

Université de Montréal

**La régulation des micro-ARNs
dans les cancers de la langue mobile**

par
Ilyes Berania, M.D.

Faculté de médecine

Mémoire présenté à la Faculté des Études Supérieures
en vue de l'obtention du grade de M. Sc.
en Sciences Biomédicales

Août, 2018

© Ilyes Berania MD, 2018

Université de Montréal

Faculté des études supérieures et postdoctorales

Ce mémoire intitulé :

**La régulation des micro-ARNs
dans les cancers de la langue mobile**

Présenté par :

Ilyes Berania M.D.

a été évalué par un jury composé de personnes suivantes:

Olivier Abboud MD, F.R.C.S.C, *président-rapporteur*

Apostolos Christopoulos MD, MSc, F.R.C.S.C., *co-directeur de recherche*

Philip Wong MD, MSc, F.R.C.S.C, *co-directeur de recherche*

Monika Knapik, MD, MSc, F.R.C.S.C, *membre du jury*

I. RÉSUMÉ EN FRANÇAIS

L'objectif de ce projet vise à déterminer la valeur pronostique et les voies de signalisation oncogéniques associées à l'expression des micro-ARNs dans le carcinome épidermoïde de la langue mobile. De plus, nous évaluerons l'interaction entre les micro-ARNs identifiés et leurs gènes cibles potentiels. Nous avons réalisé un dépistage de micro-ARNs auprès de notre cohorte institutionnelle (n= 58 patients). Nous avons identifié cinq micro-ARNs à valeur pronostique, dont quatre se retrouvent co-exprimés (miR-18a, miR-92a, miR-103, et miR-205). L'analyse multivariée démontre que l'expression du miR-548b ($p = 0.007$) et du miR-18a ($p = 0.004$, représentatif des 4 micro-ARNs co-exprimés) sont des marqueurs pronostic indépendants du carcinome épidermoïde de la langue mobile. Ces trouvailles ont également été validées dans la cohorte TCGA (The Cancer Genome Atlas) (n=131) pour les 2 micro-ARNs (miR-548b; $p = 0.027$, et miR-18a: $p = 0.001$). L'analyse bio-informatique a permis d'identifier les gènes PTEN et ACTN4 comme cibles régulées directement par les 4 micro-ARNs co-exprimés ainsi que le miR-548b, respectivement. De plus, nous observons des corrélations significatives entre les 5 micro-ARNs identifiés et leur gènes cibles respectifs. Ces dernières ont été validées auprès des deux cohortes à l'étude (miR-18a/PTEN: $p < 0.0001$; miR-92a/PTEN: $p = 0.0008$; miR-103/PTEN: $p = 0.008$; miR-203/PTEN: $p = 0.019$; miR-548b/ACTN4: $p = 0.009$).

Mots clés

Langue, carcinome épidermoïde, micro-ARN, PTEN, ACTN4, PI3K.

II. RÉSUMÉ ANGLAIS

The purpose of this study was to determine the prognostic value and oncogenic pathways associated to miRNA expression in squamous cell carcinoma of the oral tongue and to link these miRNA candidates with potential gene targets. We performed a miRNA screening within our institutional cohort (n = 58 patients) and reported five prognostic targets including a cluster of four co-expressed miRNAs (miR-18a, miR-92a, miR-103, and miR-205). Multivariate analysis showed that expression of miR-548b (p = 0.007) and miR-18a (p = 0.004, representative of co-expressed miRNAs) are independent prognostic markers for squamous cell carcinoma of the oral tongue. These findings were validated in The Cancer Genome Atlas (TCGA) cohort (n=131) for both miRNAs (miR-548b: p = 0.027; miR-18a: p = 0.001). Bioinformatics analysis identified PTEN and ACTN4 as direct targets of the four co-expressed miRNAs and miR-548b, respectively. Correlations between the five identified miRNAs and their respective targeted genes were validated in the two merged cohorts and were concordantly significant (miR-18a/PTEN: p < 0.0001; miR-92a/PTEN: p = 0.0008; miR-103/PTEN: p = 0.008; miR-203/PTEN: p = 0.019; miR-548b/ACTN4: p = 0.009).

Key words: oral tongue, squamous cell carcinoma, micro-RNA, PTEN, ACTN4, PI3K.

III. LISTE DES SIGLES ET DES ABRÉVIATIONS

Anglais:

AUC: area under the curve;

CI: confidence intervals;

FFPE: formalin-fixed paraffin-embedded;

HNSCC: head and neck squamous cell carcinoma;

HPV: human papilloma virus;

OCC: oral cavity carcinoma;

SCCOT: squamous cell carcinoma of the oral tongue;

TCGA: the cancer genome atlas.

Français:

CECO: carcinome épidermoïde de la cavité orale

ARNm: ARN messenger

miR: micro-ARN

IV. TABLE DES MATIÈRES

I. Résumé français	i
II. Résumé anglais	ii
III. Liste des sigles et abréviations	iii
IV. Table des matières	iv
V. Dédicace	vi
VI. Contribution des coauteurs	vii
VII. Introduction	1
VIII. Objectifs	3
IX. Recension des écrits	
IX.I Revue des cancers de la cavité orale	
IX.Ia. Épidémiologie des cancers de la cavité orale	4
IX.Ib. Anatomie de la cavité orale	6
IX.Ic. Histologie de la cavité orale	8
IX.II Carcinogénèse des cancers de la cavité orale	
IX.IIa. Changements génétiques et épigénétiques des cancers de la cavité orale	10
IX.IIb. Méthylation d'ADN	11
IX.IIc. Les modifications des histones	12
IX.III – Le rôle des micro-ARNs dans les CECO	
IX.III a. Le silençage post-transcriptionnel d'ARN	13
IX.III b. Formation et fonction des micro-ARNs	13
IX.III c. Le rôle des micro-ARNs dans les cancers	14

XI. Article	17
XII. Discussion	64
XIII. Conclusion	69
XIV. Références	70

V. DÉDICACE

Je dédie ces travaux à mes parents et mes professeurs qui ont été une grande source de support et d'inspiration, m'ayant permis de réaliser ce projet.

VI. CONTRIBUTION DES COAUTEURS

Ilyes Berania, médecin résident en ORL au CHUM

Contribution à la planification des expériences au laboratoire, aux manipulations et à l'extraction des données, aux analyses des résultats, et à la rédaction de l'article.

Guillaume B. Cardin, Assistant de recherché au CRCHUM

Contribution à la planification des expériences au laboratoire, aux manipulations et à l'extraction des données, aux analyses des résultats, et à la rédaction de l'article.

Isabelle Clement, Assistant de recherche au CRCHUM

Contribution aux manipulations et à l'extraction des données.

Louis Guertin, Chirurgien ORL au CHUM

Contribution à la révision de l'article.

Tareck Ayad, Chirurgien ORL au CHUM

Contribution à la révision de l'article.

Eric Bissada, Chirurgien ORL au CHUM

Contribution à la révision de l'article.

Phuc Felix Nguyen-Tan, Radio-oncologue au CHUM

Contribution à la révision de l'article.

Edith Filion, Radio-oncologue au CHUM

Contribution à la révision de l'article.

Julie Guilmette, médecin résidente en pathologiste au CHUM

Contribution à l'évaluation des échantillons tumoraux, et à la révision de l'article.

Olguta Gologan, Pathologiste au CHUM

Contribution à l'évaluation des échantillons tumoraux, et à la révision de l'article.

Denis Soulieres, Hémato-oncologue au CHUM

Contribution à la révision de l'article.

Francis Rodier, Chercheur au CRCHUM

Contribution à la planification des expériences, aux analyses des résultats et à la révision de l'article.

Philip Wong, Radio-oncologue au CHUM et co-directeur

Supervision du projet, encadrement de l'étudiant, planification des expériences, analyses des résultats, révision et correction de l'article.

Apostolos Christopoulos, Chirurgien ORL au CHUM et co-directeur

Supervision du projet, encadrement de l'étudiant, planification des expériences, analyses des résultats, révision et correction de l'article.

VII. INTRODUCTION

Malgré les avancées thérapeutiques en oncologie, les cancers de la cavité orale demeurent avec un pronostic défavorable ¹. Les cancers de la cavité orale possèdent un haut potentiel d'envahissement des structures avoisinantes, en raison de leur localisation et relation intime avec les structures nerveuses, vasculaires et lymphatiques, ². Cet envahissement local est également associé à un risque important de métastases ganglionnaires et de métastases à distance ³. Par ailleurs, en plus de leurs caractéristiques biologiques agressives, ces cancers peuvent altérer de manière importante plusieurs fonctions essentielles, telles que l'élocution, la mastication, la déglutition et la respiration ⁴.

Au cours des dernières décennies, on rapporte en cancérologie tête et cou une hausse inquiétante de cancers de la cavité orale auprès d'une jeune population de patients sans facteurs de risques identifiables ⁵. Cette population se distingue du groupe de patients présentant typiquement des antécédents de tabagisme et d'abus d'alcool. Par ailleurs, on note une augmentation marquée de cancers de l'oropharynx liés à une infection au virus du papillome humain (VPH), chez une jeune population de patients. Toutefois, cette association au VPH n'a pu être établie pour les cancers de la cavité orale ⁶. Ces jeunes patients avec cancers de la cavité orale, démontrent ainsi des caractéristiques épidémiologiques distinctes, suggérant des mécanismes carcinogènes différents. Ces constatations supportent un besoin croissant d'approfondir notre compréhension en biologie moléculaire pour les cancers de la cavité orale, dans l'objectif de développer des traitements

personnalisés aux individus. Des traitements ciblés pourraient ainsi améliorer le pronostic et la survie de ces patients atteints de cancers avec une biologie cellulaire agressive.

Dans notre étude, il a été possible de confirmer le rôle pronostic des micro-ARNs en tant que biomarqueurs impliqués dans la régulation des cancers de la langue mobile. Les 5 micro-ARNs identifiés ont également permis de prédire la survie globale de patients. Il a été ensuite possible d'identifier deux gènes (PTEN et ACTN4) ciblés par les micro-ARNs, et d'établir une association avec la voie de signalisation commune PI3K/Akt. Nos résultats supportent ainsi l'existence d'une régulation épigénétiques importantes associées au développement du cancer de la cavité orale pouvant servir de cibles thérapeutiques novatrices.

VIII. OBJECTIFS

L'objectif de cette étude est d'identifier les micro-ARNs spécifiquement exprimés dans les carcinomes épidermoïdes de la langue mobile et d'évaluer leur rôle pronostic. De plus, nous évaluerons les voies de signalisation oncogéniques majeures associées aux micro-ARNs identifiés.

IX. RECENSION DES ÉCRITS

IX.I Revue des cancers de la cavité orale

IX.Ia. Épidémiologie des cancers de la cavité orale

La cavité orale se définit comme l'entrée de tractus aérodigestif supérieur. Celle-ci débute aux lèvres et se termine au niveau de la surface antérieure des piliers amygdaliens ⁷. La cavité orale est tapissée d'un épithélium stratifié ⁸, constituant une interface de contact continuellement exposée à diverses particules exogènes, dont certaines comportent des caractéristiques carcinogènes. Les cancers primaires de la cavité orale peuvent avoir pour origine la surface épithéliale, la sous-muqueuse, les tissus mous ou les glandes salivaires mineures, alors que les lésions odontogènes constituent une entité clinique distincte. Parmi les divers sous-types histologiques de tumeurs observées dans la cavité orale, les carcinomes épidermoïdes constituent près de 90% des tumeurs malignes ⁹.

À l'échelle mondiale, les cancers de la tête et du cou se situent au 6^{ème} rang parmi les cancers ayant le plus haut taux de mortalité ¹⁰. Le Sud de l'Asie demeure la région ayant la plus grande incidence de cancers tête de cou. Cette incidence augmentée résulte entre autres d'un usage plus important de produits de tabacs ou dérivés, dont la noix de Bétel ¹¹.

Avec une hausse récente des carcinomes épidermoïdes de la cavité orale (CECO) chez une jeune population sans facteurs de risque, plusieurs études se sont penchées sur l'importance des caractéristiques démographiques dans le développement tumoral ¹². À ce jour, il n'existe aucun consensus clair concernant le rôle pronostic de l'âge initial au diagnostic de cancers de la cavité orale ¹³. Toutefois, plusieurs études dans la littérature soulèvent l'importance d'une catégorisation en fonction de l'âge, permettant de comparer les issues oncologiques des jeunes patients à celles des patients âgés ¹⁴. On note toutefois une grande hétérogénéité dans la définition permettant de subdiviser ces deux populations, ce qui entraîne une difficulté de comparaison entre les études ¹⁵⁻¹⁶.

La contribution du sexe dans le développement des cancers de la cavité orale demeure incertaine. Malgré que plusieurs études ont soulevé une hausse importante des CECO chez les jeunes femmes au courant des dernières décennies ¹⁷, cette constatation demeure variable entre les études. On note également qu'il existe une variabilité à l'égard du pronostic rapporté chez les jeunes patients avec CECO. Tandis que certaines études suggèrent une augmentation du risque de récurrences, de métastases et de mortalité ¹⁸⁻¹⁹, d'autres études suggèrent plutôt une survie améliorée ²⁰. Dans une étude de Myers et collaborateur ²¹, les auteurs ont effectué une analyse par séquençage complet de l'exome afin de comparer les échantillons tumoraux des jeunes patients et des patients âgés. Ces derniers ont noté un profil génomique similaire entre les groupes. Ces trouvailles suscitent ainsi un intérêt croissant de compréhension des

processus génétiques et épigénétiques impliqués dans les CECO, pour une pathologie qui demeure hétérogène.

IX.Ib. Anatomie de la cavité orale

La cavité orale est subdivisée en sept sous-sites distincts. On y compte la langue mobile, le plancher buccal, la muqueuse jugale, les gencives, le trigone rétro-molaire, le palais dur et les lèvres ⁷. Cette région anatomique permet de multiples fonctions essentielles, tels que la mastication, la gustation, la déglutition, l'élocution et la respiration ²². Une atteinte de l'intégrité de cette région, en l'occurrence par un envahissement tumoral, occasionne ainsi une importante altération fonctionnelle auprès des patients, et un handicap affectant significativement leur qualité de vie ²³. La langue mobile représente la région la plus fréquemment atteinte par les cancers de la cavité orale. Près de 60% de ces tumeurs se retrouvent au niveau des deux tiers antérieurs de langue, majoritairement au niveau du bord latéral ou de la surface ventrale ²⁴.

