mini-chromosome maintenance

Mdm2 : Mouse double minute 2 homolog

microARN (microRNA) : micro-acide ribonucléique

miRISC : microRNA induced silencing complex

MMP : Métallo-protéase matricielle

NFκB : Nuclear factor - κB

OMS : Organisation Mondiale de la Santé

PBS : Phosphate buffer saline

PCNA : Proliferating cell nuclear antigen

PHH3 : phospho-histone H3

PI3K : Phosphoinositide 3-kinase

PKC : Protéine kinase C

PTEN : Phosphatase and tensin homolog

PVDF : Polyvinylidene difluoride

qRT-PCR : Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction

RT-PCR : Reverse transcription polymerase chain reaction

SiRNA : Small interfering ribonucleic acid

SIRT1 : Silent information regulator 1

VEGF : Vascular endothelial growth factor

Remerciements

A notre Maître et Directeur de Thèse,

M. le Pr Jean-Michel VIGNAUD,

Vous avez accepté avec enthousiasme de diriger et juger cette thèse,
Vos conseils avisés ont permis l'aboutissement de ce travail,
Pour votre confiance et votre soutien quotidien,
Veuillez trouver ici le témoignage de notre profond respect et de notre sincère reconnaissance.

A nos Maîtres et Juges,

M. le Pr Jean-Louis GUEANT, Directeur de l'Unité INSERM U954,

Vous nous avez fait l'honneur de juger cette thèse,
Pour votre accueil au sein de l'Unité U954,
Pour votre soutien et votre bienveillance,
Recevez l'expression de notre profonde gratitude.

Mme la Pr Marie-Pierrette CHENARD-NEU,

Vous nous avez fait l'honneur d'accepter de juger cette thèse,
Veuillez trouver ici le témoignage de notre profond respect et de notre sincère reconnaissance.

M. le Pr François LABROUSSE,

Vous nous avez fait l'honneur de juger cette thèse,
Veuillez recevoir l'expression de notre profond respect et de nos sincères remerciements.

M. le Pr Luc TAILLANDIER,

Vous nous avez fait l'honneur de juger cette thèse,
Pour votre agréable et enrichissante collaboration au cours de ces dernières années,
Que ce travail soit pour nous l'occasion de vous exprimer toute notre considération et notre gratitude.

Mme le Dr Shyue-Fang BATTAGLIA-HSU, Co-Directrice de Thèse,

Vous nous avez fait l'honneur de co-diriger et de juger cette thèse,
Pour vos conseils et votre aide précieuse,
Pour votre enthousiasme et vos encouragements,
Recevez nos plus profonds remerciements.

Pour leur aide, leurs conseils et leur soutien :

Mme Lydia BROCHIN, Mme Sandra LOMAZZI et toute l'équipe du Service d'Anatomie et Cytologie Pathologiques,

Mme Déborah HELLE, Mme Sophie LORENTZ, M. Jean-Marc ALBERTO, Dr Rose GHEMRAWI et toute l'équipe de l'unité INSERM U954,

Dr Charlène VIGOUROUX,

Dr Béatrice MARIE,

Dr Fabien RECH,

Dr Aude BRESSENOT,

M. Marc SOUDANT.

A mes parents,

A mon épouse Emilie,

A mes enfants, Quentin, Gabriel et Maxime,

A ma sœur,

A mes grands-parents,

A toute ma famille,

Avec toute mon affection,

Je vous dédie ce travail.

Introduction

Avant propos

Les méningiomes sont les tumeurs intracrâniennes les plus fréquentes, pour la plupart de bas grade, mais avec un risque de récurrence élevé. Il n'y a actuellement que peu de marqueurs pronostiques évalués dans ces tumeurs.

Dans la première partie de cette étude, nous évaluons, à partir d'une série de 60 méningiomes, la valeur pronostique de marqueurs de prolifération et du cycle cellulaire, en particulier de MCM6, un marqueur jusqu'à ce jour non évalué dans les méningiomes.

Dans la seconde partie de cette étude, nous nous intéressons au rôle de la protéine HuR (ELAV-like 1) dans la progression tumorale des méningiomes, à partir d'un modèle cellulaire et *in vivo*. La protéine HuR est une protéine pro-oncogène connue pour stimuler la prolifération et la survie cellulaire dans divers types de tumeur, et à ce titre considérée comme une cible thérapeutique potentielle. Nous analysons l'expression immunohistochimique de HuR et méthyl(R217)HuR dans les méningiomes, puis, *in vitro*, les effets de l'inhibition de HuR sur la prolifération, la survie cellulaire et la résistance à l'hypoxie. Nous étudions en particulier le rôle de HuR dans la régulation des niveaux d'expression de SIRT1, impliqué dans la survie cellulaire, et HIF-1 α , jouant un rôle clé dans la réponse à l'hypoxie.

I. Généralités sur les méningiomes

Le méningiome est l'une des tumeurs intracrâniennes primitives de l'adulte les plus fréquentes. L'incidence est d'une dizaine de cas pour 100000 habitants par an. Le méningiome touche principalement les adultes, avec un pic entre 60 et 80 ans, mais peut également rarement toucher les enfants et les adultes jeunes. Le sexe ratio femme/homme est d'environ 1,7 (1).

Cette lésion est développée à partir des cellules méningothéliales, tapissant la membrane arachnoïdienne. Celle-ci recouvre la surface de l'encéphale et est séparée de la dure-mère par un espace virtuel, expliquant ainsi la localisation extra-parenchymateuse de ces tumeurs et leur adhérence à la dure-mère.

La grande majorité des tumeurs est intracrânienne, intraspinale ou orbitaire, plus rarement intraventriculaire. Quelques cas ont cependant été décrits dans d'autres organes. Dans les localisations intracrâniennes, le méningiome siège majoritairement en regard des convexités cérébrales, fréquemment en position parasagittale. Les autres sites classiques sont les fentes olfactives, la région du sphénoïde, les régions supra- ou parasellaires, la gaine des nerfs optiques, l'os pétreux, la tente du cervelet et la fosse postérieure.

Les signes cliniques sont secondaires à la compression des structures adjacentes, et dépendent ainsi de la localisation de la tumeur. Les céphalées et les crises convulsives sont des symptômes révélateurs classiques. Les méningiomes peuvent également être découverts de façon fortuite lors d'examens radiologiques.

Radiologiquement, il s'agit typiquement d'une tumeur extra-parenchymateuse, au contact de la dure-mère, arrondie, rehaussée après injection de produit de contraste, pouvant être calcifiée.

II. Diagnostic anatomo-pathologique

Macroscopiquement, le méningiome se présente classiquement sous la forme d'une tumeur ferme ou élastique, arrondie ou lobulée, à large attache durale, et refoulant le parenchyme cérébral adjacent, le plus souvent sans l'envahir.

Si les méningiomes présentent des aspects histologiques variés, le sous-type méningothélial est le plus classique (figure A). Les cellules tumorales s'arrangent en lobules, et présentent un aspect cytologique proche de celui des cellules arachnoïdiennes normales, avec un noyau ovalaire, à chromatine fine, parfois clarifié, ou contenant des inclusions nucléo-cytoplasmiques. Quelques enroulements et corps psammomateux peuvent être visibles. Dans la forme fibroblastique, les cellules sont fusiformes, s'agencent en faisceaux entremêlés au sein d'un stroma riche en collagène. Fréquemment, les aspects méningothéliaux et fibroblastiques co-existent, correspondant alors à la définition du sous-type mixte (transitionnel). Dans le sous-type psammomateux, il existe une prédominance de corps psammomateux calcifiés. D'autres sous-types sont décrits : angiomateux, microkystique, sécrétoire, riche en lymphocytes, métaplasique, à cellules claires, chordoïde, papillaire et rhabdoïde. Le grade histologique (grades I, II et III) selon l'OMS (1) est établi en fonction de différents critères cyto-architecturaux détaillés plus bas.

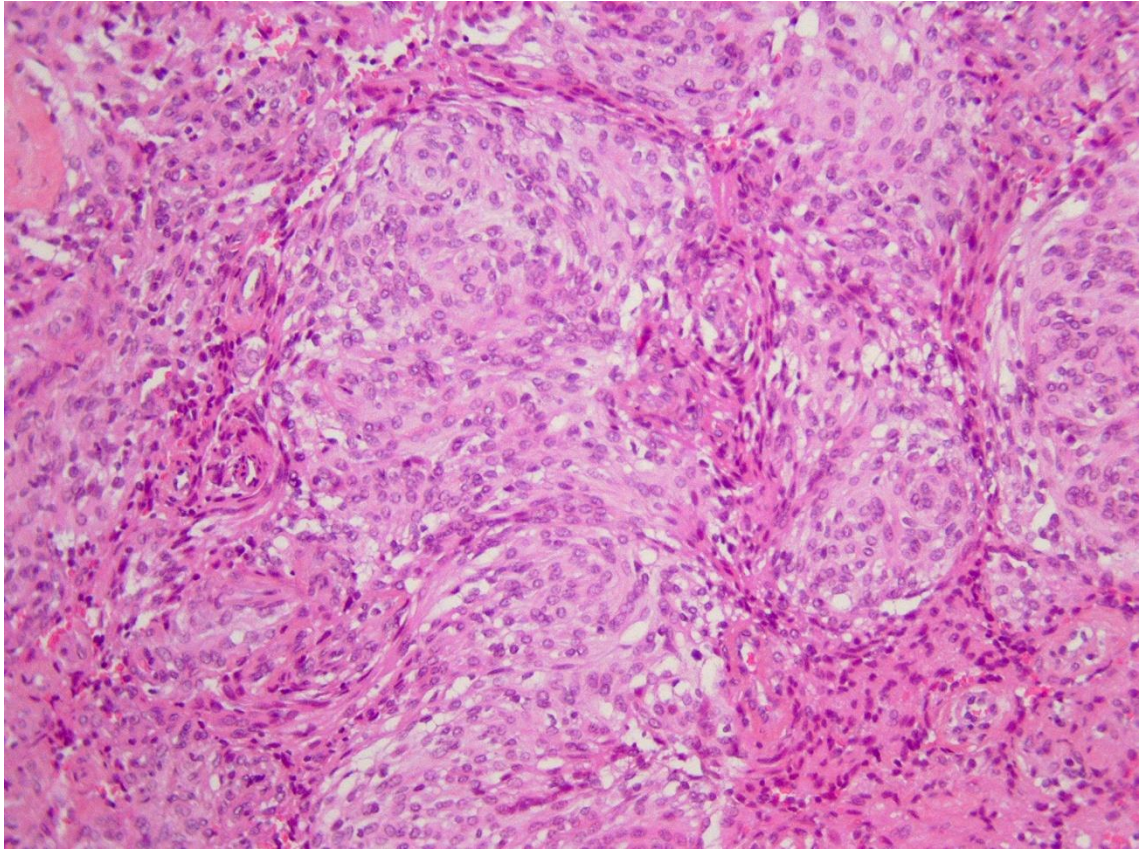


FIGURE A. Méningiome méningothélial (hématoxyline, éosine et safran, x200).

III. Principes thérapeutiques et embolisation

Le traitement de référence est l'exérèse chirurgicale, permettant d'obtenir une exérèse complète dans environ 60% à 80% des cas (2) (figure B).

En cas de résidu post-opératoire, notamment dans les méningiomes atypiques et anaplasiques, une radiothérapie adjuvante peut être proposée. Dans les formes inopérables symptomatiques ou menaçantes, l'indication d'une radiothérapie doit être discutée (2). La radiothérapie reste d'efficacité limitée, pouvant permettre d'obtenir une stabilisation de la

croissance tumorale, généralement sans régression du volume lésionnel (2). Ce traitement expose à des complications non négligeables.

Il n'y a pas de chimiothérapie de référence dans les méningiomes échappant au traitement par chirurgie et radiothérapie. L'hydroxyurée est proposée par certains auteurs (3). D'autres traitements comme par exemple les antiprogéstatifs, l'interféron, ou les antiangiogéniques sont en cours d'évaluation, avec des résultats encore incertains (2, 4).

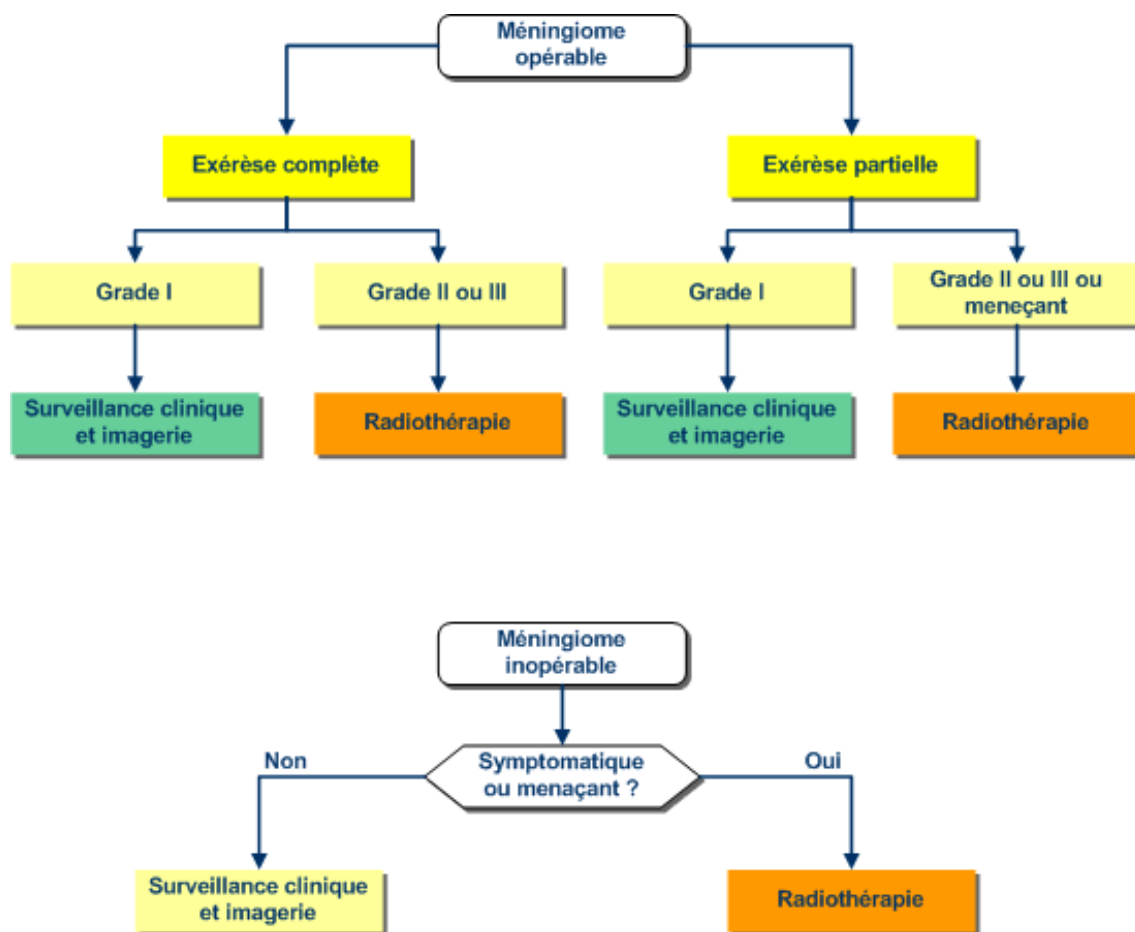


FIGURE B. Principes de prise en charge des méningiomes : arbre décisionnel.

Source : référentiel Oncolor (2).

L'embolisation pré-opératoire des artères irriguant la tumeur peut être réalisée dans certaines lésions hypervascularisées à haut risque hémorragique. Il s'agit d'une procédure de radiologie interventionnelle visant à occlure les vaisseaux nourriciers de la tumeur. Après

introduction d'un cathéter par voie fémorale, le réseau artériel irriguant le méningiome est identifié grâce à la réalisation d'une angiographie carotidienne. Le réseau vasculaire est ensuite occlus grâce à la libération dans la circulation d'un matériel à type de microparticules ou de glue, bloquant ainsi la microcirculation en aval. Il est démontré que cette technique permet de diminuer de façon significative les pertes hémorragiques per-opératoires (5, 6), avec un taux de complication majeure inférieur à 1% (7). Des essais contrôlés randomisés seraient cependant nécessaires afin de valider l'embolisation dans cette indication (8). L'embolisation créant une hypoxie intra-tumorale et ainsi une nécrose ischémique (9, 10), cette procédure pourrait théoriquement entraîner une diminution de la croissance tumorale. Cependant, très peu d'études se sont intéressées aux propriétés anti-tumorales de ce traitement. A l'aide d'un agent liquidien, Shi *et al.* ont montré dans une série de trois cas une nécrose tumorale massive, avec dans un cas une diminution de la taille tumorale à 8 jours (11) (figure C). Dans une courte série incluant 7 patients inopérables, Bendszus *et al.* ont étudié l'intérêt de l'embolisation seule, sans chirurgie, dans un contexte palliatif. Ils décrivent une diminution de la taille tumorale dans 6 cas sur 7 (12). Cependant, d'autres études sont nécessaires afin d'évaluer l'efficacité de ce traitement à long terme.

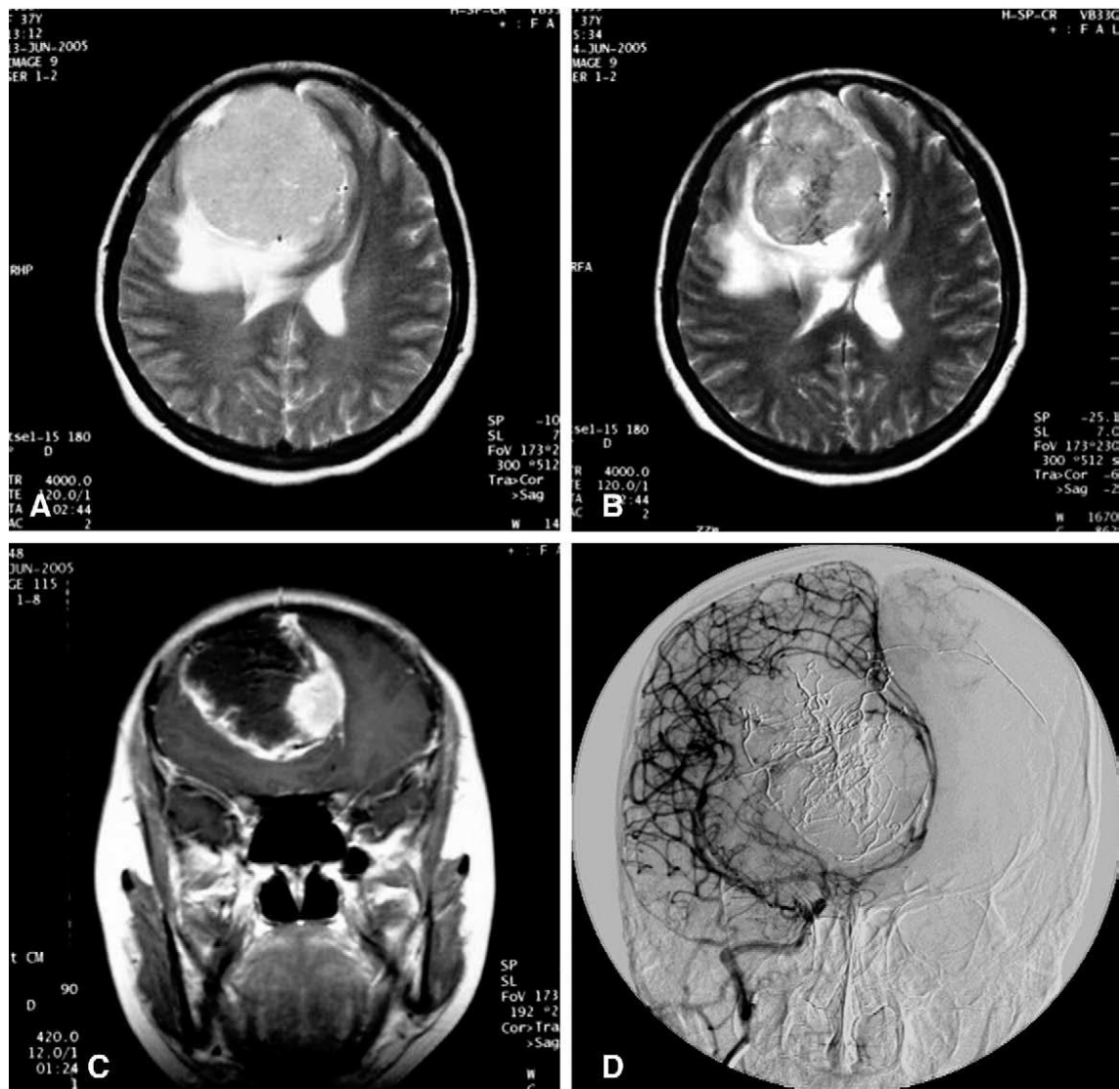


FIGURE C. Exemple d'embolisation pré-opératoire d'un méningiome avec le produit Onyx 18. (A) Aspect en IRM avant l'embolisation : lésion parasagittale frontale droite en hypersignal T2, mesurant 6,8 cm de grand axe, avec œdème périlésionnel et déviation controlatérale de la ligne médiane. Huit jours après l'embolisation : (B) diminution de la taille de la tumeur à 5,9 cm de grand axe (IRM en séquence T2) ; (C) prise de contraste limitée à la périphérie de la lésion (T1 après injection de Gadolinium). (D) Angiographie de l'artère carotide commune droite réalisée immédiatement après l'embolisation, montrant une disparition complète du flux intra-tumoral. Source : Shi et al. (11).

IV. Grade histologique et prolifération dans les méningiomes

Le grade histologique selon la classification OMS 2007 est un facteur pronostique unanimement reconnu dans les méningiomes (1). L'établissement du grade, en particulier la distinction entre tumeurs de grades I et II, est parfois cependant particulièrement difficile et soumise à une variabilité inter-observateur non négligeable (13).

Le diagnostic de méningiome atypique (grade II) repose sur les critères suivants :

- Présence d'au moins un des critères majeurs suivants :
 - Indice mitotique supérieur ou égal à 4 mitoses pour 10 champs au fort grossissement (CFG) (1,6 mm²)
 - Invasion cérébrale
 - Sous-type chordoïde ou à cellules claires
- Et/ou présence d'au moins trois des critères mineurs suivants :
 - Cellularité augmentée
 - Aspect à petites cellules
 - Nucléoles proéminents
 - Perte de l'architecture lobulaire (architecture diffuse)
 - Nécrose (en l'absence d'embolisation pré-opératoire)

Le diagnostic de méningiome anaplasique (grade III) est porté quand l'indice mitotique est supérieur ou égal à 20 mitoses pour 10 CFG (1,6 mm²), et/ou en cas d'aspect franchement anaplasique des cellules tumorales, et/ou en cas de sous-type rhabdoïde ou papillaire.

La plupart des critères ci-dessus sont relativement subjectifs, à l'exception de l'indice mitotique : la différence entre tumeurs de grades I, II ou III repose ainsi sur le nombre de mitoses pour 10 champs au fort grossissement, en ajustant à la surface de 1,6 mm², la taille d'un champ pouvant varier d'un microscope à l'autre. La détermination de l'indice mitotique peut cependant s'avérer être relativement fastidieuse et également soumise à une variabilité inter-observateur non négligeable (14). L'anticorps anti-PHH3, marquant les mitoses, pourrait permettre d'aider à établir l'indice mitotique et ainsi de limiter cette variabilité (14).

Les marqueurs de prolifération pourraient constituer des marqueurs pronostiques intéressants dans les méningiomes. La protéine la plus étudiée est Ki-67, la plupart des études ayant montré une corrélation entre le taux de cellules marquées et le grade histologique ou le risque de récurrence (15-19), cependant sans valeur pronostique significative dans deux études (20, 21). Un autre marqueur de prolifération est PCNA (proliferating cell nuclear antigen), mais avec également des résultats discordants (21, 22). Certaines études ont par ailleurs rapporté l'existence d'une corrélation entre le grade histologique et l'expression de protéines impliquées dans la progression du cycle cellulaire, comme la cycline D1 ou p53 (17, 23).

Les protéines MCM (mini-chromosome maintenance), au nombre de six, forment une hélicase hexamérique jouant un rôle clé dans l'initiation de la synthèse et de la réplication de l'ADN (figure D) (24). L'expression de ces protéines est corrélée avec le grade histologique dans diverses tumeurs, en particulier les astrocytomes et les oligodendrogliomes (25-27). Saydam *et al.* ont montré en qRT-PCR une surexpression des différentes protéines MCM par rapport au tissu sain contrôle (28). Hunt *et al.* ont montré que l'une de ces protéines, MCM2, est surexprimée dans les méningiomes bénins récidivants (20). Il n'y a pas à notre connaissance d'autre étude sur les protéines MCM dans les méningiomes.

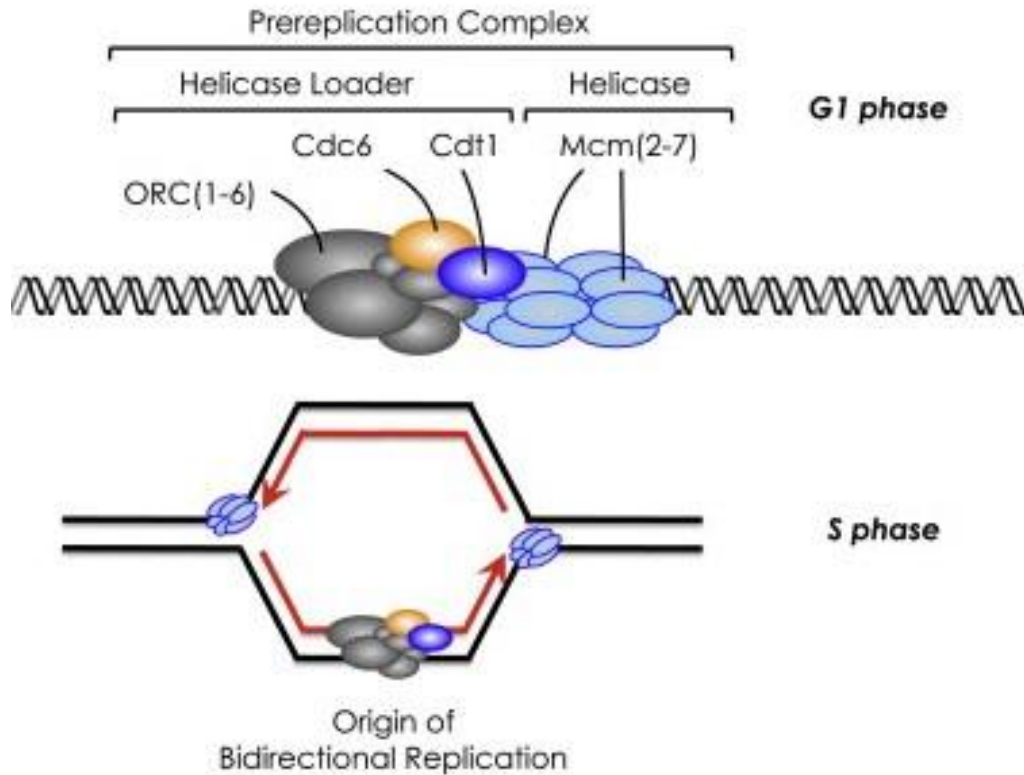


FIGURE D. Rôle des protéines MCMs dans le cycle cellulaire en phases G1 et S. Source :
Lee et al. (29).

V. Protéine Hur (ELAV-like 1)

La protéine HuR (Human antigen R), ou ELAV-like 1, est codée par un gène situé en 19p13.2 (30), et appartient à la famille des protéines ELAV (Embryonic Lethal Abnormal Vision) interagissant avec les ARN. La protéine HuR se fixe aux éléments riches en AU (ARE) dans la région 3' non-traduite des ARN messagers, permettant ainsi leur stabilisation, en particulier en entraînant une dissociation du complexe miRISC de l'ARNm cible (31), ou modulant leur traduction (32). Ses cibles incluent des ARNm codant pour de multiples protéines régulant le cycle cellulaire, des cytokines, des facteurs de croissance, des protéines impliquées dans la survie cellulaire et dans l'angiogénèse (33, 34). HuR est principalement localisé dans le noyau, mais cette protéine peut se relocaliser du noyau vers le cytoplasme, et

la stabilisation des ARNm-ARE par HuR serait associée à sa localisation cytoplasmique (34, 35) (figure E). HuR, dans sa localisation nucléaire, jouerait également un rôle dans l'épissage alternatif de certains ARNm (36, 37).

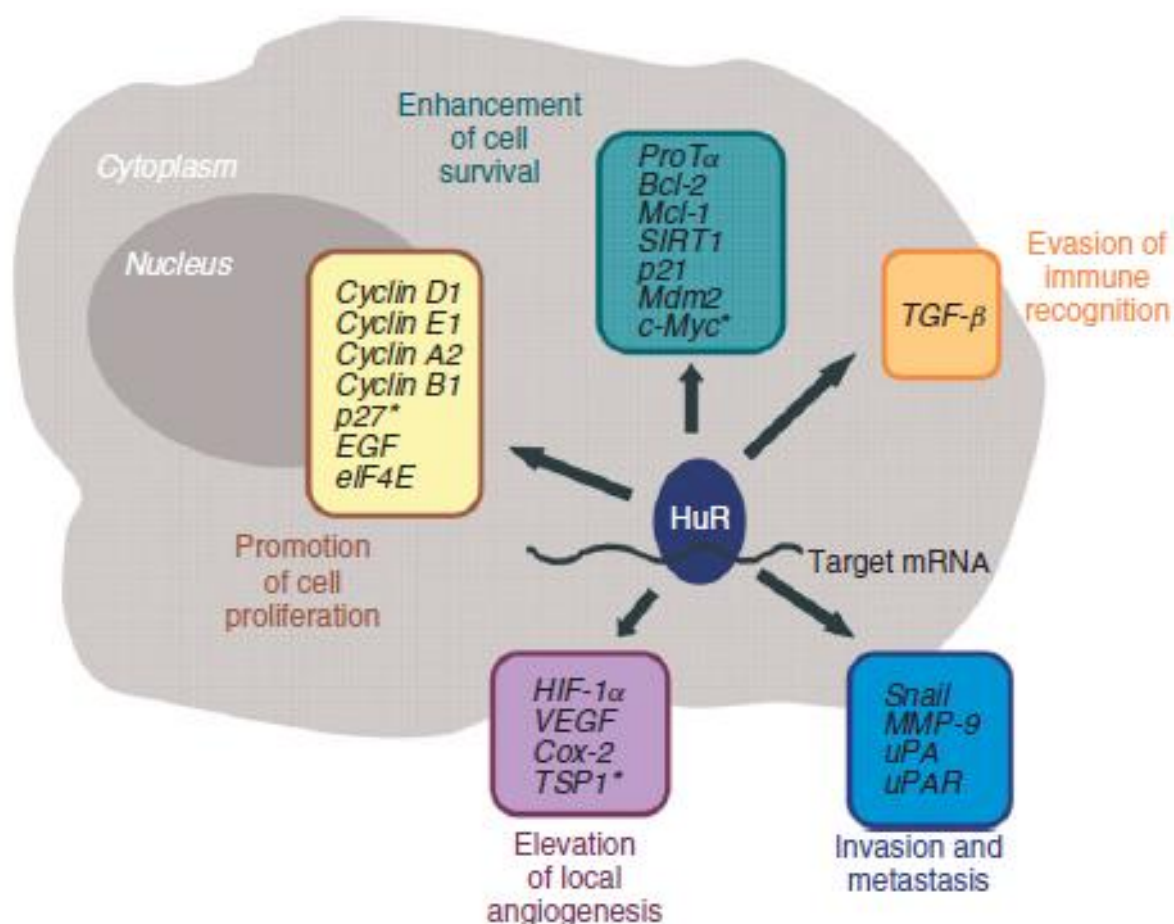


FIGURE E. Cibles de HuR. Source : Abdelmohsen K and Gorospe M (32).

Dans certains cancers, son niveau d'expression globale mais surtout son expression cytoplasmique sont corrélés à un grade plus élevé et constituent un facteur de mauvais pronostic. Des données expérimentales suggèrent que cette relocalisation cytoplasmique serait un mécanisme d'adaptation des cellules tumorales au stress (32). Les mécanismes de dérégulation de HuR restent à ce jour mal compris, quelques études expérimentales ayant montré le rôle de microARNs et de modifications post-traductionnelles (32, 38-41). Dans les

tumeurs cérébrales, l'expression de HuR, sa valeur pronostique et ses mécanismes de dérégulation sont à ce jour très peu étudiés.

A. Expression de HuR et cancer

a. Approche expérimentale

Le rôle clé de HuR dans la croissance tumorale a pu être mis en évidence par le biais de manipulations expérimentales visant à réduire l'expression de cette protéine dans les cellules cancéreuses. Ainsi, dans les cellules dont l'expression de HuR est réprimée, une réduction de la croissance cellulaire a été fréquemment observée. Filippova et al. (42) ont montré que l'inhibition de HuR dans des xénogreffes de glioblastomes primaires issus de patients réduit la taille des tumeurs et leur caractère infiltrant. De plus, la diminution de la quantité disponible de HuR, obtenue par interaction avec d'autres protéines telles que la protéine phosphatase 32, entraîne une inhibition de la croissance cellulaire (43). Ces résultats, mais aussi ceux décrits dans des travaux complémentaires (35, 39, 44), ont ainsi permis d'établir clairement le rôle primordial de la surexpression de HuR dans la prolifération des cellules cancéreuses.

Dans les conditions normales, HuR est principalement localisé dans le noyau. En situation de survie et de prolifération cellulaire, HuR se relocaliserait dans le cytoplasme (32). Ceci pourrait permettre aux cellules cancéreuses de se multiplier rapidement et de survivre au stress, en particulier d'un traitement anticancéreux, suite à la fixation cytoplasmique de HuR à de multiples ARNm-ARE de proto-oncogènes, régulateurs du cycle cellulaire, cytokines et facteurs de croissance, tels que la cycline D1, Bcl-2, Mdm2, VEGF, SIRT1 et HIF-1 α (32) (tableau A). En particulier, SIRT1 est une désacétylase jouant un rôle important dans la

résistance au stress et la survie cellulaire, capable d'inhiber l'apoptose dans les cellules tumorales (45, 46). HIF-1 α est une autre cible de HuR particulièrement intéressante, impliquée dans la réponse à l'hypoxie, et présentant dans certaines tumeurs des propriétés pro-oncogènes (47).