La langue mobile comporte un arrangement tridimensionnel complexe comprenant une musculature intrinsèque et extrinsèque. L'intégrité de ces muscles permet à la langue de générer une force importante, et lui confère une mobilité multidirectionnelle. Parmi la musculature intrinsèque, on compte les muscles longitudinaux supérieurs et inférieurs, les muscles transverses et verticaux, ayant pour origine et insertion la langue elle-même. Ces derniers sont innervés

exclusivement par le nerf crânien hypoglosse (XII). Par ailleurs, les muscles extrinsèques de la langue, incluant le muscle génioglosse, hyoglosse, styloglosse, palatoglosse et glossopharyngé, présentent tous une origine osseuse. Ceux-ci sont innervés par le nerf hypoglosse (XII), à l'exception du muscle palatoglosse qui est innervé par le nerf vague (X) ²⁵.

Les études antérieures ont démontré une association significative entre le degré d'invasion tumorale et le pronostic des patients avec CECO ²⁶. Toutefois, l'évaluation histopathologique de l'invasion tumorale de la langue mobile demeure laborieuse à cause de la distribution et de l'arrangement hétérogène de fibres musculaires. Certains repères anatomiques clés sont alors utilisés dans l'évaluation pathologique et radiologique de la profondeur d'invasion tumorale. Parmi ceux-ci, on compte le septum fibro-adipeux paramédian, qui permet la séparation des muscles génioglosse (médial) et hypoglosse (latéral) ²⁷. Par ailleurs, on compte dorénavant la profondeur d'invasion (Depth of Invasion ; DOI) figurant parmi les critères d'évaluation de la taille (T) tumorale dans la cavité orale ²⁸.

La langue mobile est composée d'un riche réseau lymphatique, impliquant de multiples voies de drainage. Dans les cancers de la langue mobile, on retrouve des métastases cervicales fréquentes, estimées chez près de 30% des patients avec un examen clinique négatif ²⁹. Les réseaux lymphatiques de la langue mobile se définissent selon leur localisation anatomique. La zone I permet un drainage

antérieur et comprend les chaînes ganglionnaires sous-mentonnières et sous-maxillaires. Le réseau de drainage latéral comprend les chaînes lymphatiques jugulaires supérieures, moyennes et inférieures, qui représentent les zones II, III et IV, respectivement. De plus, on compte un réseau lymphatique médial qui implique les zones I et III, permettant un drainage lymphatique bilatéral². Dans les cancers de la langue mobile, on estime une atteinte ganglionnaires affectant majoritairement les zones I, II et III. On décrit également un taux non-négligeable de métastases de la zone IV (0-10%), observé principalement pour les tumeurs du bord antérieur de la langue mobile, et une atteinte moins fréquente de la zone V (postérolatérale) dans 0-2%³⁰.

IX.Ic. Histologie de la cavité orale

Le développement des cancers d'origine épithéliale été décrit comme un processus impliquant un continuum de changements histologiques. Ces modifications cellulaires débutent par des changements dysplasiques progressifs évoluant au développement de carcinome épidermoïde invasif³¹. Les carcinomes épidermoïdes se caractérisent également selon leur grade histologique et leur degré la différenciation cellulaire (grade I à IV). Les tumeurs pauvrement différenciées (grade IV) ont ainsi les caractéristiques biologiques les plus agressives, et le pronostic le plus défavorable³².

Les carcinomes épidermoïdes ont comme origine la surface épithéliale de la muqueuse de la cavité orale, et sont caractérisés par des îlots et cordons de cellules épidermoïdes invasives. Cette invasion cellulaire se définit par une extension de l'infiltration tumorale au-delà de la membrane basale et du tissu conjonctif sous-épithélial ³³. L'invasion tumorale se poursuit en profondeur jusqu'aux tissus sous-jacents incluant les tissus adipeux, la musculature et les structures osseuses, entraînant une destruction locale progressive. L'évolution des cellules tumorales engendre également une réponse inflammatoire et une réaction immunitaire focale induisant des foyers de nécrose. Au niveau cellulaire, on note des changements éosinophiliques au niveau du cytoplasme, ainsi que des phénomènes d'hyperchromatisme et de pléomorphisme nucléaire. De plus, on retrouve fréquemment de débris épithéliaux caractéristiques contenant des amas et perles de kératine ³⁴.

IX.II Carcinogénèse des cancers de la cavité orale

IX.II.a. Changements génétiques et épigénétiques des cancers de la cavité orale

Le processus d'oncogénèse de la cavité orale comprend un ensemble de changements cellulaires complexes impliquant des facteurs endogènes et environnementaux. Suite à l'exposition de divers facteurs de risque, tel que le tabagisme, l'abus d'alcool et l'infection du virus du papillome humain (VPH), on note des modifications génétiques et épigénétiques cumulatives favorisant le développement et la progression tumorale ³⁵⁻³⁶.

Parmi les processus génomiques impliqués, on observe des changements irréversibles de la séquence d'ADN, engendrés par une série d'altérations, impliquant des phénomènes de délétions, d'amplifications et des mutations. Ces modifications génétiques induisent des changements favorisant l'activation d'oncogène et l'inactivation de gènes de suppresseur de tumeur ³⁷. Parmi les gènes impliqués dans le développement des carcinomes épidermoïdes la cavité orale, on compte fréquemment le gène codant pour le p53, présentant des mutations dans près de 60% des tumeurs ³⁸. On retrouve également des altérations du récepteur du facteur de croissance épithélial (EGFR), surexprimé dans près de 30% des cancers de la cavité orale ³⁹ (49), ainsi que des mutations des gènes p16^{INK4A} et cycline D ⁴⁰.

Par ailleurs, on retrouve les changements épigénétiques jouant un rôle important dans le processus de carcinogénèse de la cavité orale. Ces modifications se définissent comme toute altération de l'expression génétique acquise sans atteinte propre de la séquence d'ADN. Ces changements se produisent plus fréquemment que les mutations génétiques et influencent le processus de transcription sous diverses formes. Une altération de ces mécanismes cellulaires entraîne ainsi une expression génétique aberrante favorisant la progression tumorale. Parmi les mécanismes épigénétiques impliqués, on compte la méthylation d'ADN, les modifications d'histone, et le silençage d'ARN par processus post-transcriptionnel⁴¹.

IX.IIb. Méthylation d'ADN

La méthylation d'ADN représente la modification épigénétique la plus fréquemment observée et étudiée⁴². Ce processus implique les enzymes ADN méthyltransférases, et permet la méthylation des dinucléotides CpG localisés dans la région terminale 5' des gènes. Ces dinucléotides sont dispersés au niveau du génome, et localisés majoritairement au niveau de promoteurs des gènes suppresseurs de tumeurs. Lors d'un processus d'hyperméthylation, on assiste donc à une répression des gènes suppresseurs, favorisant la croissance cellulaire et la progression tumorale.⁴³⁻⁴⁴ Dans les cancers de la cavité orale, près de 40 gènes associés à une hyperméthylation ont été identifiés. Parmi ceux-ci, on

compte des gènes régulateurs du cycle cellulaire, de l'apoptose, de l'adhésion, de la signalisation cellulaire et de la réparation d'ADN ⁴⁵.

IX.IIc. Les modifications des histones

La chromatine constitue une structure dynamique impliquée dans plusieurs processus cellulaires. Les histones et les modificateurs de chromatines engendrent des changements architecturaux nécessaires à la fonction cellulaire. Les histones supportent la chromatine sous forme nucléosomes. Ces derniers peuvent subir plusieurs modifications impliquant des processus d'acétylation, de méthylation, de phosphorylation et d'ubiquitylation, induisant des changements de l'expression des gènes ⁴⁶. Plusieurs études suggèrent une implication du processus de dé-acétylation des histones dans le développement de tumeurs malignes ⁴⁷⁻⁴⁸. Ce mécanisme médié par l'histone de-acéthylase (HDAC) engendre une polarisation des histones, leur permettant d'interagir avec les brins d'ADN. Cette interaction structurale induit subséquemment une répression de la transcription, et un silençage des gènes. Chang et collaborateurs ⁴⁹ ont par ailleurs démontré une surexpression de l'HDAC dans les CECO. De plus, on note un rôle antinéoplasique prometteur par l'usage d'inhibiteurs de l'HDAC. Ces derniers ont démontré une réponse cellulaire favorable pour des lignées cellulaires de CECO

⁵⁰.

IX.III. Le rôle des micro-ARNs dans les CECO

IX.IIIa. Le silençage post-transcriptionnel d'ARN

Les micro-ARNs (miRs) constituent des petits brins d'ARN non-codants d'une longueur d'environ 22 nucléotides, permettant la régulation de l'expression génique via un processus épigénétique post-transcriptionnel ⁵¹. L'activité des miRs se manifeste par la répression et une dégradation d'ARNs messagers (ARNm) cibles. Les miRs interagissent directement avec les ARNm en s'appariant aux bases complémentaires au niveau de la région 3' UTR (3' untranslated region) ⁵².

À ce jour, plus de 400 miRs ont été identifiés. On estime toutefois que plus d'un millier seraient potentiellement impliqués dans la régulation du génome humain ⁵³. Malgré qu'il existe un nombre limité de miRs occasionnant un impact fonctionnel, on considère que ces derniers possèdent une haute capacité de réguler simultanément plusieurs gènes ⁵⁴.

IX.IIIb. Formation et fonction des micro-ARNs

La synthèse des micro-ARNs provient des régions non-codantes ou introns des gènes codeurs de protéines. La transcription primaire des miRs origine de promoteurs indépendants ou de promoteurs se situant dans la région proximale

du gène codant. Ce processus de transcription s'effectue à l'aide de la polymérase ARN II. On observe ensuite une interaction intranucléaire impliquant l'ARNase III Drosha et le complexe microprocesseur, permettant la formation d'un micro-ARN précurseur. Une fois synthétisés, les miRs précurseurs sont exportés au niveau du cytoplasme via l'Exportin-5. Ces micro-ARNs précurseurs sont alors transformés en micro-ARNs matures à doubles brins par la protéine Dicer (RNAase III)⁵⁵.

Les micro-ARNs matures sont ensuite incorporés dans un complexe multiprotéique (RNA-induced silencing complex), qui entraîne leur dégradation en un seul brin. Une fois ce processus complété, les miRs fonctionnels peuvent se lier de façon complémentaire aux ARNs situés au niveau du 5^{ème} et 7^{ème} nucléotide⁵⁶. Cette interaction est finalement suivie d'un processus de traduction, de dégradation ou de répression cellulaire.

IX.IIIc. Le rôle des micro-ARNs dans les cancers

L'expression génique est modulée par divers processus post-transcriptionnels impliquant l'interaction entre les ARNm et les miRs. Cette régulation a d'ailleurs été rapportée dans le développement de multiples cancers⁵⁷⁻⁵⁸.

Parmi les divers mécanismes oncogéniques impliqués par les miRs, on compte ;

- *Une diminution de miRs favorisant une dérégulation de protéines oncogènes*⁵⁹.

- *Une réduction d'expression de miRs agissant comme suppresseurs de tumeurs*⁶⁰.
- *Une hausse de miRs oncogènes, causant une répression de gènes suppresseurs de tumeurs*⁶¹.
- *La mutation de miRs par modifications de leurs précurseurs, causant une altération de leur activité fonctionnelle*⁶².
- *Une altération de mécanismes épigénétiques ciblés par les miRs, dont l'ADN méthyltransférase*⁶³.
- *Une instabilité génomique causée par l'altération de multiples miRs découlant d'une région commune du gène codant*⁵⁴.

On note un nombre croissant d'études centrées sur le rôle des micro-ARNs dans le développement des cancers de la cavité orale. Les algorithmes informatisés sont actuellement largement utilisés afin de prédire les micro-ARNs cibles, qui sont ensuite validés expérimentalement. Les études actuelles suggèrent que les miRs agissent principalement comme oncogènes ou suppresseurs de tumeur dans les CECO⁶⁴. De plus, parmi les différentes fonctions cellulaires des miRs rapportées dans les CECO, on note principalement des fonctions favorisant ; 1) la prolifération et l'apoptose⁶⁵⁻⁶⁶, 2) le processus métastatique⁶⁷⁻⁶⁸ et 3) la chimiorésistance⁶⁹⁻⁷⁰.

Parmi les multiples miRs répertoriés dans la littérature, une expression augmentée du miR-21 est fréquemment rapportée comme un facteur prédictif indépendant de survie chez les patients avec carcinomes épidermoïdes de la langue mobile⁷¹.

De manière similaire, une sous-expression combinée du miR-205 et let -7d a été démontrée comme un facteur prédicteur fiable de survie chez les patients avec cancers tête et cou ⁷².

De plus, le profil d'expression des micro-ARNs permet de distinguer les tissus tumoraux des tissus sains. L'analyse d'expression des micro-ARN a été proposée comme modalité novatrice de détection précoce des carcinomes épidermoïdes de la cavité orale ⁷³. Kimura et collaborateurs ont démontré que la surexpression combinée du mir-21 et du mir-205 peut servir de biomarqueur spécifique aux CECO ⁷⁴. De plus, il est décrit que l'expression de miRs peut servir comme outil potentiel de détection d'une atteinte ganglionnaire métastatique. Avec la surexpression fréquente du miR-205 dans les cancers tête et cou, Fletcher et al. sont parvenus à décrire une distinction entre les profils d'expressions de différents sous-sites de cancers primaires et leurs métastases ganglionnaires cervicales respectives ⁷⁵.

XI. ARTICLE

Four PTEN-targeting co-expressed miRNAs and ACTN4- targeting miR-548b are independent prognostic biomarkers in human squamous cell carcinoma of the oral tongue.

Publié dans; International Journal of Cancer

Ilyes Berania MD^{1,2}, Guillaume B. Cardin MSc¹, Isabelle Clément MSc¹, Louis Guertin MD², Tareck Ayad MD², Eric Bissada MD², Phuc Felix Nguyen-Tan MD³, Edith Fillion MD³, Julie Guilmette MD^{4,5}, Olguta Gologan MD⁴, Denis Soulieres MD⁶, Francis Rodier MD^{1,7}, Philip Wong MD, MSc^{1,3} and Apostolos Christopoulos MD, MSc^{1,2}

¹ CRCHUM and Institut du cancer de Montréal, Montreal, QC, Canada

² Otolaryngology-Head and Neck Surgery Service, Centre Hospitalier de l'Université de Montréal, Montreal, QC, Canada

³ Department of Radiation Oncology, Centre Hospitalier de l'Université de Montréal, Montreal, QC, Canada

⁴ Department of Pathology, Centre Hospitalier de l'Université de Montréal, Montréal, QC, Canada

⁵ Department of Pathology, Massachusetts General Hospital/Massachusetts Eye and Ear Infirmary, Boston, MA

⁶ Department of Medicine, Service of Hemato-Oncology, Centre Hospitalier de l'Université de Montréal, Montreal, QC, Canada

⁷ Département de radiologie, radio-oncologie et médecine nucléaire, Université de Montréal, Montreal, QC, Canada

WHAT'S NEW?