Target mRNA	Binding Site	Influence on mRNA	Main Cancer Traits
Cyclin D1	3'UTR	Stability $\uparrow$	Proliferation
Cyclin E1	3'UTR	Stability $\uparrow$	Proliferation
Cyclin A2	3'UTR	Stability $\uparrow$ Translation $\uparrow$	Proliferation
Cyclin B1	3'UTR	Stability $\uparrow$	Proliferation
p27	5'UTR	Translation $\downarrow$	Proliferation, survival
EGF	3'UTR	$\uparrow$ (n.d.)	Proliferation, survival
eIF4E	3'UTR	Stability $\uparrow$	Proliferation, survival
ProT α	3'UTR	Translation $\uparrow$	Proliferation, survival
Bcl-2	3'UTR	Stability $\uparrow$ Translation $\uparrow$	Survival
Mcl-1	n.d.	Stability $\uparrow$	Survival
SIRT1	3'UTR	Stability $\uparrow$	Survival
p21	3'UTR	Stability $\uparrow$	Proliferation, survival
Mdm-2	n.d.	Stability $\uparrow$	Survival
c-Myc	3'UTR	Translation $\downarrow$	Proliferation, survival
HIF-1 α	5'UTR, 3'UTR	Stability $\uparrow$	Angiogenesis, survival
VEGF	3'UTR	Stability $\uparrow$ Translation $\uparrow$	Angiogenesis, proliferation
COX-2	3'UTR	Stability $\uparrow$	Angiogenesis
TSP1*	3'UTR	Translation $\uparrow$	Angiogenesis
TGF- β	3'UTR	$\uparrow$ (n.d.)	Immunity/inflammation
Snail	3'UTR	Stability $\uparrow$	Invasion
MMP-9	3'UTR	Stability $\uparrow$	Invasion
uPA	3'UTR	Stability $\uparrow$	Invasion
UPAR	3'UTR	Stability $\uparrow$	Invasion
BRCA1	3'UTR	$\downarrow$ (n.d.)	Tumor suppression
Wnt5a	3'UTR	Translation $\downarrow$	Oncogenesis
c-fms	3'UTR	Stability $\uparrow$	Oncogenesis
ARHI	3'UTR	Stability $\uparrow$	Tumor suppression

TABLEAU A. ARNm cibles de HuR et mécanismes d'action. Source : Abdelmohsen K and Gorospe M (32).

b. Expression de HuR dans les tissus tumoraux

Dans diverses tumeurs humaines, la surexpression de HuR est corrélée au grade histologique et/ou au pronostic. Si certaines études ont rapporté que la surexpression nucléaire

globale de HuR constituait un facteur de mauvais pronostic (48), la plupart des autres études ont démontré l'importance du signal cytoplasmique. En particulier, la surexpression cytoplasmique est corrélée à une plus faible survie dans les carcinomes ovariens, mammaires et les mésothéliomes (49-52), et à un taux plus élevé d'extension métastatique ganglionnaire ou à une survie plus courte dans les carcinomes pulmonaires (53, 54).

Il n'y a que très peu d'études traitant de l'expression de HuR dans les tumeurs cérébrales. Dans les gliomes, des études ont montré une surexpression cytoplasmique de HuR dans les lésions gliales de haut grade (55, 56), corrélée à l'expression du VEGF (55). Très récemment, Bolognani et al. ont analysé l'expression de HuR dans 211 tumeurs astrocytaires, oligodendrogiales et mixtes de grades II à IV. Les auteurs rapportent que le niveau d'expression global est plus élevé dans les tumeurs oligodendrogiales. De plus, quel que soit le type histologique, l'expression cytoplasmique est plus élevée dans les lésions de haut grade (57). L'éventuelle corrélation avec la survie n'a pas été étudiée, de même que les mécanismes de cette dérégulation de HuR.

Il y n'a à notre connaissance que deux publications traitant de l'expression de HuR dans les méningiomes. Dans la première étude, Nabors *et al.* ont observé, par Western Blot, une surexpression de HuR dans 6 méningiomes, en comparaison avec des échantillons de tissu sain (56). Dans une série de 40 méningiomes, incluant 34 tumeurs de grade I et 6 méningiomes atypiques de grade II (OMS 2007), Sakuma et al. ont démontré une corrélation entre le niveau d'expression nucléaire de HuR et l'expression de VEGF. Ils ont également constaté une surexpression cytoplasmique dans 2 méningiomes atypiques (58). Enfin, les auteurs ont noté l'existence d'une surexpression de HuR en cas d'embolisation pré-opératoire, et, *in vitro*, une surexpression cytoplasmique de HuR en hypoxie (58).

B. Mécanismes de régulation de la protéine HuR

a. Localisation subcellulaire

Il a été montré que le transport de HuR à travers la membrane nucléaire implique un domaine spécifique HNS (HuR nucleo-cytoplasmic shuttling sequence) au sein de cette protéine, ainsi que plusieurs composants de transport nucléaire (32). Les mécanismes moléculaires de ce transport restent cependant mal compris, même s'il apparaît que des modifications post-traductionnelles de la région HNS sont essentielles, reposant en particulier sur des processus de phosphorylation ou de méthylation (figure F). Des travaux préliminaires menés par notre équipe, à partir d'un modèle de lignée de neuroblastome déficiente en vitamine B12 (59, 60), ont montré l'importance de la vitamine B12 dans le transfert nucléocytoplasmique de HuR, probablement en lien avec la méthylation CARM1-dépendante de HuR sur l'arginine R217, résultats également corroborés par Li *et al.* (40).

b. Niveau global d'expression de HuR

Le niveau global d'expression de HuR peut être régulé au niveau transcriptionnel par NFκB (nuclear factor -κB) et les Smads (61). La protéine HuR peut également augmenter son expression en stabilisant son propre ARNm (62). HuR est dégradé par ubiquitination (38), ou clivé par les caspases (63).

Des études expérimentales ont montré le rôle de certains microARNs (miRs) dans la régulation de HuR. En particulier, miR16, par des mécanismes post-transcriptionnels, pourrait

inhiber la traduction de HuR. Xu et al. ont ainsi montré, sur une lignée de carcinome mammaire, que l'inhibition de miR16 augmente l'expression protéique de HuR, sans modification de son niveau d'ARNm en RT-PCR. Ces résultats sont corroborés par une corrélation inverse entre le niveau de miR16 et l'expression de HuR dans des tumeurs mammaires humaines (41). Par ailleurs, Abdelmohsen et al. ont rapporté une corrélation inverse entre le niveau de miR519 et l'expression de HuR dans des échantillons de cancers ovariens, pulmonaires et rénaux (39). Dans des lignées cellulaires, comme pour miR16, l'inhibition de miR519 entraîne une augmentation de l'expression de HuR, sans modification du niveau d'ARNm, s'accompagnant de plus d'une inhibition de la croissance des cellules tumorales (39, 64). A notre connaissance, miR16 et miR519 n'ont pas à ce jour été spécifiquement étudiés dans les tumeurs cérébrales.

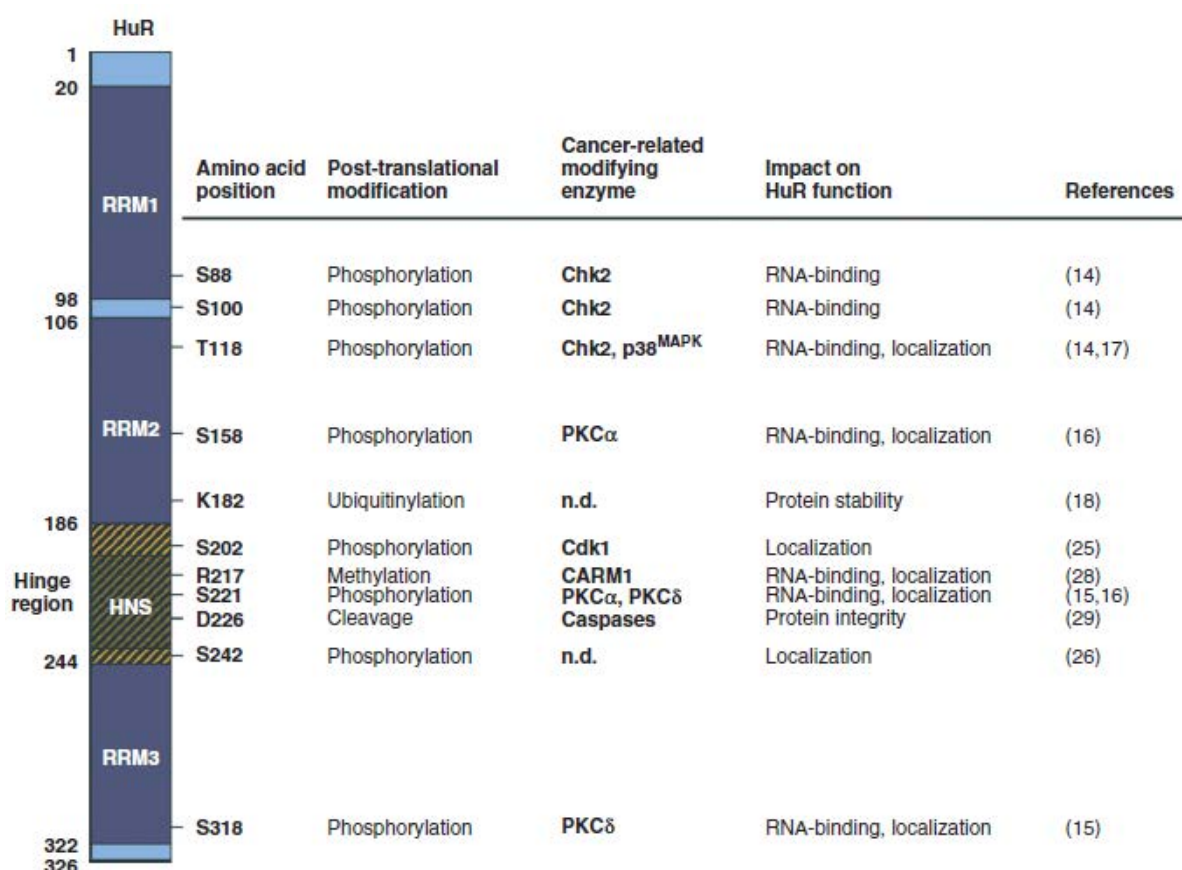


FIGURE F. Principaux mécanismes post-traductionnels de régulation de HuR. Source : Abdelmohsen K and Gorospe M (32).

Objectifs

I. Etude clinico-pathologique :

- A. Evaluer MCM6, Ki-67, PHH3, la cycline D1 et p53 comme marqueurs pronostiques dans les méningiomes.
- B. Etudier l'expression de HuR et méthyl(R217)HuR et leur valeur pronostique dans les méningiomes.
- C. Rechercher une corrélation entre HuR et les marqueurs de prolifération.
- D. Quantifier les microARNs miR16 et miR519 et rechercher une corrélation avec HuR.

II. Etude expérimentale :

- A. Etudier les effets de l'inhibition de HuR sur la prolifération et la survie cellulaire dans une lignée de méningiomes.
- B. Etudier les effets de l'inhibition de HuR en conditions d'hypoxie.
- C. Etudier les effets de miR16 et miR519.

Matériel et Méthodes

I. Etude clinico-pathologique

A. Population étudiée et données cliniques

Soixante cas de méningiomes sont sélectionnés de façon rétrospective, incluant 30 cas consécutifs de méningiome bénin (grade I selon la classification OMS) et 30 cas consécutifs de méningiome atypique (grade II), de 1997 à 2007. Ces cas sont identifiés dans les archives à l'aide du logiciel Diamic (Infologic), en utilisant les codes ADICAP spécifiques à ces lésions.

Les données cliniques sont collectées à partir des dossiers du Département de Neurochirurgie du CHU de Nancy. Les données suivantes sont recueillies : âge, sexe, localisation, score de Simpson (1 : exérèse macroscopiquement complète, incluant la dure-mère et l'os ; 2 : exérèse macroscopiquement complète, coagulation de la dure-mère ; 3 : exérèse macroscopiquement complète, dure-mère non coagulée ; 4 : exérèse partielle ; 5 : décompression simple), date de récurrence, date de décès, date des dernières nouvelles, traitement (néo)adjuvant.

B. Analyse histologique

Les lames ayant servi au diagnostic sont revues par deux pathologistes expérimentés (JMV, GG), en utilisant les critères diagnostiques de la classification OMS 2007 (1). Deux cas de méningiome initialement classés en méningiome atypique (grade II) sont reclassés en méningiome de grade I, permettant d'arriver à un total de 32 méningiomes de grade I et 28 méningiomes de grade II.

Un bloc représentatif de tissu fixé dans le formol et inclus en paraffine par patient est sélectionné, correspondant aux zones de plus forte cellularité tumorale. Des coupes de 5 µm sont réalisées et colorées par hématoxyline, éosine et safran.

L'indice mitotique est évalué de façon indépendante par deux lecteurs (CV, GG) pour chaque cas, correspondant au nombre de mitoses pour 10 champs au fort grossissement, rapporté à une surface de 1,6 mm².

C. Etude immunohistochimique

a. Technique d'immunohistochimie

Des coupes de 5 µm sont réalisées et étalées sur des lames en verre, puis immergées pendant 20 minutes à 97°C dans une solution tamponnée de citrate de sodium à 10 mM pH6 contenant des détergents, permettant de déparaffiner les lames et de démasquer les antigènes.

L'immunohistochimie est réalisée sur un automate Dako Autostainer Plus (Dako Cytomation, Glostrup, Denmark), à l'aide du système d'amplification FLEX+ (Dako), avec diaminobenzidine comme chromogène, en suivant les recommandations du constructeur.

b. Marqueurs de prolifération et du cycle cellulaire (Ki-67, MCM6, cycline D1, PHH3, p53)

Anticorps utilisés

Les anticorps primaires utilisés sont les suivants : Ki-67 (1/200; anticorps monoclonal de souris, MIB-1, Dako Cytomation), MCM6 (1/400; anticorps polyclonal de chèvre, Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Germany), phospho-histone H3 (1/2000; anticorps polyclonal de lapin, MBL, Nagoya, Japan), cycline D1 (1/25; anticorps monoclonal de souris, SP4, Neomarkers, Fremont, CA, USA) et p53 (1/60; anticorps monoclonal de souris, DO7, Novocastra, Newcastle, UK).

Quantification

Pour ces cinq marqueurs, on définit le taux de cellules marquées comme étant le pourcentage de cellules présentant un marquage nucléaire, en comptant 1000 cellules, dans les zones présentant le plus de noyaux marqués. L'analyse est effectuée de façon indépendante par deux observateurs, sans connaissance du grade histologique ni des données cliniques.

c. Niveaux d'expression de HuR et méthylHuR

Anticorps utilisés

Les anticorps primaires utilisés sont les suivants : HuR (1/500 ; anticorps monoclonal de souris, 19F12, Clontech, Clontech, CA, USA), méthyl(R217)-HuR (1/2000 ; anticorps polyclonal de lapin, dont le design et la validation ont été réalisés dans notre unité).

Extraction protéique et Western Blot

Des extraits nucléaires et cytoplasmiques sont préparés à partir de fragments tumoraux congelés pour 4 tumeurs (protocole en annexe 1).

Une analyse en Western Blot est réalisée dans ces 4 cas, selon le protocole détaillé en annexe 1.

Méthode de quantification en immunohistochimie

Le protocole d'immunohistochimie, reposant sur la technique d'amplification FLEX Envision (Dako Cytomation) sur automate Dako Autostainer Plus (Dako Cytomation), est détaillé en annexe 1.

Pour chaque tumeur, un score nucléaire et un score cytoplasmique sont obtenus par analyse d'image en utilisant les logiciels Adobe Photoshop CS2 9.0 (Adobe Systems Incorporated, USA) et Image J 1.42u (Wayne Rasband, National Institutes of Health, USA). Après prise d'un cliché dans la zone de marquage d'intensité maximale, on sélectionne les noyaux ou les cytoplasmes à l'aide d'un outil de sélection automatique de couleurs avec Adobe Photoshop, permettant d'obtenir deux fichiers distincts (noyaux et cytoplasmes), ensuite convertis en niveaux de gris. La densité intégrée est mesurée avec Image J. Le score correspond à la densité intégrée divisée par le nombre de pixels sélectionnés. Le protocole est détaillé en annexe 1.

Une évaluation semi-quantitative a également été effectuée, aboutissant à l'établissement d'un score nucléaire et d'un score cytoplasmique selon la formule suivante :
$$\text{score [nucléaire ou cytoplasmique]} = 1 \times (\text{pourcentage de cellules avec marquage faible}) + 2 \times (\text{pourcentage de cellules avec marquage modéré}) + 3 \times (\text{pourcentage de cellules avec marquage intense}).$$
Cette évaluation est effectuée sur l'ensemble de la lame d'immunohistochimie, par un seul lecteur (GG).

D. Analyse de méthylHuR en microscopie confocale par technique Duolink

Afin de confirmer la spécificité de l'anticorps méthylHuR utilisé en immunohistochimie et la localisation strictement cytoplasmique de méthylHuR, 4 tumeurs de niveau d'expression variable de méthylHuR sont sélectionnées. La technique de Duolink (Olink Bioscience, Uppsala, Sweden) permet d'obtenir un signal lorsque deux antigènes d'intérêt sont très proches (proximité de moins de 40 nm). On utilise ainsi un premier anticorps primaire anti-HuR (1/1000 ; anticorps polyclonal de lapin, Millipore, Billerica, MA, USA), et un deuxième anticorps primaire anti-mono- et di- méthylarginine (anticorps monoclonal de souris, 7E6, Abcam, Cambridge, UK). Des anticorps secondaires spécifiques d'espèce sont couplés à de courts fragments d'ADN. Lorsqu'ils sont proches, ces derniers peuvent être liés par une ligase, puis amplifiés par une polymérase, permettant d'obtenir un ADN circulaire fluorescent (illustration en annexe 1). Les étapes techniques sont détaillées en annexe 1. Les lames sont lues avec un microscope confocal.

En cas de détection du site antigénique de HuR et d'une arginine méthylée très proche, on obtient un marquage sous forme d'un signal punctiforme. Il n'est pas connu dans la protéine HuR d'autre arginine que l'arginine 217 pouvant être méthylée et ayant des

conséquences fonctionnelles, le signal obtenu correspondant ainsi très probablement à méthyl(R217)-HuR.

La localisation du signal est appréciée à l'aide des images des différents plans d'acquisition et des reconstructions en trois dimensions. On compte pour chaque cas le nombre de points obtenus sur un champ avec l'objectif x20.

E. Quantification des microARNs miR16 et miR519 par qRT-PCR

a. Extraction d'ARN

Après une étape préalable de validation de la technique de qRT-PCR sur une quinzaine d'échantillons congelés, on effectue une extraction de l'ARN à partir de tissu fixé dans le formol et inclus en paraffine. Une quantité suffisante de tissu est présente dans 55 des 60 cas. On utilise comme tissu sain de référence du tissu leptoméningé prélevé à la surface de l'encéphale au décours de 10 autopsies puis fixé dans le formol et inclus en paraffine.

Des copeaux sont récupérés au scalpel à la surface des blocs, recueillis dans un tube Eppendorf puis soumis à digestion enzymatique. L'ARN est extrait par technique de séparation de phase de type phénol-chloroforme, en utilisant le réactif TRIzol (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA), conformément aux instructions du fournisseur. Le dosage de l'ARN repose sur l'utilisation du fluoromètre Qubit (Invitrogen), à l'aide du kit Quant-iT RNA BR Assay 2-1000 ng.

b. Technique de qRT-PCR et quantification

La quantification est effectuée par qRT-PCR, à l'aide des réactifs TaqMan MicroRNA Assays (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

On utilise comme référence miR191 (Assay Name hsa-miR-519a, miRBase ID hsa-miR-519a-3p), les premiers essais réalisés sur 15 échantillons de méningiome ayant montré un niveau d'expression inter-échantillon plus stable pour miR191 que pour RNU6B (Normfinder). Les microARNs d'intérêt sont miR16 (Assay Name hsa-miR-16, miRBase ID hsa-miR-16-5p, Applied Biosystems) et miR519 (Assay Name hsa-miR-519a, miRBase ID hsa-miR-519a-3p, Applied Biosystems). Pour miR16 et miR191, le calibrateur est un mélange d'ARN de plusieurs méningiomes de grade I et II, et pour miR519 un mélange de deux tissus sains. L'efficacité (E) est déterminée pour chaque microARN avec le calibrateur à partir d'une gamme de 4 dilutions en triplicat réalisée deux fois. L'efficacité sur tissu fixé en paraffine est globalement similaire à celle sur tissu congelé (paraffine : miR16 : E=0,98 ; miR519 : E=0,90 ; miR191 : E=0,94).

Pour miR191 et miR16, une quantité de 10 µg d'ARN est utilisée, et pour miR519 une quantité de 20 µg. Après une étape de rétrotranscription spécifique à chaque microARN, l'amplification est effectuée dans un thermocycleur selon les instructions du fournisseur.

La quantité relative de microARNs est déterminée par la formule suivante :

$$\text{Ratio} = E^{-\Delta\Delta C_t}$$

$$E = 1 + \text{efficacité}$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ échantillon} - \Delta Ct \text{ calibrateur}$$

$$\Delta Ct \text{ échantillon} = (Ct \text{ microARN d'intérêt} - Ct \text{ microARN de référence})$$

$$\Delta Ct \text{ calibrateur} = (Ct \text{ microARN d'intérêt} - Ct \text{ microARN de référence})$$

II. Etude expérimentale

A. Lignée cellulaire

La lignée cellulaire utilisée est une lignée humaine dérivée d'un méningiome anaplasique appelée Iomm-Lee (don de Dr Gillespie et Dr Jensen, University of Utah, USA), obtenue chez un homme de 61 ans présentant un méningiome anaplasique avec extension osseuse (65).

B. Conditions de culture

a. Culture standard en normoxie

Les cellules sont incubées à 37°C sous 5% de CO₂, en utilisant le milieu de culture de suivant : 78% de DMEM (Dulbecco's modified Eagle medium) 41965, 10% de sérum de veau foetal (SVF) décomplémenté, 1% d'antibiotiques (pénicilline et streptomycine) et 1% de pyruvate (réactifs Life Technologies, Carlsbad, California, USA).

En phase de croissance, le temps de doublement est d'environ 12h, la confluence étant obtenue en 48 à 72h.

b. Culture en hypoxie

Pour les cellules soumises à une hypoxie, après une incubation de 48h en conditions standards, les cellules sont incubées 24h sous 1,5% d'O₂ et 5% de CO₂ à 37°C, une injection d'azote permettant de diminuer le taux d'O₂ (Ecole de Chirurgie, Faculté de Médecine de Nancy).

C. Inhibition de HuR par siRNA

HuR est inhibé à l'aide des ARN interférant Silencer Select siRNA ELAVL1 s4608 et s4610 (Ambion, Life Technologies), formés chacun de 21 paires de base. Dans la suite des expérimentations, le siRNA s4608 est utilisé pour les techniques d'immunofluorescence et de Western Blot, et le siRNA s4610 pour la prolifération cellulaire, après validation préalable de l'inhibition de HuR par Western Blot. L'inhibition est réalisée en présence de lipofectamine RNAiMAX (Life Technologies). On utilise comme contrôle négatif Silencer Select Negative Control siRNA#1 (Ambion, Life Technologies). Le protocole est détaillé en annexe 1.

D. Croissance cellulaire

La transfection est effectuée dans des boîtes de 24 puits en déposant 25.000 cellules par puits, avec 1 mL de milieu. On effectue un compte du nombre de cellules viables 2 jours, 3 jours, 4 jours et 7 jours après la transfection (siHuR et siControl). Le compte cellulaire est

effectué à partir de 3 prises d'essai par puits de transfection, avec 3 transfections indépendantes par condition, selon le protocole détaillé en annexe 1.

E. Analyse de HuR, Ki-67 et caspase 3 clivée en immunofluorescence

Soixante-douze heures après la transfection, les cellules sont lavées 3 x 5 min dans le PBS, fixées 12 min dans une solution à 4% de paraformaldéhyde, puis lavées 2 x 5 min (PBS).

On utilise les anticorps primaires suivants :

- HuR (1/2000 ; anticorps polyclonal de lapin, Millipore)
- Caspase 3 clivée (1/500 ; anticorps polyclonal de lapin, Cell signaling Technology, Danvers, MA, USA)
- Ki-67 (1/200; anticorps monoclonal de souris, MIB-1, Dako Cytomation)

Les étapes de la détection des protéines par technique d'immunofluorescence indirecte sont détaillées en annexe 1.

Chaque condition (siHuR, siControl ; normoxie, hypoxie) est répétée 9 fois (3 transfections pour 3 passages différents, soit en tout 9 transfections indépendantes).

Pour chaque lame, on effectue trois prises de vue avec l'objectif x20 à l'aide d'une caméra en niveaux de gris, avec les filtres FITC et DAPI. Les images sont ensuite colorées et fusionnées avec Image J 1.42u (Wayne Rasband, National Institutes of Health).

L'expression de HuR est analysée de façon qualitative, en appréciant la localisation nucléaire et/ou cytoplasmique. Les expressions de Ki-67 et de la caspase 3 clivée sont analysées de façon quantitative, correspondant au pourcentage de cellules marquées, en comptant 300 cellules à partir des images fusionnées.

F. Extraction protéique et Western Blot

Après 3 lavages rapides des cellules avec du PBS froid, on effectue une extraction des protéines totales en tampon RIPA selon le protocole détaillé en annexe 1.

On réalise une technique de Western Blot reposant sur une électrophorèse sur gel de polyacrylamide en condition dénaturante. Le dépôt de protéines est de 15 µg par puits pour HuR et SIRT1, et 30 µg pour HIF-1 α , en dilution dans du tampon Laemmli 2x (Sigma).

On utilise les anticorps primaires suivants, dilués dans du lait :

- HuR (1/1000 ; anticorps polyclonal de lapin, Millipore ; 36 Kda)
- SIRT1 (1/500 ; anticorps polyclonal de lapin, Cell Signaling Technologies ; 120 Kda)
- HIF-1 α (1/250 ; anticorps polyclonal de lapin, Cell Signaling Technologies ; 80-120 Kda)
- GAPDH (1/2000 ; anticorps polyclonal de poulet, Millipore ; 38 Kda)

Les anticorps secondaires sont les suivants :

- Anticorps anti-lapin HRP (1/2000 ; singe, sc-3213, Santa-Cruz)
- Anticorps anti-poulet HRP (1/2000 ; singe, 703-035-155, Jackson).

Le protocole de Western Blot ainsi que la composition des tampons de migration, de transfert et de lavage PBS sont détaillés en annexe 1. La révélation est effectuée dans l'appareil FUSION Fx7 (Fisher Biotec, Wembley, Australia).

Les images obtenues sont enregistrées en format JPEG. La mesure de la densité absolue est effectuée avec le logiciel Image J 1.42u (Wayne Rasband, National Institutes of Health). Pour chaque marqueur (HuR, HIF-1 α , SIRT1, GAPDH), la valeur de densité relative est obtenue en divisant la valeur de densité absolue de la bande d'intérêt par la valeur de densité absolue de la bande de l'échantillon de référence du même gel. La valeur finale de densité normalisée est calculée en divisant la densité relative du marqueur par la densité relative de la GAPDH obtenue à partir du même échantillon et du même gel.

G. Effets de miR16 et miR519 sur l'expression de HuR et la prolifération : étude préliminaire

Les effets de miR16 et miR519 sur l'expression de HuR et l'indice prolifératif (Ki-67) sont évalués en réalisant trois transfections indépendantes. Les conditions d'expérimentation sont identiques à celles utilisées pour SiHuR (10 μ L à 1 μ mol/L par puits, boîte de 24 puits), en utilisant comme ARN interférants les produits suivants :

- mirVana miRNA Mimic Negative Control (Ambion, Life Technologies)
- mirVana miRNA Mimic hsa-miR-16-5p (Ambion, Life Technologies)
- mirVana miRNA Mimic hsa-miR-519a-3p (Ambion, Life Technologies)

Les expressions de HuR et de Ki-67 sont évaluées par immunofluorescence (cf technique ci-dessus).

III. Analyse statistique

A. Etude clinico-pathologique

a. Grade histologique, prolifération et marqueurs du cycle cellulaire

L'analyse statistique est effectuée avec le logiciel SAS 9.2 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA) (analyses réalisées par Marc Soudant, service d'épidémiologie et d'évaluation cliniques, CHU Nancy). Le coefficient de corrélation de Spearman est utilisé pour évaluer la corrélation entre les marqueurs immunohistochimiques. La concordance entre les observateurs est mesurée avec le coefficient de Kappa pour les variables qualitatives et le coefficient de corrélation intraclasse pour les variables quantitatives. La corrélation entre les marqueurs et le grade est évaluée avec le modèle ANOVA. L'analyse de la survie sans récurrence est réalisée par l'estimation de Kaplan-Meier (Log-rank test) et le modèle de Cox. La méthode *cubic spline* permet de rechercher d'éventuels effets non linéaires ou temps-dépendants. Une valeur de p inférieure ou égale à 0,05 est considérée comme étant significative.

b. Expression de HuR et méthylHuR

L'analyse statistique est effectuée avec le logiciel Statview 5.0 (SAS Institute Inc.). Le coefficient de corrélation de Spearman est utilisé pour évaluer la corrélation entre les

marqueurs immunohistochimiques. Le test de corrélation de Kendall est effectué pour rechercher une corrélation entre l'immunohistochimie et le marquage en Duolink. La corrélation entre les marqueurs et le grade est évaluée avec le test de Mann-Whitney. L'analyse de la survie sans récurrence est réalisée par l'estimation de Kaplan-Meier (Log-rank test) et le modèle de Cox. Une valeur de p inférieure ou égale à 0,05 est considérée comme étant significative.

B. Etude expérimentale

L'analyse statistique est effectuée avec le logiciel Statview 5.0 (SAS Institute Inc.). La comparaison de l'expression des marqueurs entre les différentes conditions est effectuée avec le test de Mann-Whitney. Une valeur de p inférieure ou égale à 0,05 est considérée comme étant significative.

Résultats

I. Etude clinico-pathologique

A. Caractéristiques de la population étudiée et données cliniques

L'âge moyen des patients est de 60 ans, avec des extrêmes allant de 33 ans à 85 ans. Le sexe ratio global homme/femme est de 0,45 dans les méningiomes de grade I, et de 1,2 dans les méningiomes de grade II (sexe ratio global : 0,7).

La qualité de l'exérèse chirurgicale est évaluée par le neurochirurgien à l'aide du score de Simpson : score 1 dans 52% des cas ; score 2, 18% ; score 3, 20% ; score 4, 10%. Il n'y a pas de corrélation entre le score de Simpson et la survie dans récurrence ($p=0,33$).

Les tumeurs sont supra-tentorielles dans 55 cas, sous-tentorielles dans 3 cas et spinales dans 2 cas.

Le suivi clinique est disponible dans 54 cas, avec une période médiane de suivi de 27 mois (min. 2 mois ; max. 93 mois). Le taux global de récurrence est de 44% (24/54). Un décès en lien avec la pathologie est survenu dans 9% des cas (5/54).

Le tableau 1 résume les principales données clinico-pathologiques.

Données clinico-pathologiques	Global	Grade I	Grade II
Nombre de cas	60	32	28
Age (min-max)	60 (33-85)	58 (40-76)	63 (33-85)
Sexe	F: 58%	F: 69%	F: 46%
	M: 42%	M: 31%	M: 54%
Score de Simpson	1: 52%	1: 47%	1: 57%
	2: 18%	2: 25%	2: 11%
	3: 20%	3: 22%	3: 18%
	4: 10%	4: 6%	4: 14%
Invasion cérébrale	5%	0%	11%
Indice mitotique moyen (/1.6 mm ² , IC 95%)	3.6 (2.6-4.5)	0.8 (0.5-1.1)	6.7 (5.5-7.9)
Cellularité augmentée	32%	9%	57%
Aspect à petites cellules	2%	0%	4%
Nucléole proéminent	37%	16%	61%
Architecture diffuse	37%	13%	64%
Nécrose	32%	3%	64%
Taux de récurrence	44 (24/54)	26% (8/30)	67% (16/24)
Délai moyen de récurrence (min-max)	21 mo (1-91)	23 mo (11-41)	21 mo (1-91)
Décès	9% (5/54)	3% (1/30)	17% (4/24)
F : féminin; M : masculin ; mo : mois ; IC : intervalle de confiance			

TABLEAU 1. Grade histologique et principales données clinico-pathologiques.

B. Sous-types histologiques et établissement du grade

Parmi les 32 tumeurs de grade I, les sous-types sont les suivants : méningothélial 56% (18/32) (figure 1), mixte 34% (11/32), fibroblastique 6% (2/32), psammomateux 3% (1/32).

Dans les méningiomes atypiques (grade II), l'indice mitotique n'est inférieur au seuil de 4 mitoses pour 10 CFG (1,6 mm²) que dans 1 cas sur 28, correspondant à un méningiome à cellules claires (par définition, grade II selon l'OMS). L'invasion cérébrale n'est présente que dans 11% (3/28) des cas, s'associant dans tous les cas à un indice mitotique supérieur au seuil de 4/10 CFG. Au moins 3 des 5 critères diagnostiques mineurs de méningiome atypique selon l'OMS sont présents dans 50% (14/28) des cas, avec également dans ces cas un indice mitotique supérieur au seuil.

Le taux de récurrence est plus élevé dans les méningiomes de grade II que de grade I (67% vs 27%), le grade selon l'OMS étant corrélé avec la survie sans récurrence (Log-rank : $p=0,007$) (figure 2A).

Le coefficient de corrélation inter-observateur pour l'établissement du grade est excellent (kappa : 0,93 ; IC95% : 0,84-1), de même que pour l'indice mitotique (0,90; IC95%I: 0,83-0,94) (tableau 2). Il y a cependant deux cas de discordances sur le grade, liées à des différences d'évaluation de l'indice mitotique (3/1,6 mm² vs 4/1,6 mm²).

	Coefficient de correlation	IC 95%
Grade selon l'OMS 2007	0.93	0.84-1.00
Indice mitotique	0.90	0.83-0.94
Ki-67	0.93	0.89-0.96
MCM6	0.97	0.95-0.98
PHH3	0.81	0.71-0.88
Cycline D1	0.87	0.80-0.92
P53	0.84	0.73-0.90
OMS : Organisation Mondiale de la Santé; IC : intervalle de confiance.		

TABLEAU 2. Concordance inter-observateur.