MicroRNAs (miRNAs) are increasingly recognized as key regulatory factors in cancer. This study examined their significance specifically in the context of squamous cell carcinoma of the oral tongue (SCCOT). Co-expression of four miRNAs was found to be inversely correlated with expression of the tumor suppressor PTEN, a downregulator of PI3K/Akt signaling, which is frequently altered in cancer. Increased expression of an additional miRNA, miR-548b, was inversely correlated with ACTN4, an Akt regulator. The miRNAs were further associated with SCCOT patient prognosis. The findings highlight potential prognostic and therapeutic avenues centering on miRNAs in oral tongue carcinoma.

INTRODUCTION

It is estimated that 30,260 individuals in the United States are diagnosed annually with oral cavity carcinoma.¹ The distinctive anatomy of the oral cavity, in close proximity to a dense lymphatic network and neurovascular structures, tends to cause rapid and aggressive local cancer invasion.² Squamous cell carcinoma is the most frequently observed histological subtype, reported in 90% of head and neck cancers, and affects most commonly the oral tongue.³ Despite improvements in multimodality management, oral cavity carcinoma (OCC) has persistently shown poor therapy response and unfavorable overall survival outcomes within the first 5

years of follow-up.⁴ The development of squamous cell carcinoma of the oral tongue (SCCOT) has been attributed to tobacco smoking and alcohol abuse,⁵ while past reports failed to consistently show a clear contributive role of human papilloma virus (HPV).⁶

Over the past decades, the overall incidence of SCCOT appears on a decreasing slope, due to a reduction of smoking habits.⁷ Meanwhile, a distinctive increase of oral tongue cancer has also been observed among younger patients, which do not present any typical risk factors.⁸ These changes in incidence observed over the past years support the heterogenic nature of oral tongue carcinoma and have been suggested to be driven through specific mutations and gene expression modulated by epidemiologically distinctive patient characteristics.⁹ Improved molecular understanding in gene expression patterns would thus play an important role in defining a better portrait of oral tongue carcinoma and to explore clinical correlations among various subgroups of patients.

Post-transcriptional cancer regulatory processing through miRNA has been attributed to play an important role in gene expression and cancer regulation.¹⁰ Advancement in microarray technologies has thus allowed improved characterization and screening of miRNAs and mRNAs expression within various tumor tissues.¹¹ Altered regulation of miRNAs through changes in functional activity induces variations in target protein expression.¹²

The PI3K/Akt/mTOR signaling is frequently altered across multiple cancers.¹³ Among the eight known PI3K kinase subclasses, the class I intracellular signaling has been acknowledge to play a role as an oncogenic driver in various cancers types, including solid tumors such as breast, pancreatic, and renal carcinoma.^{14–}
¹⁶ The PI3K protein can be activated by several tyrosine kinases, enabling phosphorylation and production of PIP3, which serves as a downstream second messenger through Akt signaling activation.¹⁷ The Akt pathway induces increased cell proliferation and survival. In addition, the mTOR kinase activity allowing protein synthesis and cell growth is also dependent from regulation of the PI3K/Akt signaling complex.¹⁸ Therefore, the PI3K/Akt/mTOR axis is described as a whole, and has been the center component of emerging therapeutic anticancer agents. In a past clinical trial, authors demonstrated that patients which showed initial response to PI3Ka inhibition therapy eventually became refractory to additional treatment, but noted promising good response in cell line work using a combined therapy targeting Axl or EGFR (epithelial growth factor receptor) inhibition.¹⁹ Also, a recent study reported favorable clinical outcomes for head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) using buparlisib, a specific oral-specific inhibitor of the pan-class I PI3K family.²⁰ Although dozens of miRNAs have been shown to regulate the PI3K/Akt/mTOR oncogenic signaling pathways,²¹ the interaction between miRNA regulation and these pathways specifically in SCCOT remains not fully understood.

Among several key protein targets in cancer regulation, the implication of the oncogenic receptor tyrosine kinase Axl protein has been of an increased interest in HNSCC.²² Axl expression has been attributed in the development and progression of many cancers, including OCC, while increased levels appear associated to poor clinical outcomes.¹⁹ Moreover, Axl is an inducer of the PI3K/Akt signaling pathway.²² Axl expression has shown to mediate resistance to anti-EGFR therapy (cetuximab), which is considered a major molecular target in HNSCC.²³

Past studies have assessed miRNA expression in HNSCC as a whole, although none has previously specifically evaluated SCCOT through the assessment of two large independent cohorts for an unbiased miRNA expression analysis. To improve our understanding of miRNA regulation in SCCOT population, the purpose of this study aimed to identify specific miRNA expression and to assess its potential prognostic value. In addition, we explored the main oncogenic pathways associated to the previously identified miRNAs. We hope that these novel prognostic tools and their relationship with gene expression will facilitate a better understanding of the disease on a molecular level and contribute to a potential emergence of individualized targeted therapy.

MATERIAL AND METHODS

Patients and specimens

A total of 58 patients were recruited at the “Centre Hospitalier de l’Université de Montreal” (CHUM) and have undergone surgical resection for primary SCCOT between 2010 and 2015. All patients provided informed consent to participate to our head and neck tumor biobank, member of the Canadian Tissue Repository Network. Patient information was prospectively collected through the “Système d’Archivage des Données en Oncologie” cancer registry. Clinical parameters, including patient demographics, past medical history, tobacco exposure, and alcohol, were recorded. In addition, oncological and pathological parameters, including TNM staging and nonsurgical therapy modalities details, were also obtained from medical records (Table 1).

Table 1.

Demographic and clinical parameters of the CHUM and TCGA SCCOT cohorts at time of surgery.

Characteristics	CHUM, no. (%)	TCGA, no. (%)	<i>p</i>
Patients	58 (100)	131 (100)	
Age (years)			0.84
≤ 50	16 (28)	34 (26)	
> 50	42 (72)	96 (73)	
Unknown	0 (0)	1 (1)	
Gender			0.33
Male	41 (71)	83 (63)	
Female	17 (29)	48 (37)	
Tobacco use history			0.19
Current/reformed smokers	42 (72)	80 (61)	
Never smokers	16 (28)	48 (37)	
Unknown	0 (0)	3 (2)	
Alcohol use history			<0.0001
Yes	24 (41)	44 (34)	
No	34 (59)	13 (10)	
Unknown	0 (0)	74 (56)	
HPV			0.21
Negative	45 (78)	24 (18)	
Positive	13 (22)	3 (2)	
Unknown	0 (0)	104 (79)	
Tumor size (cm)			<0.0001
≤ 4 (TNM pt ≤ 2)	45 (78)	36 (27)	
> 4 (TNM pt ≥ 3)	13 (22)	80 (61)	
Unknown	0 (0)	15 (11)	
Node status			0.0003
Negative	36 (62)	39 (30)	
Positive	20 (34)	72 (55)	
Unknown	2 (3)	20 (15)	
Living/deceased			0.28
Living	41 (71)	82 (63)	
Deceased	17 (29)	49 (37)	
Survival follow-up time (Years, median)	2.33	2.48	0.40

p values were assessed using Pearson's Chi-squared test for nominal variables. Median survival time was analyzed using Student's t-test.

The Cancer Genome Atlas (TCGA) is a publically available data repository in the form of large-scale genome sequencing database generated by the TCGA Research Network (<http://cancergenome.nih.gov/>).^{24,25} All 131 patients from the TCGA SCCOT were evaluated as an independent cohort from the CHUM cohort. HPV positivity was assessed by P16 immunofluorescence for the CHUM cohort and both by P16 immunochemistry and in situ hybridization for the TCGA cohort.

Paraffin-embedded formalin-fixed samples were processed by the CHUM pathology department. Tumor and normal tissue were reviewed by trained head and neck pathologists (J. Guilmette and O. Gologan). All experiments of this study were conducted without prior knowledge of the patient survival. This study was approved by our Institutional Ethics Review Committee.

RNA extraction

Identification of the tumor and healthy tissue was performed on a hematoxylin and eosin stain for all 58 patients. On a second slice of 10 μ M, nonspecific tissue was scrapped with a scalpel to conserve only the tumor or healthy section, which was transferred in a clean tube. RNA extraction was performed using RecoverAll Total Nucleic Acid Isolation Kit for FFPE (Thermo Fisher Scientific) according to the manufacturer's recommendations. RNA quantification was done using the 260 nm absorbance with a NanoDrop ND-1000 spectrophotometer.

MiRNA quantification

All 58 tumor samples and the 36 matched control tissues with the highest RNA yield were used for the miRNA quantification step. A range of 11.3–15.0 µg and 2.8–15.0 µg was used for tumor and healthy tissue, respectively, to perform reverse transcription using TaqMan MicroRNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific). The 8 µL reaction mix contained 1X Megaplex RT Primers Human Pool A v2.1 (Thermo Fisher Scientific), 1X RT buffer, 2.5 mM dNTPs, 75 µL MultiScribe RT enzyme, and 2 µL RNase inhibitor. Reverse transcription conditions included 40 cycles of 16°C for 2 min, 42°C for 1 min, and 50°C for 1 min. Reaction was terminated by a 5 min incubation at 85°C.

Preamplification was performed using a mix of 2 µL cDNA, 2.5 µL TaqMan PreAmp Master Mix 2X (Thermo Fisher Scientific) and 0.5 µL MegaPlex PreAmp Primers Human Pool A v2.1 (Thermo Fisher Scientific). Preamplification conditions included a 10 min period at 95°C, 2 min at 55°C, and 2 min at 72°C, followed by 14 cycles of 95°C for 15 sec, and 60°C for 4 min. Reaction was terminated by a 10 min incubation at 99.9°C.

Real-time PCR analysis was performed using four Fluidigm 96.96 integrated fluidic circuits on the Biomark HD system (Fluidigm). TaqMan Universal Master Mix II, no UNG (Thermo Fisher Scientific) was used according to the manufacturer's recommendations with 377 different miRNA TaqMan assays (Thermo Fisher Scientific, Supporting Information, Table S1). U6 and RNU48 were used as controls and were measured on the four integrated fluidic circuits.

Immunofluorescence

Formalin-fixed paraffin-embedded (FFPE) samples were collected from our institutional cohort. A tissue microarray including two punches of each tumor tissue was assembled, and immunofluorescence staining was performed as previously described.²⁶ Assessment of p16 status (presence or absence) (Santa Cruz Biotechnologies, JC8, 1/500 dilution), Axl (R&D Systems, AF154, 1/100 dilution), PTEN (Spring Bioscience, SP218, 1/50 dilution), and ACTN4 (Sigma- Aldrich, HPA001873, 1/70 dilution) were performed in combination to the analysis of cytokeratin H.M.W. (Cedarlane, 34 β E12, 1/500 dilution). The cytokeratin staining was used to determine the areas composed of epithelial cancer cells as previously described.²⁶ The mean detected fluorescence intensities of Axl, PTEN, and ACTN4 were measured using the VisiomorphDP platform. A mean value of the two tumor cores for each patient was used for the analysis.

Statistical analysis

Gene expression and protein data were normalized using *z* scores for statistical analysis. For cohort characteristics comparison, Pearson's Chi-squared test was used to compare nominal variables and *t* test for continuous numerical variables. Upregulation of miRNA in the tumor tissue was analyzed using a paired sample *t* test and Cohen's *d* effect size, pairing healthy and tumor tissues within the same patient. A likelihood ratio test was used to evaluate hazard ratios and to perform the multivariate prediction model. Kaplan–Meier curves were assessed using log-rank *p* values, hazard ratios, and confidence intervals (CI) of the high-level group.

Multivariate correlations between miRNAs expression were analyzed using Pearson correlation coefficient p and r values. A robust regression model using Huber M-estimation was used for evaluation of miRNA and target gene univariate correlations to prevent false positive due to aberrant outliers. Differences in miRNA expression between clinical groups were tested using the Wilcoxon signed-rank test.

Throughout the analyses, p values <0.05 were considered statistically significant. Statistical analysis was performed using JMP 12.0.1 statistical software (SAS Institute Inc.).

RESULTS

Descriptive data of the SCCOT CHUM and TCGA cohorts

Demographic and clinical parameters of patients in the CHUM and TCGA cohorts are available in Table 1. A positive alcohol status included patients with current or prior alcohol use in the CHUM cohort. Patients with documented consumption of ≥ 1 drink/day were considered positive in the TCGA cohort. Alcohol use history, tumor size, and node status differed significantly between the two cohorts. All other clinical parameters did not significantly vary between both groups. Importantly, follow-up time and overall survival were similar in the two cohorts. Unknown data were not taken into account for this analysis.

Selection of candidate prognostic miRNAs from a 375 miRNA screen

To select candidate prognostic miRNAs, we profiled the miRNA expression from the CHUM cohort instead of the TCGA data, as our group of patients had no missing data and all samples were collected from the same institution, thus reducing potential variations in sample collection. Also, our group of patients included a much greater number of paired healthy tissues than the TCGA cohort.

We predefined a strategy to identify candidate prognostic miRNAs that tested: (1) detectable levels in at least 80% of the samples for reliable statistical analysis; (2) ROC area under the curve (AUC) ≥ 0.65 according to patient alive/deceased status at 7 years or at the end of follow-up, as an initial screening tool; (3) upregulations in tumor tissue in comparison to paired healthy tissue to confirm specific tumor miRNA expression; and (4) statistically significant hazard ratios for both studied cohorts using two equally distributed $n = 29$ low and high expression groups, as a second unbiased screening tool of predictive value (Table 2).

A total of 375 miRNAs were screened within the CHUM cohort, including 58 tumor samples and 36 matched control tissues. The $2^{\Delta Ct}$ miRNA values were normalized according to the average of U6 and RNU48 ct values. Eighty-six miRNAs were detected in at least 80% of tumor samples in the CHUM cohort (Supporting Information, Table S2).

Eight miRNAs had ROC AUC ≥ 0.65 (miR-92a, miR-18a, miR-103, miR-205, miR-548b, miR-532, miR-20a, and miR-365; Supporting Information, Fig. S1). All eight miRNAs were upregulated in tumor tissue in comparison to their matched normal

tissues (Supporting Information, Fig. S2). Only miR-92a, miR-548b, miR-18a, miR-103, and miR-205 had significant unbiased hazard ratios and were therefore selected as potential prognostic miRNAs.