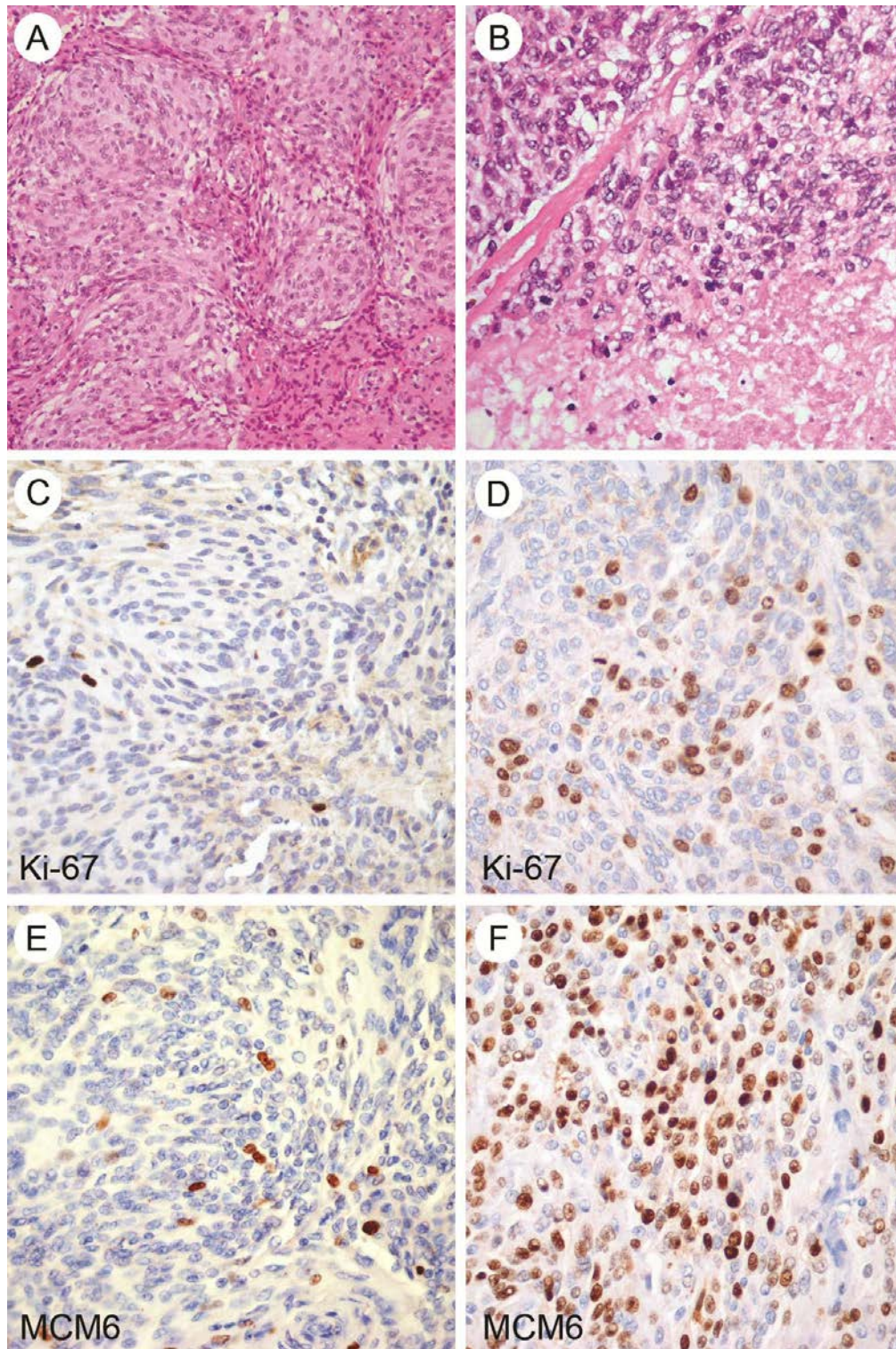


FIGURE 1 Expression de Ki-67 et MCM6. (A) Méningiome méningothélial de grade I (HES, x200). (B) Méningiome atypique (grade II), avec nécrose tumorale (x400). (C) Rares cellules marquées avec l'anticorps MIB1 (Ki-67) dans un méningiome de grade I (x400). (D) Expression modérée de Ki-67 dans un méningiome atypique (x400). (E) Expression faible de MCM6 (x400) dans un méningiome de grade I. (F) Surexpression de MCM6 dans un méningiome atypique (x400).

C. Indice mitotique et marqueurs de prolifération et du cycle cellulaire

a. Indice mitotique

L'indice mitotique est corrélé de façon inverse avec la survie sans récurrence (modèle de Cox : $p=0.02$; logrank : $p=0.016$), l'indice mitotique étant en moyenne de 6,7/1,6 mm² dans les méningiomes de grade II et 0,8/1,6 mm² dans les méningiomes de grade I (figure 2B).

b. Ki-67

L'indice de prolifération évalué avec l'anticorps Ki-67 est significativement plus élevé dans les méningiomes atypiques (16.3%; IC 95% : 12.8-19.8) que dans les méningiomes de grade I (3.2%; IC 95% : 1.7-4.7) ($p<0.001$) (figure 2C, figure 2D).

Le modèle de Cox met en évidence une corrélation inverse entre le taux de cellules marquées pour Ki-67 et la survie sans récurrence ($p=0.003$). Avec ce modèle, un indice prolifératif de 20% entraîne un risque relatif de récurrence de 3,3 en comparaison avec un indice de 5% (figure 3A). Dans le groupe des méningiomes de grade I, il n'y a pas de corrélation entre le taux de cellules marquées pour Ki-67 et la survie sans récurrence (Logrank : $p=0.2$; Cox : $p=0.09$). Dans le groupe des méningiomes atypiques, il existe une corrélation significative entre le taux de cellules marquées et le risque de récurrence (Cox : $p=0.03$).

La concordance inter-observateur est excellente (corrélation intraclasse : 0.93; 95% CI: 0.89-0.96).

Marqueur	Global	Grade I	Grade II	P
Ki-67	9.3% (6.9-11.8)	3.2% (1.7-4.7)	16.3% (12.8-19.8)	<0.001*
MCM6	42.6% (34.9-50.3)	21.8% (15.4-28.2)	66.4% (58.0-74.8)	<0.001*
PHH3	1.6‰ (1.2-2.0)	0.7‰ (0.5-0.9)	2.7‰ (2.2-3.2)	<0.001*
Cycline D1	59.6% (52.6-66.6)	50.4% (39.9-60.1)	70.0% (62.1-77.9)	0.004*
P53	24.3% (18.4-30.3)	17.3% (10.0-24.6)	32.4% (23.3-41.5)	0.010*
IC : intervalle de confiance; *, statistiquement significatif ($p \leq 0.05$), F-test (ANOVA).				

TABLEAU 3. Résultats de l'immunohistochimie en fonction du grade histologique (comptage pour 1000 cellules, IC 95%).

c. MCM6

Le taux moyen de cellules marquées pour MCM6 est significativement plus élevé dans les méningiomes de grade II (66.4%; IC 95% : 58.0-74.8) que de grade I (21.8%; 95% CI: 15.4-28.2) ($p < 0.001$).

L'analyse de survie met en évidence une corrélation inverse entre MCM6 et la survie sans récurrence, avec le modèle de Cox ($p < 0.001$) comme avec le test de Log-rank (valeur seuil de 50%; $p < 0.001$) (figure 2D). Un taux de 70% de noyaux marqués entraîne un risque relatif de récurrence de 5,1 par rapport à un taux de 25%. Une augmentation de 1% du taux de cellules marquées expose à une augmentation de 3% du risque de récurrence (IC 95% : 1-4) (figure 3B). Le taux de récurrence est de 80% pour un taux de cellules marquées pour MCM6 de plus de 70% et de 31% pour un taux

inférieur à 70%. Dans le groupe des méningiomes de grade I, il n'y a pas de corrélation entre le taux de cellules marquées pour MCM6 et la survie sans récurrence (Logrank : $p=0,30$; Cox : $p=0,24$). Dans le groupe des méningiomes atypiques, on retrouve par contre une corrélation significative entre le taux de cellules marquées et le risque de récurrence (Cox : $p=0,025$; Logrank : $p=0,022$).

Le taux de corrélation intraclasse entre les deux lecteurs est de 0.97 (95% CI: 0.95-0.98), correspondant à une excellente concordance inter-observateur, plus élevée que Ki-67.

d. Phospho-histone H3

Il est retrouvé une différence significative du taux de cellules marquée pour PHH3 entre les tumeurs de grade I (0.7‰; IC 95% : 0.5-0.9) et de grade II (2.7‰; IC 95% : 2.2-3.2) ($p<0.001$).

Avec le modèle de Cox, l'expression de PHH3 est corrélée de façon significative avec la survie sans récurrence ($p=0.037$). Avec une valeur seuil de 2‰, le test du Log-Rank permet d'obtenir une plus forte corrélation ($p=0.001$) (figure 2E).

Le coefficient de corrélation intraclasse est de 0,81 (IC 95% : 0.71-0.88).

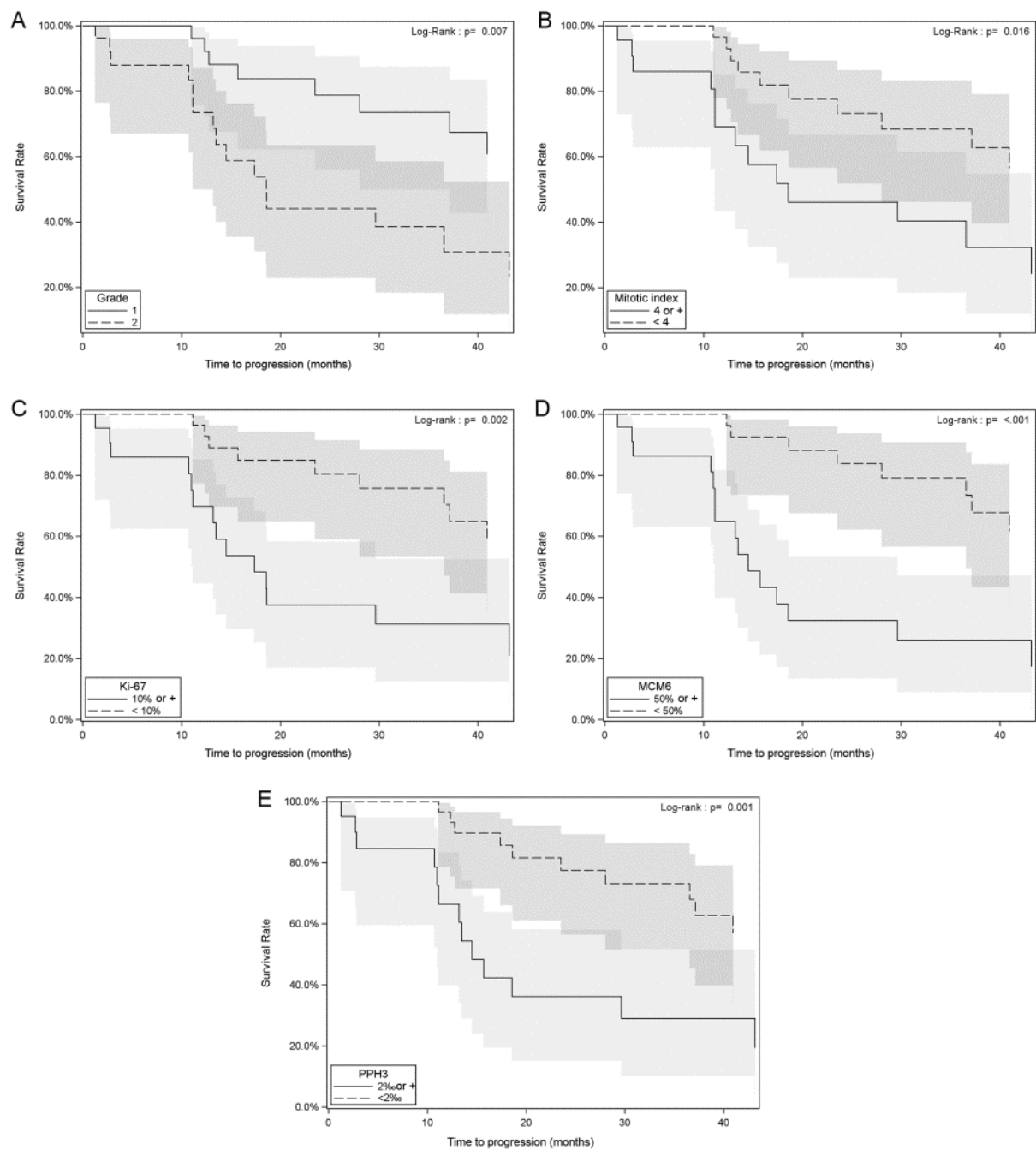


FIGURE 2. Corrélation avec la survie sans récidence du grade (A), de l'indice mitotique (B), Ki-67 (C), MCM6 (D) et PPH3 (E).

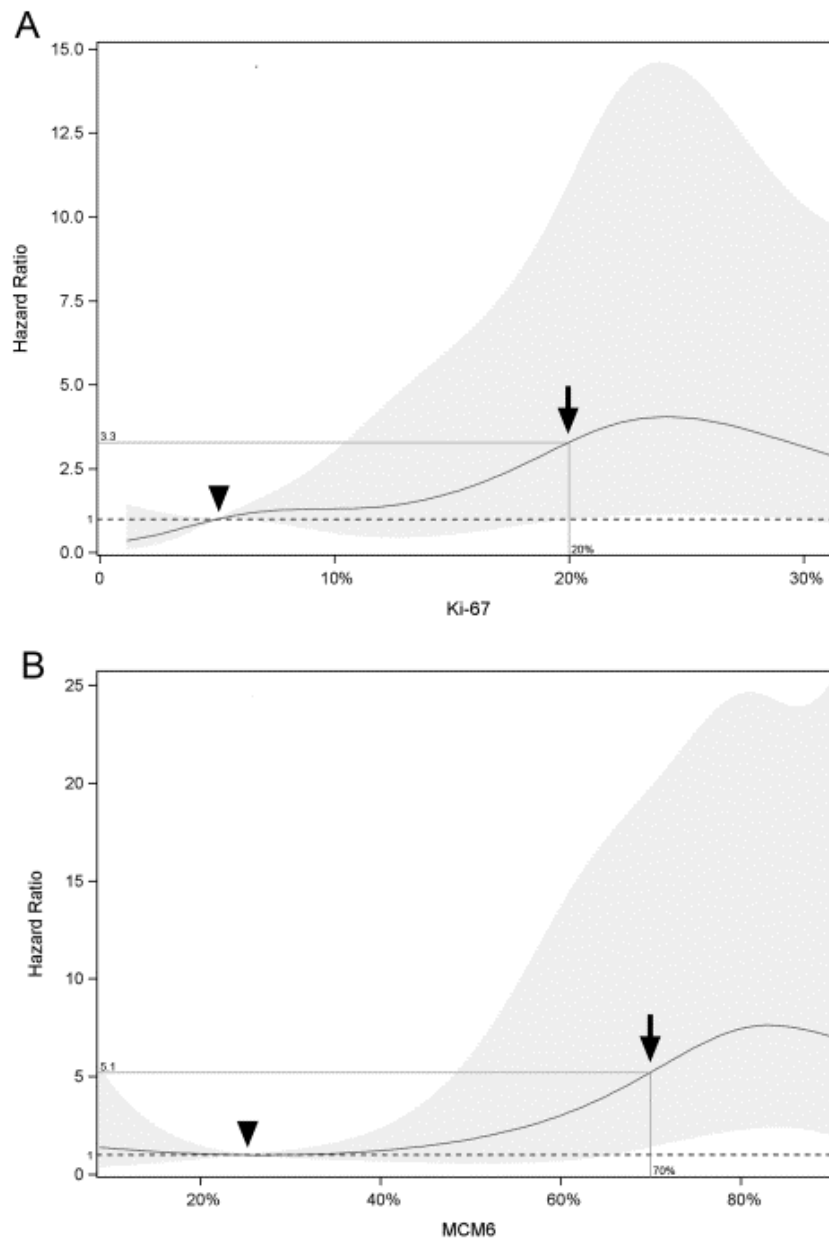


FIGURE 3. Modèle de Cox. Effet de la variation du taux de cellules marquées pour Ki-67 et MCM6, estimé avec la méthode cubic spline (modèle de Cox) ; absence d'effet temps dépendant (Ki-67: $p=0.277$, MCM6: $p=0.745$) ou non linéaire significatif (Ki-67: $p=0.241$, MCM6: $p=0.554$). (A) Corrélacion entre le risque de récidence et l'expression de Ki-67 ; par exemple, un taux marquage de 20% pour Ki-67 (flèche) correspond à un risque relatif de récidence de 3,3, en comparaison avec un taux de 5% (tête de flèche). (B) Corrélacion entre le risque de récidence l'expression de MCM6 ; par exemple, un taux de 70% (flèche) correspond à un risque relatif de 5,1 en comparaison avec un taux de 25% (tête de flèche) (zone grisée : IC 95%).

e. Cycline D1

L'expression de la cycline D1 est corrélée de façon significative avec le grade histologique (grade I: 50.4%, IC 95% : 39.9-60.9; grade II : 70.0%, IC 95% : 62.1-77.9; $p=0.004$), sans corrélation significative avec la survie sans récurrence (modèle de Cox : $p=0,40$; Log-rank, seuil à 60% : $p=0,236$).

Le coefficient de corrélation intraclasse est de 0.87 (IC 95% : 0.80-0.92).

f. P53

L'expression de p53 est significativement plus élevée dans les méningiomes de grade II (32.4%; IC 95% : 23.3-41.5) que de grade I (17.3%; IC 95% : 10.8-28.4) ($p=0.010$), sans corrélation significative avec la survie sans récurrence (modèle de Cox : $p=0,763$; Log-rank, seuil à 25% : $p=0,255$).

Le coefficient de corrélation intraclasse est de 0.84 (IC 95% : 0.73-0.90).

g. Corrélation entre les marqueurs

Le test de corrélation de Spearman permet de retrouver une corrélation significative entre les différents marqueurs (PHH3 et p53: $p<0.004$; autres marqueurs: $p<0.001$). Les corrélations les plus fortes sont Ki-67 et MCM6 (0.76), suivis par Ki-67 et PHH3 (0.75), MCM6 et PHH3 (0.75) (tableau 4).

Protéine	Ki67	MCM6	PHH3	Cycline D1	P53
Ki67	1.00	0.76	0.75	0.48	0.46
MCM6	0.76	1.00	0.75	0.60	0.54
PHH3	0.75	0.75	1.00	0.44	0.36
Cyclin D1	0.48	0.60	0.44	1.00	0.68
P53	0.46	0.54	0.36	0.68	1.00

TABLEAU 4. Corrélation entre les marqueurs de prolifération et du cycle cellulaire (coefficient de Spearman).

D. Expression de HuR et de méthylHuR

a. Valeur pronostique de l'expression de HuR dans les méningiomes

Il existe une surexpression cytoplasmique significative de HuR dans les méningiomes atypiques (grade II) (moy. : 785 ; IC 95% : 650-920) par rapports aux méningiomes de grade I (moy. : 488 ; IC 95% : 352-625) (p=0,0007). Le score cytoplasmique de HuR est corrélé négativement avec la survie sans récidence, avec le modèle de Cox (p=0,044) comme avec le test du Log-rank (seuil : moyenne ; p=0,028).

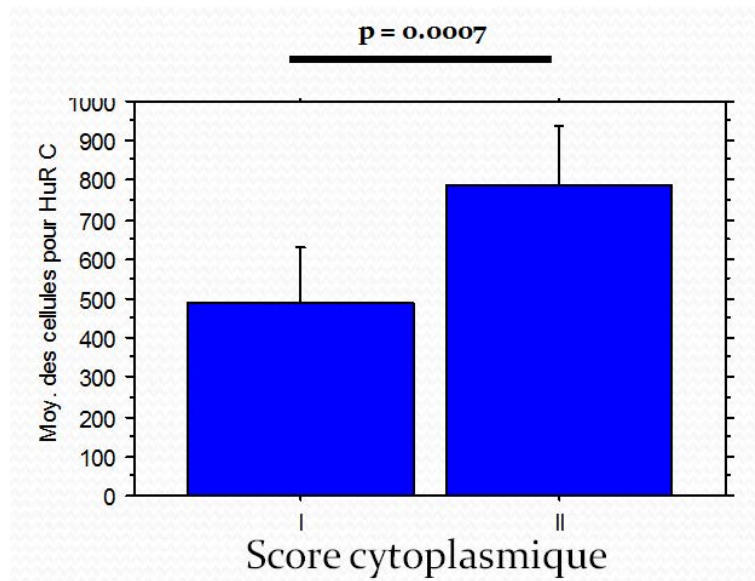


FIGURE 4. Surexpression cytoplasmique significative de HuR dans les méningiomes atypiques (grade II) par rapport aux méningiomes de grade I ($p=0,0007$).

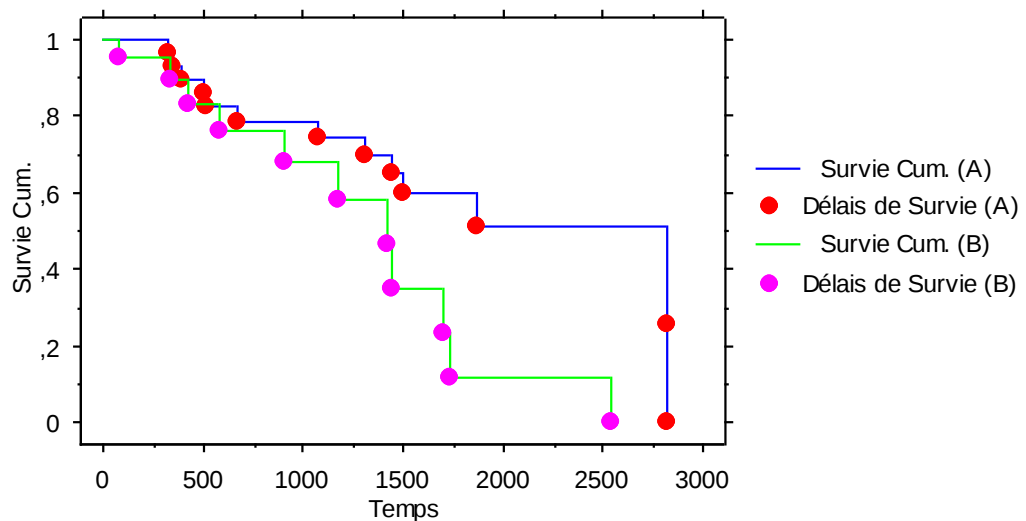


FIGURE 5. Corrélation inverse entre l'expression cytoplasmique de HuR et la survie sans récurrence (A : $<$ moyenne ; B : $\geq$ moyenne) ($p=0,028$).

Pour le score nucléaire, il n'y a pas de différence significative entre les méningiomes de grade I et de grade II (grade I : moy. 2473 ; IC 95% : 2182-2764 vs grade II : moy. 2512 ; IC 95% : 2199-22825) ($p=0,936$), ni de corrélation avec la survie sans récurrence (modèle de Cox : $p=0,959$; Log-rank, moyenne : $p=0,316$).

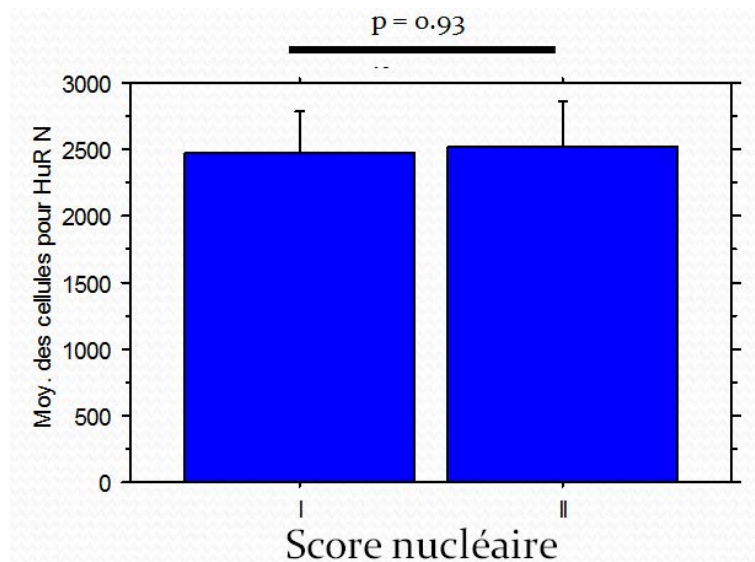


FIGURE 6. Absence de différence d'expression significative entre méningiomes de grade I et II pour le score nucléaire ($p=0,93$).

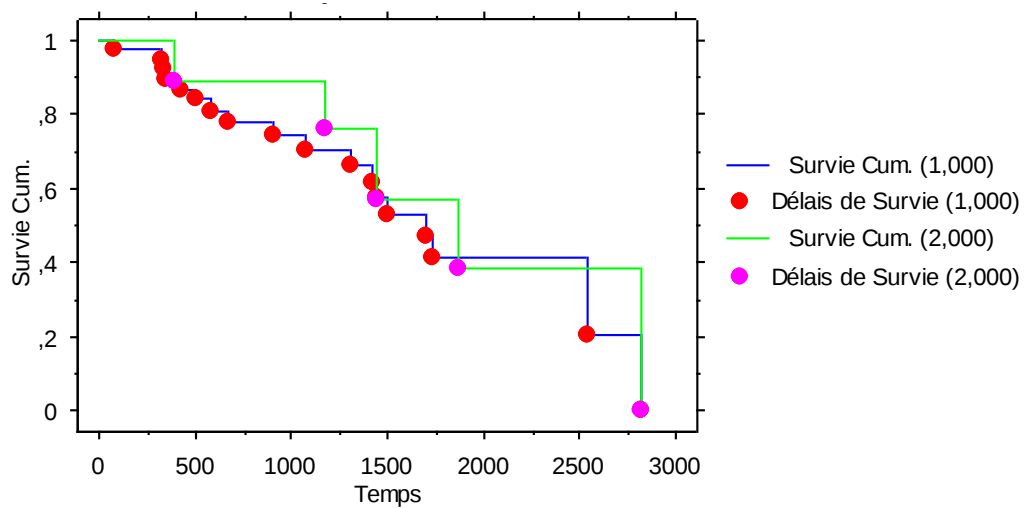


FIGURE 7. Absence de corrélation significative entre l'expression nucléaire de HuR et la survie sans récidence (A : $<$ moyenne ; B : $\geq$ moyenne) ($p=0,316$).

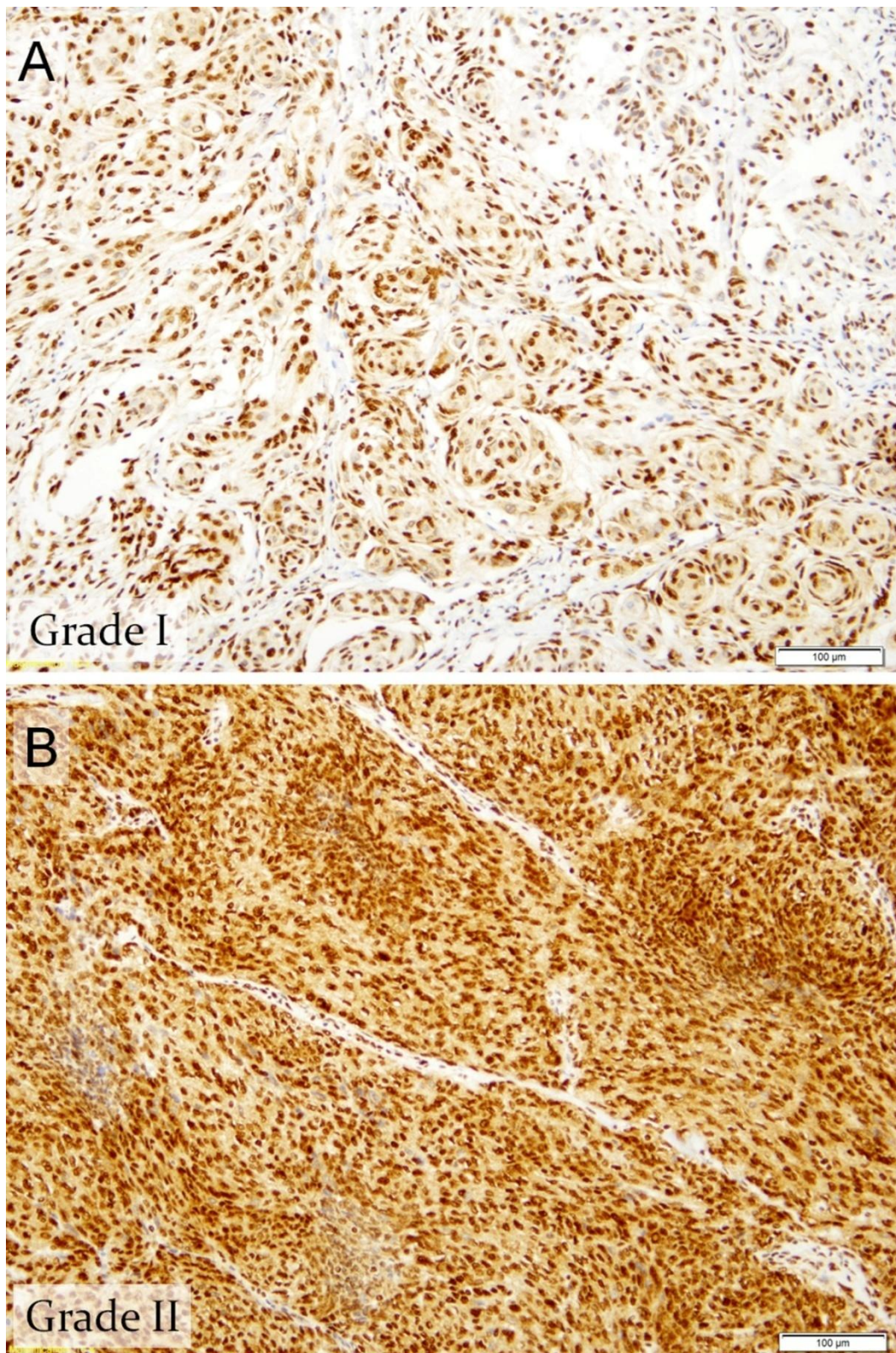


FIGURE 8. Expression de HuR dans les méningiomes. (A) Expression de HuR dans un méningiome méningothélial de grade I : marquage principalement nucléaire, marquage cytoplasmique très faible. (B) Méningiome atypique (grade II) : forte expression nucléaire et expression cytoplasmique modérée (x100).

Avec l'évaluation semi-quantitative, on retrouve une corrélation significative entre le score cytoplasmique et le grade histologique ($p=0,0009$) ainsi qu'avec le risque de récurrence (Log-rank : $p=0,012$). Le score semi-quantitatif est également corrélé avec le grade ($p=0,032$), mais pas avec la survie ($p=0,92$).

b. Western blot

La technique de Western Blot permet de ne retrouver qu'une seule bande, au poids moléculaire attendu de 36 Kda (figure 9). Dans les deux méningiomes de grade I non récidivants testés, l'expression de HuR est principalement nucléaire. Le méningiome de grade II présente une forte expression cytoplasmique, comparable à l'expression nucléaire. Dans le méningiome de grade I récidivant (cas reclassé en méningiome de grade I à la relecture histologique), il existe une expression cytoplasmique modérée, restant plus faible que l'expression nucléaire.

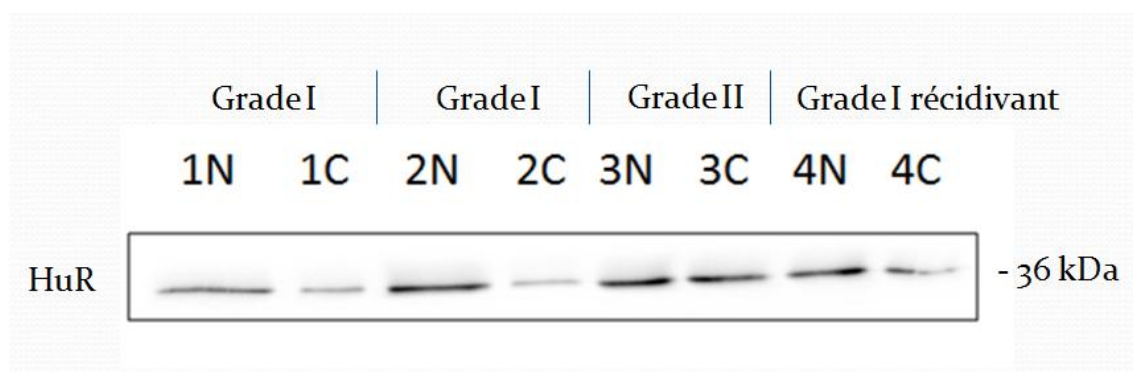


FIGURE 9. Expression de HuR en Western Blot sur extraction fractionnée à partir de tissu congelé.

c. Expression de méthyl(R217)HuR et corrélation avec HuR

Une expression cytoplasmique de méthylHuR (méthyl(R217)HuR) est présente dans 92% (55/60) des cas, avec également un marquage nucléaire dans 23% (14/60) des cas (figure 10). Dans les cas positifs, l'expression nucléaire reste très faible. Il n'y a pas d'expression de méthylHuR dans 8% (5/60) des cas.

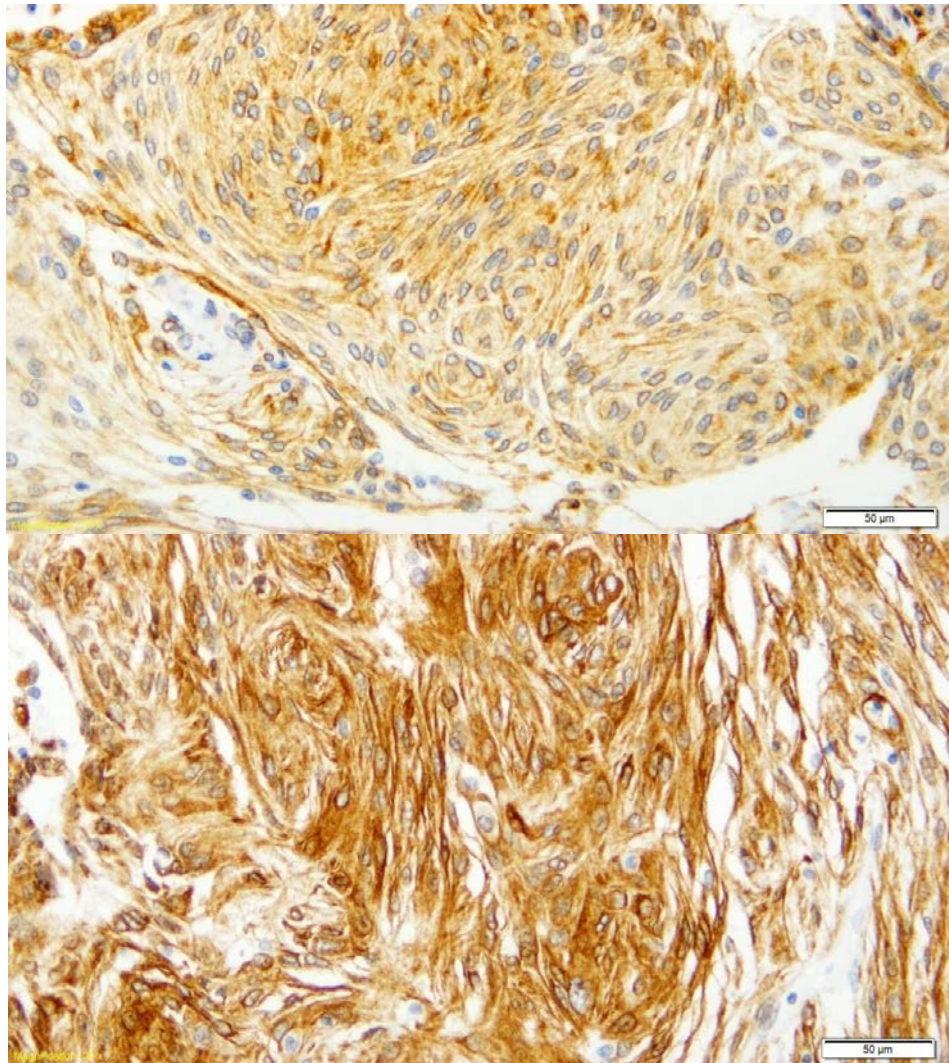


FIGURE 10. Expression de MéthylHuR. En haut, expression cytoplasmique faible à modérée de méthylHuR (méningiome de grade I) ; en bas, expression cytoplasmique forte et diffuse, et faible expression nucléaire de méthylHuR par quelques cellules tumorales (grade II) (immunohistochimie, objectif x20).

L'expression cytoplasmique de méthylHuR est corrélée significativement avec l'expression cytoplasmique de HuR ($\rho : 0,372 ; p=0,004$). Il existe une corrélation significative entre l'expression nucléaire de méthylHuR et l'expression nucléaire de HuR ($\rho : 0,432 ; p=0,0009$) (figure 11).

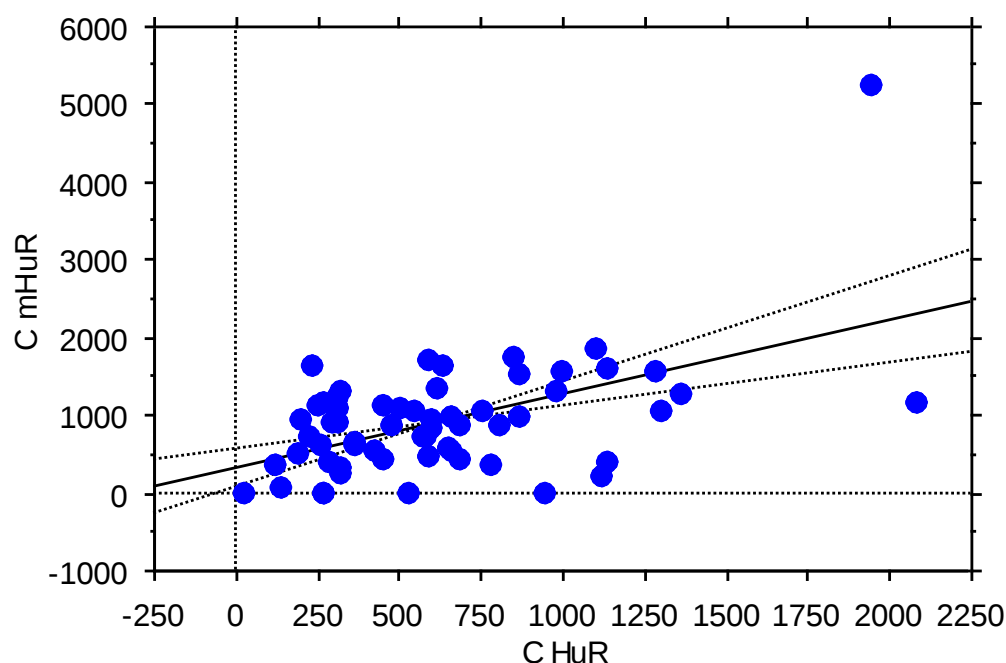


FIGURE 11. Corrélation significative entre les expressions cytoplasmiques de HuR et méthylHuR ($\rho : 0,372 ; p=0,004$).

Il n'y a pas de corrélation significative entre l'expression cytoplasmique de méthylHuR et le grade histologique ($p=0,93$). Il n'y a pas non plus de corrélation entre la survie sans récurrence et l'expression nucléaire ($p=0,43$) ou cytoplasmique ($p=0,35$) de méthylHuR.

Il n'y a pas de corrélation entre l'expression de méthylHuR et l'indice mitotique ou les marqueurs de prolifération et du cycle cellulaire.

d. Localisation subcellulaire de méthyl-arginine et HuR par technique Duolink

Dans les 4 cas testés, on obtient en microscopie confocale un signal strictement cytoplasmique avec les anticorps anti-méthylarginine/anti-HuR, sans marquage intranucléaire (figure 12).

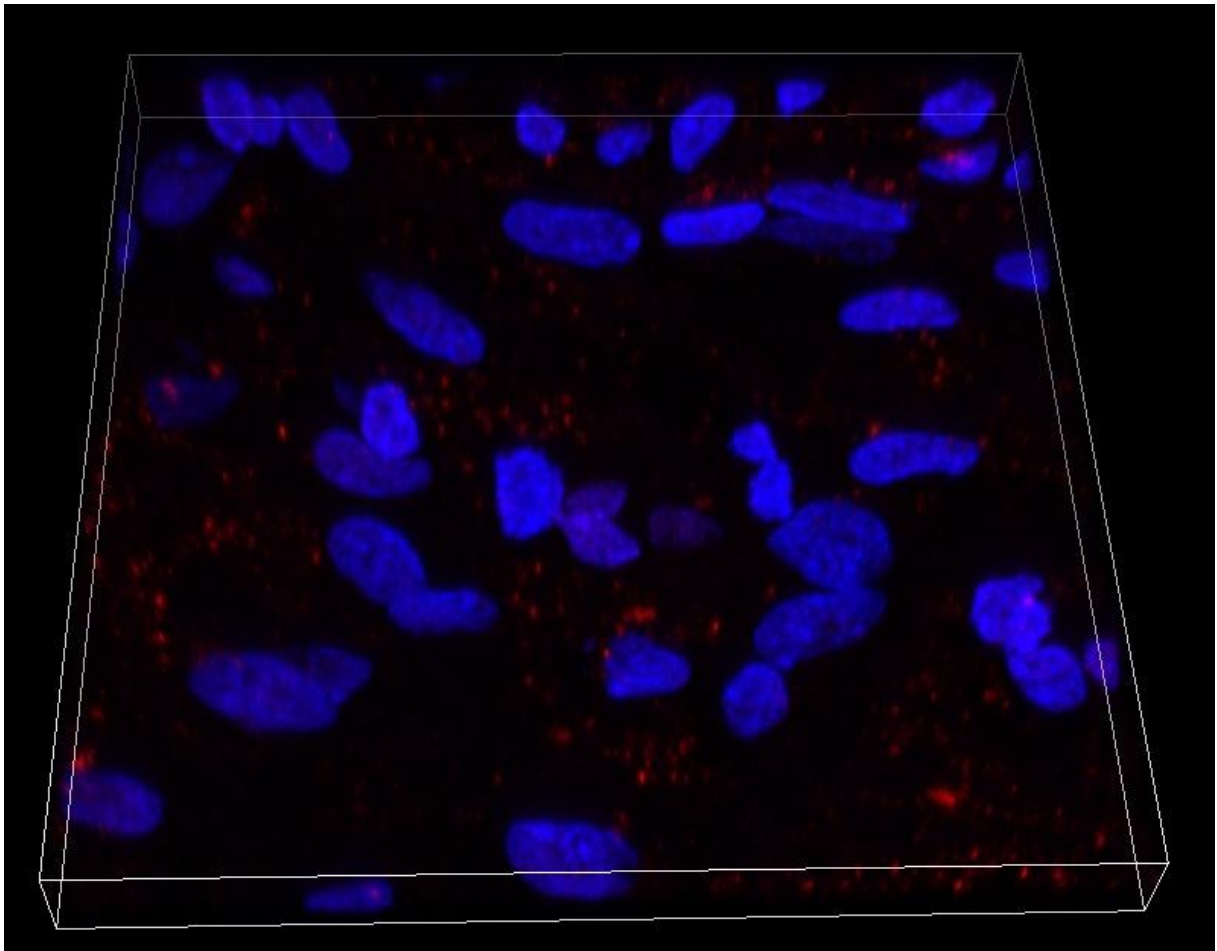


FIGURE 12. Duolink, méningiome de grade I présentant en immunohistochimie une forte expression de méthyl(R217)HuR : la microscopie confocale montre un signal punctiforme strictement intracytoplasmique en Duolink avec les anticorps anti-méthylarginine/anti-HuR (x600, reconstruction tridimensionnelle) (objectif x60).

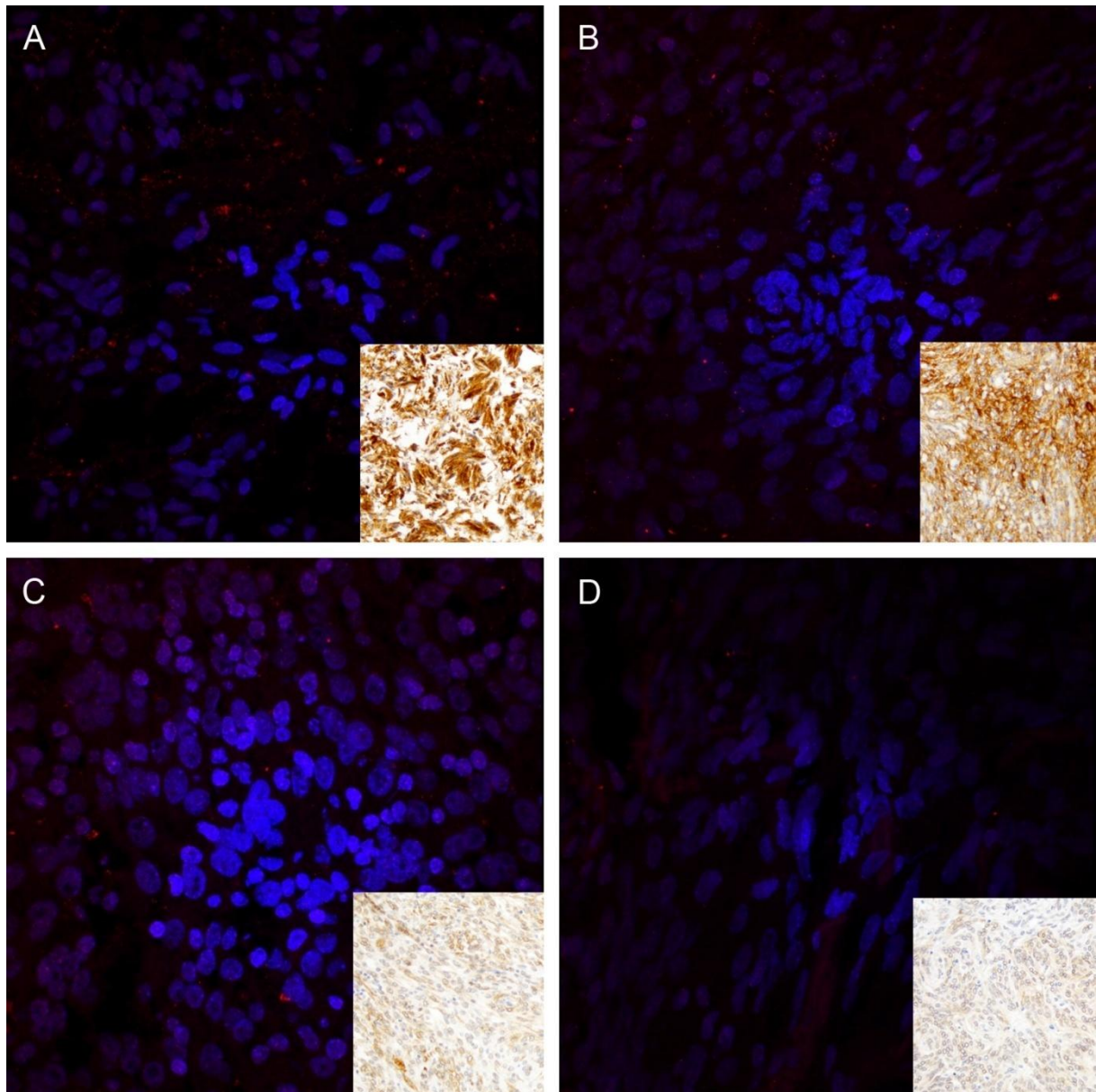


FIGURE 13. Duolink, anti-HuR et anti-méthylarginine en microscopie confocale (objectif x20). En haut, nombreux signaux punctiformes intracytoplasmiques dans des méningiomes de grade I (A) et II (B) présentant en immunohistochimie une forte expression de méthyl-HuR (inserts). En bas, marquage plus faible dans des méningiomes de grade I (C et D), d'intensité et de distribution comparables avec l'immunohistochimie (inserts). Valeurs obtenues par comptage : (A) 826 points/champ ; (B) 257 points/champ ; (C) 139 points/champ ; (D) 30 points/champ.

Le nombre de points par champ est en moyenne de 313. Ces valeurs obtenues par technique Duolink sont corrélées de façon significative avec le score

cytoplasmique obtenu en immunohistochimie pour méthylHuR ($\tau=1$; $p=0,04$) (figure 13).

E. Quantification des microARNs miR16 et miR519

a. MiR16

Il existe une nette diminution de miR16 dans les méningiomes par rapport aux échantillons de tissu sain ($p=0,004$) (figure 14). On note l'existence d'une diminution non significative de miR16 dans les méningiomes de grade I par rapport aux méningiomes de grade II ($p=0,07$).

Il n'est pas mis en évidence de corrélation entre miR16 et l'expression de HuR (nucléaire : $p=0,78$; cytoplasmique : $p=0,16$), l'indice mitotique ($p=0,16$), Ki-67 ($p=0,17$), MCM6 ($p=0,09$), p53 ($p=0,450$) ou la cycline D1 ($p=0,67$). On note l'existence d'une corrélation positive avec le taux de cellules marquées pour PHH3 ($\rho=0,278$; $p=0,038$).

Il n'y a pas de corrélation avec la survie sans récurrence (Cox : $p=0,26$).

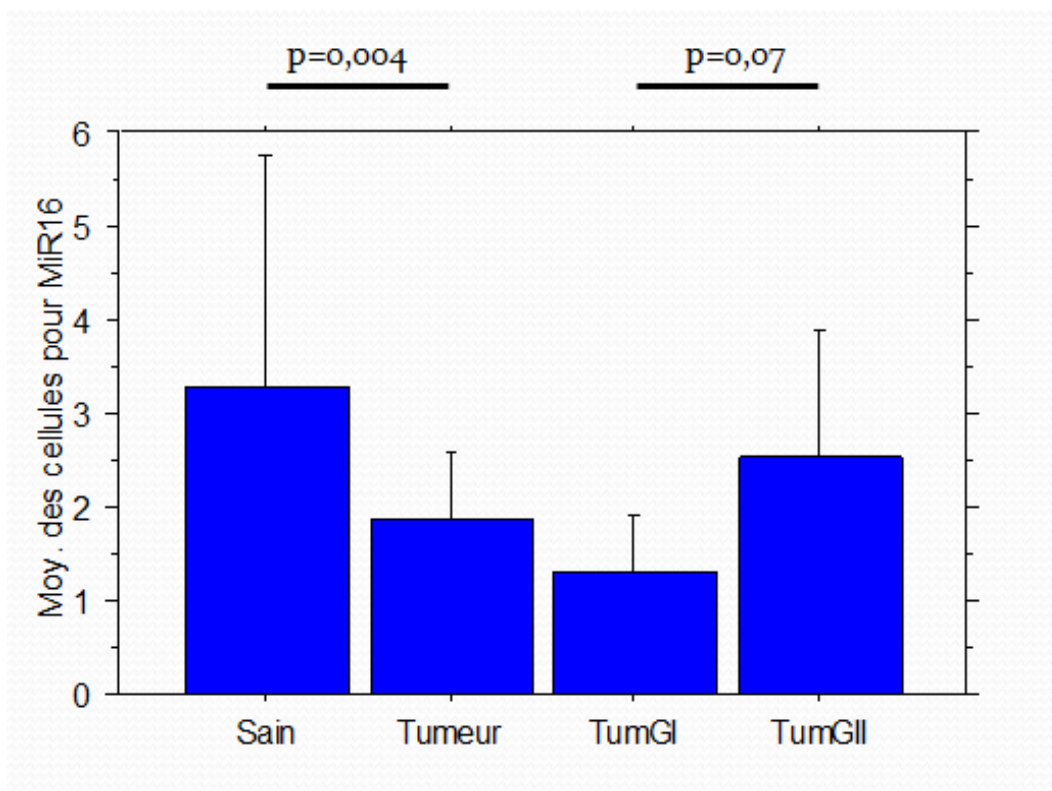


FIGURE 14. Diminution significative de miR16 dans les méningiomes par rapport aux échantillons de ménin­ge saine ($p=0,004$). Absence de différence significative entre tumeurs de grade I et de grade II ($p=0,07$).

b. MiR519

MiR519 est diminué de façon très significative dans les méningiomes par rapport aux échantillons de tissu sain ($p<0,000001$), sans différence significative entre méningiomes de grades I et II ($p=0,68$) (figure 15).

Il n'y a pas de corrélation significative entre miR519 et l'expression de HuR (nucléaire : $p=0,12$; cytoplasmique : $p=0,46$), l'indice mitotique ($p=0,93$), Ki-67 ($p=0,93$), MCM6 ($p=0,90$), PHH3 ($p=0,93$), p53 ($p=0,10$) ou la cycline D1 ($p=0,36$).

Il n'y a pas de corrélation avec la survie sans récidence (Cox : $p=0,97$).

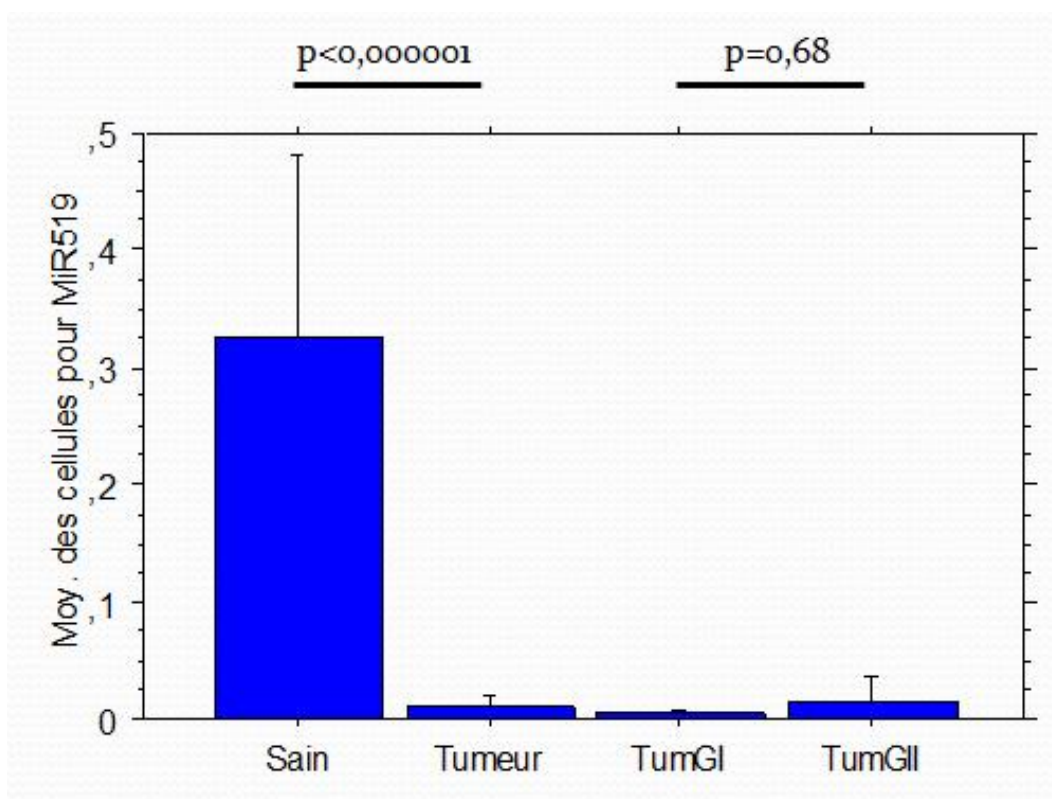


FIGURE 15. Diminution significative de miR519 dans les méningiomes par rapport aux échantillons de méninge saine ($p < 0,000001$). Absence de différence significative entre tumeurs de grade I et de grade II ($p = 0,68$).

II. Etude expérimentale

A. Expression de HuR

En normoxie, l'expression de HuR est principalement nucléaire, avec une expression cytoplasmique plus faible. L'immunofluorescence montre une surexpression cytoplasmique de HuR en condition d'hypoxie (figure 16).

L'inhibition de HuR par siHuR est efficace, le Western Blot (figure 17) et l'immunofluorescence montrant une nette diminution de son expression, avec persistance d'un faible signal cytoplasmique (figure 16).

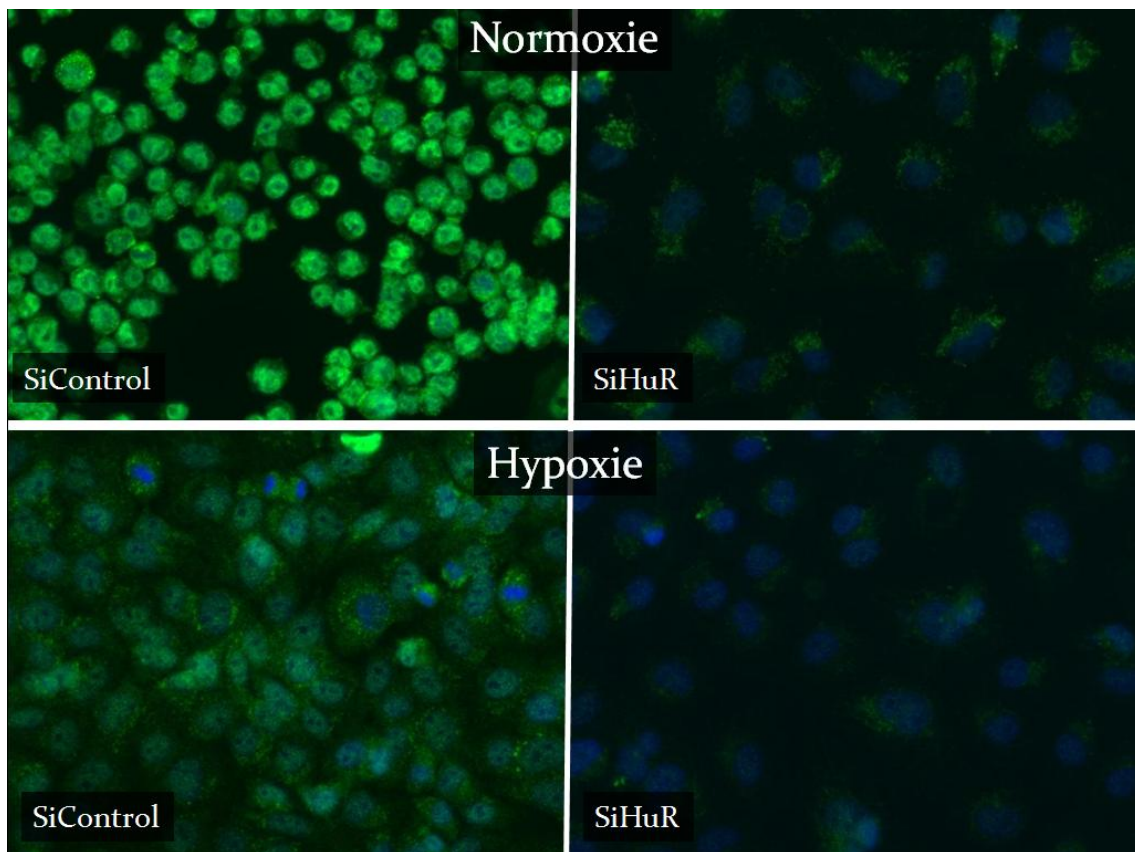


FIGURE 16. Effets de l'hypoxie et de SiHuR. Surexpression cytoplasmique de HuR en hypoxie (en bas à gauche), par rapport au contrôle en normoxie (en haut à gauche). Nette diminution de l'expression de HuR par l'utilisation de SiHuR (à droite) (immunofluorescence, objectif x20).

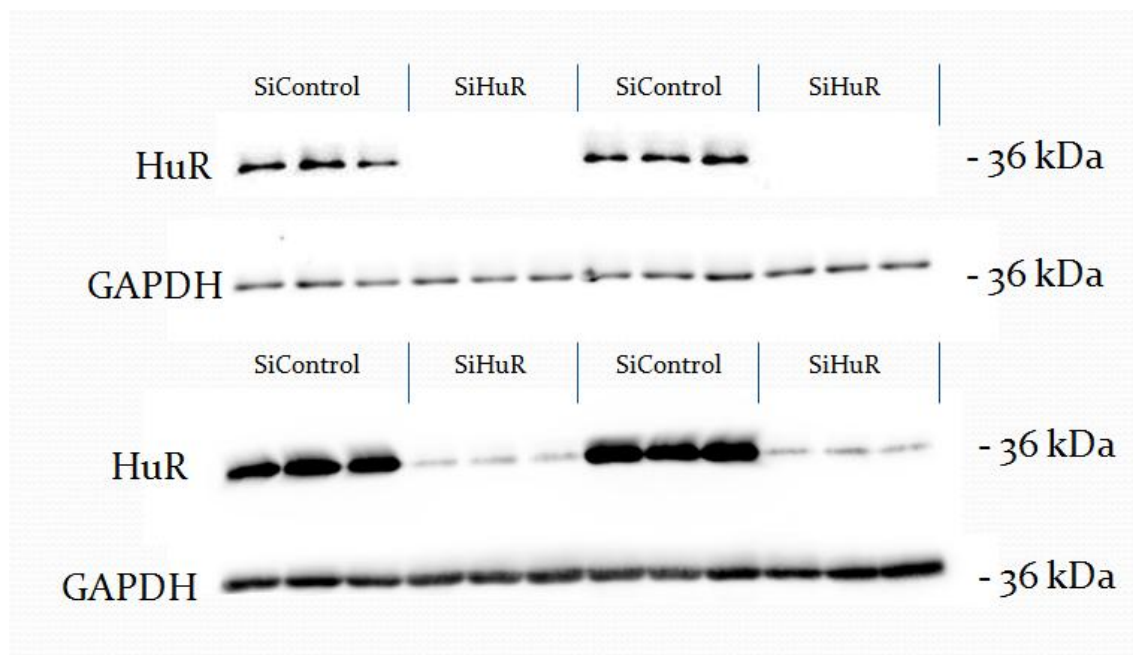


FIGURE 17. Western Blot : nette diminution de l'expression de HuR par l'utilisation du RNA silencer siHuR (chaque piste correspondant à une transfection indépendante).

B. Effets de l'inhibition de HuR et de l'hypoxie sur la croissance cellulaire

L'hypoxie seule permet de diminuer significativement la croissance cellulaire (nombre de cellules par μL) à J2 ($p=0,003$), J4 ($p=0,001$) et J7 ($p=0,0004$) (J3 : $p=0,13$). En normoxie, l'inhibition de HuR entraîne une diminution significative de la croissance cellulaire à J2 ($p=0,0006$), J3 ($p=0,002$), J4 ($p=0,0004$) et J7 ($p=0,006$). On retrouve un effet similaire de siHuR en conditions d'hypoxie (J2 : $p=0,005$; J3 : $p=0,51$; J4 : $p=0,0004$; J7 : $p=0,0004$) (figure 18).

L'utilisation combinée de l'hypoxie et de siHuR permet d'obtenir un effet cumulatif par rapport à siHuR seul ou à l'hypoxie seule ($p=0,0004$) (figure 18).

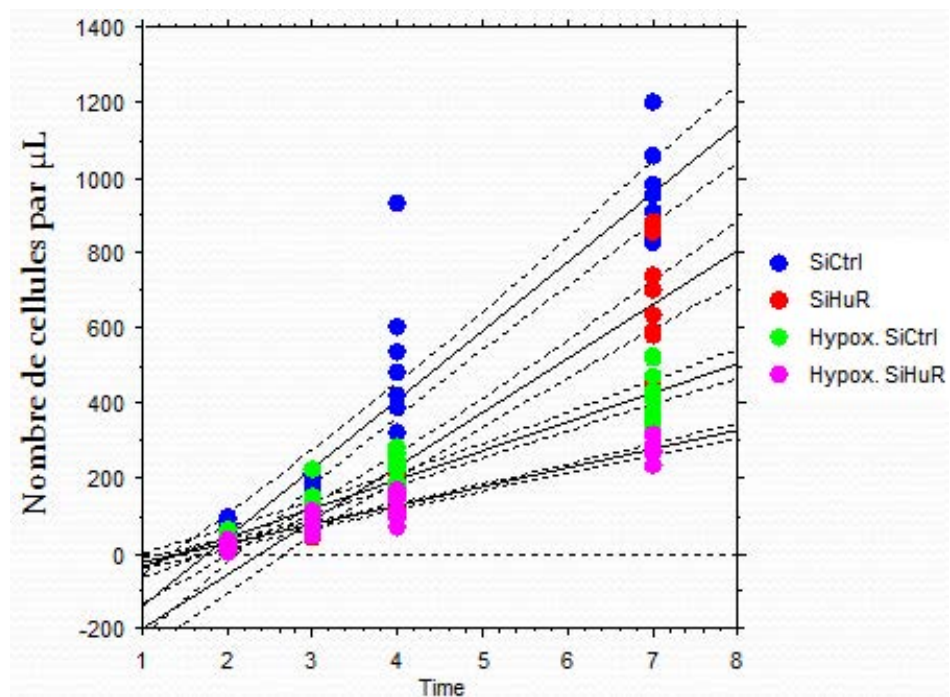
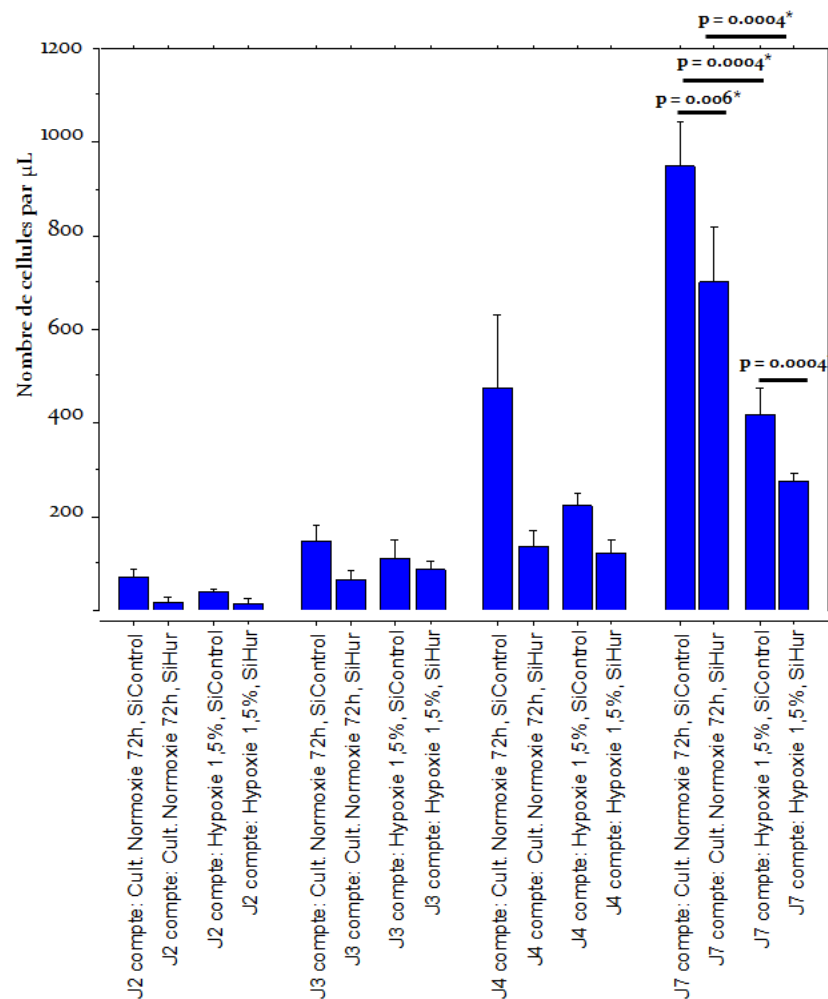


FIGURE 18. Effets de l'hypoxie et de siHuR sur la croissance cellulaire (nombre de cellules par μL ; compte cellulaire à J2, J3, J4 et J7) ($n=9$).

C. Effets de l'hypoxie et de siHuR sur l'indice prolifératif

L'hypoxie entraîne une diminution significative de l'indice prolifératif évalué avec l'anticorps MIB1 (Ki-67) ($p=0,0009$). L'inhibition de HuR par siRNA permet également de diminuer l'indice prolifératif, en normoxie ($p=0,0004$) comme en hypoxie ($p=0,00016$) (figure 19, figure 20).

L'utilisation de siHuR potentialise l'effet de l'hypoxie sur la diminution de l'indice prolifératif ($p=0,001$), suggérant l'existence d'un effet synergique de siHuR et de l'hypoxie.