Table 2.

miRNAs targets showing AUC > 0.65 obtained from a 375 miRNA screening panel.

miRNAs	ROC curve (AUC)	Effect	Tumor upregulation (<i>p</i> value)	Tumor upregulation effect size (Cohen's <i>d</i>)	HR (95% CI)	Likelihood ratio (<i>p</i> value)
miR-92a	0.654	Deleterious	0.010	0.473	4.22 (1.49-15.04)	0.0058
miR-548b	0.651	Protective	0.002	0.627	0.30 (0.08-0.84)	0.021
miR-103	0.660	Deleterious	0.002	0.623	2.82 (1.04-8.93)	0.041
miR-18a	0.682	Deleterious	0.008	0.493	2.80 (1.04-8.82)	0.042
miR-205	0.672	Deleterious	0.025	0.395	2.73 (1.01-8.59)	0.048
miR-532	0.673	Deleterious	0.037	0.358	1.76 (0.66-5.20)	0.20
miR-20a	0.661	Deleterious	0.0002	0.798	1.87 (0.71-5.43)	0.21
miR-365	0.666	Deleterious	<0.0001	0.848	1.42 (0.54-3.90)	0.48

Tumor upregulation *p* values and Cohen's *d* values were calculated with the use of paired sample t-test. Hazard ratios and their *p* values were calculated with the use of likelihood ratio test.

Univariate analysis of the selected five potential prognostic miRNAs

Following the initial identification of candidate miRNAs, we assessed the prognostic significance of these targets within the CHUM and TCGA cohort. In addition, we also evaluated the reproducibility of our results in concordance to a previously known prognostic factor, Axl, which has been demonstrated to have a strong prognostic value. Increased Axl levels were associated with poor outcomes in SCCOT and head and neck carcinoma in two independent past studies ($p < 0.0001$, HR = 2.0 and $p = 0.007$, HR = 1.7).^{22,27}

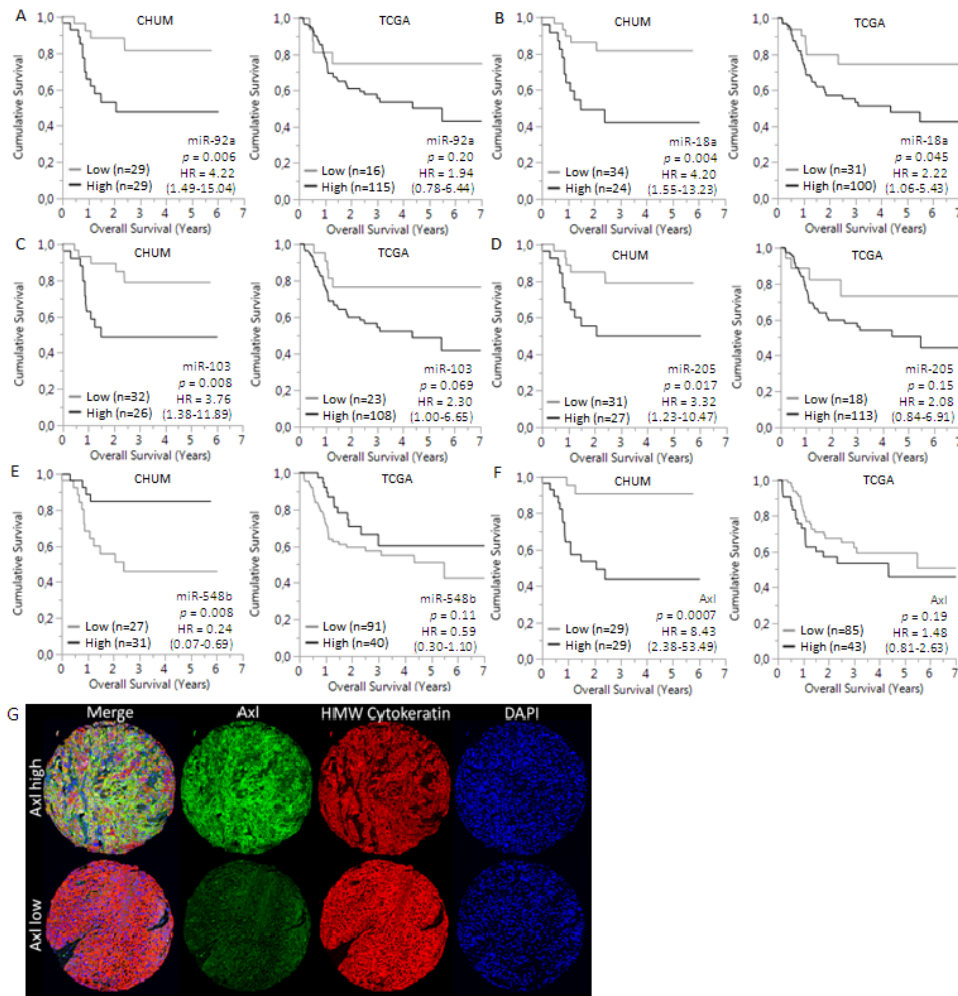
Association between expression of miR-92a, miR-548b, miR-18a, miR-103, and miR-205 and patient prognosis was tested in the CHUM and TCGA cohort (Figs. 1A-E). Patients were classified according to miRNA expression levels (high or low) using the threshold maximizing the prediction value on a ROC curve associated to patient alive-deceased status (sensitivity - (1 - specificity)). ROC curves and their respective cutoffs are shown on Supporting Information, Figure S1. A seven-year follow-up interval was used in both cohorts according to the longest recorded time assessment in the CHUM group.

Axl protein levels were measured using immunofluorescence in the CHUM cohort (Supporting Information, Table S3), in addition to expression level available in the TCGA cohort. These results were included in the multivariate likelihood ratio test. In addition, the prognostic value of AXL was evaluated in both cohorts (Fig. 1F). Representative Axl immunofluorescence stainings are shown in Figure 1G. Assessment of Axl expression level was included in our multivariate model to

determine the prognostic significance of the previously identified miRNAs in association to the known prognostic value of Axl expression.

Significant expression differences were observed for the five miRNAs and Axl in the CHUM cohort, while only for miR-18a in the TCGA cohort with nonsignificant trends observed for the other candidates. We hypothesized that a multivariate analysis including clinical parameters would thus help confirm the prognostic value of the five identified miRNAs and Axl in the TCGA cohort.

Figure 1.



Five miRNAs and Axl protein/RNA expression levels are prognostic for patient survival in SCCOT patients. Comparison of patient survival for all SCCOT patients of the CHUM and TCGA cohorts using the Kaplan-Meier curve estimation and log-rank test univariate survival analysis for tumor high (black) and low (gray) levels of (a) miR-92a, (b) miR-18a, (c) miR-103, (d) miR-205, (e) miR-548b, and (f) Axl. Representative high and low Axl immunofluorescence stainings (g). The three patients from the TCGA cohort with no Axl expression data were removed from the analysis (f). Protein levels were used for Axl assessment in the CHUM cohort. Other analysis used miRNA and mRNA levels. *P* values were calculated using the log-rank test.

Four miRNAs are co-expressed and inversely correlated with PTEN, while miR-548b is independently expressed and inversely correlated with ACTN4

To conduct a multivariate analysis, we assessed any potential redundancy results of our five candidate miRNAs, using a correlation analysis. Our findings demonstrated that miR-92a, miR-103, miR-18a, and miR-205 are strongly correlated together, in both cohorts (Table 3). These findings appear to suggest an underlying co-expression process, for which the miRNAs prognostic value may be redundant. Multivariate analysis revealed strong correlations ($p < 0.0001$; r ranging from 0.35 to 0.91) between miR-92a, miR-18a, miR-103, and miR-205 in both cohorts, at the exception for miR-103 and miR-205 in the TCGA cohorts ($p = 0.064$), while no significant association was noted for miR-548b and the other candidates. Also verified was the relationship between clinical parameters (tumor size, node status, gender, age, HPV, smoking, and alcohol history) and miRNA expression (Supporting Information, Table S4). Albeit expression of the four co-expressed miRNA is higher for patients with smoking history (p values from 0.006 to 0.077) in the CHUM cohort, this effect was not reproduced in the TCGA cohort. Also, expression of miR-18a was significantly lower ($p = 0.048$) for patients with negative node status in the TCGA cohort but not in the CHUM cohort. No other significant difference was observed.

Using the miRWalk2.0 validated target module,^{28,29} we looked for validated targets for miR-548b, miR-92a, miR-18a, miR-103, and miR-205 (Supporting Information, Table S5). We then cross-referenced the 5 miRNAs' validated targets

with the Axl activated PI3K/Akt pathway and observed two targets; miR-548b associated to ACTN4 and the four co-expressed miRNAs targeting PTEN (Fig. 2A).

In *silico* data were verified within our studied groups. As RNAs/miRNAs were extracted from FFPE tissues, their quality (RIN 1.00–2.40) was insufficient to directly quantify the expression of potential target mRNA, which were fragmented when compared to short miRNAs in FFPE samples.³⁰ We therefore used the same tissue microarray as for Axl and p16 analysis to evaluate PTEN and ACTN4 levels in tumor tissues (Supporting Information, Table S3). Representative high and low PTEN and ACTN4 immunofluorescence stainings are shown in Figures 2B and 2C. Previously identified miRNA levels were used in the TCGA cohort. Data for both cohorts were normalized using z scores to test for correlation pooling both cohorts. z score normalization of the miRNA expressions was performed to confirm the inverse correlation of PTEN with miR-18a ($p < 0.0001$, Fig. 2D), miR-92a ($p = 0.0008$, Fig. 2E), miR-103 ($p = 0.008$, Fig. 2F), and miR-205 ($p = 0.019$, Fig. 2G). An inverse correlation between ACTN4 with miR-548b ($p = 0.009$, Fig. 2H) was also confirmed. Correlation analysis between miRNA expression and their target gene was assessed separately in both cohorts. In the CHUM cohort, inverse correlations were significant for miR-205/PTEN ($p = 0.003$), miR-18a/PTEN ($p = 0.005$), and miR-92a/PTEN ($p = 0.021$). Concordantly, in the TCGA cohort inverse correlations were also significant for miR-548b/ACTN4 ($p < 0.0001$), miR-18a/PTEN ($p = 0.0005$), miR-92a/PTEN ($p = 0.016$), and miR-103/PTEN ($p = 0.032$) (Supporting Information, Table S6).

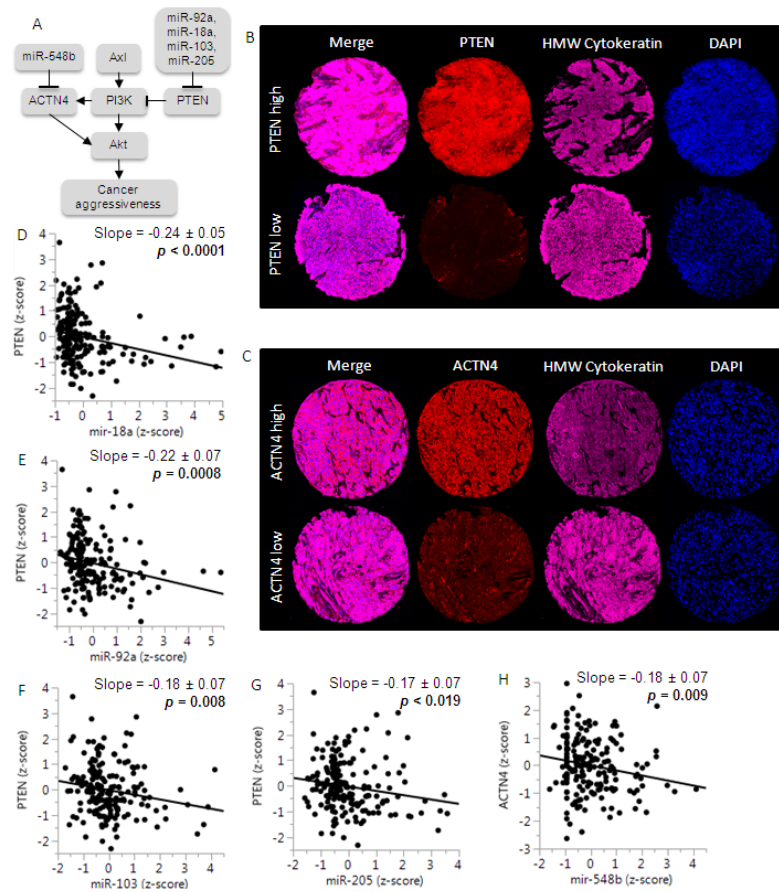
Table 3.

Correlations between the five potential prognostic miRNAs in the two independent cohorts.

		Pearson correlation p values				
		miR-548b	miR-92a	miR-103	miR-18a	miR-205
CHUM	miR-548b	---	0.80	0.63	0.60	0.67
	miR-92a	0.80	---	<0.0001	<0.0001	<0.0001
	miR-103	0.63	<0.0001	---	<0.0001	<0.0001
	miR-18a	0.60	<0.0001	<0.0001	---	<0.0001
	miR-205	0.67	<0.0001	<0.0001	<0.0001	---
TCGA	miR-548b	---	0.56	0.24	0.52	0.47
	miR-92a	0.56	---	<0.0001	<0.0001	<0.0001
	miR-103	0.24	<0.0001	---	<0.0001	0.064
	miR-18a	0.52	<0.0001	<0.0001	---	<0.0001
	miR-205	0.47	<0.0001	0.064	<0.0001	---
		Pearson correlation r values				
		miR-548b	miR-92a	miR-103	miR-18a	miR-205
CHUM	miR-548b	---	0.03	0.06	0.07	0.06
	miR-92a	0.03	---	0.69	0.68	0.91
	miR-103	0.06	0.69	---	0.78	0.81
	miR-18a	0.07	0.68	0.78	---	0.78
	miR-205	0.06	0.91	0.91	0.78	---
TCGA	miR-548b	---	0.05	0.10	0.06	0.06
	miR-92a	0.05	---	0.42	0.52	0.39
	miR-103	0.10	0.42	---	0.35	0.16
	miR-18a	0.06	0.52	0.35	---	0.45
	miR-205	0.06	0.39	0.16	0.45	---

p and *r* values were calculated using Pearson's correlation test.

Figure 2.



miR-92a, miR-18a, miR-103 and miR-205 target PTEN while miR-548b targets ACTN4. (A) Illustration of the cross-referencing of miR-92a, miR-18a, miR-103, miR-205, and miR-548b validated targets as determined by miRWalk2.0 with the Axl activated PI3K/Akt pathway. Representative high and low PTEN (B) and ACTN4 (C) immunofluorescence stainings. Huber M-estimator based robust correlation of PTEN z-scores with (D) miR-18a, (E) miR-92a, (F) miR-103, and (G) miR-205 for pooled data of the CHUM and TCGA cohorts. (H) Huber M-estimator based robust correlation of ACTN4 z-scores with miR-548b for pooled data of the CHUM and TCGA cohorts.