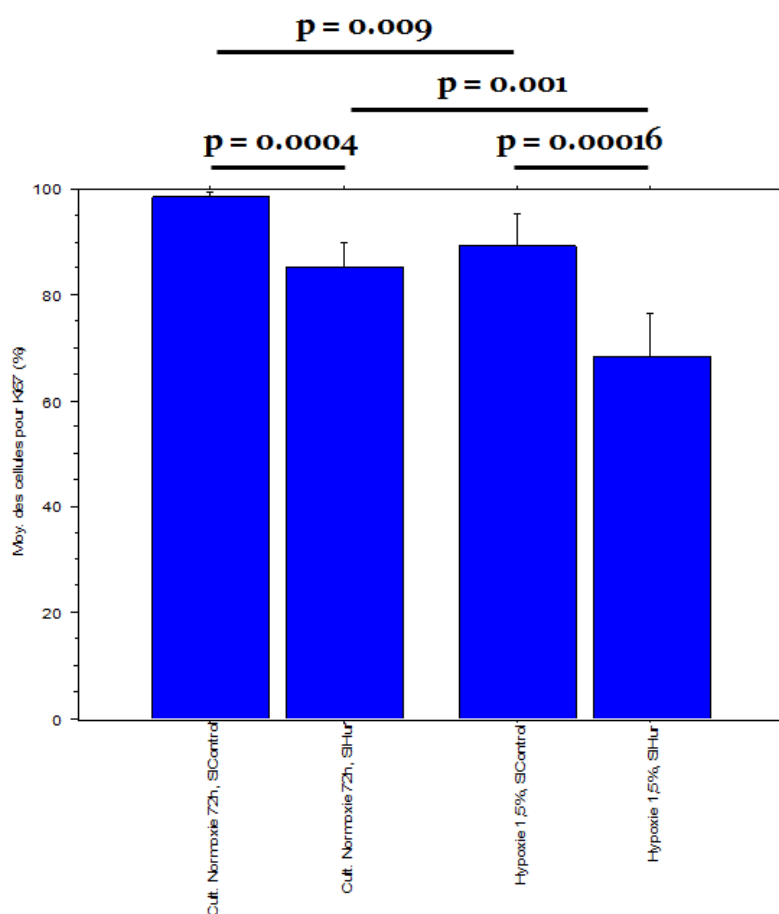


FIGURE 19. Diminution significative de la prolifération cellulaire (Ki-67) par l'inhibition de HuR ou par l'incubation en hypoxie ($n=9$).

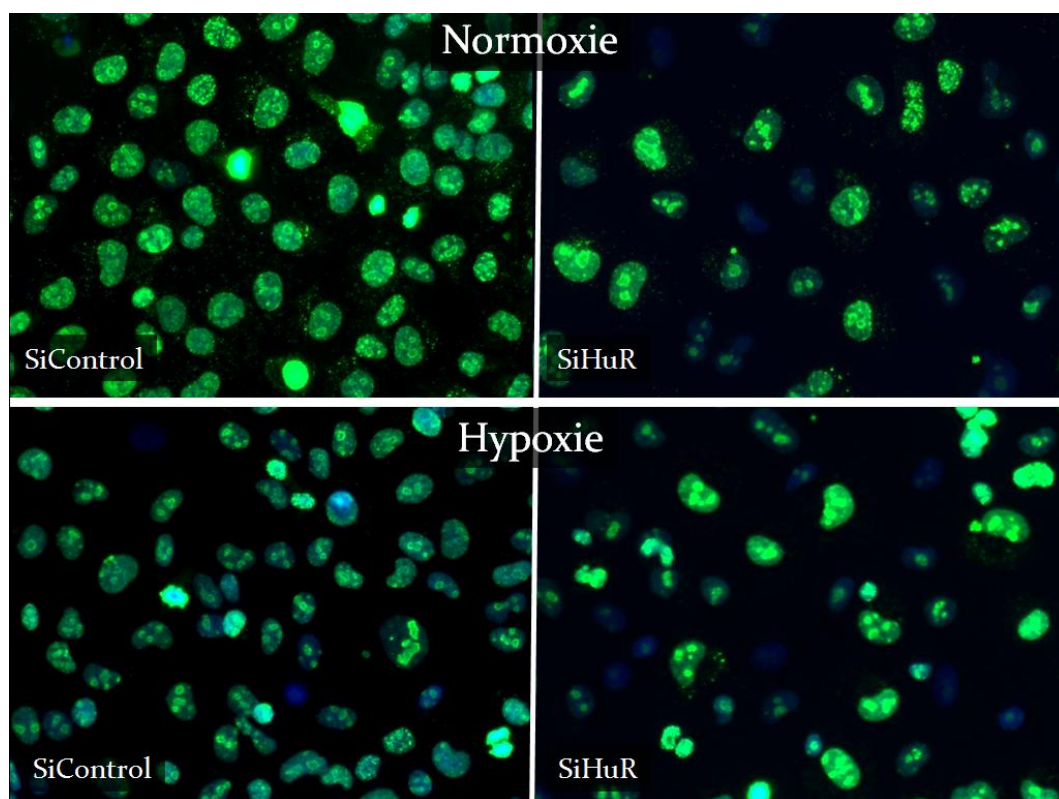


FIGURE 20. Diminution du taux de cellules marquées avec l'anticorps anti-Ki-67 secondaire à l'inhibition de HuR (à droite) par rapport au contrôle (à gauche), avec un effet plus marqué en hypoxie (en bas) qu'en normoxie (en haut) (immunofluorescence, objectif x20).

D. Effets de l'hypoxie et de l'inhibition de HuR sur l'apoptose

L'hypoxie seule n'entraîne pas d'augmentation significative de l'apoptose mise en évidence avec l'anticorps anti-caspase 3 clivée ($p=0,89$) (figure 21 et figure 22). En inhibant HuR par siRNA, on obtient une augmentation significative de l'apoptose ($p=0,0018$).

L'inhibition de HuR et l'hypoxie ont un effet synergique sur l'augmentation de l'apoptose, par rapport à siHuR ($p=0,001$) ou à la normoxie seuls ($p=0,01$) (figure 21).

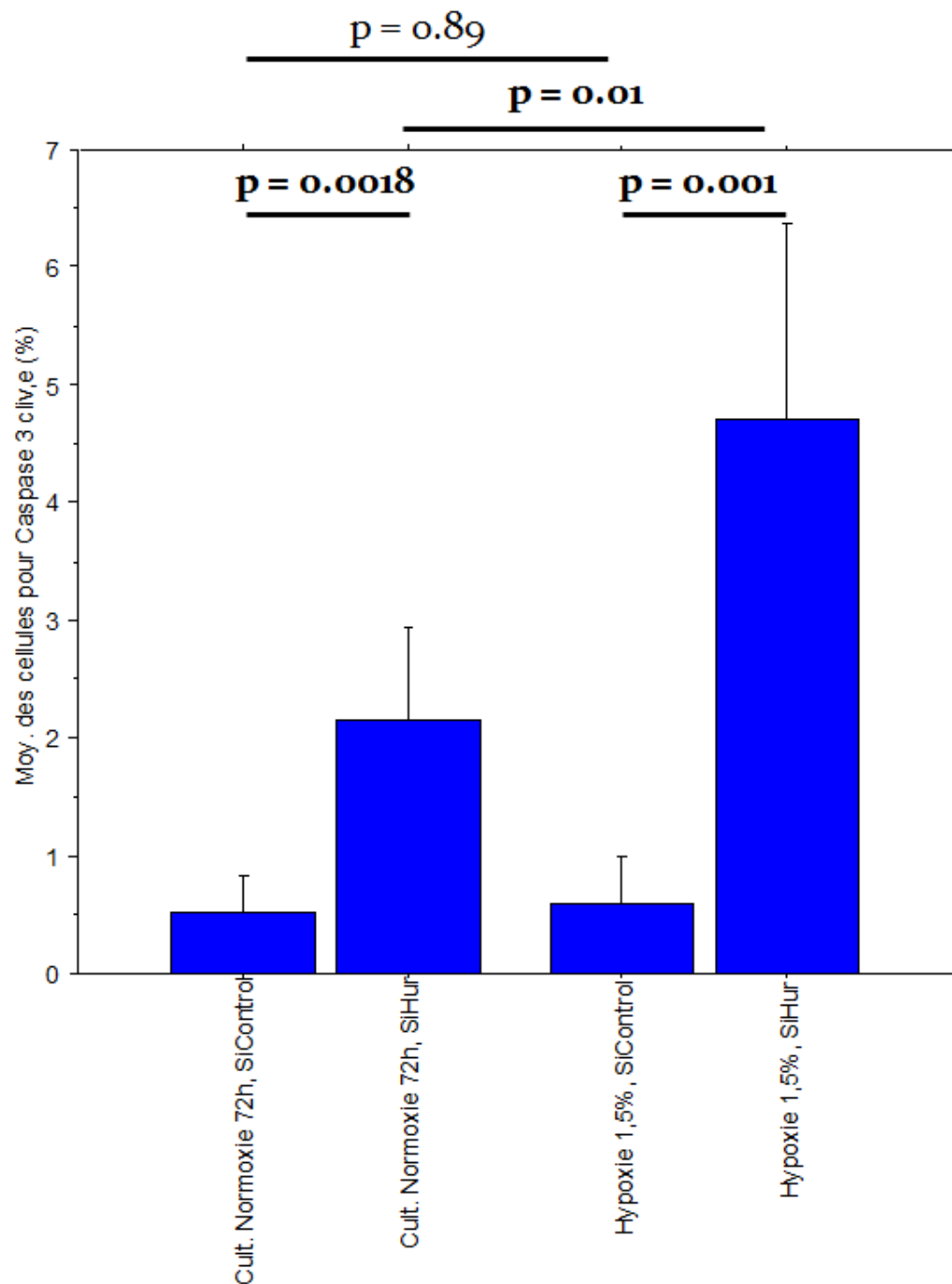


FIGURE 21. Augmentation significative de l'apoptose avec l'anticorps anti-caspase 3 clivée par l'inhibition de HuR, sans effet significatif pour l'hypoxie seule, et effet synergique de HuR et de l'hypoxie sur l'apoptose ($n=9$).

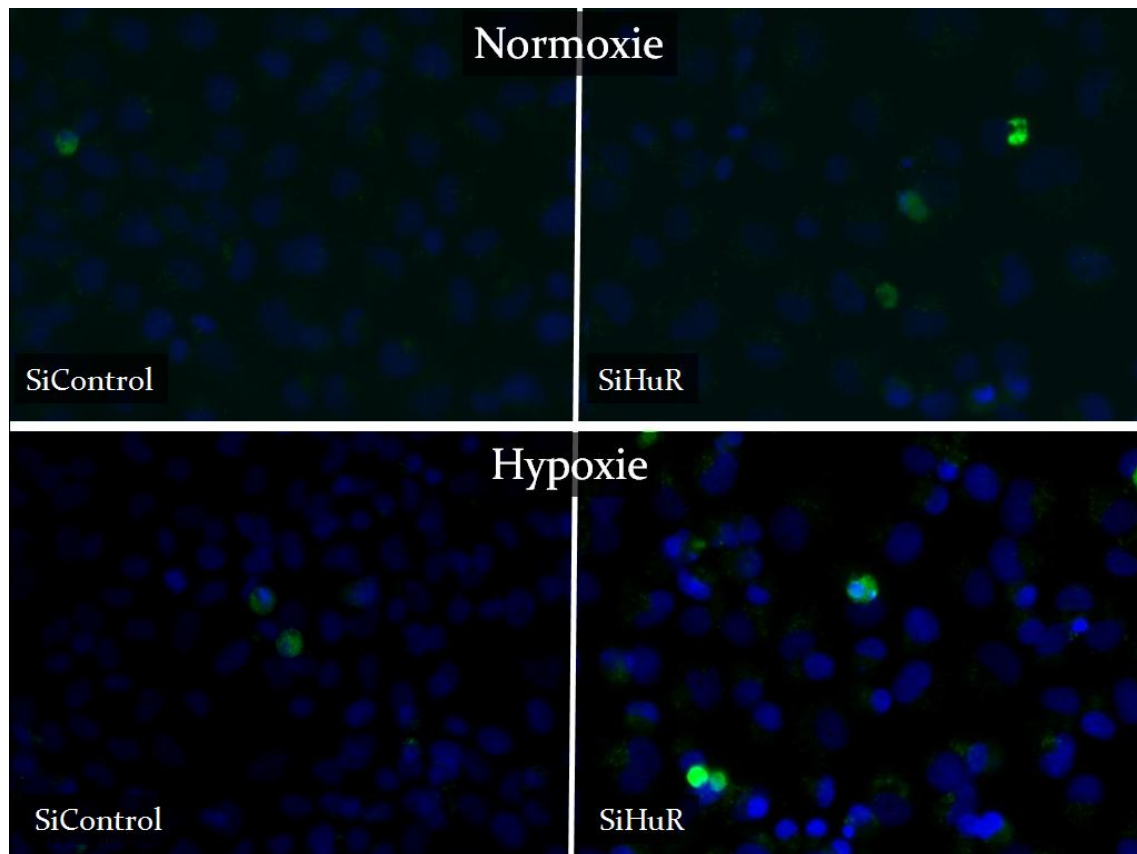


FIGURE 22. Augmentation du nombre de cellules en apoptose exprimant la caspase 3 clivée secondaire à l'inhibition de HuR (à droite) par rapport au contrôle (à gauche), avec un effet synergique en conditions d'hypoxie (en bas à droite) (immunofluorescence, objectif x20).

E. Effets de l'hypoxie et de siHuR sur l'expression de SIRT1

En Western Blot (figure 23), l'inhibition de HuR entraîne une diminution de l'expression de SIRT1, en normoxie ($p=0,01$) et en hypoxie ($p=0,0006$), sans effet cumulatif significatif de SiHuR avec l'hypoxie ($p=0,22$) (figure 24). L'hypoxie seule n'entraîne pas de diminution significative de SIRT1 ($p=0,79$).

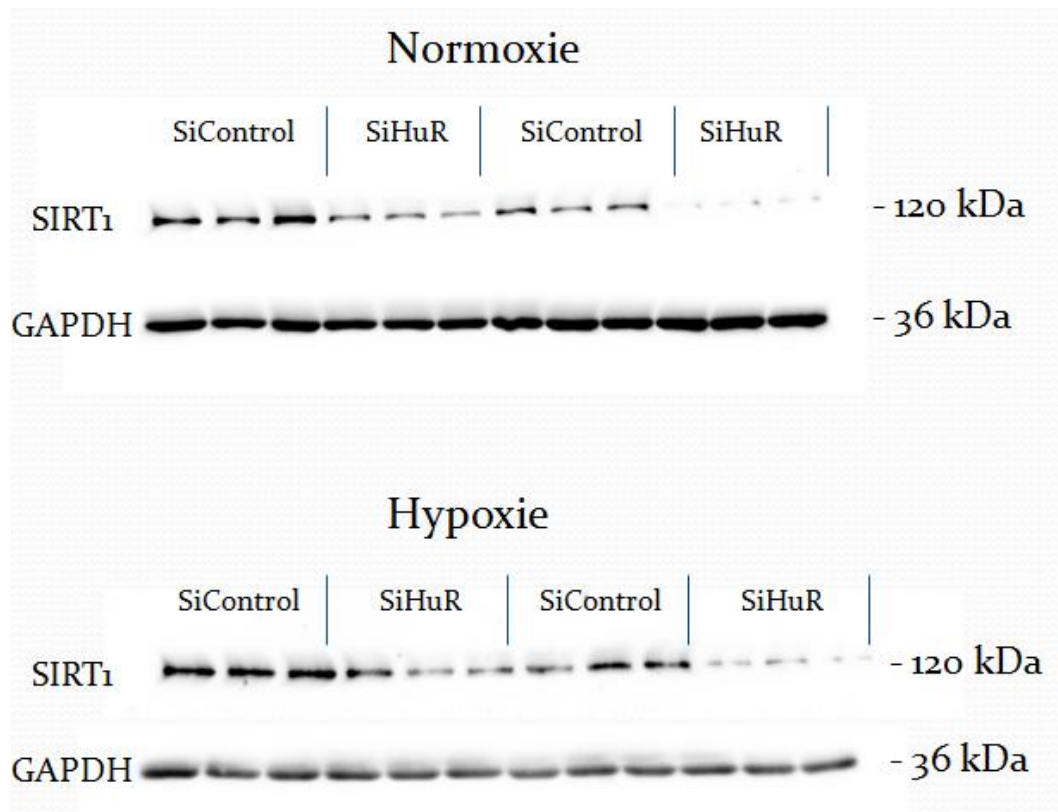


FIGURE 23. Western Blot : diminution de l'expression de SIRT1 par l'utilisation de siHuR (chaque piste correspondant à une transfection indépendante).

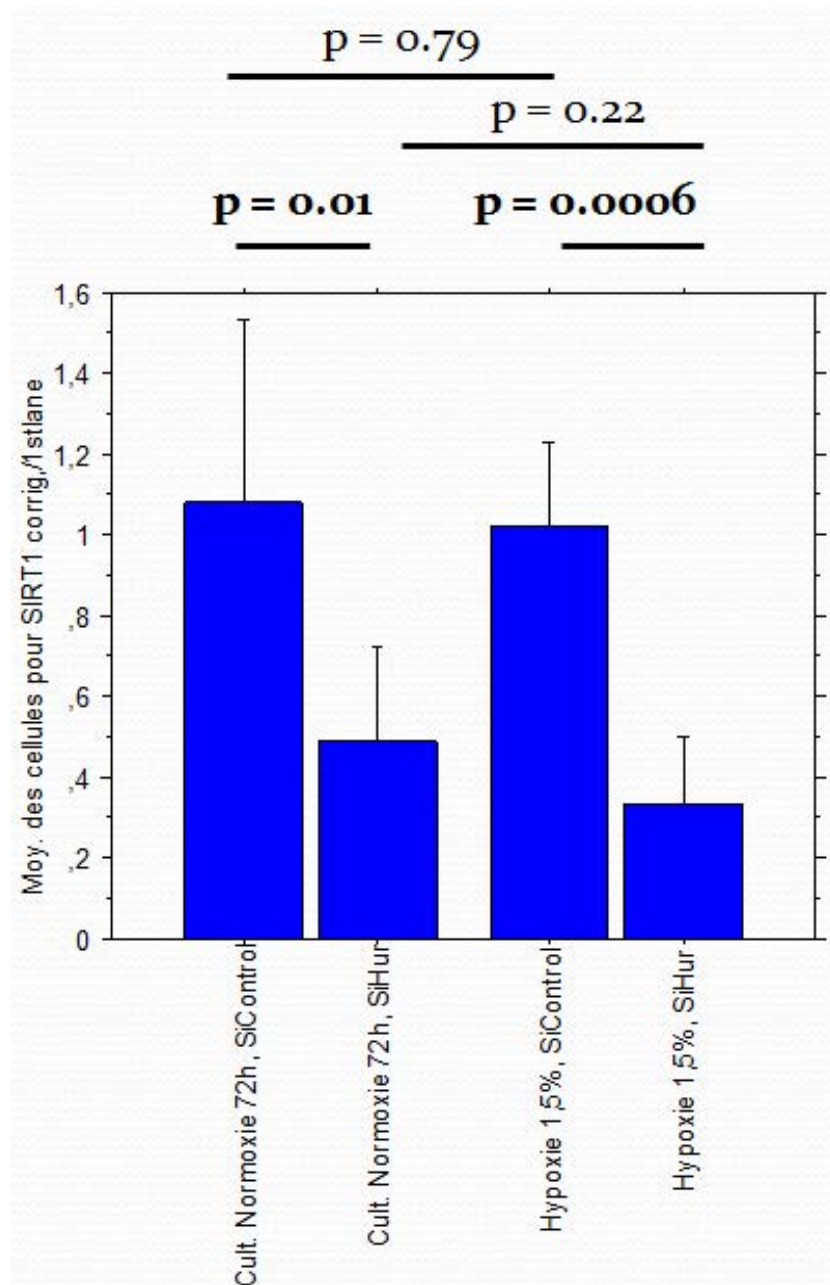


FIGURE 24. Diminution significative de l'expression de SIRT1 secondaire à l'inhibition de HuR, en normoxie et en hypoxie ($n=9$).

F. Effets de l'hypoxie et de l'inhibition de HuR sur l'expression de HIF-1 α

Il existe une surexpression significative de HIF-1 α en conditions d'hypoxie par rapport à l'incubation en normoxie ($p=0,003$). En normoxie, on observe une bande à environ 90 Kda, à laquelle s'ajoute en hypoxie deux bandes à environ 120 Kda et 250 Kda (figure 25).

En normoxie, l'inhibition de HuR entraîne une diminution significative de l'expression de HIF-1 α ($p=0,038$). Au contraire, en hypoxie, il existe une augmentation significative de HIF-1 α , pour les bandes à 90 Kda ($p=0,04$) et 120 Kda ($p=0,04$) (global : $p=0,02$), sans différence significative pour 250 Kda ($p=1$) (figure 26).

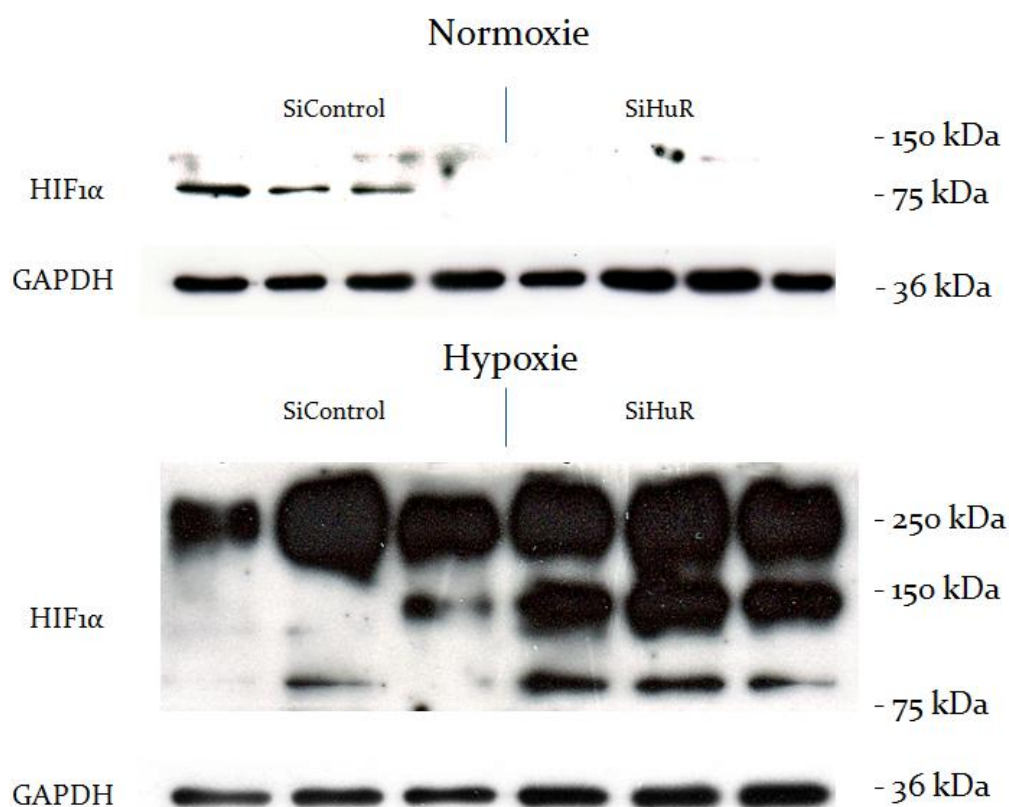


FIGURE 25. Western blot : expression augmentée de HIF-1 α en hypoxie (en bas) par rapport à la normoxie (en haut) ($p=0,002$). En normoxie, bande à environ 90 Kda. En hypoxie, présence de bandes à environ 90, 120 et 250 kDa. En normoxie (en haut), diminution de HIF-1 α lorsque HuR est inhibé. En hypoxie, augmentation de HIF-1 α lors de l'inhibition de HuR.

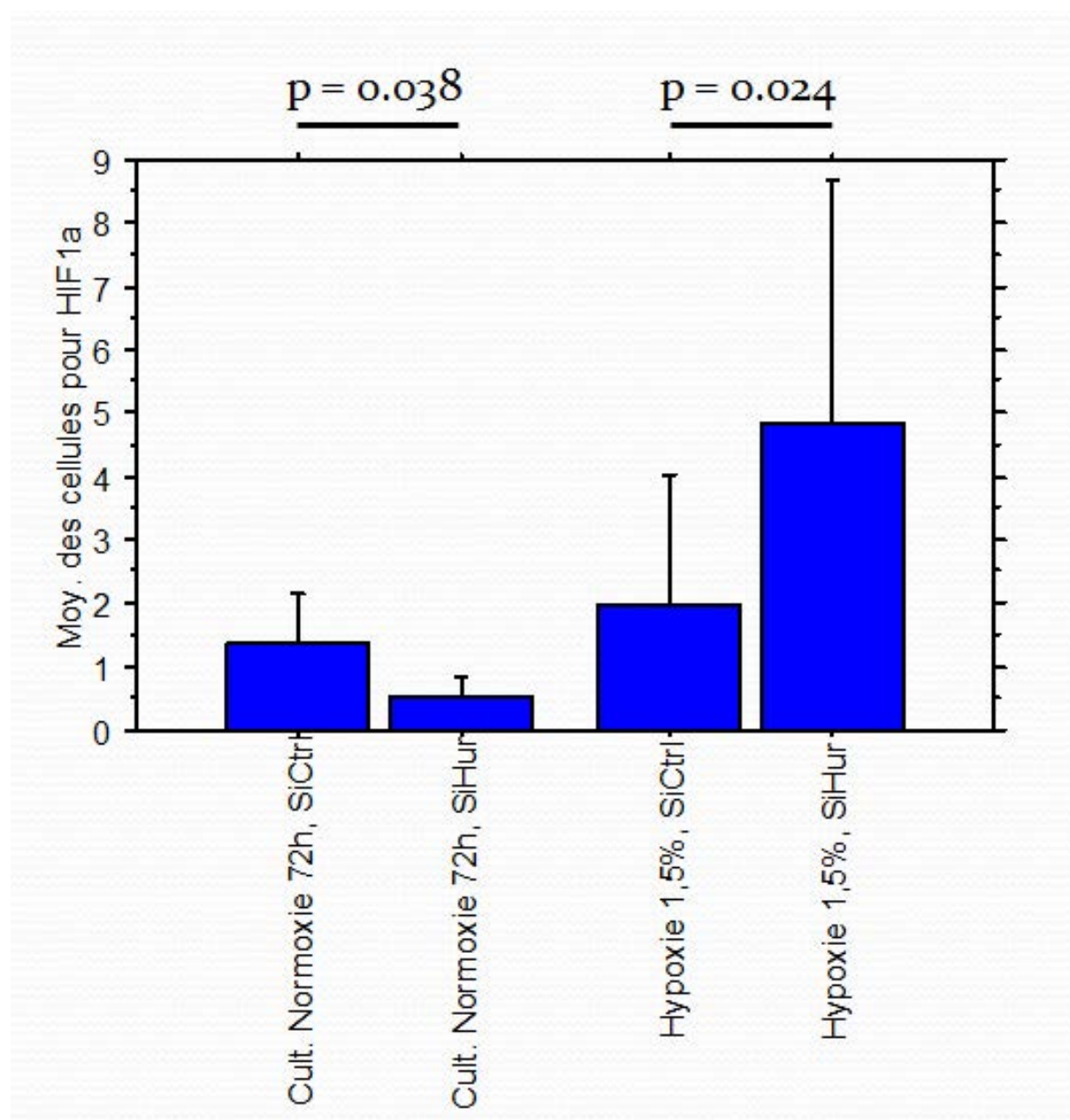


FIGURE 26. Expression de HIF-1 α en Western Blot. En normoxie, diminution significative de HIF-1 α secondaire à l'inhibition de HuR ($p=0,038$). En hypoxie, augmentation significative de HIF-1 α lorsque HuR est inhibé ($p=0,024$).

G. Effets de miR16 et miR519 sur la prolifération : résultats préliminaires

La surexpression de miR16 n'entraîne pas de modifications de HuR visible en immunohistochimie, en particulier pas de modification de la localisation subcellulaire de HuR (figure 27). Avec miR519, il semble exister une diminution de l'expression de HuR. La quantification de HuR par Western Blot est en cours de réalisation.

En utilisant le contrôle négatif, le taux moyen de prolifération est évalué avec l'anticorps Ki-67 à 93,3%. La surexpression de miR16 entraîne une nette diminution pour les 3 transfections, avec un taux moyen de cellules marquées de 49,7% (figure 27). La surexpression de miR519 entraîne une diminution du taux de cellules exprimant Ki-67 dans 2 transfections sur 3 (moyenne pour les triplicats : 92,7%). Ces données seront complétées pour obtenir un total de 9 transfections par condition.

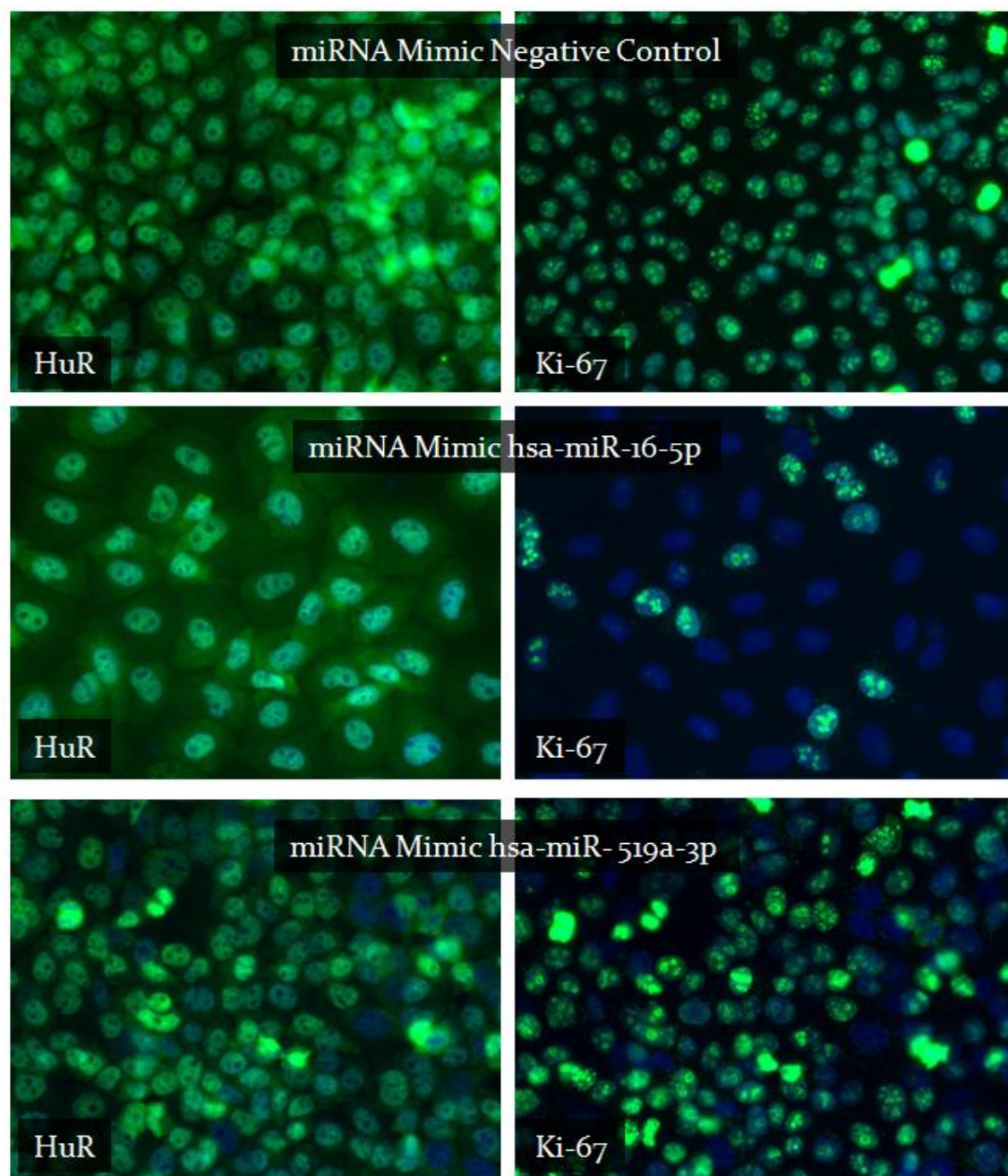


FIGURE 27. Effets de la surexpression de miR16 et miR519 sur l'expression de HuR (à gauche) et l'indice prolifératif (Ki-67) (à droite).

Discussion

I. Marqueurs de prolifération et du cycle cellulaire dans les méningiomes

A. PHH3 et indice mitotique

L'histone H3 est l'une des protéines constituant la chromatine (66), et sa phosphorylation survient au cours du processus mitotique, en particulier dès le stade initial de la condensation chromatinienne (67). En pratique diagnostique, le marquage immunohistochimique de PHH3 permet d'identifier rapidement les zones contenant les plus de mitoses, et constitue ainsi un marqueur très utile dans les tumeurs pour lesquelles l'indice mitotique a un intérêt diagnostique ou pronostique (68). La phosphorylation de l'histone H3 survenant juste avant la prophase, les noyaux marqués sans que l'on puisse reconnaître morphologiquement une figure de mitose doivent être exclus pour l'établissement de l'indice mitotique (14).

Dans les méningiomes, l'indice mitotique est associé avec le risque de récurrence et c'est un critère majeur pour l'établissement du grade histologique (1). Il doit être évalué dans les zones d'activité mitotique maximale, avec un seuil de 4 mitoses pour 10 CFG (1,6 mm²) pour le grade II et de 20 pour 10 CFG pour le grade III (1). Cependant, l'identification de la zone la plus proliférante peut être difficile. De plus, il peut exister une faible reproductibilité entre les pathologistes pour différencier les mitoses des figures apoptotiques ou des cellules déformées (14). Ainsi, l'immunomarquage de PHH3 est proposé comme une méthode rapide et performante pour l'établissement de l'indice mitotique et du grade histologique (14, 69).

Nous retrouvons dans cette étude une corrélation significative entre la survie sans récurrence et l'indice mitotique ainsi que l'expression de PHH3. Celle-ci est déterminée en comptant 1000 cellules, en incluant les noyaux en prophase. Le taux de cellules marquées pour PHH3 reflète indirectement l'indice mitotique, mais est indépendant de la densité en cellules tumorales, contrairement à l'indice mitotique, celui-ci étant évalué par rapport à une surface. En effet, la densité en cellules tumorales, et donc le nombre de cellules tumorales par champ, peut varier d'une tumeur à l'autre.

B. Valeur pronostique de Ki-67

L'antigène nucléaire Ki-67 est exprimé aux phases G1, S, G2 et pendant la mitose, mais pas en G0 (70). Malgré de nombreuses études sur les applications diagnostiques et pronostiques de Ki-67, sa place exacte reste encore mal précisée. Il s'agit d'une protéine formée d'un assemblage de chaînes polypeptidiques, d'un poids moléculaire compris entre 345 et 395 kDa, encodé par une séquence génique indéfinie (70). Il a été démontré dans la plupart des études une corrélation très significative entre l'indice prolifératif évalué avec Ki-67 et les critères histologiques de malignité (70). Cependant, le marquage de Ki-67 peut être influencé par plusieurs facteurs externes. En effet, si la reproductibilité inter-observateur est bonne, comme c'est le cas dans notre étude, Mengel *et al.* ont montré qu'il existe une haute variabilité inter-laboratoire dans l'intensité et le pourcentage de cellules marquées (71). D'après les auteurs, ces différences pourraient s'expliquer par des variations portant sur les conditions de démasquage antigénique et les étapes de détection immunohistochimique du signal. Bien que proposée dans certaines pathologies, l'utilisation de ce marquage pour l'établissement du pronostic dans une approche multi-centre semble peu judicieuse, en l'absence de standardisation technique plus stricte.

Le marquage de Ki-67, en particulier avec l'anticorps monoclonal MIB-1, est un facteur pronostique utilisé dans plusieurs tumeurs, en particulier les astrocytomes (72). Dans les méningiomes, plusieurs études ont montré une corrélation entre le pronostic et l'indice prolifératif évalué avec l'anticorps MIB-1 (15-19), avec cependant des données contradictoires dans d'autres études (20, 21). Nous avons mis en évidence une forte corrélation entre l'indice prolifératif et la survie sans récurrence. Le modèle de Cox a montré l'absence d'effet non-linéaire, suggérant que l'indice prolifératif pourrait être plus performant que le grade histologique pour prédire le risque de récurrence. Dans le sous-groupe des méningiomes de grade II, l'indice prolifératif est dans notre étude corrélé significativement avec le risque de récurrence ($p=0,03$). Nous n'avons pas mis en évidence de corrélation significative dans le sous-groupe des méningiomes de grade I, vraisemblablement par manque de puissance ($p=0,09$). Cependant, la faible reproductibilité inter-laboratoire semble en limiter l'intérêt en pratique. De plus, le taux de cellules marquées est globalement bas, même dans les formes de mauvais pronostic, Ki-67 étant exprimé tardivement en G1. Il peut être difficile de repérer la zone de marquage maximal et de mettre en évidence des différences de quelques pourcents entre les formes de bon et de mauvais pronostic. Il est ainsi relativement difficile à utiliser en pratique.

C. Valeur pronostique de MCM6

Les protéines MCM jouent un rôle critique dans l'initiation de la synthèse et de la réplication de l'ADN. Le complexe MCM est composé de six polypeptides (MCM2, MCM3, MCM4, MCM5, MCM6 et MCM7), formant une hélicase hexamérique. L'activité de cette hélicase est essentielle pour l'initiation et l'élongation des fourches de réplication (24). Les

protéines MCM sont assemblées à la fin de la mitose en complexes pré-réplicatifs, ces derniers étant à l'origine de la réplication de l'ADN et requis pour l'entrée dans la phase S. En particulier, ces protéines seraient nécessaires au déroulement de la chromatine à la phase initiale de la réplication chromosomique (24). Elles jouent un rôle essentiel en limitant la survenue de l'initiation et de l'élongation à une seule fois pendant la phase S (24).

L'indice prolifératif évalué avec les anticorps anti-MCM est fortement corrélé avec Ki-67, mais est significativement plus élevé (73, 74). En effet, les protéines MCM sont exprimées dès la phase précoce de G1, et sont inhibées de façon plus tardive, quand les cellules adoptent un phénotype de différenciation terminale (75, 76). Il a été montré que les protéines MCMs peuvent être des facteurs de prolifération utiles dans différentes tumeurs, en particuliers les carcinomes cutanés, le chondrosarcome, le carcinome mammaire, l'adénocarcinome colo-rectal et le cancer du poumon (77-82). Dans le domaine de la neuropathologie, quelques études ont analysé l'expression de MCM3 et MCM7 dans l'astrocytome (25, 26), et MCM2 dans l'oligodendrogliome (27). Dans le médulloblastome, MCM2, MCM3 et MCM7 stimulent la croissance cellulaire, mais seraient également capables d'augmenter la migration cellulaire et l'invasion, par des mécanismes encore inconnus (83).

Hunt *et al.* ont décrit une surexpression de MCM2 dans les méningiomes bénins récidivant, cependant sans détail quant au grade selon l'OMS (20). Les auteurs n'ont retrouvé cette surexpression de façon significative qu'en comptant dans les zones d'intensité de marquage maximale, sans différence significative lorsque le comptage était effectué de façon aléatoire au sein de la tumeur (20). Compte tenu de ces résultats, nous avons dans cette étude évalué le taux de cellules marquées dans les zones les plus proliférantes. Dans une étude plus récente, Saydam *et al.* ont montré par qRT-PCR une surexpression de MCM2, MCM3,

MCM4, MCM5 et MCM7 dans les méningiomes par rapport au tissu sain arachnoïdien, sans différence significative entre tumeurs de grade I, II ou III, les effectifs des différents groupes étant cependant réduit.

Cette étude est à notre connaissance la première à analyser l'expression de MCM6 dans les méningiomes. Nous avons mis en évidence une forte corrélation de l'expression de MCM6 avec le grade histologique et le risque de récurrence. Le modèle de Cox a mis en évidence une corrélation presque linéaire entre MCM6 et la survie sans récurrence. Le marquage pour MCM6 pourrait ainsi être plus performant que le grade histologique selon l'OMS pour prédire le risque de récurrence. Dans le groupe des méningiomes de grade II, on retrouve une corrélation significative avec la survie. Cette corrélation n'est pas retrouvée dans les méningiomes de grade I. Cela pourrait peut-être s'expliquer par un manque de puissance, le nombre de récurrence étant plus faible dans ce groupe : une étude complémentaire avec de plus grands effectifs serait utile afin de prédire le risque de récurrence dans les méningiomes bénins, et ainsi d'aider à décider de la mise en place d'un éventuel traitement complémentaire dans les méningiomes d'exérèse incomplète.

La reproductibilité est dans notre étude excellente, légèrement supérieure à celle de Ki-67. Cela pourrait s'expliquer par le fait que le taux moyen de cellules marquées est nettement plus élevé pour MCM6 que pour Ki-67 (42% vs 10%). Ceci pourrait faciliter la sélection de la zone de marquage maximal et ainsi la reproductibilité inter-observateur. En pratique quotidienne, la large différence de marquage entre les tumeurs de grade I et de grade II (66% vs 22%) pourrait permettre d'évaluer rapidement l'indice de prolifératif et de repérer facilement les tumeurs à plus haut risque de récurrence. Cependant, avant de valider son

utilisation en diagnostic de routine, il semble nécessaire de tester l'anticorps dans différents laboratoires, afin d'évaluer la reproductibilité inter-laboratoire.

D. Cycline D1

La cycline D1 est une protéine nucléaire requise pour la progression des cellules au-delà de la phase G1 du cycle (84). Elle est exprimée en phase moyenne et tardive de G1, mais une expression inattendue pendant tout le cycle cellulaire a été décrite (85). Dans les cancers, il a été montré que la cycline D1 est impliquée dans la réparation de l'ADN, par exemple après une irradiation (86). Sa surexpression constitutive dans certaines cellules tumorales pourrait être consécutive à une amplification ou à des réarrangements du gène de la cycline D1 (*CCND1*) ou être liée à la mutation d'agents impliqués dans sa dégradation (86).

Gladden et Diehl ont montré que la cycline D1, en association avec CDK4, se lie aux composants de l'hélicase hexamérique MCM, et joue un rôle direct en altérant le complexe inhibiteur RB.MCM7, et pourrait ainsi initier la préparation de la réplication de l'ADN (87). Si certaines études ont montré une corrélation entre les protéines MCMs et d'autres cyclines, comme la cycline A (74), aucune corrélation entre les expressions des MCMs et de la cycline D1 n'a été jusqu'à ce jour rapportée *in vivo*. Nous retrouvons dans cette étude une forte corrélation entre MCM6 et la cycline D1 ($p < 0,001$).

Dans les méningiomes, l'expression de la cycline D1 est décrite dans deux études, l'une basée sur une technique de Western Blot (23), l'autre sur l'immunohistochimie (88). Les auteurs ont montré l'existence d'une corrélation de la cycline D1 avec le grade (88), ou avec d'autres marqueurs comme PCNA, Ki-67 (23, 88) et p53 (23). Nous avons retrouvé une

corrélation avec le grade histologique ($p=0,005$), mais en l'absence de corrélation avec la survie, la cycline D1 ne semble pas avoir d'intérêt diagnostique ou pronostique par rapport aux autres marqueurs. La concordance inter-observateur est de plus beaucoup plus faible que Ki-67 ou MCM6.

E. Expression de P53

TP53 est un gène suppresseur de tumeur codant pour p53, répondant à divers facteurs de stress cellulaire et régulant le cycle cellulaire. En cas de dommage à l'ADN, p53 contribue à l'interruption du cycle cellulaire, dans le but de réparer l'ADN avant la division cellulaire, ou force la cellule à rentrer en apoptose via l'activation de BAX (89). Des mutations ou des délétions de *TP53* ont été décrites dans les méningiomes atypiques et anaplasiques, avec une fréquence variant selon les études de 0 à 62%, sans mutation identifiée dans les méningiomes de grade I (90-94). Il existe ainsi une grande variabilité selon les études. Amatya *et al.* n'ont pas mis en évidence de mutation de *TP53*, malgré une fréquence élevée de surexpression protéique de p53, suggérant que la protéine serait de type sauvage (90). Les auteurs ont montré que la surexpression de p53 pourrait s'expliquer par la méthylation de p14^{ARF}, et que la dérégulation de la voie p14-MDM2-p53 pourrait contribuer à la progression maligne des méningiomes (90).

Si les mécanismes à l'origine d'une dérégulation de p53 sont probablement multiples, la surexpression de p53 est associée à un grade histologique plus élevé et au risque de récurrence dans la plupart des études (15, 18, 19, 95-97). Dans notre étude, p53 est surexprimé significativement dans les méningiomes atypiques ($p=0,017$), cependant sans association significative avec le risque de récurrence. La corrélation intraclasse est plus basse que pour Ki-

67 ou MCM6, ce qui peut s'expliquer par un marquage d'intensité souvent plus faible et d'intensité variable, rendant ainsi l'interprétation plus délicate. Ce marqueur n'a ainsi probablement pas d'intérêt en pratique diagnostique dans les méningiomes.

II. Dérégulation de HuR dans les méningiomes

A. Valeur pronostique de la surexpression cytoplasmique de HuR

Cette étude est la première à montrer que la surexpression cytoplasmique de HuR dans les méningiomes est un facteur de mauvais pronostic. En effet, l'expression cytoplasmique de HuR est significativement plus élevée dans les méningiomes de grade II que dans les méningiomes de grade I ($p=0,0007$), et est corrélée de façon inverse avec la survie sans récurrence (Log-rank : $p=0,028$). Au contraire, l'expression nucléaire n'a pas de valeur pronostique. Ces résultats sont ainsi cohérents avec les données de la littérature rapportant la valeur pronostique péjorative de la surexpression cytoplasmique de HuR dans diverses tumeurs. En particulier, dans les gliomes, Bolognani *et al.* et Ido *et al.* ont mis en évidence une corrélation entre l'expression cytoplasmique de HuR et le grade histologique (55, 57).

Dans les méningiomes, Sakuma *et al.* ont décrit une surexpression cytoplasmique de HuR dans 2 cas de méningiomes atypiques, leur étude ne comportant cependant que 6 cas de méningiomes atypiques, n'autorisant ainsi pas d'exploitation statistique (58). L'étude de Sakuma *et al.* comporte par ailleurs 36 méningiomes de grade I, mais l'éventuel lien avec la survie sans récurrence n'y est pas abordée. Dans notre étude, il n'y a pas de corrélation significative avec la survie sans récurrence lorsque l'on s'intéresse aux sous-groupes des méningiomes de grade I ($p=0,11$) ou de grade II ($p=0,99$), la corrélation n'étant retrouvée que

pour l'ensemble de la cohorte ($p=0,028$). Il est prévu de compléter cette série par une vingtaine de cas de méningiomes anaplasiques (grade III selon l'OMS).

B. Intérêts de la méthode de quantification par analyse d'image

HuR est exprimé dans la totalité des cellules tumorales, mais avec une intensité variable. Si l'évaluation d'un pourcentage de cellules marquées, par exemple un indice de prolifération, ne pose pas de problème particulier en immunohistochimie lorsque la méthodologie est bien définie, l'évaluation de la densité d'un marquage peut s'avérer être relativement délicate et peu reproductible. Nous avons utilisé ici une méthode originale de quantification basée sur l'analyse d'image, adaptée d'après l'étude de Lehr *et al.* (98). Le logiciel Photoshop permet de sélectionner les noyaux ou les cytoplasmes grâce à un outil de sélection de couleur, et ainsi d'extraire noyaux et cytoplasmes dans deux fichiers images séparés. Après conversion en niveau de gris, on obtient avec Image J une densité intégrée, que l'on rapporte au nombre de pixels sélectionnés, pour que le résultat ne soit pas modifié par la densité cellulaire. Avec cette technique, on obtient ainsi une valeur de densité de façon plus objective que les échelles semi-quantitatives habituellement utilisées pour ce type de marquage immunohistochimique.

Nous avons également utilisé dans cette étude un score semi-quantitatif. Cette évaluation a aussi permis de montrer une corrélation significative avec le grade histologique et la survie sans récurrence, mais n'a été évaluée dans cette étude que par un seul lecteur, ne permettant ainsi pas d'en connaître la reproductibilité. Nous avons cependant mené une étude similaire dans les cancers pulmonaire en établissant un score pour HuR en double aveugle,

n'ayant permis de ne retrouver qu'un coefficient de corrélation intraclasse faible à modéré, compris entre 0,40 et 0,60. L'évaluation quantitative par analyse d'image semble donc être une alternative intéressante et plus objective.

L'évaluation de la densité en immunohistochimie nécessite cependant une méthode technique standardisée sur automate, afin de limiter la variabilité technique. En effet, contrairement au Western Blot, il n'est pas possible de normaliser les valeurs obtenues à l'expression d'une protéine de référence. Par rapport au Western Blot, cette technique a par contre l'intérêt d'être plus simple et rapide, moins coûteuse, nécessitant peu de matériel et utilisable sur tissu fixé dans le formol et inclus en paraffine. Elle est ainsi particulièrement adaptée à des cohortes comportant plusieurs dizaines d'échantillons. De plus, contrairement à l'immunohistochimie, il n'est pas possible en Western Blot d'isoler les cellules tumorales des cellules du stroma et des protéines contaminantes de la matrice extra-cellulaire.

C. Liens entre HuR, la prolifération et la survie cellulaire

Conformément à nos hypothèses, il existe dans cette étude une forte corrélation entre l'expression cytoplasmique de HuR et la prolifération cellulaire, évaluée par l'indice mitotique ou les marqueurs de prolifération (Ki-67, MCM6, PHH3).

Ces données sont appuyées par les manipulations expérimentales, montrant que l'inhibition de HuR entraîne une diminution significative de la croissance cellulaire. L'évaluation de la croissance et de la viabilité a été évaluée en conditions d'adhérence, en comptant le nombre de cellules viables à J2, J3, J4 et J7, montrant une diminution du nombre de cellules viables dès J2. Les manipulations en milieu non adhérent (boîtes d'agar/agarose)

n'ont pas donné de résultats significatifs. Cette étude est à notre connaissance la première à montrer dans une lignée cellulaire humaine de méningiome une diminution de la prolifération induite par l'inhibition de HuR. Ces constatations sont en accord avec les données de la littérature montrant un effet comparable dans d'autres lignées cellulaires (35, 42, 43, 99). De façon similaire, on retrouve une diminution significative de l'indice prolifératif évalué avec Ki-67, cette diminution étant faible mais constante. Ainsi, la diminution de la croissance cellulaire peut s'expliquer en grande partie par une inhibition de la prolifération cellulaire. Ceci est concordant avec la littérature, les cibles connues de HuR comportant des protéines impliquées dans la progression du cycle cellulaire, comme les cyclines, p21 ou p27 (32). Notre étude sera complétée prochainement par l'étude en Western Blot des effets de l'inhibition de HuR sur l'expression de la cycline D1.

L'inhibition expérimentale de HuR entraîne de plus une augmentation significative de l'apoptose évaluée par l'expression de la caspase 3 clivée. Ceci peut s'expliquer par la stabilisation par HuR d'ARNm correspondant à des protéines impliquées dans la survie cellulaire, comme Bcl-2, Mdm2 ou SIRT1. Dans cette étude, l'inhibition de HuR cause ainsi une diminution de l'expression de SIRT1, jouant un rôle clef dans la résistance au stress et la survie cellulaire (46, 100-102). Par exemple, nous avons montré récemment, dans une lignée murine de neuroblastome, que SIRT1 protège les cellules du stress du réticulum endoplasmique, induit en particulier par une carence en vitamine B12, via une désacétylation de HSF1 (100). SIRT1 inhibe également l'apoptose par d'autres mécanismes, comme la désacétylation de FoxO1 (101), de p53 (45), ou via la voie PTEN/PI3K/AKT, comme cela a été montré dans les gliomes (46). Dans des essais préliminaires, nous n'avons pas observé d'apoptose en nombre significatif dans les méningiomes, rendant difficile l'évaluation du taux de cellules marquées avec l'anticorps anti-caspase 3 clivée. Nous avons retrouvé quelques

rare cellules marquées en périphérie des foyers de nécrose, dans certains méningiomes atypiques. Il est prévu d'évaluer prochainement l'expression de SIRT1 dans les méningiomes.

D. HuR et résistance à l'hypoxie

L'incubation en hypoxie entraîne dans ce modèle cellulaire une diminution de la croissance cellulaire et de la prolifération, ainsi qu'une augmentation de l'apoptose. Ces données expérimentales sont concordantes avec les rares données clinico-radiologiques montrant une diminution de la taille tumorale après traitement par embolisation seule (11, 12), celle-ci entraînant une hypoxie intra-tumorale par brutale diminution de l'apport de sang artériel.

Les conséquences de cette hypoxie intra-tumorale s'observent histologiquement dans les pièces d'exérèse de méningiome après embolisation sous forme de plages de nécrose. Ces plages de nécrose ischémique ne doivent pas être confondues avec les foyers de nécrose tumorale observés dans les méningiomes atypiques ou anaplasiques, d'autant plus qu'une augmentation de la prolifération des cellules tumorales a été décrite en périphérie immédiate de ces foyers de nécrose (9, 103-105). D'après certaines données de la littérature, l'embolisation n'entraînerait pas de diminution significative de l'indice prolifératif global (103, 105). Les études sont cependant rares, rétrospectives, avec des effectifs réduits. En l'absence de randomisation, il semble de plus difficile de comparer les groupes avec et sans embolisation, celle-ci étant proposée pour des tumeurs volumineuses et richement vascularisées. Sur le plan immunohistochimique, il est décrit une surexpression significative de HIF-1 α dans les méningiomes embolisés (10). Sakuma *et al.* ont également mis en évidence une augmentation du taux cellules exprimant HuR (marquage nucléaire) dans les

méningiomes traités par embolisation (58). Nous n'avons pas mis en évidence de surexpression nucléaire ou cytoplasmique de HuR dans les méningiomes traitées par embolisation, mais notre série ne comporte qu'un faible nombre de méningiomes embolisés (5 cas). In vitro, nous avons cependant observé, comme Sakuma *et al.* (58), une augmentation de l'expression cytoplasmique de HuR en immunofluorescence. L'hypoxie pourrait ainsi entraîner une surexpression de HuR, en particulier cytoplasmique, favorisant la prolifération et la survie cellulaire. Les cibles de HuR concernent en effet des ARNm codant pour des protéines impliquées dans la réponse à l'hypoxie, dont VEGF (58), SIRT1 (102) et HIF-1 α (106).

Sakuma *et al.* ont démontré dans les méningiomes le rôle de l'expression cytoplasmique de HuR sur la stabilisation de VEGF, en particulier en hypoxie. En réponse à l'hypoxie, VEGF pourrait en particulier stimuler l'angiogenèse, participant ainsi à la formation d'un réseau vasculaire de suppléance. Plusieurs études rapportent une corrélation entre VEGF et la densité microvasculaire, mais également l'indice prolifératif, le grade et le risque de récurrence (107, 108). Des résultats similaires sont rapportés dans les gliomes (55).

Nous n'avons pas mis dans cette étude de surexpression significative de SIRT1 en conditions d'hypoxie. L'inhibition de SIRT1 par siHuR pourrait cependant expliquer en partie la moindre résistance à l'hypoxie des cellules méningiomateuses lorsque l'on inhibe HuR, se traduisant en particulier par une très nette augmentation de l'apoptose, avec un effet synergique de siHuR et de l'hypoxie. SIRT1 ne pourrait plus ainsi jouer son rôle protecteur par inhibition de l'apoptose (46, 102). Il serait intéressant de compléter cette étude en analysant les effets de l'inhibition de SIRT1 sur la résistance à l'hypoxie, indépendamment de l'inhibition de HuR en amont. SIRT1 peut en effet être inhibé spécifiquement par certains

agents pharmaceutiques, comme le sirtinol, actuellement en cours d'évaluation dans différents cancers (45, 109, 110).

En conditions d'hypoxie, la dégradation du facteur de transcription HIF-1 α est inhibée, aboutissant à une accumulation de cette protéine (111). L'hypoxie entraîne également des modifications post-traductionnelles de HIF-1 α , en particulier une diminution de son hydroxylation par FIH-1 (factor inhibiting HIF-1) secondaire à une diminution de la quantité d'oxygène intra-cellulaire, et favorisant les interactions avec des protéines pro-activatrices (111). En hypoxie, HIF-1 α forme un dimère avec HIF-1 β et active dans le noyau de multiples gènes favorisant l'angiogenèse (dont *VEGF*), la prolifération et la survie cellulaire, le transport du glucose et la glycolyse (111). Il est montré dans plusieurs tumeurs que la surexpression de HIF-1 α constitue un facteur de mauvais pronostic (47, 112, 113), en particulier dans les méningiomes (108). D'autres auteurs rapportent au contraire que l'expression de HIF-1 α serait un facteur de bon pronostic (114). Dans les tumeurs solides, HIF-1 α pourrait jouer un rôle important dans le processus métastatique, la résistance à la radiothérapie et la chimiorésistance. L'hypoxie pourrait en particulier, via HIF-1 α , augmenter l'instabilité génomique et favoriser l'émergence de cellules souches (47). Des thérapies ciblées visant à inhiber HIF-1 α sont actuellement en cours de développement ou d'évaluation (47, 115, 116). Dans notre étude, HIF-1 α est significativement augmenté en conditions d'hypoxie par rapport à la normoxie, le niveau basal d'expression de HIF-1 α étant très faible en normoxie. L'inhibition de HuR en hypoxie aurait dû théoriquement diminuer l'expression de HIF-1 α , dont l'ARNm est stabilisé par HuR. Paradoxalement, nous avons observé une surexpression significative de HIF-1 α par rapport aux contrôles (hypoxie avec siControl). Une autre voie de régulation de HIF-1 α semble donc être impliquée, limitant ainsi probablement

les effets de l'inhibition de HuR. L'inhibition de HIF-1 α couplée à celle de HuR pourrait ainsi être particulièrement intéressante.

D'après la fiche technique de l'anticorps, le poids moléculaire théorique de HIF-1 α est de 120 Kda. Nous avons retrouvé une ou deux bandes à environ 120 Kda, et une bande à environ 90 Kda correspondant vraisemblablement à des variants d'épissage. En effet, de multiples variants d'épissage de HIF-1 α ont été décrits, plus ou moins fonctionnels selon le ou les site(s) manquant(s) (117-120). Nous avons également retrouvé en hypoxie des bandes à environ 250 Kda, pouvant par exemple s'expliquer par l'existence de dimères, comme HIF-1 α /HIF1 β . L'évaluation de la spécificité de ces bandes semble néanmoins nécessaire. Dans les tissus, comme Sakuma *et al.* (58), nous n'avons pas mis en évidence d'expression de HIF-1 α , dans dix échantillons testés. Il n'est cependant pas exclu que ceci soit lié à un manque de sensibilité de l'anticorps utilisé, d'autres équipes retrouvant une expression cytoplasmique de HuR dans les méningiomes embolisés (10) ou dans les méningiomes de mauvais pronostic (108).

Au total, nous avons mis en évidence un effet cumulatif voire synergique de l'inhibition de HuR et de l'hypoxie, entraînant une diminution significative de la prolifération cellulaire et une nette augmentation de l'apoptose par rapport à l'hypoxie ou à l'inhibition de HuR seules. Ces résultats mériteraient d'être confirmés dans des modèles animaux, avec un recul suffisant pour en évaluer l'innocuité et à plus long terme les effets sur la taille tumorale. Ces constatations pourraient alors ouvrir de nouvelles perspectives thérapeutiques dans les méningiomes échappant au traitement chirurgical, par exemple en couplant l'embolisation à une injection intra-artérielle d'inhibiteurs de HuR par abord radiologique.

E. Mécanismes de régulation post-traductionnelle de HuR et transfert nucléo-cytoplasmique

D'après les données expérimentales, la méthylation de HuR par CARM1 sur l'arginine 217, située dans le domaine HNS, pourrait jouer un rôle important dans son transport du noyau vers le cytoplasme (40). In vivo, dans les méningiomes, nous retrouvons une expression majoritairement cytoplasmique de méthylHuR, alors qu'il existe une expression nucléaire constante de HuR dans ces mêmes échantillons. L'expression de méthylHuR est corrélée de façon significative avec l'expression cytoplasmique de HuR. En Duolink, bien que le nombre d'échantillons testés soit réduit, le signal pour méthylarginine/HuR est strictement cytoplasmique et corrélé significativement avec l'expression immunohistochimique de méthylHuR. Ces résultats sont ainsi concordants avec les données expérimentales. Il est prévu d'utiliser un peptide bloquant afin de pleinement confirmer la spécificité de l'anticorps anti-méthylHuR.

Cependant, il existe dans certains cas une forte expression cytoplasmique de HuR, mais avec un signal faible ou nul pour méthylHuR, suggérant que HuR pourrait être localisé dans le cytoplasme sans être méthylé. De façon similaire, une étude menée par notre équipe dans les cancers du poumon (C. Vigouroux, thèse d'exercice (121), manuscrit en cours de préparation), a montré, dans une série de 190 carcinomes non à petites cellules, une corrélation significative entre les expressions cytoplasmiques de HuR et méthylHuR. Par ailleurs, de façon préliminaire, nous avons également testé 7 cas de glioblastome, montrant une surexpression cytoplasmique de HuR dans 6 cas sur 7, mais une expression de méthylHuR uniquement localisée dans les astrocytes réactionnels, sans marquage des cellules

tumorales. Ainsi, l'expression cytoplasmique de HuR ne semble pas uniquement être liée à sa méthylation. De plus, il est possible que la méthylation de HuR influence l'affinité entre HuR et les ARNm cibles. Dans les cancers du poumon, nous avons trouvé une corrélation significative entre l'expression de méthylHuR et les types histologiques de bon pronostic ($p=0,001$) et, au contraire, une corrélation inverse de l'expression de méthylHuR avec l'indice prolifératif (MCM6 : $p=0.0001$; Ki-67: $p=0.006$) et avec le risque de décès ($p=0,036$) (121). L'expression cytoplasmique de méthylHuR semble ainsi être un facteur de bon pronostic, corrélé inversement avec les marqueurs de prolifération, alors que l'expression de HuR est au contraire dans ces mêmes tumeurs corrélée de façon positive avec les marqueurs de prolifération. La forme méthylée de HuR semblerait ainsi avoir un effet opposé à sa forme non méthylée. De façon similaire, en pathologie hépatique, Vazquez-Chantada *et al.* ont mis en évidence une diminution de méthylHuR dans les foies porteurs d'un carcinome hépatocellulaire par rapport aux foies sains, et au contraire une augmentation de la forme non méthylée de HuR (122). Par analogie, dans la lignée cellulaire PC12, la méthylation par CARM-1 de HuD (autre protéine de liaison aux ARN de la famille Hu/ELAV, d'expression principalement neuronale) sur l'arginine 236 diminue l'affinité avec certains ARNm cibles (123). Des études complémentaires sont nécessaires pour déterminer si la méthylation de HuR entraînerait également des modifications de son affinité avec les ARNm cibles.

D'autres mécanismes pouvant influencer la localisation cytoplasmique de HuR mériteraient d'être explorés dans ces différentes tumeurs. En particulier, la phosphorylation de HuR sur des résidus sérine en positions 158 et 221 par la protéine kinase C (PKC) alpha et en position 221 par PKC delta entraîne dans des modèles expérimentaux une diminution de l'export nucléaire, alors que la phosphorylation sur la sérine 318 par PKC delta ou sur S88, S100 ou T118 par Chk2 modifierait les interactions avec certains ARNm cibles (124-128). Au

contraire, Cdk1, par la phosphorylation de HuR sur la sérine 202, bloquerait son export du noyau vers le cytoplasme (129). Il serait particulièrement intéressant d'évaluer l'état de phosphorylation de HuR dans les méningiomes, en utilisant des anticorps reconnaissant certaines formes phosphorylées de HuR tels qu'utilisés dans plusieurs de ces études.

F. HuR et microARNs

Les microARNs sont des ARNs non codants de petite taille (en moyenne 22 nucléotides), pouvant influencer le profil d'expression des gènes. Ils sont synthétisés à partir d'ARNs plus long, les pri-miARN, transformés dans le noyau par des ribonucléases en précurseurs appelés pré-miARN. Après transport vers le cytoplasme, les pré-miARN sont transformés par la ribonucléase Dicer en duplex d'ARN d'une vingtaine de paires de bases. L'un des deux brins est chargé dans le complexe RISC, contenant les protéines Argonautes. Le complexe miARN-RISC cible ensuite un ARNm, généralement dans la région 3' non traduite, contenant une séquence complémentaire du microARN. L'association du complexe miARN-RISC/ARNm diminue la stabilité et/ou la traduction de l'ARNm. Rarement, le miARN peut cependant promouvoir la traduction de certains ARNm (130).

Le niveau d'expression global de HuR peut être régulé par certains microARNs, dont miR16 et miR519. Il est en effet démontré dans plusieurs lignées cellulaires que miR16 et miR519 diminuent l'expression de la protéine HuR, cependant sans modifier la quantité d'ARNm (39, 64, 131). Ces microARNs entraîneraient une inhibition de la traduction de HuR, en interagissant avec son ARNm. Ces deux microARNs pourraient ainsi jouer un rôle

suppresseur de tumeur en inhibant HuR. Young *et al.* ont par ailleurs montré que HuR, par un mécanisme de rétrocontrôle, peut également inhiber miR16 (132).

Nous retrouvons en qRT-PCR une nette diminution de la quantité de miR16 et miR519 par rapport au tissu sain, particulièrement profonde pour miR519 (miR16 : $p=0,004$; miR519 : $p<0,000001$). Cependant, nous n'avons pas mis en évidence de corrélation significative entre la quantité de ces deux microARNs et l'expression de HuR, l'indice prolifératif ou la survie. Il n'y a pas non plus de corrélation significative avec le grade. Ainsi, si l'inhibition *in vitro* de miR16 et miR519 permettrait de diminuer la prolifération, ces deux microARNs ne semblent pas avoir de lien significatif avec HuR ou la prolifération dans les méningiomes. Compte tenu de la forte diminution de l'expression de miR16 et miR519 dans les tumeurs par rapport au tissu sain, il est possible que la diminution de ces deux microARNs soient impliquée de façon précoce dans la tumorigenèse, mais ne jouerait pas ou que peu de rôle dans la progression tumorale des méningiomes. De façon similaire, nous avons mis en évidence une forte diminution de miR16 et miR519 dans les cancers du poumon par rapport aux tissus sains appariés (121).

Ces deux microARNs ont des cibles autres que HuR pouvant avoir un intérêt en cancérologie. En particulier, miR16 pourrait inhiber Bcl2, NF-kappa B1 et MMP9 et ainsi, dans les gliomes, augmenter l'apoptose et diminuer les propriétés invasives des cellules tumorales (133).

D'après des données expérimentales, d'autres microARNs sont impliqués dans la régulation post-transcriptionnelle de HuR, inhibant son expression, comme miR34a (134), miR29a (135) et miR125a (136). Au-delà de la régulation de l'expression HuR, les

interactions entre HuR et les microARNs sont par ailleurs multiples. HuR et certains microARNs ont par exemple un effet compétitif sur l'expression de microARNs cibles, HuR ayant un rôle stabilisateur et, au contraire, les microARNs entraînant la dégradation de ces mêmes ARNm, en particulier COX2 (132) et ERBB2 (137). Enfin, des microARNs peuvent par ailleurs s'associer à HuR pour inhiber la traduction d'autres ARNm cibles, comme MYC (138) et p16 (139).

Conclusion et perspectives

En conclusion, l'évaluation de la prolifération cellulaire par l'immunohistochimie permet d'évaluer de façon fiable le pronostic dans méningiomes. En particulier, en raison de son haut niveau d'expression et d'une nette différence de marquage entre les tumeurs non récidivantes et les tumeurs récidivantes, MCM6 apparaît comme le marqueur le plus efficace pour identifier les méningiomes à haut risque de récurrence.

La localisation de la protéine HuR est fortement corrélée à la prolifération cellulaire, et nous montrons que l'inhibition de HuR permet *in vitro* de diminuer la prolifération, et d'augmenter l'apoptose. L'inhibition de HuR permet de plus de potentialiser les effets de l'hypoxie. L'inhibition de HuR par des oligonucléotides ou par des inhibiteurs spécifiques pourrait ainsi ouvrir d'intéressantes perspectives thérapeutiques, en particulier en association au traitement par embolisation, ce qui mériterait d'être évalué dans des modèles expérimentaux. Il serait également intéressant d'en évaluer l'association avec un traitement par radiothérapie.

Les mécanismes de régulation de HuR sont multiples et complexes. Dans les méningiomes, la méthylation de HuR sur l'arginine 217 semble jouer un rôle important sur la localisation cytoplasmique, mais d'autres mécanismes sont également probablement impliqués. Les microARNs miR16 et miR519, s'ils sont fortement diminués dans les tumeurs par rapport aux méninges saines, ne semblent pas jouer de rôle significatif sur l'expression de HuR. L'exploration d'autres voies de régulation de HuR semble donc nécessaire.