Axl, miR-548b, and miR-18a are independent prognostic factors

To proceed to a multivariate likelihood ratio test assessing overall survival outcomes on the same seven-year time period as for the univariate analysis, we subdivided our groups using standardized TNM tumor size (pT), nodal status (pN), and smoking status, thus comparing small ($\leq T2$, ≤ 4.0 cm) and large ($> T3$, > 4.0 cm) tumors, negative lymph (N0) and positive lymph node status (N+), never smokers and reformed/current smoking patients, respectively. Age noted at the initial diagnosis aimed to compare younger (≤ 50 years) and older (> 50 years) patients. HPV status and past history of alcohol use were also assessed in the CHUM analysis, but removed from the TCGA analysis due to a high number of missing data causing too much bias in the multivariate analysis. Those clinical parameters were also tested with a univariate analysis with no significant results in the CHUM cohort and smoking history being the only significant factor ($p = 0.034$; HR = 2.00, CI = 1.07–4.01) in the TCGA cohort (Supporting Information, Fig. S3). As miR-18a, miR-92a, miR-103, and miR-205 were co-expressed, only miR-18a was included in the multivariate analysis as it had the most significant univariate prognostic value in both cohorts. Axl was also included in our model to assess the role of the candidate miRNAs as Axl-independent prognostic factors. Three factors appeared significantly correlated to overall survival in both cohorts; miR-548b, Axl, and miR-18a expression (Table 4). In addition, nodal status was also significant but only in the CHUM cohort.

The same analysis was also performed looking at progression-free survival with miR-18a being the only significant factor in both cohorts (Table 4). We also

performed the same multivariate analysis for overall and progression-free survival while removing the Axl parameter (Supporting Information, Table S7). The same parameters remained significant in the CHUM cohort while for the TCGA cohort miR-548b lost significance for overall survival ($p = 0.070$) and age for progression-free survival ($p = 0.34$).

Table 4.

Multivariate likelihood ratio test for the two independent cohorts for overall and progression-free survival analysis.

	CHUM cohort		TCGA cohort	
Overall survival multivariate analysis				
	<i>P</i>	HR (95% CI)	<i>P</i>	HR (95% CI)
Axl (high)	0.002	12.11 (2.27-108.26)	0.0007	3.75 (1.76-7.94)
miR-18a (high)	0.004	10.17 (2.01-71.55)	0.001	5.08 (1.84-16.96)
miR-548b (high)	0.007	0.06 (0.003-0.53)	0.027	0.42 (0.18-0.91)
Node status (positive)	0.049	4.84 (1.01-27.50)	0.77	0.90 (0.44-1.90)
Age (>50 years)	0.057	7.74 (0.95-82.04)	0.06	2.54 (0.95-7.60)
Tumor size (> 4 cm)	0.062	12.28 (0.89-245.82)	0.11	0.54 (0.26-1.16)
Gender (male)	0.13	3.86 (0.70-28.33)	0.93	1.03 (0.51-2.17)
HPV (positive)	0.41	2.04 (0.35-11.60)	---	---
Smoking history (yes)	0.73	1.32 (0.29-7.06)	0.20	1.70 (0.76-4.09)
Alcohol history (yes)	0.80	0.78 (0.10-4.47)	---	---
Progression-free survival multivariate analysis				
	<i>P</i>	HR (95% CI)	<i>P</i>	HR (95% CI)
miR-18a (high)	0.002	6.89 (1.97-29.86)	0.004	3.13 (1.40-7.80)
Node status (positive)	0.032	4.05 (1.12-15.36)	0.97	0.99 (0.52-1.93)
miR-548b (high)	0.058	0.23 (0.04-1.05)	0.094	0.57 (0.28-1.10)
Axl (high)	0.078	3.20 (0.88-13.65)	0.0004	3.37 (1.74-6.49)
Age (>50 years)	0.093	4.11 (0.80-25.79)	0.034	2.44 (1.07-6.04)
Alcohol history (yes)	0.23	2.47 (0.53-10.43)	---	---
HPV (positive)	0.31	2.02 (0.49-7.65)	---	---
Gender (male)	0.51	1.64 (0.38-7.66)	0.35	1.36 (0.72-2.66)
Tumor size (> 4 cm)	0.56	1.81 (0.24-13.26)	0.38	0.75 (0.40-1.44)
Smoking history (yes)	0.65	1.37 (0.37-6.29)	0.76	0.90 (0.46-1.79)

NOTE: The TCGA cohort was not adjusted for HPV and alcohol use, due to a high number of missing data.

DISCUSSION

To assess the regulatory function of miRNAs in SCCOT, we performed a large miRNA screening, and determined the clinical value of miRNAs expression in our institutional group of patients. Our results suggest that the expression levels of miR- 92a, miR-18a, miR-103, miR-205, and miR-548b can be useful prognostic tools. Past reports have also evaluated the role of miRNAs in HNSCC and in other cancers sites. Zhang et al. have shown that miR-92a expression was an unfavorable prognostic marker ³¹ for nasopharyngeal carcinoma, while the co-expression of miR-18a and miR-92 as part of the miR-17/92 cluster, also known as oncomiR-1, ³² was associated to worst prognostic outcomes in esophageal squamous cell carcinoma.³³ Among other identified miRNAs, previous studies also reported that miR-103 is an unfavorable prognostic factor for breast and colorectal cancer, ^{34,35} while miR-103 appears as a poor prognostic marker in endometrial and early stage non-small-cell lung cancer.³⁶ In addition, expression of miR-548b was noted to be an important indicator of good prognostic outcomes for Axl-driven non-small-cell lung cancer.³⁷

Although we noted differences in data significance between the CHUM and TCGA cohorts using the univariate analysis, these findings may be explained by distinctive cohort characteristics, such as tumor stage and pathological grade. These differences would thus be explained by initially different tumor tissues collected in the TCGA and CHUM group. It should be noted that the TCGA dataset

required larger tumor samples (≥ 1 cm) in comparison to the CHUM biobank samples (≥ 0.5 cm), suggesting that tumors with higher staging and pathological grade were preferentially collected in the TCGA group. This could also explain why optimized thresholds found using ROC curves for survival analysis in the TCGA cohort had a larger percentage of patients in the high group for the deleterious miRNAs and in the low group for the protective miR-548b.

Multivariate analysis was used to confirm the predictive value of the identified candidate miRNAs in both cohorts. Correlations between miR-92a, miR-103, miR-18a, and miR-205 are very strong with quite high r values for in vivo correlations (Table 3). MiR-18a and miR-92a are expected to be correlated as they are encoded in the same RNA transcript cluster.³² Therefore, having r values in the same range (and sometimes higher) for all six correlations suggests a strong common control mechanism. For this reason, we used only one of the four co-expressed miRNA for the multivariate analysis as we would not be able to distinguish the single miRNAs effects in this study. The miR-18a was the only candidate among the four co-expressed miRNAs which was used in the multivariate survival analysis, as it had the most significant prognostic value in both cohorts, and allowed to avoid redundancy with the exclusion the three other candidates (miR-92a, miR-103, and miR-203). In addition, expression of Axl and miR-548 were included as distinctive risk factors. They appeared as independent prognostic factors, which is logical as they are independent regulatory effectors on the PI3K-Akt pathway (Fig. 2a). The independent prognostic value of those miRNAs was consistently reproducible in the CHUM and TCGA group, although the two cohorts

had significantly different clinical tumor characteristics, suggesting their prognostic value is relevant during the complete development of the disease.

Higher hazards ratios are observed in the CHUM cohort in comparison to the TCGA cohort. This is explained by the fact we used our in house cohort for selection of candidate prognostic factors with a stringent screening strategy, hereby ending up with highly significant results. Also, smaller cohorts may lead to broader confidence intervals which are observed in our cohort. This is why the TCGA cohort is so important in this study as larger confirmation cohort and also because it was not used for the selection of the candidate prognostic miRNAs and therefore analysis of those miRNAs in that cohort was unbiased. With this in mind, it is impressive that the miR-18a prognostic value stays highly significant ($p \leq 0,004$) in both cohorts for both overall and progression- free survival, suggesting that the four correlating miRNA (miR-18a, miR-92a, miR-103, and miR-203) are quite important in SCCOT. Interestingly, removing Axl from the multivariate analysis caused a loss of significance for miR-548b in the TCGA cohort, but not in the CHUM cohort. Also, miR- 548b was not significantly predictive of progression-free survival in both cohorts and its multivariate p values were always lower than those of miR-18a and Axl in both cohorts and for both overall and progression-free survival. This suggests that miR-548b effect might be less important than those of miR-18a or Axl.

An inverse correlation between PTEN expression and miR-18a, miR-92a, miR-103, and miR-205 was predicted in silico and confirmed in the SCCOT cohorts. The four co-expressed miRNAs appear all very strongly correlated together, show

significant inverse correlations with PTEN regulation, and appear to have an interesting predictive value in our multivariate model. PTEN is a known prognostic factor in SCCOT, which interestingly appears to be a common target for the co-expressed miRNAs.³⁸ These co-expressed miRNAs seem to have a global prognostic effect, not only through expressing of miR-18a, as observed in the multivariate model, but more as effectors to a common target. PTEN is an important tumor suppressor which downregulates the PI3K/Akt pathway by catalyzing dephosphorylation of PIP3.³⁹ Although PTEN mutations have been often reported in other cancers subtypes, it appears rarely affected in head and neck carcinomas,⁴⁰ therefore suggesting a logical anticancer target for miRNAs. PTEN regulation through expression of miR-92a has been demonstrated in nasopharyngeal carcinoma and linked to a poor overall survival and disease-free survival.³¹ In addition, downregulation of PTEN in association to miR-103, miR-18a, and miR-205 regulation has also been established in other tissues, including the nasopharynx.^{41–45}

An inverse correlation between ACTN4 expression and miR-548b was predicted in *silico* and confirmed in the SCCOT cohorts. Our results suggest that miR-548b expression appears to be a protective prognostic marker, which has seldom been previously reported in cancer studies. ACTN4 is considered an important PIP3-dependant regulator of Akt, which binds Akt and translocates with it as a complex to the nuclear membrane and specific silencing of ACTN using siRNA is shown to reduce Akt phosphorylation and activity.⁴⁶ In a past study using oral squamous

cell carcinoma cell lines, ACTN4 silencing has also been attributed to reduce cancer invasion potential.⁴⁷ Nevertheless, specific regulatory mechanisms by which this process promotes patient survival require further investigations. It should also be stated that other relevant targets independent of the PI3K-Akt axis may exist, and would thus have interesting prognostic value in association to miRNAs expression.

In this study, we note that the three reported independent predictive factors (the miR-18a/miR-92a/miR-103/miR-203 signature, miR-548b, and Axl) appear to show an interesting common association to the PI3K–Akt axis. Specific targeting of the PI3K axis has been recently reported to promising clinical outcomes.^{19,20} Three FDA approved therapeutic agents for HNSCC are currently available, including cetuximab, targeting EGFR, through an upstream regulatory effect on the PI3K-Akt axis,⁴⁸ and anti-PD-1 immune checkpoint inhibitors pembrolizumab and nivolumab, which inhibit immune invasion by blocking the interaction between T-cell PD-1 and tumor cell PD-L1.⁴⁹ Ritprajak et al. have previously shown that PI3K promotes PD-L1 expression in mouse HNSCC and in human oral squamous cell carcinoma.⁵⁰ We suggest that modulation of miR-548b, miR-18a, miR-92a, miR-103, and/or miR-203 expression level may confer additional therapeutic benefits through indirect regulation of the PI3Kaxis.

In summary, this work used two independent cohorts to discover and validate two novel prognostic tools for SCCOT, including the ACTN4 inversely correlated miR-548b and the PTEN inversely correlated miRNA cluster group consisting of miR-18a, miR-92a, miR-103, and miR-203.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors would like to thank members of the Rodier, Kaufman, Mes-Masson, Wong, and Christopoulos laboratories for the insightful discussions; and Gabriela Fragoso and Veronique Barres of the Molecular Pathology core facility of the CRCHUM for performing the slide preparation from paraffin blocs and immunofluorescence slide digitalization. They also would like to thank the TCGA research network for their efforts in making publicly available data which were used in this study.

REFERENCES

1. Siegel RL, Miller KD, Jemal A. Cancer statistics, 2015. *CA Cancer J Clin.* 2015;65:5-29.
2. Lindberg R. Distribution of cervical lymph node metastases from squamous cell carcinoma of the upper respiratory and digestive tracts. *Cancer* 1972;29:1446-9.
3. Franceschi D, Gupta R, Spiro RH, et al. Improved survival in the treatment of squamous carcinoma of the oral tongue. *Am J Surg* 1993;166:360–5.
4. Silverman S Jr. Demographics and occurrence of oral and pharyngeal cancers. The outcomes, the trends, the challenge. *J Am Den Assoc* 2001;132:7S-11S.
5. Farshadpour F, Roepman P, Hordijk GJ, et al. A gene expression profile for non-smoking and non-drinking patients with head and neck cancer. *Oral Dis* 2012;18:178-83.
6. Lingen MW, Xiao W, Schmitt A, et al. Low etiologic fraction for high-risk human papillomavirus in oral cavity squamous cell carcinomas. *Oral Oncol* 2013;49:1-8.
7. Patel SC, Carpenter WR, Tyree S, et al. Increasing incidence of oral tongue squamous cell carcinoma in young white women, age 18 to 44 years. *J Clin Oncol* 2011;29:1488-94.
8. Shiboski CH, Schmidt BL, Jordan RC. Tongue and tonsil carcinoma, increasing trends in the US population ages 20-44 years. *Cancer* 2005;103-1843-1849.
9. Li R, Faden DL, Fakhry C, et al. Clinical, genomic, and metagenomic characterization of oral tongue squamous cell carcinoma in patients who do not smoke. *Head Neck* 2015;37:1642-9.

10. Estilo CL, O-charoenrat P, Talbot S, et al. Oral tongue cancer gene expression profiling: Identification of novel potential prognosticators by oligonucleotide microarray analysis. *BMC Cancer* 2009;9:11.
11. Hui AB, Shi W, Boutros PC, et al. Robust global micro-RNA profiling with formalin-fixed paraffin-embedded breast cancer tissues. *Lab Invest* 2009;89:597-606.
12. Lin S, Gregory RI. MicroRNA biogenesis pathways in cancer. *Nat Rev Cancer* 2015;15:321-33.
13. Owonikoko TK, Khuri FR. Targeting the PI3K/AKT/mTOR pathway: biomarkers of success and tribulation. *Am Soc Clin Oncol Educ Book*. 2013.
14. Baselga J, Campone M, Piccart M, et al. Everolimus in postmenopausal hormone-receptor-positive advanced breast cancer. *N Engl J Med* 2012;366 :520-9.
15. Yao JC, Shah MH, Ito T, et al. Everolimus for advanced pancreatic neuroendocrine tumors. *N Engl J Med* 2011;364:514-23.
16. Hudes G, Carducci M, Tomczak P, et al. Temsirolimus, interferon alfa, or both for advanced renal-cell carcinoma. *N Engl J Med* 2007;356:2271-81.
17. Vasudevan KM, Barbie DA, Davies MA, et al. AKT-independent signaling downstream of oncogenic PIK3CA mutations in human cancer. *Cancer Cell* 2009;16:21-32.
18. O'Reilly T, McSheehy PM. Biomarker Development for the Clinical Activity of the mTOR Inhibitor Everolimus (RAD001): Processes, Limitations, and Further Proposals. *Transl Oncol* 2010;3:65-79.