Bibliographie

1. Perry A, Louis DN, Scheithauer BW, et al. Meningiomas. In: Barnes L, Eveson JW, Reichart P, et al., eds. *WHO Classification of tumours of the Central Nervous System*. Lyon: IARC Press; 2007:164-172.
2. Oncolor, Carol, Oncobourgogne, et al. Méningiomes. 2011. Available at: www.oncologik.fr.
3. Mason WP, Gentili F, Macdonald DR, et al. Stabilization of disease progression by hydroxyurea in patients with recurrent or unresectable meningioma. *Journal of neurosurgery*. 2002;97:341-346.
4. Ragel B, Jensen RL. New approaches for the treatment of refractory meningiomas. *Cancer Control*. 2003;10:148-158.
5. Chun JY, McDermott MW, Lamborn KR, et al. Delayed surgical resection reduces intraoperative blood loss for embolized meningiomas. *Neurosurgery*. 2002;50:1231-1235; discussion 1235-1237.
6. Borg A, Ekanayake J, Mair R, et al. Preoperative particle and glue embolization of meningiomas: indications, results, and lessons learned from 117 consecutive patients. *Neurosurgery*. 2013;73:244-251; discussion 252.
7. Shah AH, Patel N, Raper DM, et al. The role of preoperative embolization for intracranial meningiomas. *Journal of neurosurgery*. 2013;119:364-372.
8. Singla A, Deshaies EM, Melnyk V, et al. Controversies in the role of preoperative embolization in meningioma management. *Neurosurg Focus*. 2013;35:E17.
9. Barresi V, Branca G, Granata F, et al. Embolized meningiomas: risk of overgrading and neo-angiogenesis. *Journal of neuro-oncology*. 2013;113:207-219.

10. Jensen RL, Soleau S, Bhayani MK, et al. Expression of hypoxia inducible factor-1 alpha and correlation with preoperative embolization of meningiomas. *Journal of neurosurgery*. 2002;97:658-667.
11. Shi ZS, Feng L, Jiang XB, et al. Therapeutic embolization of meningiomas with Onyx for delayed surgical resection. *Surgical neurology*. 2008;70:478-481.
12. Bendszus M, Martin-Schrader I, Schlake HP, et al. Embolisation of intracranial meningiomas without subsequent surgery. *Neuroradiology*. 2003;45:451-455.
13. Willis J, Smith C, Ironside JW, et al. The accuracy of meningioma grading: a 10-year retrospective audit. *Neuropathol Appl Neurobiol*. 2005;31:141-149.
14. Fukushima S, Terasaki M, Sakata K, et al. Sensitivity and usefulness of anti-phosphohistone-H3 antibody immunostaining for counting mitotic figures in meningioma cases. *Brain Tumor Pathol*. 2009;26:51-57.
15. Terzi A, Saglam EA, Barak A, et al. The significance of immunohistochemical expression of Ki-67, p53, p21, and p16 in meningiomas tissue arrays. *Pathol Res Pract*. 2008;204:305-314.
16. Ozen O, Demirhan B, Altinors N. Correlation between histological grade and MIB-1 and p53 immunoreactivity in meningiomas. *Clin Neuropathol*. 2005;24:219-224.
17. Lanzafame S, Torrisi A, Barbagallo G, et al. Correlation between histological grade, MIB-1, p53, and recurrence in 69 completely resected primary intracranial meningiomas with a 6 year mean follow-up. *Pathol Res Pract*. 2000;196:483-488.
18. Karamitopoulou E, Perentes E, Tolnay M, et al. Prognostic significance of MIB-1, p53, and bcl-2 immunoreactivity in meningiomas. *Hum Pathol*. 1998;29:140-145.
19. Amatya VJ, Takeshima Y, Sugiyama K, et al. Immunohistochemical study of Ki-67 (MIB-1), p53 protein, p21WAF1, and p27KIP1 expression in benign, atypical, and anaplastic meningiomas. *Hum Pathol*. 2001;32:970-975.

20. Hunt DP, Freeman A, Morris LS, et al. Early recurrence of benign meningioma correlates with expression of mini-chromosome maintenance-2 protein. *Br J Neurosurg.* 2002;16:10-15.
21. Moller ML, Braendstrup O. No prediction of recurrence of meningiomas by PCNA and Ki-67 immunohistochemistry. *J Neurooncol.* 1997;34:241-246.
22. Cobb MA, Husain M, Andersen BJ, et al. Significance of proliferating cell nuclear antigen in predicting recurrence of intracranial meningioma. *J Neurosurg.* 1996;84:85-90.
23. Alama A, Barbieri F, Spaziante R, et al. Significance of cyclin D1 expression in meningiomas: a preliminary study. *J Clin Neurosci.* 2007;14:355-358.
24. Labib K, Tercero JA, Diffley JF. Uninterrupted MCM2-7 function required for DNA replication fork progression. *Science.* 2000;288:1643-1647.
25. Facchetti A, Ranza E, Benericetti E, et al. Minichromosome maintenance protein 7: a reliable tool for glioblastoma proliferation index. *Anticancer Res.* 2006;26:1071-1075.
26. Facchetti A, Ranza E, Grecchi I, et al. Immunohistochemical evaluation of minichromosome maintenance protein 7 in astrocytoma grading. *Anticancer Res.* 2006;26:3513-3516.
27. Wharton SB, Chan KK, Anderson JR, et al. Replicative Mcm2 protein as a novel proliferation marker in oligodendrogliomas and its relationship to Ki67 labelling index, histological grade and prognosis. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2001;27:305-313.
28. Saydam O, Senol O, Schaaij-Visser TB, et al. Comparative protein profiling reveals minichromosome maintenance (MCM) proteins as novel potential tumor markers for meningiomas. *J Proteome Res.* 2010;9:485-494.
29. Lee CY, Johnson RL, Wichterman-Kouznetsova J, et al. High-throughput screening for genes that prevent excess DNA replication in human cells and for molecules that inhibit them. *Methods.* 2012;57:234-248.

30. Ma WJ, Furneaux H. Localization of the human HuR gene to chromosome 19p13.2. *Hum Genet.* 1997;99:32-33.
31. Kundu P, Fabian MR, Sonenberg N, et al. HuR protein attenuates miRNA-mediated repression by promoting miRISC dissociation from the target RNA. *Nucleic acids research.* 2012;40:5088-5100.
32. Abdelmohsen K, Gorospe M. Posttranscriptional regulation of cancer traits by HuR. *Wiley Interdiscip Rev RNA.* 2010;1:214-229.
33. Brennan CM, Steitz JA. HuR and mRNA stability. *Cellular and molecular life sciences : CMLS.* 2001;58:266-277.
34. Hinman MN, Lou H. Diverse molecular functions of Hu proteins. *Cellular and molecular life sciences : CMLS.* 2008;65:3168-3181.
35. Lopez de Silanes I, Lal A, Gorospe M. HuR: post-transcriptional paths to malignancy. *RNA Biol.* 2005;2:11-13.
36. Lebedeva S, Jens M, Theil K, et al. Transcriptome-wide analysis of regulatory interactions of the RNA-binding protein HuR. *Mol Cell.* 2011;43:340-352.
37. Mukherjee N, Corcoran DL, Nusbaum JD, et al. Integrative regulatory mapping indicates that the RNA-binding protein HuR couples pre-mRNA processing and mRNA stability. *Mol Cell.* 2011;43:327-339.
38. Abdelmohsen K, Srikantan S, Yang X, et al. Ubiquitin-mediated proteolysis of HuR by heat shock. *Embo J.* 2009;28:1271-1282.
39. Abdelmohsen K, Kim MM, Srikantan S, et al. miR-519 suppresses tumor growth by reducing HuR levels. *Cell Cycle.* 2010;9:1354-1359.
40. Li H, Park S, Kilburn B, et al. Lipopolysaccharide-induced methylation of HuR, an mRNA-stabilizing protein, by CARM1. Coactivator-associated arginine methyltransferase. *J Biol Chem.* 2002;277:44623-44630.

41. Xu F, Zhang X, Lei Y, et al. Loss of repression of HuR translation by miR-16 may be responsible for the elevation of HuR in human breast carcinoma. *Journal of cellular biochemistry*. 2010;111:727-734.
42. Filippova N, Yang X, Wang Y, et al. The RNA-binding protein HuR promotes glioma growth and treatment resistance. *Mol Cancer Res*. 2011;9:648-659.
43. Williams TK, Costantino CL, Bildzukewicz NA, et al. pp32 (ANP32A) expression inhibits pancreatic cancer cell growth and induces gemcitabine resistance by disrupting HuR binding to mRNAs. *PLoS One*. 2010;5:e15455.
44. Hasegawa H, Kakuguchi W, Kuroshima T, et al. HuR is exported to the cytoplasm in oral cancer cells in a different manner from that of normal cells. *Br J Cancer*. 2009;100:1943-1948.
45. Botta G, De Santis LP, Saladino R. Current advances in the synthesis and antitumoral activity of SIRT1-2 inhibitors by modulation of p53 and pro-apoptotic proteins. *Curr Med Chem*. 2012;19:5871-5884.
46. Qu Y, Zhang J, Wu S, et al. SIRT1 promotes proliferation and inhibits apoptosis of human malignant glioma cell lines. *Neuroscience letters*. 2012;525:168-172.
47. Nurwidya F, Takahashi F, Minakata K, et al. From tumor hypoxia to cancer progression: the implications of hypoxia-inducible factor-1 expression in cancers. *Anat Cell Biol*. 2012;45:73-78.
48. Yoo PS, Sullivan CA, Kiang S, et al. Tissue microarray analysis of 560 patients with colorectal adenocarcinoma: high expression of HuR predicts poor survival. *Ann Surg Oncol*. 2009;16:200-207.
49. Heinonen M, Bono P, Narko K, et al. Cytoplasmic HuR expression is a prognostic factor in invasive ductal breast carcinoma. *Cancer Res*. 2005;65:2157-2161.
50. Denkert C, Weichert W, Pest S, et al. Overexpression of the embryonic-lethal abnormal vision-like protein HuR in ovarian carcinoma is a prognostic factor and is associated with increased cyclooxygenase 2 expression. *Cancer Res*. 2004;64:189-195.

51. Denkert C, Weichert W, Winzer KJ, et al. Expression of the ELAV-like protein HuR is associated with higher tumor grade and increased cyclooxygenase-2 expression in human breast carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2004;10:5580-5586.
52. Stoppoloni D, Cardillo I, Verdina A, et al. Expression of the embryonic lethal abnormal vision-like protein HuR in human mesothelioma: association with cyclooxygenase-2 and prognosis. *Cancer.* 2008;113:2761-2769.
53. Wang J, Zhao W, Guo Y, et al. The expression of RNA-binding protein HuR in non-small cell lung cancer correlates with vascular endothelial growth factor-C expression and lymph node metastasis. *Oncology.* 2009;76:420-429.
54. Wang J, Wang B, Bi J, et al. Cytoplasmic HuR expression correlates with angiogenesis, lymphangiogenesis, and poor outcome in lung cancer. *Med Oncol.* 2010 Epub Nov 3.
55. Ido K, Nakagawa T, Sakuma T, et al. Expression of vascular endothelial growth factor-A and mRNA stability factor HuR in human astrocytic tumors. *Neuropathology.* 2008;28:604-611.
56. Nabors LB, Gillespie GY, Harkins L, et al. HuR, a RNA stability factor, is expressed in malignant brain tumors and binds to adenine- and uridine-rich elements within the 3' untranslated regions of cytokine and angiogenic factor mRNAs. *Cancer Res.* 2001;61:2154-2161.
57. Bolognani F, Gallani AI, Sokol L, et al. mRNA stability alterations mediated by HuR are necessary to sustain the fast growth of glioma cells. *J Neurooncol.* 2011;106:531-542.
58. Sakuma T, Nakagawa T, Ido K, et al. Expression of vascular endothelial growth factor-A and mRNA stability factor HuR in human meningiomas. *J Neurooncol.* 2008;88:143-155.
59. Battaglia-Hsu SF, Akchiche N, Noel N, et al. Vitamin B12 deficiency reduces proliferation and promotes differentiation of neuroblastoma cells and up-regulates PP2A, proNGF, and TACE. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106:21930-21935.

60. Pons L, Battaglia-Hsu SF, Orozco-Barrios CE, et al. Anchoring secreted proteins in endoplasmic reticulum by plant oleosin: the example of vitamin B12 cellular sequestration by transcobalamin. *PLoS One*. 2009;4:e6325.
61. Kang MJ, Ryu BK, Lee MG, et al. NF-kappaB activates transcription of the RNA-binding factor HuR, via PI3K-AKT signaling, to promote gastric tumorigenesis. *Gastroenterology*. 2008;135:2030-2042, 2042 e2031-2033.
62. Yi J, Chang N, Liu X, et al. Reduced nuclear export of HuR mRNA by HuR is linked to the loss of HuR in replicative senescence. *Nucleic acids research*. 2010;38:1547-1558.
63. Mazroui R, Di Marco S, Clair E, et al. Caspase-mediated cleavage of HuR in the cytoplasm contributes to pp32/PHAP-I regulation of apoptosis. *J Cell Biol*. 2008;180:113-127.
64. Abdelmohsen K, Srikantan S, Kuwano Y, et al. miR-519 reduces cell proliferation by lowering RNA-binding protein HuR levels. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008;105:20297-20302.
65. Lee WH. Characterization of a newly established malignant meningioma cell line of the human brain: IOMM-Lee. *Neurosurgery*. 1990;27:389-395; discussion 396.
66. Shibata K, Inagaki M, Ajiro K. Mitosis-specific histone H3 phosphorylation in vitro in nucleosome structures. *Eur J Biochem*. 1990;192:87-93.
67. Hendzel MJ, Wei Y, Mancini MA, et al. Mitosis-specific phosphorylation of histone H3 initiates primarily within pericentromeric heterochromatin during G2 and spreads in an ordered fashion coincident with mitotic chromosome condensation. *Chromosoma*. 1997;106:348-360.
68. Tapia C, Kutzner H, Mentzel T, et al. Two mitosis-specific antibodies, MPM-2 and phospho-histone H3 (Ser28), allow rapid and precise determination of mitotic activity. *Am J Surg Pathol*. 2006;30:83-89.

69. Ribalta T, McCutcheon IE, Aldape KD, et al. The mitosis-specific antibody anti-phosphohistone-H3 (PHH3) facilitates rapid reliable grading of meningiomas according to WHO 2000 criteria. *Am J Surg Pathol*. 2004;28:1532-1536.
70. Gerdes J, Li L, Schlueter C, et al. Immunobiochemical and molecular biologic characterization of the cell proliferation-associated nuclear antigen that is defined by monoclonal antibody Ki-67. *Am J Pathol*. 1991;138:867-873.
71. Mengel M, von Wasielewski R, Wiese B, et al. Inter-laboratory and inter-observer reproducibility of immunohistochemical assessment of the Ki-67 labelling index in a large multi-centre trial. *J Pathol*. 2002;198:292-299.
72. McKeever PE, Strawderman MS, Yamini B, et al. MIB-1 proliferation index predicts survival among patients with grade II astrocytoma. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1998;57:931-936.
73. Chatrath P, Scott IS, Morris LS, et al. Immunohistochemical estimation of cell cycle phase in laryngeal neoplasia. *Br J Cancer*. 2006;95:314-321.
74. Scott IS, Morris LS, Bird K, et al. A novel immunohistochemical method to estimate cell-cycle phase distribution in archival tissue: implications for the prediction of outcome in colorectal cancer. *J Pathol*. 2003;201:187-197.
75. Kingsbury SR, Loddo M, Fanshawe T, et al. Repression of DNA replication licensing in quiescence is independent of geminin and may define the cell cycle state of progenitor cells. *Exp Cell Res*. 2005;309:56-67.
76. Eward KL, Obermann EC, Shreeram S, et al. DNA replication licensing in somatic and germ cells. *J Cell Sci*. 2004;117:5875-5886.
77. Aximu D, Azad A, Ni R, et al. A pilot evaluation of a novel immunohistochemical assay for topoisomerase II-alpha and minichromosome maintenance protein 2 expression (ProEx C) in cervical

adenocarcinoma in situ, adenocarcinoma, and benign glandular mimics. *Int J Gynecol Pathol*. 2009;28:114-119.

78. Boyd AS, Shakhtour B, Shyr Y. Minichromosome maintenance protein expression in benign nevi, dysplastic nevi, melanoma, and cutaneous melanoma metastases. *J Am Acad Dermatol*. 2008;58:750-754.

79. Gonzalez MA, Pinder SE, Callagy G, et al. Minichromosome maintenance protein 2 is a strong independent prognostic marker in breast cancer. *J Clin Oncol*. 2003;21:4306-4313.

80. Hanna-Morris A, Badvie S, Cohen P, et al. Minichromosome maintenance protein 2 (MCM2) is a stronger discriminator of increased proliferation in mucosa adjacent to colorectal cancer than Ki-67. *J Clin Pathol*. 2009;62:325-330.

81. Helfenstein A, Frahm SO, Krams M, et al. Minichromosome maintenance protein (MCM6) in low-grade chondrosarcoma: distinction from enchondroma and identification of progressive tumors. *Am J Clin Pathol*. 2004;122:912-918.

82. Kikuchi J, Kinoshita I, Shimizu Y, et al. Minichromosome maintenance (MCM) protein 4 as a marker for proliferation and its clinical and clinicopathological significance in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*. 2011;72:229-237.

83. Lau KM, Chan QK, Pang JC, et al. Minichromosome maintenance proteins 2, 3 and 7 in medulloblastoma: overexpression and involvement in regulation of cell migration and invasion. *Oncogene*. 2010;29:5475-5489.

84. Adams PD. Regulation of the retinoblastoma tumor suppressor protein by cyclin/cdks. *Biochim Biophys Acta*. 2001;1471:M123-133.

85. Barton KM, Levine EM. Expression patterns and cell cycle profiles of PCNA, MCM6, cyclin D1, cyclin A2, cyclin B1, and phosphorylated histone H3 in the developing mouse retina. *Dev Dyn*. 2008;237:672-682.

86. Jirawatnotai S, Hu Y, Michowski W, et al. A function for cyclin D1 in DNA repair uncovered by protein interactome analyses in human cancers. *Nature*. 2011;474:230-234.
87. Gladden AB, Diehl JA. The cyclin D1-dependent kinase associates with the pre-replication complex and modulates RB.MCM7 binding. *J Biol Chem*. 2003;278:9754-9760.
88. Milenkovic S, Marinkovic T, Jovanovic MB, et al. Cyclin D1 immunoreactivity in meningiomas. *Cell Mol Neurobiol*. 2008;28:907-913.
89. Lane DP, Benchimol S. p53: oncogene or anti-oncogene? *Genes Dev*. 1990;4:1-8.
90. Amatya VJ, Takeshima Y, Inai K. Methylation of p14(ARF) gene in meningiomas and its correlation to the p53 expression and mutation. *Mod Pathol*. 2004;17:705-710.
91. Cho H, Ha SY, Park SH, et al. Role of p53 gene mutation in tumor aggressiveness of intracranial meningiomas. *J Korean Med Sci*. 1999;14:199-205.
92. Joachim T, Ram Z, Rappaport ZH, et al. Comparative analysis of the NF2, TP53, PTEN, KRAS, NRAS and HRAS genes in sporadic and radiation-induced human meningiomas. *Int J Cancer*. 2001;94:218-221.
93. Wang JL, Zhang ZJ, Hartman M, et al. Detection of TP53 gene mutation in human meningiomas: a study using immunohistochemistry, polymerase chain reaction/single-strand conformation polymorphism and DNA sequencing techniques on paraffin-embedded samples. *Int J Cancer*. 1995;64:223-228.
94. Yakut T, Bekar A, Doygun M, et al. Evaluation of relationship between chromosome 22 and p53 gene alterations and the subtype of meningiomas by the interphase-FISH technique. *Teratog Carcinog Mutagen*. 2002;22:217-225.
95. Chozick BS, Benzil DL, Stopa EG, et al. Immunohistochemical evaluation of erbB-2 and p53 protein expression in benign and atypical human meningiomas. *J Neurooncol*. 1996;27:117-126.

96. Kamei Y, Watanabe M, Nakayama T, et al. Prognostic significance of p53 and p21WAF1/CIP1 immunoreactivity and tumor micronecrosis for recurrence of meningiomas. *J Neurooncol.* 2000;46:205-213.
97. Nagashima G, Aoyagi M, Yamamoto M, et al. P53 overexpression and proliferative potential in malignant meningiomas. *Acta Neurochir (Wien).* 1999;141:53-61; discussion 60-51.
98. Lehr HA, Mankoff DA, Corwin D, et al. Application of photoshop-based image analysis to quantification of hormone receptor expression in breast cancer. *J Histochem Cytochem.* 1997;45:1559-1565.
99. Lopez de Silanes I, Fan J, Yang X, et al. Role of the RNA-binding protein HuR in colon carcinogenesis. *Oncogene.* 2003;22:7146-7154.
100. Ghemrawi R, Pooya S, Lorentz S, et al. Decreased vitamin B12 availability induces ER stress through impaired SIRT1-deacetylation of HSF1. *Cell Death Dis.* 2013;4:e553.
101. Wang W, Yan C, Zhang J, et al. SIRT1 inhibits TNF-alpha-induced apoptosis of vascular adventitial fibroblasts partly through the deacetylation of FoxO1. *Apoptosis.* 2013;18:689-701.
102. Yan W, Fang Z, Yang Q, et al. SirT1 mediates hyperbaric oxygen preconditioning-induced ischemic tolerance in rat brain. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2013;33:396-406.
103. Matsuda K, Takeuchi H, Arai Y, et al. Atypical and ischemic features of embolized meningiomas. *Brain Tumor Pathol.* 2012;29:17-24.
104. Patsouris E, Laas R, Hagel C, et al. Increased proliferative activity due to necroses induced by pre-operative embolization in benign meningiomas. *Journal of neuro-oncology.* 1998;40:257-264.
105. Paulus W, Meixensberger J, Hofmann E, et al. Effect of embolisation of meningioma on Ki-67 proliferation index. *J Clin Pathol.* 1993;46:876-877.

106. Gabai VL, Meng L, Kim G, et al. Heat shock transcription factor Hsf1 is involved in tumor progression via regulation of hypoxia-inducible factor 1 and RNA-binding protein HuR. *Molecular and cellular biology*. 2012;32:929-940.
107. Lee SH, Lee YS, Hong YG, et al. Significance of COX-2 and VEGF expression in histopathologic grading and invasiveness of meningiomas. *APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica*. 2014;122:16-24.
108. Jensen R, Lee J. Predicting outcomes of patients with intracranial meningiomas using molecular markers of hypoxia, vascularity, and proliferation. *Neurosurgery*. 2012;71:146-156.
109. Gong DJ, Zhang JM, Yu M, et al. Inhibition of SIRT1 combined with gemcitabine therapy for pancreatic carcinoma. *Clin Interv Aging*. 2013;8:889-897.
110. Kuo SJ, Lin HY, Chien SY, et al. SIRT1 suppresses breast cancer growth through downregulation of the Bcl-2 protein. *Oncology reports*. 2013;30:125-130.
111. Lee JW, Bae SH, Jeong JW, et al. Hypoxia-inducible factor (HIF-1)alpha: its protein stability and biological functions. *Experimental & molecular medicine*. 2004;36:1-12.
112. Kaya AO, Gunel N, Benekli M, et al. Hypoxia inducible factor-1 alpha and carbonic anhydrase IX overexpression are associated with poor survival in breast cancer patients. *J Buon*. 2012;17:663-668.
113. Muriel Lopez C, Esteban E, Berros JP, et al. Prognostic factors in patients with advanced renal cell carcinoma. *Clin Genitourin Cancer*. 2012;10:262-270.
114. Volm M, Koomagi R. Hypoxia-inducible factor (HIF-1) and its relationship to apoptosis and proliferation in lung cancer. *Anticancer Res*. 2000;20:1527-1533.
115. Jeong W, Rapisarda A, Park SR, et al. Pilot trial of EZN-2968, an antisense oligonucleotide inhibitor of hypoxia-inducible factor-1 alpha (HIF-1alpha), in patients with refractory solid tumors. *Cancer chemotherapy and pharmacology*. 2013 Epub Dec 3.

116. Kim KH, Jung HJ, Kwon HJ. A new anti-angiogenic small molecule, G0811, inhibits angiogenesis via targeting hypoxia inducible factor (HIF)-1alpha signal transduction. *Biochem Biophys Res Commun*. 2013;441:399-404.
117. Gothie E, Richard DE, Berra E, et al. Identification of alternative spliced variants of human hypoxia-inducible factor-1alpha. *The Journal of biological chemistry*. 2000;275:6922-6927.
118. Lee KH, Park JW, Chun YS. Non-hypoxic transcriptional activation of the aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator in concert with a novel hypoxia-inducible factor-1alpha isoform. *Nucleic acids research*. 2004;32:5499-5511.
119. Lukashev D, Caldwell C, Ohta A, et al. Differential regulation of two alternatively spliced isoforms of hypoxia-inducible factor-1 alpha in activated T lymphocytes. *The Journal of biological chemistry*. 2001;276:48754-48763.
120. Lukashev D, Sitkovsky M. Preferential expression of the novel alternative isoform I.3 of hypoxia-inducible factor 1alpha in activated human T lymphocytes. *Hum Immunol*. 2008;69:421-425.
121. Vigouroux C. Dérégulation de HuR (ELAV-like 1) et prolifération dans les carcinomes bronchiques non à petites cellules. *Faculté de Médecine*. Nancy: Université de Lorraine; 2013.
122. Vazquez-Chantada M, Fernandez-Ramos D, Embade N, et al. HuR/methyl-HuR and AUF1 regulate the MAT expressed during liver proliferation, differentiation, and carcinogenesis. *Gastroenterology*. 2010;138:1943-1953.
123. Fujiwara T, Mori Y, Chu DL, et al. CARM1 regulates proliferation of PC12 cells by methylating HuD. *Molecular and cellular biology*. 2006;26:2273-2285.
124. Doller A, Akool el S, Huwiler A, et al. Posttranslational modification of the AU-rich element binding protein HuR by protein kinase Cdelta elicits angiotensin II-induced stabilization and nuclear export of cyclooxygenase 2 mRNA. *Molecular and cellular biology*. 2008;28:2608-2625.

125. Doller A, Schlepckow K, Schwalbe H, et al. Tandem phosphorylation of serines 221 and 318 by protein kinase Cdelta coordinates mRNA binding and nucleocytoplasmic shuttling of HuR. *Molecular and cellular biology*. 2010;30:1397-1410.
126. Doller A, Huwiler A, Muller R, et al. Protein kinase C alpha-dependent phosphorylation of the mRNA-stabilizing factor HuR: implications for posttranscriptional regulation of cyclooxygenase-2. *Mol Biol Cell*. 2007;18:2137-2148.
127. Doller A, Winkler C, Azrilian I, et al. High-constitutive HuR phosphorylation at Ser 318 by PKC{delta} propagates tumor relevant functions in colon carcinoma cells. *Carcinogenesis*. 2011;32:676-685.
128. Abdelmohsen K, Pullmann R, Jr., Lal A, et al. Phosphorylation of HuR by Chk2 regulates SIRT1 expression. *Mol Cell*. 2007;25:543-557.
129. Kim HH, Abdelmohsen K, Lal A, et al. Nuclear HuR accumulation through phosphorylation by Cdk1. *Genes & development*. 2008;22:1804-1815.
130. Srikantan S, Tominaga K, Gorospe M. Functional interplay between RNA-binding protein HuR and microRNAs. *Curr Protein Pept Sci*. 2012;13:372-379.
131. Xu F, Zhang X, Lei Y, et al. Loss of repression of HuR translation by miR-16 may be responsible for the elevation of HuR in human breast carcinoma. *J Cell Biochem*. 111:727-734.
132. Young LE, Moore AE, Sokol L, et al. The mRNA stability factor HuR inhibits microRNA-16 targeting of COX-2. *Molecular cancer research : MCR*. 2012;10:167-180.
133. Yang TQ, Luo XJ, Wu TF, et al. miR-16 inhibits glioma cell growth and invasion through the suppression of BCL2 and NF-kappaB1/MMP-9 signaling pathway. *Cancer science*. 2014 Epub Jan 15.
134. van Kouwenhove M, Kedde M, Agami R. MicroRNA regulation by RNA-binding proteins and its implications for cancer. *Nat Rev Cancer*. 2011;11:644-656.

135. Al-Ahmadi W, Al-Ghamdi M, Al-Souhibani N, et al. miR-29a inhibition normalizes HuR over-expression and aberrant AU-rich mRNA stability in invasive cancer. *The Journal of pathology*. 2013;230:28-38.
136. Guo X, Wu Y, Hartley RS. MicroRNA-125a represses cell growth by targeting HuR in breast cancer. *RNA biology*. 2009;6:575-583.
137. Epis MR, Barker A, Giles KM, et al. The RNA-binding protein HuR opposes the repression of ERBB-2 gene expression by microRNA miR-331-3p in prostate cancer cells. *The Journal of biological chemistry*. 2011;286:41442-41454.
138. Kim HH, Kuwano Y, Srikantan S, et al. HuR recruits let-7/RISC to repress c-Myc expression. *Genes & development*. 2009;23:1743-1748.
139. Chang N, Yi J, Guo G, et al. HuR uses AUF1 as a cofactor to promote p16INK4 mRNA decay. *Molecular and cellular biology*. 2010;30:3875-3886.

Annexe 1 : Protocoles et composition des tampons

Protocole d'immunohistochimie

- Après inclusion en paraffine, réalisation coupes fines (5µm) montées à l'eau sur des lames de verre PolysineTM (LABONORD S.A, Templemars, France)
- Séchage pendant 5 min sur une platine chauffante à 58°C puis placées à l'étuve à 56 °C pendant quelques heures
- Déparaffinage et Démasquage des sites antigéniques dans l'appareil PT Link (Dako) en tampon citrate pH 6,0 pendant 20 minutes à 97°C
- Dilution des anticorps primaires dans le diluant EnVisionTM FLEX Antibody Diluent (DM 830)
- Technique Flex + en automate Dako Autostainer Plus :
 - Rinçage avec une solution saline de tampon Tris contenant du Tween 20, pH 7,6 (±0,1) pendant 5 min
 - Blocage des peroxydases endogènes avec le réactif EnVisionTM FLEX Peroxidase Blocking Reagent (SM 801) soit avec un tampon phosphate contenant du peroxyde d'hydrogène, NaN₃ 15mmol/L et un détergent pendant 5 min
 - Rinçage pendant 5 min
 - Incubation avec l'anticorps primaire pendant 1h
 - Rinçage pendant 5 min
 - Incubation de l'anticorps secondaire EnVisionTM FLEX+ Rabbit (LINKER) (SM 805) pendant 15 min
 - Rinçage pendant 5 min
 - Dépôt d'un polymère marqué avec EnVisionTM FLEX/HRP (SM802) (dextrane couplé à des molécules de peroxydase et à des molécules secondaires de chèvre dirigées contre les immunoglobulines de lapin et de souris dans une solution tamponnée contenant une protéine stabilisante et un agent conservateur) pendant 20 min
 - Rinçage pendant 2 x 5 min
 - Révélation chromogène avec EnVisionTM FLEX Substrate Buffer (SM 803) (solution tamponnée diluant une solution contenant du

peroxyde d'hydrogène et le chromogène diaminobenzidine (DAB) et un agent conservateur) pendant 10 min

- Rinçage pendant 5 min
- Contre coloration avec EnVision™ FLEX Hematoxylin (SM 806) soit une solution aqueuse d'hématoxyline pendant 5 min
- Rinçage pendant 5 min à l'eau distillée
- Montage à l'Eukitt® (LABONORD S.A., Templemars, France) après déshydratation par des bains successifs d'éthanol à 70°, 96° et 100°.

Evaluation du marquage immunohistochimique par analyse d'image

- Photographie avec l'objectif x10 une utilisant (caméra Olympus), dans la zone de marquage d'intensité maximale, avec le même temps d'exposition et les mêmes réglages manuels pour chaque cas
- Enregistrement au format JPEG (intitulé « numéro du cas.jpg »)
- Ouverture du fichier JPEG avec Adobe Photoshop
- Sélection des noyaux avec l'outil *Color Range*, en pointant un noyau avec l'outil de sélection *Sampled Colors*, puis en ajustant sous contrôle visuel avec la barre *Fuzziness*
- Report du nombre de pixels sélectionnés dans un tableur
- Copie de la sélection et collage dans un nouveau fichier, converti en niveaux de gris (*Mode/Grayscale*), enregistrement au format JPEG (« numéro de cas -N.jpg »)
- Répétition des étapes *d*, *e* et *f* en sélectionnant les cytoplasmes (« numéro de cas - C.jpg »)
- Ouverture du fichier « numéro de cas -N.jpg » avec ImageJ
- Inversion des niveaux de gris avec la fonction *Invert*
- Mesure de la densité intégrée avec l'outil *Measure*, reporter la valeur de la colonne IntDen (à rajouter si non présente en cliquant sur *Set Measurements*)
- Répéter les étapes *h*, *i* et *j* avec le fichier avec « numéro de cas -C.jpg »
- Calcul des scores cytoplasmiques et nucléaires en divisant l'intensité intégrée par le nombre de pixels sélectionnés

Extraction des protéines totales sur lignées cellulaires

- Dépôt de 300 µL par puits de tampon de lyse (solution RIPA contenant : NaCL 8 g/L, Na₂HPO₄ 1,44 g/L, KH₂PO₄ 0,24 g/L, NP40 1%, DOC 0,5%, SDS 0,1% ; Na₃VO₄ 10 µL/mL ; antiprotéase PIC 1 tablette / 10 mL ; PMSF 10 µL/mL)
- Décollement des cellules au râteau dans le tampon pendant 10 minutes
- Recueil et lyse des cellules en effectuant 10 allers-retours à la seringue
- Faire 3 cycles congélation dans l'azote liquide / décongélation au bain marie
- Centrifugation à 12.000 tours/min pendant 30 min à 4°C
- Recueil et congélation du surnageant après dosage (méthode de dosage colorimétrique à l'acide bicinchoninique – méthode BCA, sur appareil VICTOR 3 Multilabel counter 1420, Perkin Elmer).

Protocole de Western Blot

(D'après le protocole de D. HELLE, U954)

La composition des gels est la suivante :

- Gel de concentration contenant (pour 8 mL) 1 mL d'acrylamide, 1 mL de Tris 0,5M pH 6,8, 0,08 mL de SDS 10%, 0,08 mL de persulfate d'ammonium à 10%, 0,008 mL de Temed (Carlo Erba).
- Gel de séparation à 10% contenant (pour 8 mL) 5 mL d'acrylamide, 5 mL de Tris 1,5M, pH 8,8, 0,2 mL de SDS 10%, 0,2 mL de persulfate d'ammonium à 10%, 0,008 mL de Temed (Carlo Erba).

Electrophorèse

Préparation des gels

Passer les plaques de verre à l'alcool

Monter l'appareil d'électrophorèse Mini-Protean III : plaques de verre et espaceurs (en général 1,5mm)

Préparer le gel de séparation -voir tableau- à la concentration souhaitée. Pour 2 gels prévoir 20ml de solution

Couler les gels et s'arrêter au niveau bas du plastique vert en dessous de l'emplacement du peigne

Déposer un fin film (~ 500µl) d'isopropanol (ou isobutanol)

Attendre la polymérisation à température ambiante (pour gel 12%, si $t^{\circ} \sim 20-22^{\circ}\text{C}$ compter 20mn)

Rincer abondamment à l'eau distillée et éliminer toutes traces d'eau

Couler le gel de concentration à 5% -voir tableau- Pour 2 gels prévoir 8ml

Positionner le peigne en Téflon en évitant la formation de bulles : polymérisation

Retirer le peigne et rincer les puits avec du tampon de migration

Monter l'appareil en assemblant les deux supports de gel sur le système central

Remplir le réservoir central (cathode) jusqu'en haut ainsi que la cuve (à moitié) avec le tampon de migration

Préparation des échantillons

Dans des tubes Eppendorf, ajouter 1 volume de tampon Laemmli 2X à 1 volume d'échantillon

Chauffer 5 mn à 100°C les échantillons et les marqueurs de taille (si nécessaire)

Charger les puits avec les échantillons et les marqueurs

Migration : voltage constant

Gel de concentration : 80V, environ 15mn

Gel de séparation : 110V, ~1h30

Arrêter la migration quand le front de migration arrive en bas des plaques

Electro-transfert liquide

Préparation de la membrane

Découper la membrane à la dimension du gel : 7 x 8,5cm minimum (gants)

Mettre la membrane PVDF au moins 30 sec dans du méthanol

Equilibrer la membrane dans le tampon de transfert froid (5mn max) ainsi que les éponges et les filtres

Démonter l'appareil de migration, éliminer le gel de concentration et équilibrer les gels dans le tampon de transfert froid (5mn max)

Transfert

Préparation du sandwich : placer la face blanche en haut et noire en bas, superposer sur la face blanche dans l'ordre :

- une éponge
 - 2 papiers filtre
 - la membrane
 - le gel
 - 2 papiers filtre: expulser les bulles d'air à l'aide d'une pipette plastique
 - une éponge
- et fermer le sandwich

Placer les cassettes dans le module de transfert, face noire vers face noire

Mettre le glaçon

Remplir la cuve avec du tampon froid

Transfert à ampérage constant :

350mA pendant 45mn

ou 90mA toute une nuit

Vérification du transfert (en option)

Quand on sort les membranes de la cassette on observe des bandes sur la membrane si le transfert à marcher.

ou

Coloration de la membrane avec une solution de Rouge Ponceau S (solution aqueuse de Rouge Ponceau S à 0.2% (p/v), acide acétique 0.1% (v/v), filtrée 0.2µm, 4°C) pendant 5mn puis décoloration à l'eau distillée.

A ce stade on peut laisser sécher la membrane et la conserver au frigo pour une révélation ultérieure.

Avant de réutiliser une membrane sèche, la repasser dans un bain de méthanol.

Blocage

Repérer de quel côté sont les protéines

Mettre les membranes dans une solution de TBST /lait écrémé 5% sous agitation pendant 1 heure à température ambiante

1^{er} anticorps

Préparer une pochette plastique légèrement supérieure à la surface de la membrane

Préparer la solution avec le premier anticorps dilué à la concentration souhaitée dans TBST/lait 5% (4 à 5ml au total)

Placer la membrane dans la pochette plastique, mettre la solution d'anticorps, souder la pochette et incuber pendant 1 nuit à 4°C sous agitation lente

Lavage

Sortir la membrane de sa pochette plastique et la mettre dans un petit bac

Faire 1 rinçage rapide avec du TBST, puis rincer avec du TBST 4X10mn sous agitation rapide à température ambiante

2^{ème} anticorps

Procéder de la même façon qu'avec le 1^{er} anticorps

Incuber 1 heure sous agitation lente à température ambiante

Lavage

Idem lavage ci-dessus

Révélation ECL

Préparer la solution ECL (1 :1) (pour une membrane prévoir 1ml au total)

Sortir la membrane du tampon de lavage, la secouer pour éliminer l'excès de tampon

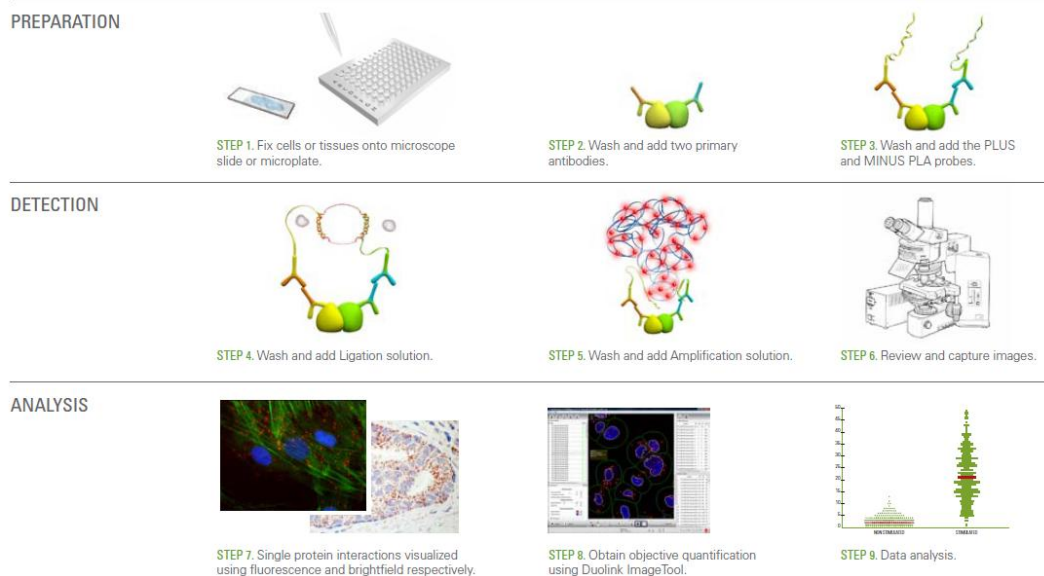
Déposer l'ECL et incuber 4 min

Révélation dans l'appareil Fusion Fx en utilisant le temps de révélation adapté

Technique de Duolink

On utilise le kit Duolink *in situ kit* (Olink Biosciences).

- Coupes de 4 μm à partir du bloc de tissu inclus en paraffine
- Déparaffinage dans l'Histoclear (National Diagnostics, USA) 2 x 3 min
- Réhydratation (éthanol 100% 3 min, éthanol 70% 3 min, éthanol 50% 3 min, eau distillée 5 min)
- Perméabilisation 10 min dans une solution de triton 0,1%
- 3 lavages de 5 minutes (PBS)
- Démasquage 20 min à 97°C dans une solution de tampon citrate 10 mM pH6 / Tween 0,05%
- Blocage 1 h à température ambiante (solution de blocage)
- Incubation 2 h à température ambiante des deux anticorps primaires dilués au 1/200 puis 2 lavages de 5 min (tampon de lavage A)
- Incubation 1 h à 37°C en chambre humide de la sonde PLA diluée au 1/5 puis 2 lavages de 2 min (tampon de lavage A)
- Ligation 30 min à 37°C en chambre humide dans une solution de ligase diluée au 1/40 dans le tampon de ligation (prédilution du tampon au 1/4 dans l'eau) puis 2 lavages de 2 min (tampon de lavage A)
- Amplification 1 h 40 min à 37°C en chambre humide dans l'obscurité dans une solution de polymérase diluée au 1/80 dans le tampon d'amplification (prédilution du tampon au 1/5 dans l'eau) puis 2 lavages de 10 min (tampon de lavage B) et 1 lavage de 1 min (tampon de lavage B dilué au 1/100)
- Contre-coloration 4 min par le DAPI (dilution 1/2000 dans l'eau) puis 2 lavages de 10 min (tampon de lavage A) et rinçage à l'eau
- Montage des lames et lecture au microscope confocal



Principes de la technique Duolink (source : www.olink.com)

Technique d'immunofluorescence

- Perméabilisation 10 min dans une solution de triton 0,1%
- 3 lavages de 5 min (PBS)
- Blocage sur la nuit à 4°C dans une solution de BSA (sérum albumine bovine) à 1%
- Incubation 1 h 45 à température ambiante de l'anticorps primaire dilué dans le BSA 1%
- 3 lavages de 10 min dans une solution de triton 0,05%
- Incubation 1 h à température ambiante de l'anticorps secondaire Alexa Fluor (Life Technologies) dilué au 1/1000 dans le BSA 1% (anti-souris ou anti-lapin)
- 3 lavages de 5 min dans une solution de triton 0,05%
- Contre-coloration 5 min avec une solution de DAPI 1/5000
- 2 lavages de 5 min (PBS)
- Rinçage dans l'eau milliQ
- Montage (Dako Fluorescence Mounting Medium, Dako Cytomation) et lecture sur microscope à fluorescence.

Inhibition de HuR par siRNA

Pour les manipulations destinées à l'immunofluorescence, on utilise une boîte de 24 puits contenant des lames en verre, et, pour les extractions protéiques, une boîte de 6 puits.

Pour une boîte de 24 puits (p24), on utilise 10 μ L de siRNA et 1 μ L de lipofectamine RNAiMAX, selon le protocole suivant :

- Dépôt de 25.000 cellules par puits et incubation 24 h en conditions de culture standard (500 μ L de milieu standard par puits)
- Changement de milieu à 24 h (500 μ L de milieu standard par puits)
- Prédilution de 10 μ L de siRNA (siHuR ou SiControl, 1 μ mol/L) dans 40 μ L d'opti-MEM (Life Technologies) et de 1 μ L de lipofectamine RNAiMAX dans 49 μ L d'opti-MEM, attendre 5 min (adapter les quantités au nombre de puits)
- Rajouter le siRNA pré-dilué dans le tube contenant la lipofectamine et attendre 20 min
- Distribuer goutte à goutte 100 μ L par puit
- Incubation 72 h en changeant de milieu à 24 h et 48 h.

Pour une boîte de 6 puits (p6), on utilise 50 μ L de siRNA et 5 μ L de lipofectamine RNAiMAX, selon le protocole suivant :

- Dépôt de 120.000 cellules par puits et incubation 24 h en conditions de culture standard (2 mL de milieu standard par puits)
- Changement de milieu à 24 h (2 mL de milieu standard par puits)
- Prédilution de 50 μ L de siRNA (siHuR ou SiControl, 1 μ mol/L) dans 200 μ L d'opti-MEM (Life Technologies) et de 5 μ L de lipofectamine RNAiMAX dans 245 μ L d'opti-MEM, attendre 5 min

- Rajouter le siRNA pré-dilué dans le tube contenant la lipofectamine et attendre 20 min
- Distribuer goutte à goutte 500 μ L par puits
- Incubation 72 h en changeant de milieu à 24 h et 48 h

Croissance cellulaire

- Aspiration du milieu et lavage par tampon PBS
- Décollement des cellules avec 200 μ L trypsine (4 min à 37°C)
- Dilution dans 1 mL de milieu et homogénéisation douce
- Aspiration d'une prise d'essai de 50 μ L mélangée à 10 μ L de bleu trypan (x3 par puits)
- Compte des cellules viables dans une cellule de Thomas
- Calcul du nombre de cellules par μ L.

Tampon de migration de Western Blot

- Pour 1 litre 10X concentré :
 - o Tris 250 mM (30g)
 - o Glycine 1,92 M (144g)
 - o SDS 1 % (10g)
 - o Compléter jusqu'à 1 litre avec de l'eau milliQ
- A utiliser 1X concentré : diluer 100ml de la solution 10X et compléter jusqu'à 1 litre avec de l'eau milliQ

Tampon de transfert de Western Blot

- Pour 1 litre 10X concentré :
 - Tris 480 mM (58,1g)
 - Glycine 390 mM (29,3g)
 - SDS 0,375 % (13 mM) (3,75g)
 - Compléter jusqu'à 1 litre avec de l'eau milliQ
 - A utiliser 1X concentré : 100ml de la solution 10X, 200ml de éthanol et compléter jusqu'à 1 litre avec de l'eau milliQ

Tampon de lavage TBS

- Pour 1 litre 10X concentré
 - Tris 200 mM, 24,2g
 - NaCl 1,5 M, 87,5g
 - pH 7,4 à ajuster avec HCl
 - Compléter jusqu'à 1 litre avec de l'eau milliQ
- A utiliser 1X concentré : 100ml de la solution 10X, 1ml de Tween 20 à 0,1%, compléter jusqu'à 1 litre avec de l'eau milliQ

Annexe 2 : publications scientifiques du candidat

Publications indexées dans Pubmed (Medline) au 16/01/2014 :

- 1: Debourgogne A, Goehringer F, Umhang G, Gauchotte G, Hénard S, Boué F, May T, Machouart M. Primary cerebral alveolar echinococcosis: mycology to the rescue. *J Clin Microbiol*. 2013 Dec 11. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 24335950.
- 2: Chapelet A, Audibert G, Plénat F, Vignaud JM, Gauchotte G. [A sudden cardiac arrest during the anesthesia induction]. *Ann Pathol*. 2013 Dec;33(6):426-8. doi: 10.1016/j.annpat.2013.10.006. Epub 2013 Nov 20. French. PubMed PMID: 24331728.
- 3: Elakoum R, Gauchotte G, Oussalah A, Wissler MP, Clément-Duchêne C, Vignaud JM, Guéant JL, Namour F. CARM1 and PRMT1 are dysregulated in lung cancer without hierarchical features. *Biochimie*. 2014 Feb;97:210-8. doi: 10.1016/j.biochi.2013.10.021. Epub 2013 Nov 6. PubMed PMID: 24211191.
- 4: Gauchotte G, Marie B, Gallet P, Nguyen DT, Grandhay M, Jankowski R, Vignaud JM. Respiratory epithelial adenomatoid hamartoma: a poorly recognized entity with mast cell recruitment and frequently associated with nasal polyposis. *Am J Surg Pathol*. 2013 Nov;37(11):1678-85. doi: 10.1097/PAS.0000000000000092. PubMed PMID: 24121171.
- 5: Trechot P, Jouzeau JY, Brouillard C, Scala-Bertola J, Petitpain N, Cuny JF, Gauchotte G, Schmutz JL, Barbaud A. Role of nicotinic acid and nicotinamide in nicorandil-induced ulcerations: from hypothesis to demonstration. *Int Wound J*. 2013 Sep 13. doi: 10.1111/iwj.12147. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 24028540.
- 6: Nguyen DT, Gauchotte G, Nguyen-Thi PL, Jankowski R. Does surgery of the olfactory clefts modify the sense of smell? *Am J Rhinol Allergy*. 2013 Jul-Aug;27(4):317-21. doi: 10.2500/ajra.2013.27.3907. PubMed PMID: 23883814.
- 7: Gauchotte G, Ameisen D, Boutonnat J, Battistella M, Copie C, Garcia S, Rigau V, Galateau-Sallé F, Terris B, Vergier B, Wendum D, Bertheau P; autres universités du réseau; sous l'égide du Collège des pathologistes. [The inter-university learning website: a national

university network for online teaching of pathology]. *Ann Pathol*. 2013 Jun;33(3):162-8. doi: 10.1016/j.annpat.2013.04.004. Epub 2013 May 28. French. PubMed PMID: 23790654.

8: Bressenot A, Chevaux JB, Williet N, Oussalah A, Germain A, Gauchotte G, Wissler MP, Vignaud JM, Bresler L, Bigard MA, Plénat F, Guéant JL, Peyrin-Biroulet L. Submucosal plexitis as a predictor of postoperative surgical recurrence in Crohn's disease. *Inflamm Bowel Dis*. 2013 Jul;19(8):1654-61. doi: 10.1097/MIB.0b013e318281f336. PubMed PMID: 23751396.

9: Gauchotte G, Wissler MP, Casse JM, Pujo J, Minetti C, Gisquet H, Vigouroux C, Plénat F, Vignaud JM, Martrille L. FVIIIra, CD15, and tryptase performance in the diagnosis of skin stab wound vitality in forensic pathology. *Int J Legal Med*. 2013 Sep;127(5):957-65. doi: 10.1007/s00414-013-0880-1. Epub 2013 Jun 11. PubMed PMID: 23749256.

10: Gauchotte G, Lacomme S, Brochin L, Tournier B, Cahn V, Monhoven N, Piard F, Klein M, Martinet N, Rochette-Egly C, Vignaud JM. Retinoid acid receptor expression is helpful to distinguish between adenoma and well-differentiated carcinoma in the thyroid. *Virchows Arch*. 2013 Jun;462(6):619-32. doi:10.1007/s00428-013-1419-z. Epub 2013 May 4. PubMed PMID: 23639973.

11: Gauchotte G, Martrille L, Plénat F, Vignaud JM. [The markers of wound vitality in forensic pathology]. *Ann Pathol*. 2013 Apr;33(2):93-101. doi:10.1016/j.annpat.2013.02.006. Epub 2013 Mar 26. Review. French. PubMed PMID:23582835.

12: Ghemrawi R, Pooya S, Lorentz S, Gauchotte G, Arnold C, Gueant JL, Battaglia-Hsu SF. Decreased vitamin B12 availability induces ER stress through impaired SIRT1-deacetylation of HSF1. *Cell Death Dis*. 2013 Mar 21;4:e553. doi:10.1038/cddis.2013.69. PubMed PMID: 23519122; PubMed Central PMCID: PMC3615730.

13: Gauchotte G, Vignaud JM, Ménard O, Wissler MP, Martinet Y, Siat J, Paris C, Clément-Duchêne C. A combination of smears and cell block preparations provides high diagnostic accuracy for endobronchial ultrasound-guided transbronchial needle aspiration. *Virchows Arch*. 2012 Nov;461(5):505-12. doi: 10.1007/s00428-012-1296-x. Epub 2012 Aug 16. PubMed PMID: 22895864.

- 14: Bressenot A, Pooya S, Bossenmeyer-Pourie C, Gauchotte G, Germain A, Chevaux JB, Coste F, Vignaud JM, Guéant JL, Peyrin-Biroulet L. Methyl donor deficiency affects small-intestinal differentiation and barrier function in rats. *Br J Nutr*. 2012 Jul 16;116:1-11. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 22794784.
- 15: Gauchotte G, Vigouroux C, Rech F, Battaglia-Hsu SF, Soudant M, Pinelli C, Civit T, Taillandier L, Vignaud JM, Bressenot A. Expression of minichromosome maintenance MCM6 protein in meningiomas is strongly correlated with histologic grade and clinical outcome. *Am J Surg Pathol*. 2012 Feb;36(2):283-91. doi:10.1097/PAS.0b013e318235ee03. PubMed PMID: 22020044.
- 16: Gauchotte G, Wissler MP, Bressenot A, Clément-Duchêne C, Marie B, Ménard O, Vignaud JM. [Diagnostic accuracy of endobronchial ultrasound-guided transbronchial needle aspiration in mediastinal lymph nodes]. *Ann Pathol*. 2011 Jun;31(3):142-51. doi:10.1016/j.annpat.2011.02.007. Epub 2011 May 18. French. PubMed PMID: 21736993.
- 17: Gauchotte G, Philippe C, Lacomme S, Léotard B, Wissler MP, Allou L, Toussaint B, Klein M, Vignaud JM, Bressenot A. BRAF, p53 and SOX2 in anaplastic thyroid carcinoma: evidence for multistep carcinogenesis. *Pathology*. 2011 Aug;43(5):447-52. doi:10.1097/PAT.0b013e3283486178. PubMed PMID: 21716161.
- 18: Gauchotte G, Coffinet L, Schmitt E, Bressenot A, Hennequin V, Champigneulle J, Vignaud JM. Salivary gland anlage tumor: a clinicopathological study of two cases. *Fetal Pediatr Pathol*. 2011;30(2):116-23. doi:10.3109/15513815.2010.524690. PubMed PMID: 21391752.
- 19: Gauchotte G, Gauchotte E, Bressenot A, Verhaeghe JL, Guillemin F, Leroux A, Genin P. [Metaplastic carcinomas of the breast: a morphological and immunohistochemical study]. *Ann Pathol*. 2011 Feb;31(1):18-27. doi:10.1016/j.annpat.2010.10.007. Epub 2011 Jan 26. French. PubMed PMID: 21349384.

- 20: Chetty R, Serra S, Gauchotte G, Märkl B, Agaimy A. Sclerosing nodular lesions of the gastrointestinal tract containing large numbers of IgG4 plasma cells. *Pathology*. 2011 Jan;43(1):31-5. doi: 10.1097/PAT.0b013e328340e450. PubMed PMID:21240062.
- 21: Gauchotte G, Bressenot A. Colonic cryptosporidiosis in allograft patients: a rare differential diagnosis of acute graft-versus-host disease. *Hum Pathol*. 2010 Jun;41(6):918-9; author reply 919-20. doi: 10.1016/j.humpath.2010.01.017. PubMed PMID: 20466123.
- 22: Gauchotte G, Baylac F, Marie B, Vignaud JM. [Medullomyoblastoma: a medulloblastoma with rhabdomyoblastic differentiation]. *Ann Pathol*. 2010 Apr;30(2):135-8. doi: 10.1016/j.annpat.2010.02.002. Epub 2010 Apr 2. French. PubMed PMID: 20451073.
- 23: Moisei A, Gauchotte G, Sanou R, Dautel G, Vignaud J, Blum A. [Answer to december e-quid. Recurrent cartilaginous tumor of the finger: Nora's tumor]. *J Radiol*. 2010 Jan;91(1 Pt 1):82-7. French. PubMed PMID: 20212384.
- 24: Bressenot A, Delaunay C, Gauchotte G, Oliver A, Boudrant G, Montagne K. Composite renal cell carcinoma with clear cell renal cell carcinomatous and carcinoid tumoral elements: a first case report. *J Clin Pathol*. 2010 Feb;63(2):174-6. doi: 10.1136/jcp.2009.070292. PubMed PMID: 20154040.
- 25: Bressenot A, Zimmer O, Marchal S, Gauchotte G, Montagne K, Plénat F. [Detection of apoptosis in vivo: comparison of different methods in histological sections of subcutaneous xenografts of HT29 human colon adenocarcinoma]. *Ann Pathol*. 2009 Oct;29(5):370-5. doi: 10.1016/j.annpat.2009.06.001. Epub . French. PubMed PMID: 20004835.
- 26: Bressenot A, Marcon N, Feuillu B, Gauchotte G, Montagne K. [Primary leiomyosarcoma of the epididymis: a case report with review of the literature]. *Prog Urol*. 2009 Oct;19(9):643-7. doi: 10.1016/j.purol.2009.04.004. Epub 2009 May 17. Review. French. PubMed PMID: 19800557.
- 27: Gauchotte G, Bressenot A, Serradori T, Boissel P, Plénat F, Montagne K. Reactive nodular fibrous pseudotumor: a first report of gastric localization and clinicopathologic

review. *Gastroenterol Clin Biol*. 2009 Dec;33(12):1076-81. doi: 10.1016/j.gcb.2009.04.012. Epub . Review. PubMed PMID: 19762186.

28: Gauchotte E, Gauchotte G, Marie B, Pruna L, Koebele A. [An isolated vasculitis of uterine cervix and isthmus]. *J Gynecol Obstet Biol Reprod (Paris)*. 2009 Oct;38(6):521-3. doi: 10.1016/j.jgyn.2009.04.005. Epub 2009 May 23. French. PubMed PMID: 19477079.

29: Gauchotte G, Marie B, Pinelli C, Foscolo S, Vignaud JM. [A pigmented tumour of medullary cone]. *Ann Pathol*. 2009 Apr;29(2):150-2. doi: 10.1016/j.annpat.2008.09.053. Epub 2009 Mar 13. French. PubMed PMID: 19364592.

30: Gauchotte G, Tissier S, Wassel J, Régent D. [MDCT in the lateral decubitus position with Valsalva maneuver in the evaluation of abdominal wall hernias]. *J Radiol*. 2008 Sep;89(9 Pt 1):1113-6. French. PubMed PMID: 18772793.

Annexe 3 : communications orales et affichées

Liste des communications en lien avec l'étude :

- Communications orales :

Gauchotte G, Vigouroux C, Rech F, Battaglia-Hsu SF, Soudant M, Pinelli C, Civit T, Taillandier L, Vignaud JM, Bressenot A. L'expression de MCM6 dans les méningiomes est fortement corrélée au grade histologique et à l'évolution clinique. Journée Claude Huriet de la recherche biomédicale 2012. Prix Bernard Fortier (recherche clinique).

Gauchotte G, Vigouroux C, Rech F, Battaglia-Hsu SF, Soudant M, Pinelli C, Civit T, Taillandier L, Vignaud JM et Bressenot A. L'expression de MCM6 dans les méningiomes est fortement corrélée au grade histologique et à l'évolution clinique. Journée de la Société Française de Neuropathologie 7 décembre 2012.

Gauchotte G, Lorentz S, Vigouroux C, Brochin L, Rech F, Guéant JL, Vignaud JM, Battaglia-Hsu SF. Valeur pronostique de la surexpression de HuR dans les méningiomes et effets sur la prolifération cellulaire et la résistance à l'hypoxie. Journée de la Société Française de Neuropathologie 6 décembre 2013.

- Communications affichées :

Gauchotte G, Vigouroux C, Rech F, Battaglia-Hsu SF, Soudant M, Pinelli C, Civit T, Taillandier L, Vignaud JM and Bressenot A. Expression of mini-chromosome maintenance MCM6 protein in meningiomas is strongly correlated with histological grade and clinical outcome. USCAP 2012.

Annexe 4 : publication “Expression of minichromosome maintenance MCM6 protein in meningiomas is strongly correlated with histologic grade and clinical outcome”

Gauchotte G, Vigouroux C, Rech F, Battaglia-Hsu SF, Soudant M, Pinelli C, Civit T, Taillandier L, Vignaud JM, Bressenot A. Expression of minichromosome maintenance MCM6 protein in meningiomas is strongly correlated with histologic grade and clinical outcome. *Am J Surg Pathol*. 2012 Feb;36(2):283-91. doi: 10.1097/PAS.0b013e318235ee03.

Abstract: The 2007 World Health Organization histologic grading of meningiomas is associated with recurrence and clinical outcome. However, distinction of grade I from grade II (atypical) meningiomas can be challenging. In the World Health Organization classification, there are 4 parameters on the basis of which grade II status can be determined: mitotic rate, cytoarchitectural features, brain invasion, and/or histologic subtype. Furthermore, this classification fails to detect grade I recurrent meningiomas, for which other prognostic criteria would be needed. The aim of this study was to evaluate the respective value of several markers involved in cell cycle as effective tools to predict recurrence. This retrospective study was based on a series of 59 meningiomas (grade I: 32 of 59, grade II: 27 of 59, all harboring ≥ 4 mitoses/1.6 mm), analyzed with the following immunohistochemical markers: MCM6, Ki-67, PHH3, cyclin D1, and p53. We found a significant correlation between histologic grade and mean labeling index for MCM6 (grade I: 21.8% vs. grade II: 65.8%; $P < 0.001$), Ki-67 (3.2% vs. 16.9%; $P < 0.001$), PHH3 (0.7% vs. 2.8%; $P < 0.001$), cyclin D1 (50.4% vs. 70.0%; $P = 0.005$), and p53 (17.3% vs. 32.4%; $P = 0.017$). Histologic grading and mitotic index were correlated with progression-free survival ($P = 0.010$ and $P = 0.020$, respectively). A nearly linear correlation was found between progression-free survival and staining for MCM6 ($P < 0.001$), Ki-67 ($P = 0.003$), and PHH3 ($P = 0.037$) but not for cyclin D1 ($P = 0.400$) and p53 ($P = 0.758$). The interobserver agreement coefficients for MCM6, Ki-67, PHH3, cyclin D1, and p53 were, respectively, 0.97 (95% confidence interval, 0.95-0.98), 0.93 (0.89-0.96), 0.81 (0.70-0.88), 0.90 (0.83-0.94), and 0.84 (0.73-0.90). In conclusion, because of its strong level of expression and sharp difference in labeling index between indolent and recurrent tumors, MCM6 is the most efficient marker to identify tumors with a high risk of recurrence.

Financement du projet (appel d'offres)

Ce travail a été réalisé grâce aux soutiens suivants :

- Groupement Interrégional de Recherche Clinique et d'Innovation Est (GIRCI-Est)
 - Appel à projet *Jeunes Chercheurs* 2012
 - Nom du projet : « Rôle pronostique et mécanismes de dérégulation de HuR dans les tumeurs cérébrales »
 - Investigateur principal : Dr Guillaume GAUCHOTTE
 - Promoteur : CHU de NANCY
 - Budget : 25.000 €

- Région Lorraine
 - Programme spécifique Cancer 2012
 - Nom du projet : « Dérégulation de HuR dans les tumeurs cérébrales »
 - Responsable : Pr Jean-Louis GUEANT
 - Laboratoire : INSERM U954 Nutrition-Génétique et exposition aux risques environnementaux
 - Budget : 15.000 €

RESUME :

Introduction et objectifs : Les méningiomes sont des tumeurs intracrâniennes pour la plupart de bas grade. Les récurrences sont cependant fréquentes. A ce jour, il n'y a que peu de marqueurs pronostiques évalués dans ces tumeurs. La première partie de cette étude a pour objectif d'évaluer la valeur pronostique de marqueurs de prolifération et du cycle cellulaire dans une série de 60 méningiomes. HuR (ELAV-like 1) est une protéine pro-oncogène pouvant stimuler la prolifération et la survie cellulaire. Dans la seconde partie de cette étude, nous analysons l'expression de HuR dans les méningiomes et les effets de l'inhibition de HuR sur la prolifération, l'apoptose et la résistance à l'hypoxie.

Résultats : Il existe une corrélation significative entre le grade histologique et l'expression nucléaire de MCM6 ($p < 0,001$), Ki-67 ($p < 0,001$), PHH3 ($p < 0,001$), la cycline D1 ($p = 0,005$) et p53 ($p = 0,017$). Le grade histologique et l'indice mitotique sont corrélés avec la survie sans progression ($p = 0,010$ and $p = 0,020$). Les coefficients de corrélation inter-observateur pour MCM6, Ki-67, PHH3, cycline D1 et p53 sont respectivement de 0,97 (IC 95% : 0,95-0,98), 0,93 (0,89-0,96), 0,81 (0,70-0,88), 0,90 (0,83-0,94) et 0,84 (0,73-0,90). Nous retrouvons une surexpression cytoplasmique de HuR dans les méningiomes atypiques (grades I vs II : $p = 0,0007$), et une corrélation inverse entre le score cytoplasmique et la survie sans récurrence ($p = 0,028$). L'expression cytoplasmique de HuR est corrélée positivement avec l'indice mitotique ($p = 0,0001$), Ki-67 ($p = 0,0007$) et MCM6 ($p = 0,0009$). *In vitro*, l'inhibition de HuR (siRNA) entraîne une diminution de la croissance cellulaire ($p = 0,0004$) et de la prolifération (Ki-67, $p = 0,0004$), et une augmentation de l'apoptose (caspase 3 clivée, $p = 0,002$), ces différents effets étant significativement augmentés en hypoxie. L'inhibition de HuR entraîne également une diminution de SIRT1 en normoxie ($p = 0,01$) et en hypoxie ($p = 0,0006$). Enfin, l'inhibition de HuR entraîne une diminution de HIF-1 α en normoxie ($p = 0,038$), et, au contraire, une augmentation de HIF-1 α en hypoxie ($p = 0,024$).

Conclusion : En raison de son haut niveau d'expression et d'une nette différence de marquage entre les tumeurs non récidivantes et les tumeurs récidivantes, MCM6 apparaît comme le marqueur le plus efficace pour identifier les méningiomes à haut risque de récurrence. HuR est un marqueur de mauvais pronostic, dont l'inhibition permet de diminuer la prolifération cellulaire et d'augmenter l'apoptose. HuR pourrait être une cible thérapeutique potentielle dans les méningiomes non contrôlés par la chirurgie.

MOTS CLES : méningiome, prolifération, MCM6, Ki-67, HuR, hypoxie.

SUMMARY:

Introduction and aims: Meningiomas are in most of cases low grade intracranial tumors. However, relapses are frequent. To date, only few prognostic markers are described in the literature. The aim of the first part of this study is to evaluate the prognostic value of proliferation and cell cycle markers, in a series of 60 meningiomas. HuR (ELAV-like 1) is a pro-oncogenic protein which can stimulate cell proliferation and survival. In the second part of this study, we analyze HuR expression in meningiomas, and the effects of HuR inhibition on proliferation, apoptosis and resistance to hypoxia.

Results: A significant correlation is found between histological grade and mean labeling index for MCM6 ($p < 0.001$), Ki-67 ($p < 0.001$), PHH3 ($p < 0.001$), cyclin D1 ($p = 0.005$), and p53 ($p = 0.017$). Histologic grading and mitotic index is correlated with progression-free survival ($p = 0.010$ and $p = 0.020$, respectively). The interobserver agreement coefficients for MCM6, Ki-67, PHH3, cyclin D1, and p53 are, respectively, 0.97 (95% confidence interval, 0.95-0.98), 0.93 (0.89-0.96), 0.81 (0.70-0.88), 0.90 (0.83-0.94), and 0.84 (0.73-0.90). A significant HuR cytoplasmic overexpression is present in atypical meningiomas (grades I vs II: $p = 0.0007$), and there is an inverse correlation between cytoplasmic score and relapse free survival ($p = 0.028$). Cytoplasmic staining for HuR is positively correlated with mitotic index ($p = 0.0001$), Ki-67 ($p = 0.0007$) and MCM6 ($p = 0.0009$). *In vitro*, HuR inhibition (siRNA) results in decrease of cell growth ($p = 0.0004$) and proliferation (Ki-67, $p = 0.0004$), and increase of apoptosis (cleaved caspase 3, $p = 0.002$). These effects are significantly increased under hypoxic conditions. HuR inhibition also decreases SIRT1 expression, under normoxia ($p = 0.01$) and hypoxia ($p = 0.0006$). Finally, HuR inhibition decreases HIF-1 α under normoxia ($p = 0.038$), but increases HIF-1 α under hypoxia ($p = 0.024$).

Conclusion: Because of its strong level of expression and sharp difference in labeling index between indolent and recurrent tumors, MCM6 is the most efficient marker to identify tumors with a high risk of recurrence. HuR is a poor prognosis marker. Its inhibition decreases cell proliferation and increases apoptosis. HuR could be a potential therapeutic target in meningiomas which are not controlled by surgery.

KEYWORDS: meningioma, proliferation, MCM6, Ki-67, HuR, hypoxia.