19. Brand TM, Iida M, Stein AP, et al. AXL is a logical molecular target in head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res* 2015;21:2601-12.
20. Soulieres D, Faivre, S, Mesia, R et al. Buparlisib and paclitaxel in patients with platinum-pretreated recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck (BERIL-1): a randomized, double-blind, placebo-controlled phase 2 trial. *Lancet Oncol* 2017;17:30064-5.
21. Dong P, Konno Y, Watari H, et al. The impact of microRNA-mediated PI3K/AKT signaling on epithelial-mesenchymal transition and cancer stemness in endometrial cancer. *J Transl Med* 2014;12:231.
22. Giles KM, Kalinowski FC, Candy PA, et al. Axl mediates acquired resistance of head and neck cancer cells to the epidermal growth factor receptor inhibitor erlotinib. *Mol Cancer Ther* 2013;12:2541-58.
23. Elkabets M, Pazarentzos E, Juric D, et al. AXL mediates resistance to PI3K α inhibition by activating the EGFR/PKC/mTOR axis in head and neck and esophageal squamous cell carcinomas. *Cancer Cell* 2015;27:533-46.
24. Cerami E, Gao J, Dogrusoz U, et al. The cBio cancer genomics portal: an open platform for exploring multidimensional cancer genomics data. *Cancer Discov* 2012;2:401-4.
25. Gao J, Aksoy BA, Dogrusoz U, et al. Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal. *Sci Signal* 2013;6:pl1
26. Labouba I, Le Page C, Communal L, et al. Potential cross-Talk between alternative and classical NF- κ B pathways in prostate cancer tissues as measured

by a multi-staining immunofluorescence co-localization assay. PLoS One 2015;10:e0131024.

27. Lee CH, Yen CY, Liu SY, et al. Axl is a prognostic marker in oral squamous cell carcinoma. Ann Surg Oncol 2012;19:S500-8.

28. Dweep H, Sticht C, Pandey P, et al. miRWalk--database: prediction of possible miRNA binding sites by "walking" the genes of three genomes. J Biomed Inform 2011;44:839-47.

29. Dweep H, Gretz N. miRWalk2.0: a comprehensive atlas of microRNA-target interactions. Nat Methods 2015;12:697.

30. Hall JS, Taylor J, Valentine HR, et al. Enhanced stability of microRNA expression facilitates classification of FFPE tumour samples exhibiting near total mRNA degradation. Br J Cancer 2012;107:684-94.

31. Zhang H, Cao H, Xu D, et al. MicroRNA-92a promotes metastasis of nasopharyngeal carcinoma by targeting the PTEN/AKT pathway. Onco Targets Ther 2016;9:3579-88.

32. Mogilyansky E, Rigoutsos I. The miR-17/92 cluster: a comprehensive update on its genomics, genetics, functions and increasingly important and numerous roles in health and disease. Cell Death Differ 2013;20:1603-14.

33. Xu XL, Jiang YH, Feng JG, et al. MicroRNA-17, microRNA-18a and microRNA-19a are prognostic indicators in esophageal squamous cell carcinoma. Ann Thorac Surg 2014;97:1037-45.

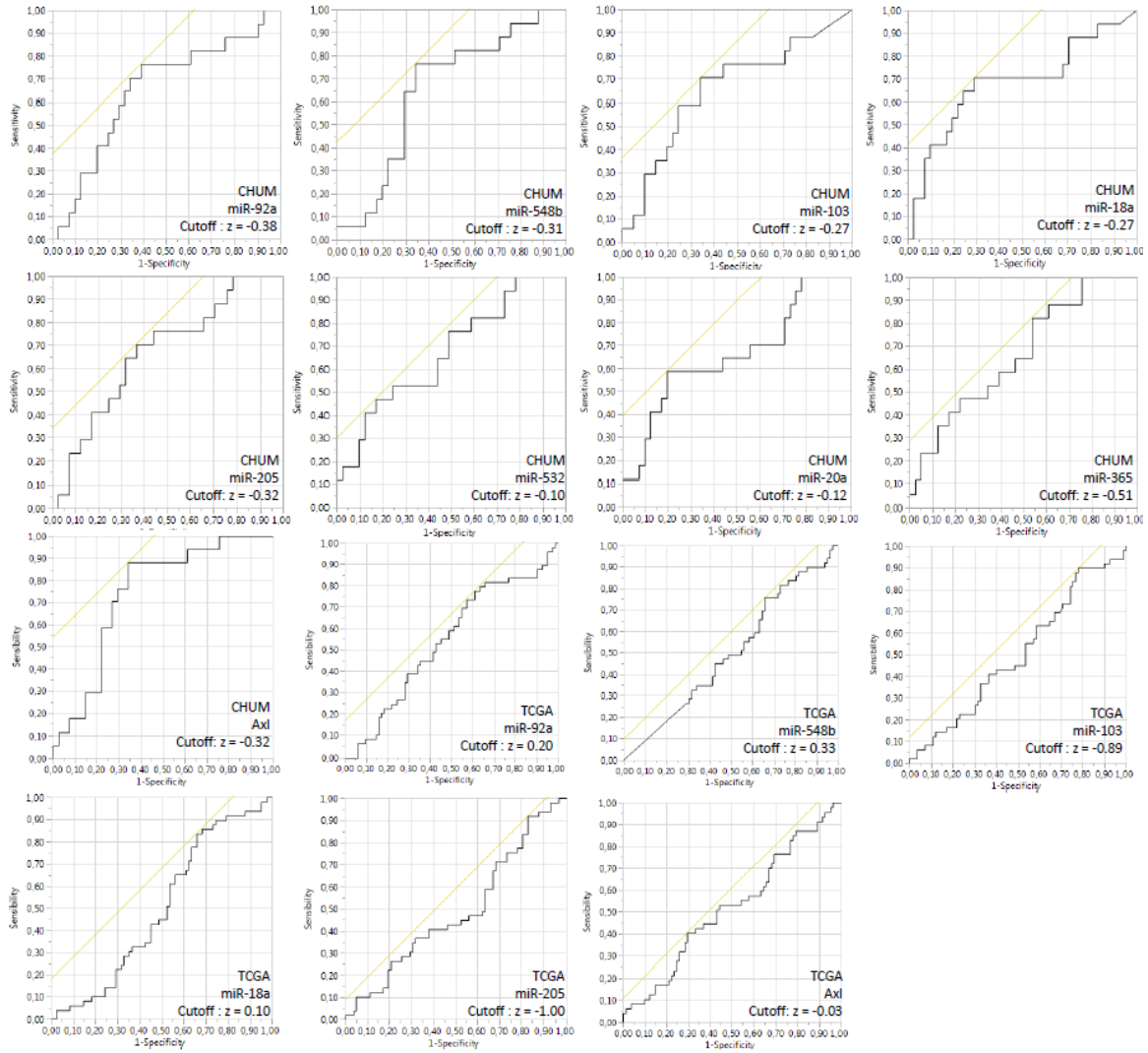
34. Martello G, Rosato A, Ferrari F, et al. A MicroRNA targeting dicer for metastasis control. Cell 2010;141:1195-207.

35. Chen HY, Lin YM, Chung HC, et al. miR-103/107 promote metastasis of colorectal cancer by targeting the metastasis suppressors DAPK and KLF4. *Cancer Res* 2012;72:3631-41.
36. Boldrini L, Giordano M, Servadio A, et al. Prognostic role of mir-205 in early-stage (T1N0) non-small cell lung cancer. *Adv Lung Cancer* 2014;3:45-51.
37. Wang Y, Xia H, Zhuang Z, et al. Axl-altered microRNAs regulate tumorigenicity and gefitinib resistance in lung cancer. *Cell Death Dis* 2014;5:e1227.
38. Lee JI, Soria JC, Hassan KA, et al. Loss of PTEN expression as a prognostic marker for tongue cancer. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2001;127:1441-5.
39. Maehama T, Dixon JE. PTEN: a tumour suppressor that functions as a phospholipid phosphatase. *Trends Cell Biol* 1999;125-8.
40. Kandoth C, McLellan MD, Vandin F, et al. Mutational landscape and significance across 12 major cancer types. *Nature* 2013;502:333-9.
41. Geng L, Sun B, Gao B, et al. MicroRNA-103 promotes colorectal cancer by targeting tumor suppressor DICER and PTEN. *Int J Mol Sci* 2014;15:8458-72.
42. Liu XS, Chopp M, Wang XL, et al. MicroRNA-17-92 cluster mediates the proliferation and survival of neural progenitor cells after stroke. *J Biol Chem* 2013;288:12478-88.
43. Lei L, Huang Y, Gong W. miR-205 promotes the growth, metastasis and chemoresistance of NSCLC cells by targeting PTEN. *Oncol Rep* 2013;30:2897-902.

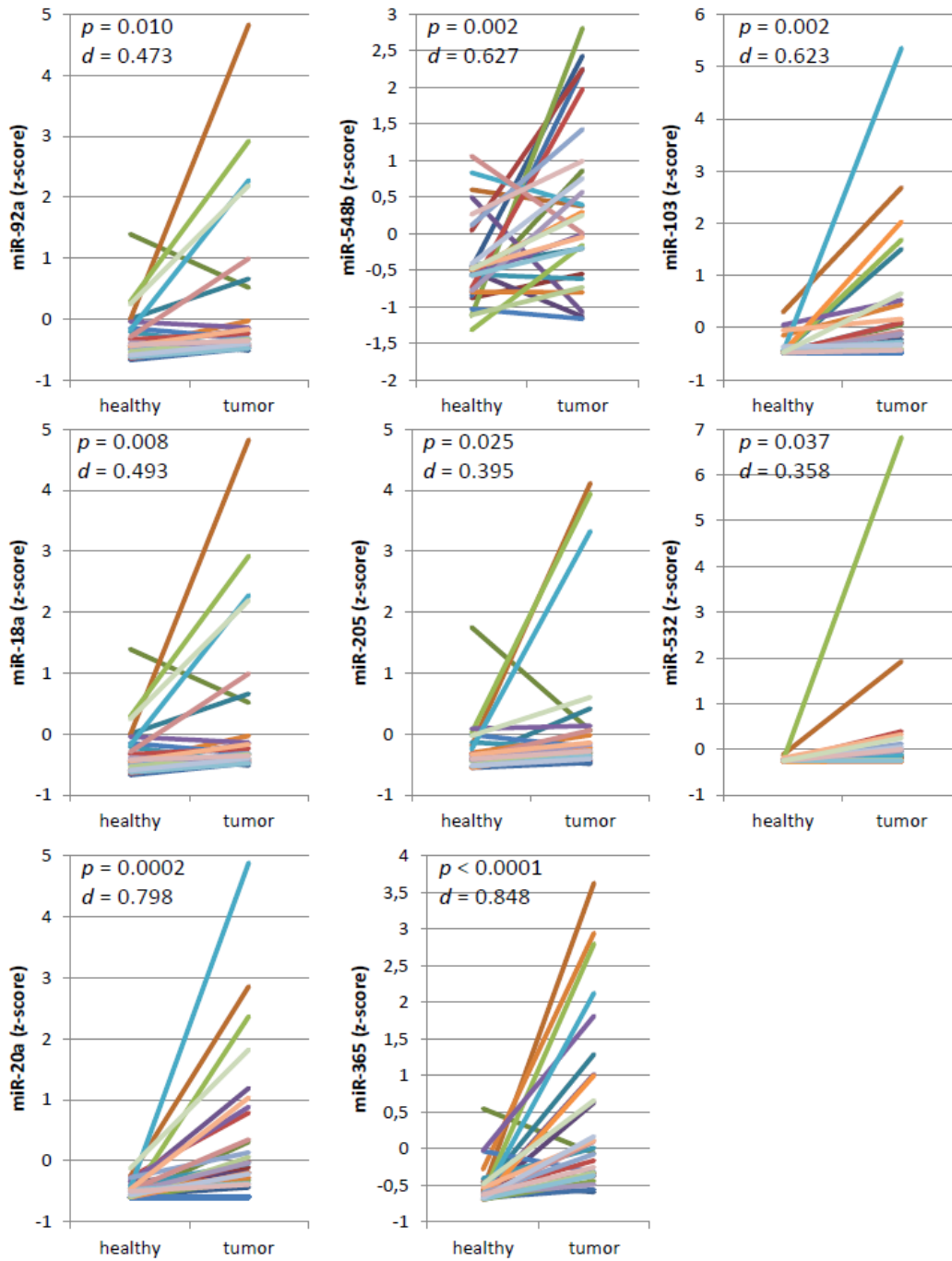
44. Qu C, Liang Z, Huang J, et al. MiR-205 determines the radioresistance of human nasopharyngeal carcinoma by directly targeting PTEN. *Cell Cycle* 2012;11:785-796.
45. Cai J, Fang L, Huang Y, et al. miR-205 targets PTEN and PHLPP2 to augment AKT signaling and drive malignant phenotypes in non-small cell lung cancer. *Cancer Res* 2013;73: 5402-15.
46. Ding Z, Liang J, Lu Y, et al. A retrovirus-based protein complementation assay screen reveals functional AKT1-binding partners. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:15014-9.
47. Yamada S, Yanamoto S, Yoshida H, et al. RNAi-mediated down-regulation of alpha-actinin-4 decreases invasion potential in oral squamous cell carcinoma. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2010;39: 61-67.
48. Vermoken JB, Mesia R, Rivera F, et al. Platinum-based chemotherapy plus cetuximab in head and neck cancer. *N Engl J Med* 2008;359:1116-27.
49. Ferris RL, Blumenschein G Jr, Favette J, et al. Nivolumab for recurrent squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med* 2016;375:1856-67.
50. Ritprajak P, Azuma M. Intrinsic and extrinsic control of expression of the immunoregulatory molecule PD-L1 in epithelial cells and squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 2015;51:221-8

SUPPORTING INFORMATION

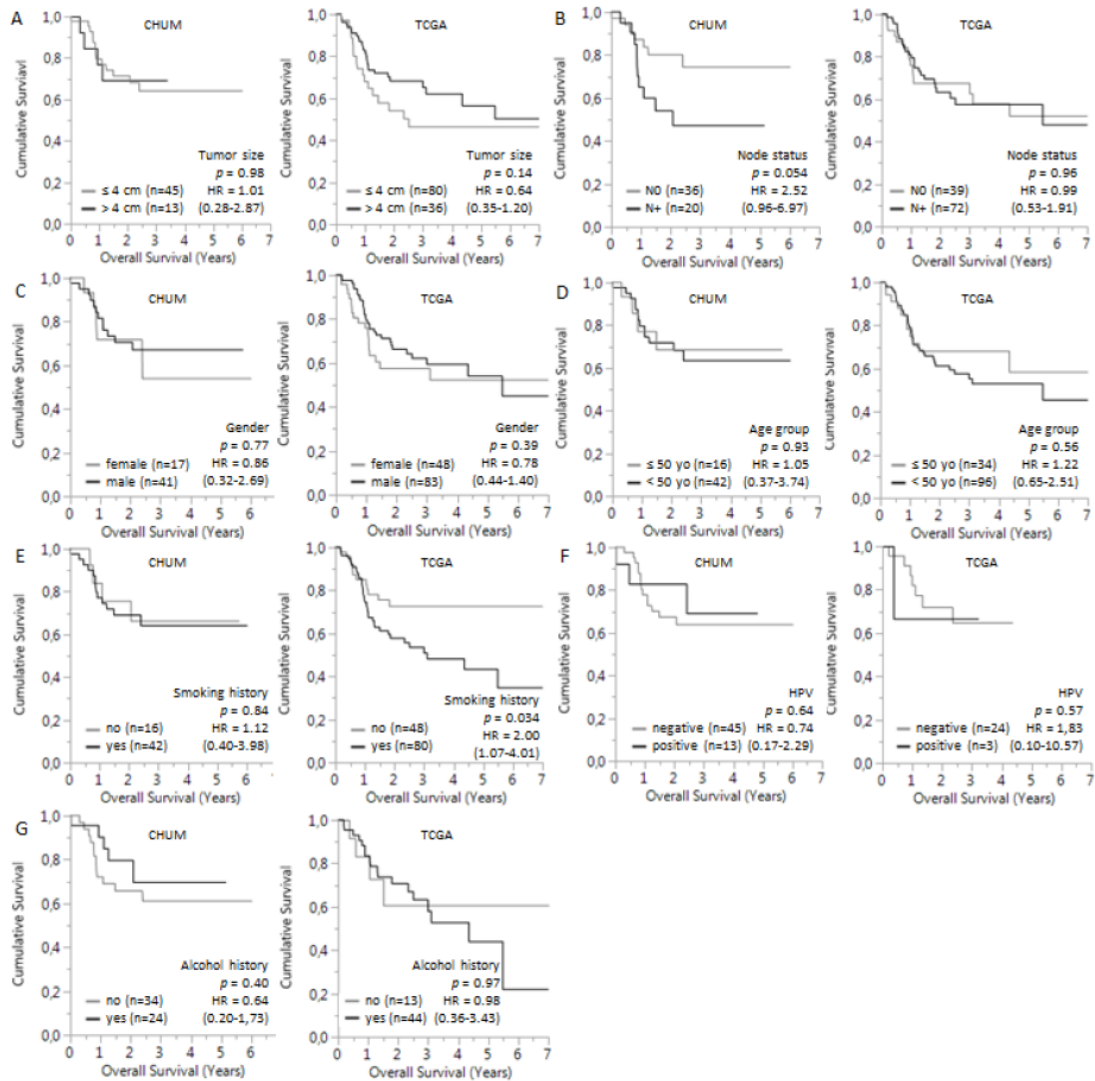
Supporting information Figure 1: ROC curves testing for survival status at 7 years or end of follow-up. Cut-offs are normalized as z-score.



Supporting Information Figure 2: MiRNA expression for paired healthy and tumor samples of the CHUM cohort. Paired t-test p values and Cohen's d effect size are given.



Supporting Information Figure 3: Comparison of patient survival for all SCCOT patients of the CHUM and TCGA cohorts using the Kaplan-Meier curve estimation and log-rank test univariate survival analysis of (a) tumor size, (b) node status, (c) gender, (d) age group, (e) smoking history, (f) HPV and (g) alcohol history. The patients with no data were removed from the analysis. Hazards ratio indicated are for the dark line groups.



Please refer to the available online data for the following tables;

Supporting information table S1.

Supporting information table S2.

Supporting information table S3.

Supporting information table S4.

Supporting information table S5.

[HTTPS://ONLINELIBRARY.WILEY.COM/DOI/ABS/10.1002/IJC.30915](https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/IJC.30915)

Supporting information table S6.

Robust correlations p values and slopes for the two independent cohorts

CHUM cohort					
	miR-92a	miR-103	miR-18a	miR-205	miR-548b
ACTN4	0.80	0.96	0.13	0.36	0.50
PTEN	0.021	0.13	0.005	0.003	0.40
TCGA cohort					
	miR-92a	miR-103	miR-18a	miR-205	miR-548b
ACTN4	0.64	0.22	0.27	0.68	< 0.0001
PTEN	0.016	0.032	0.0005	0.23	0.17

Supporting information table S7.

Multivariate likelihood ratio test for the two independent cohorts for survival and progression-free survival analysis, without Axl.

	CHUM cohort		TCGA cohort	
	<i>p</i>	HR (95% CI)	<i>p</i>	HR (95% CI)
Overall survival multivariate analysis				
miR-18a (high)	0.003	6.72 (1.87-29.54)	0.015	2.98 (1.22-8.96)
miR-548b (high)	0.007	0.09 (0.008-0.57)	0.070	0.50 (0.22-1.06)
Node status (positive)	0.017	4.87 (1.32-20.82)	0.57	0.82 (0.42-1.65)
Tumor size (> 4 cm)	0.12	6.42 (0.60-82.09)	0.12	0.58 (0.30-1.17)
Age (>50 years)	0.30	2.25 (0.48-11.83)	0.58	1.27 (0.55-3.24)
Smoking history (yes)	0.48	0.62 (0.17-2.51)	0.076	1.99 (0.93-4.55)
Gender (male)	0.54	1.47 (0.43-5.52)	0.42	0.75 (0.38-1.53)
Alcohol history (yes)	0.56	0.60 (0.08-3.06)	---	---
HPV (positive)	0.66	1.42 (0.27-6.58)	---	---
Progression free survival multivariate analysis				
miR-18a (high)	0.002	6.20 (1.96-23.52)	0.032	2.24 (1.07-5.31)
Node status (positive)	0.006	5.11 (1.59-17.94)	0.47	0.80 (0.45-1.48)
miR-548b (high)	0.053	0.24 (0.04-1.02)	0.092	0.57 (0.28-1.09)
Age (>50 years)	0.25	2.29 (0.09-1.79)	0.34	1.43 (0.70-3.16)
Alcohol history (yes)	0.25	2.40 (0.52-10.31)	---	---
HPV (positive)	0.31	2.03 (0.49-7.52)	---	---
Tumor size (> 4 cm)	0.68	1.50 (0.21-10.28)	0.42	0.78 (0.43-1.45)
Gender (male)	0.90	0.92 (0.26-3.28)	0.90	0.96 (0.53-1.80)
Smoking history (yes)	0.91	0.93 (0.27-3.52)	0.92	0.97 (0.81-1.85)

NOTE: The TCGA cohort was not adjusted for HPV and alcohol use, due to a high number of missing data.

XII. DISCUSSION

Dans cette étude, nous avons effectué une analyse ciblée de l'expression des micro-ARNs dans les carcinomes épidermoïdes de la langue mobile. Le profil d'expression des micro-ARNs identifiés a servi comme marqueur pronostic reproductible. Nous avons ainsi identifié une co-expression de 4 micro-ARNs et une surexpression du miR-548b, ciblant respectivement les gènes PTEN et ACTN4. Nos résultats suggèrent que ces miRs sont spécifiquement surexprimés dans les cancers de la langue mobile, et permettent de caractériser de manière distincte ce type de tumeurs. Il a été possible de valider nos résultats par l'analyse d'une deuxième population indépendante (TCGA) aux caractéristiques tumorales et démographiques distinctes.

Par ailleurs, l'utilisation intégrée d'analyses bio-informatiques a permis d'évaluer l'implication des micro-ARNs identifiés dans la régulation de leurs gènes cibles, et d'établir leur rôle dans la voie de signalisation PI3K, fréquemment altérée dans les cancers tête et cou ⁷⁶. La voie PI3K/AKT contribue à la croissance tumorale et possède un potentiel métastatique préalablement décrit dans les cancers de la cavité orale ⁷⁷. L'activation de la voie Phosphoinositide 3-kinase (PI3K / AKT) débute par une initiation au niveau du récepteur de croissance épithéliale (EGFR), qui déclenche une cascade d'évènements activateurs de kinases, de transcription et de traduction ⁷⁶. Plusieurs études suggèrent une hausse de l'expression du PI3K auprès de patients avec carcinome épidermoïde de la cavité orale en comparaison

aux sujets sains ⁷⁸. De plus, dans une étude récente du Centre MD Anderson ⁷⁹, on rapporte que l'activation de la voie de signalisation AXL-PI3K augmente conjointement l'expression du marqueur immunitaire PD-L1, et apparait liée à un phénomène de radorésistance pour les cancers de la tête et du cou. Ainsi, il est possible d'affirmer, à la lumière de nos résultats, qu'il existe une implication importante de la voie de signalisation PI3K dans le développement des carcinomes de la langue mobile, par une régulation post-transcriptionnelle des miRs.

Suite à nos résultats, on note une valeur pronostic fiable des 4 micro-ARNs co-exprimés, soit le miR-18a, 92a, 103 et 203. En effet, on observe une association significative entre l'expression de ces miRs et la survie globale des patients, reproductible dans les deux populations à l'étude (CHUM et TCGA). Cette validation observée uniquement pour les quatre miRs co-exprimés, suggère que la régulation du gène PTEN (phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome 10) joue un rôle plus important dans le processus d'oncogenèse que la régulation d'ATCN4. La réduction d'expression du gène PTEN, agissant comme supprimeur de tumeur, occasionne une perte de régulation des voies de signalisation cellulaires, favorisant la survie cellulaire, la prolifération tumorale et le développement de métastases ⁸⁰. La méthylation du promoteur de PTEN a par ailleurs été démontrée dans plusieurs types de cancers ⁸¹⁻⁸². De plus, il a été démontré que malgré l'absence de mutation observée dans les lignées cellulaires de cancers de la cavité orale, on note une réduction significative de l'expression

d'ARNm du gène PTEN en comparaison aux tissus sains ⁸³. Dans une revue récente, on rapporte que près de 80% de la réduction de l'expression du gène PTEN dans les tissus tumoraux est associée à une hyperméthylation du promoteur du gène. Ces résultats renforcent donc l'importance de PTEN dans la carcinogénèse des CECO.

Parmi les nombreux miRs cibles rapportés dans la littérature, le miR-21 demeure le plus étudié. Ce dernier démontre une surexpression et activité oncogénique augmentées dans les carcinomes épidermoïdes de la langue mobile ⁸⁵. On suggère que la hausse d'expression du miR-21 est associée à une réduction des taux d'expression de tropmyosine 1 (TPM1) et du gène PTEN, causant une réduction de l'apoptose cellulaire ⁶⁵. Par ailleurs, l'inactivation du miR-21, effectuée par l'ajout de l'anti-miR-21, a démontrée une réduction de l'apoptose et de la croissance cellulaire au sein des lignées cellulaires de carcinomes épidermoïdes de langue mobile ⁶⁵. Dans notre étude, malgré qu'il n'y avait pas de surexpression significative du miR-21, la co-expression des 4 miR-cibles identifiés semble toutefois favoriser une régulation commune du gène PTEN.

En plus de leurs fonctions régulatrices agissant sur une multitude de gènes, les micro-ARNs possèdent également des caractéristiques idéales permettant des prélèvements fiables dans des échantillons de salives ⁸⁶ et au niveau plasmatique ⁸⁷. Ces taux circulants de micro-ARNs résultent d'une libération systémique médiée par les cellules tumorales, qui demeure dépendante de la tumeur primaire. Des taux sériques et salivaires augmentés de miRs ont d'ailleurs été détectés avec

succès chez les patients avec CECO ⁸⁸. Les prélèvements salivaires constituent un moyen plus accessible et relativement peu dispendieux, pouvant servir comme substrat idéal dans l'évaluation des micro-ARNs en tant que biomarqueurs tumoraux ⁸⁸.

L'amélioration des connaissances à l'égard de l'implication des miRs dans le développement tumoral a permis l'émergence de nouvelles thérapies ciblées ⁸⁹. L'objectif de la thérapie par miRs vise à une augmentation de l'expression de miRs suppresseurs de tumeurs et une diminution de l'expression des miRs oncogènes. Des miRs synthétiques (agomiRs) ⁹⁰, sont actuellement mis à l'étude dans le but d'augmenter l'expression de miRs suppresseurs de tumeurs. La transfection des ces miRs dans des lignes cellulaires de CECO a été démontrée prometteuse et a été associée à une réduction de la croissance cellulaire in vitro ⁹¹. De plus, des inhibiteurs de miRs, tel que les anti-miRNA oligonucléotides, sont actuellement en développement dans le but de restreindre la fonction oncogène de certains miRs par une liaison à leur séquence complémentaire⁶⁵.

La résistance aux agents de chimiothérapie demeure une cause non-négligeable d'échec thérapeutique. Dans l'étude de Yu et al. ⁹², les auteurs ont évalué l'effet des miRs comme source de chimiorésistance dans les CECO. Les auteurs ont démontré une distinction entre le profil d'expression des miRs observé dans les lignées tumorales de la langue mobile résistantes au cisplatine et les lignées sensibles. Dans cette étude, le miR-21 a plutôt démontré des propriétés de chimiosensibilité, tandis que le miR-23a, et 214 favorisent une chimiorésistance.

XIII. CONCLUSION

L'implication des micro-ARNs dans le processus de carcinogénèse semble prendre de plus en plus d'importance pour les cancers de la cavité orale. En relevant le profil d'expression de micro-ARNs spécifiques aux carcinomes épidermoïdes de la langue mobile, il a été possible de déterminer leur impact pronostic et leur fonction régulatrice dans la voie de signalisation PI3K/AKT. Par ailleurs, l'émergence des miRs offre un vaste répertoire d'applications potentielles, incluant un rôle diagnostique, pronostique, et thérapeutique. Toutefois, l'évaluation de l'efficacité thérapeutique par la modulation des miRs identifiés nécessite une validation expérimentale dans un modèle de lignées cellulaires.

XIV. RÉFÉRENCES

1. Silverman, S., Jr. (2001). Demographics and occurrence of oral and pharyngeal cancers. The outcomes, the trends, the challenge. *Journal American Dental Association*, 132(Suppl), 7S–11S.
2. Lindberg R. Distribution of cervical lymph node metastases from squamous cell carcinoma of the upper respiratory and digestive tracts. *Cancer* 1972;29:1446–9.
3. Teichgraeber, J. F., & Clairmont, A. A. (1984). The incidence of occult metastases for cancer of the oral tongue and floor of the mouth: Treatment rationale. *Head and Neck Surgery*, 7, 15–21.
4. Pipkorn P, Rosenquist K, Zenga J. Functional considerations in oral cavity reconstruction. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg*. 2018;
5. Shiboski CH, Schmidt BL, Jordan RC. Tongue and tonsil carcinoma, increasing trends in the US population ages 20–44 years. *Cancer* 2005;103:1843–1849.
6. Gillison M, Alemany L, Snijders PJ, Chaturvedi A, Steinberg BM, Schwartz SM, et al. HPV and diseases of the upper airway: head and neck cancer and respiratory papillomatosis. *Vaccine*, in press.
7. Laine FJ, Smoker WR. Oral cavity: anatomy and pathology. *Semin Ultrasound CT MR*. 1995;16(6):527-45.
8. Winning TA, Townsend GC. Oral mucosal embryology and histology. *Clin Dermatol*. 2000;18(5):499-511.
9. Montero PH, Patel SG. Cancer of the oral cavity. *Surg Oncol Clin N Am*. 2015;24(3):491-508.

10. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, et al. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin.* 2005;55(2):74–108.
11. Liao CT, Kang CJ, Chang JT, et al. Survival of second and multiple primary tumors in patients with oral cavity squamous cell carcinoma in the betel quid chewing area. *Oral Oncol.* 2007;43(8):811–819.
12. Lingen M, Sturgis EM, Kies MS. Squamous cell carcinoma of the head and neck in nonsmokers: clinical and biologic characteristics and implications for management. *Curr Opin Oncol.* 2001;13(3):176-82.
13. Cusumano RJ, Persky MS: Squamous cell carcinoma of the oral cavity and oropharynx in young adults. *Head Neck Surg* 1988, 10:229–234.
14. Schantz SP, Yu G-P. Head and neck cancer incidence trends in young Americans, 1973–1997, with a special analysis for tongue cancer. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 2002;128:268–274.
15. Llewellyn CD, Johnson NW, Warnakulasuriya KA. Risk factors for squamous cell carcinoma of the oral cavity in young people— a comprehensive literature review. *Oral Oncol.* 2001;37(5): 401–18.
16. Toner M, O'regan EM. Head and neck squamous cell carcinoma in the young: a spectrum or a distinct group? Part 1. *Head Neck Pathol.* 2009;3(3):246-8.
17. Cusumano RJ, Persky MS: Squamous cell carcinoma of the oral cavity and oropharynx in young adults. *Head Neck Surg* 1988, 10:229–234.
18. Vargas H, Pitman KT, Johnson JT, Galati LT. More aggressive behavior of squamous cell carcinoma of the anterior tongue in young women. *Laryngoscope.* 2000;110(10 Pt 1):1623-6.

19. Amsterdam JT, Strawitz JG. Squamous cell carcinoma of the oral cavity in young adults. *J Surg Oncol*. 1982;19(2):65-8.
20. Annertz K, Anderson H, Biörklund A, et al. Incidence and survival of squamous cell carcinoma of the tongue in Scandinavia, with special reference to young adults. *Int J Cancer*. 2002;101(1):95-9.
21. Pickering CR, Zhang J, Neskey DM, et al. Squamous cell carcinoma of the oral tongue in young non-smokers is genomically similar to tumors in older smokers. *Clin Cancer Res*. 2014;20(14):3842-8.
22. Omura K. Current status of oral cancer treatment strategies: surgical treatments for oral squamous cell carcinoma. *Int J Clin Oncol*. 2014;19(3):423-30.
23. Kronenberger M B, Meyers A D. Dysphagia following head and neck cancer surgery. *Dysphagia* 1994; 9: 236–244.
24. Ariyoshi Y, Shimahara M, Omura K et al (2008) Epidemiological study of malignant tumors in the oral and maxillofacial region: survey of member institutions of the Japanese Society of Oral and Maxillofacial Surgeons, 2002. *Int J Clin Oncol* 13:220–228
25. Sanders I, Mu L. A three-dimensional atlas of human tongue muscles. *Anat Rec (Hoboken)*. 2013;296(7):1102-14.
26. Bier-Laning CM, Durazo-Arvizu R, Muzaffar K, et al. Primary tumor thickness as a risk factor for contralateral cervical metastases in T1/T2 oral tongue squamous cell carcinoma. *Laryngoscope* 2009; 119:883 – 888.
27. Abd-El-Malek S. Observations on the morphology of the human tongue. *J Anat* 1938; 73:201 – 210.

28. Lydiatt WM, Patel SG, O'sullivan B, et al. Head and Neck cancers-major changes in the American Joint Committee on cancer eighth edition cancer staging manual. *CA Cancer J Clin.* 2017;
29. Shah J P, Andersen P E. Evolving role of modifications in neck dissection for oral squamous carcinoma. *Br J Maxillofac Surg* 1995; 33: 3–8.
30. Hughes, C. J., Gallo, O., Spiro, R. H., & Shah, J. P. (1993). Management of occult neck metastases in oral cavity squamous carcinoma. *American Journal of Surgery*, 166, 380–383
31. Califano J, van der Riet P, Westra W, et al. Genetic progression model for head and neck cancer: implications for field cancerization. *Cancer research* 1996;56:2488-92.
32. Reichert PA, Smith CJ, et al, eds: Histological typing of cancer and precancer of the oral mucosa, ed 2, Berlin, 1997, SpringerVerlag, p 11.
33. Rivera C, Venegas B. Histological and molecular aspects of oral squamous cell carcinoma (Review). *Oncol Lett.* 2014;8(1):7-11.
34. Johnson NW. The role of histopathology in diagnosis and prognosis of oral squamous cell carcinoma. *Proc R Soc Med.* 1976;69(10):740-7.
35. Blot, W.J.; McLaughlin, J.K.; Winn, D.M.; Austin, D.F.; Greenberg, R.S.; Preston-Martin, S.; Bernstein, L.; Schoenberg, J.B.; Stemhagen, A.; Fraumeni, J.F., Jr. Smoking and drinking in relation to oral and pharyngeal cancer. *Cancer Res.* **1988**, 48, 3282–3287

36. Gillison, M.L.; Koch, W.M.; Capone, R.B.; Spafford, M.; Westra, W.H.; Wu, L.; Zahurak, M.L.; Daniel, R.W.; Viglione, M.; Symer, D.E.; Shah, K.V.; Sidransky, D. Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers. *J. Natl. Cancer Inst.* **2000**, *92*, 709–720.
37. Lingen, M.W.; Pinto, A.; Mendes, R.A.; Franchini, R.; Czerninski, R.; Tilakaratne, W.M.; Partridge, M.; Peterson, D.E.; Woo, S.B. Genetics/epigenetics of oral premalignancy: Current status and future research. *Oral Dis.* 2011, *17*, 7–22.
38. Khan Z, Tiwari RP, Mulherkar R, Sah NK, Prasad GB, Shrivastava BR, Bisen PS: Detection of survivin and p53 in human oral cancer: correlation with clinicopathologic findings. *Head Neck* 2009, *31*:1039–1048.
39. Huang SF, Chien HT, Cheng SD, Chuang WY, Liao CT, Wang HM. EGFR copy number alterations in primary tumors, metastatic lymph nodes, and recurrent and multiple primary tumors in oral cavity squamous cell carcinoma. *BMC Cancer.* 2017;*17*(1):592.
40. Bova RJ, Quinn DI, Nankervis JS, et al. Cyclin D1 and p16INK4A expression predict reduced survival in carcinoma of the anterior tongue. *Clin Cancer Res.* 1999;*5*(10):2810-9.
41. Egger G, Liang G, Aparicio A, Jones PA (2004). Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature* 429: 457–463.
42. Jones, P.A.; Baylin, S.B. The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat. Rev. Genet.* 2002, *3*, 415–428.
43. Board, R.E.; Knight, L.; Greystoke, A.; Blackhall, F.H.; Hughes, A.; Dive, C.;

Ranson, M. DNA methylation in circulating tumour DNA as a biomarker for cancer. *Biomark. Insights* 2008, 2, 307–319.

44. Bird, A. DNA methylation patterns and epigenetic memory. *Genes Dev.* **2002**, 16, 6–21.

45. Shaw R (2006). The epigenetics of oral cancer. *Int J Oral Maxillofac Surg* 35:101-108.

46. Jenuwein, T.; Allis, C.D. Translating the histone code. *Science* **2001**, 293, 1074–1080.

47. Staibano, S.; Mascolo, M.; Mancini, F.P.; Kisslinger, A.; Salvatore, G.; Di Benedetto, M.; Chieffi, P.; Altieri, V.; Prezioso, D.; Ilardi, G.; *et al.* Overexpression of chromatin assembly factor-1 (CAF-1) p60 is predictive of adverse behaviour of prostatic cancer. *Histopathology* **2009**, 54, 580–589.

48. Staibano, S.; Mascolo, M.; Rocco, A.; Lo Muzio, L.; Ilardi, G.; Siano, M.; Pannone, G.; Vecchione, M.L.; Nugnes, L.; Califano, L.; *et al.* The proliferation marker Chromatin Assembly Factor-1 is of clinical value in predicting the biological behaviour of salivary gland tumours. *Oncol. Rep.* **2011**, 25, 13–22.

49. Chang, H.H.; Chiang, C.P.; Hung, H.C.; Lin, C.Y.; Deng, Y.T.; Kuo, M.Y. Histone deacetylase 2 expression predicts poorer prognosis in oral cancer patients. *Oral Oncol.* **2009**, 45, 610–614.

50. Shen, J.; Huang, C.; Jiang, L.; Gao, F.; Wang, Z.; Zhang, Y.; Bay, J.; Zhou, H.; Chen, Q. Enhancement of cisplatin induced apoptosis by suberoylanilide hydroxamic acid in human oral squamous cell carcinoma cell lines. *Biochem. Pharmacol.* **2007**, 73, 1901–1909.

51. Lin PY, Yu SL and Yang PC: MicroRNA in lung cancer. *Br J Cancer* 103: 1144-1148, 2010.
52. Bartel DP. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 2004;116(2):281–97.
53. Griffiths-Jones S, Saini HK, van Dongen S, Enright AJ. MiRBase: tools for microRNA genomics. *Nucleic Acids Res* 2008;36:D154–8 (Database issue).
54. Huppi K, Volfovsky N, Mackiewicz M, Runfola T, Jones TL, Martin SE, et al. MicroRNAs and genomic instability. *Semin Cancer Biol* 2007;17(1):65–73.
55. Gorenchtein M, Poh CF, Saini R, Garnis C. MicroRNAs in an oral cancer context - from basic biology to clinical utility. *J Dent Res*. 2012;91(5):440-6.
56. Doench JG, Sharp PA. Specificity of microRNA target selection in translational repression. *Genes Dev* 2004;18:504–11.
57. Kent OA, Mendell JT. A small piece in the cancer puzzle: microRNAs as tumor suppressors and oncogenes. *Oncogene* 2006;25:6188–96.
58. Takamizawa J, Konishi H, Yanagisawa K, Tomida S, Osada H, Endoh H, et al. (2004). Reduced expression of the let-7 microRNAs in human lung cancers in association with shortened postoperative survival. *Cancer Res* 64:3753-3756.
59. Kumar MS, Lu J, Mercer KL, Golub TR, Jacks T. Impaired microRNA processing enhances cellular transformation and tumorigenesis. *Nat Genet* 2007;39:673–7.
60. Zhang HH, Wang XJ, Li GX, Yang E, Yang NM. Detection of let-7a microRNA by real-time PCR in gastric carcinoma. *World J Gastroenterol* 2007;13:2883–8.
61. He H, Jazdzewski K, Li W, et al. The role of microRNA genes in papillary

thyroid carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005;102:19075–80.

62. Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, et al. Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002;99:15524–9.

63. Chuang JC, Jones PA. Epigenetics and microRNAs. *Pediatr Res* 2007;61(5 Pt 2):24R–9R.

64. Lujambio, A.; Ropero, S.; Ballestar, E.; Fraga, M.F.; Cerrato, C.; Setién, F.; Casado, S.; Suarez-Gauthier, A.; Sanchez-Cespedes, M.; Git. A.; *et al.* Genetic unmasking of an epigenetically silenced microRNA in human cancer cells. *Cancer Res.* **2007**, *67*, 1424–1429.

65. Li JS, Huang HZ, Sun LJ, Yang M, Pan CB, Chen WL, et al. MiR-21 indicates poor prognosis in tongue squamous cell carcinomas as an apoptosis inhibitor. *Clin Cancer Res* 2009;15(12):3998–4008.

66. Wong TS, Liu XB, Ho ACW, Yuen APW, Ng RWM, Wei WI. Identification of pyruvate kinase type M2 as potential oncoprotein in squamous cell carcinoma of tongue through microRNA profiling. *Int J Cancer* 2008;123(2):251–7.

67. Jiang L, Liu XQ, Kolokythas A, Yu JS, Wang AX, Heidbreder CE, et al. Downregulation of the Rho GTPase signaling pathway is involved in the microRNA-138-mediated inhibition of cell migration and invasion in tongue squamous cell carcinoma. *Int J Cancer* 2010;127(3):505–12.

68. Liu X, Yu J, Jiang L, Wang A, Shi F, Ye H, et al. MicroRNA-222 regulates cell invasion by targeting matrix metalloproteinase 1 (MMP1) and manganese

superoxide dismutase 2 (SOD2) in tongue squamous cell carcinoma cell lines. *Cancer Genomics Proteomics* 2009;6(3):131–9.

69. Yu ZW, Zhong LP, Ji T, Zhang P, Chen WT, Zhang CP. MicroRNAs contribute to the chemoresistance of cisplatin in tongue squamous cell carcinoma lines. *Oral Oncol* 2010;46(4):317–22.

70. Hebert C, Norris K, Scheper MA, Nikitakis N, Sauk JJ. High mobility group A2 is a target for miRNA-98 in head and neck squamous cell carcinoma. *Mol Cancer* 2007;6:5.

71. Li J, Huang H, Sun L, Yang M, Pan C, Chen W, Wu D, Lin Z, Zeng C, Yao Y, Zhang Song E. MiR-21 indicates poor prognosis in tongue squamous cell carcinomas as an apoptosis inhibitor. *Clin Cancer Res.* 2009; 15:3998–4008.

72. Childs G, Fazzari M, Kung G, Kawachi N, Brandwein-Gensler M, McLemore M, et al. Low-level expression of microRNAs let-7d and miR-205 are prognostic markers of head and neck squamous cell carcinoma. *Am J Pathol* 2009;174(3):736–45.

73. Kozaki K, Imoto I, Mogi S, Omura K, Inazawa J. Exploration of tumor-suppressive microRNAs silenced by DNA hypermethylation in oral cancer. *Cancer Res* 2008;68(7):2094–105.

74. Kimura S, Naganuma S, Susuki D, Hirono Y, Yamaguchi A, Fujieda S, et al. Expression of microRNAs in squamous cell carcinoma of human head and neck and the esophagus: miR-205 and miR-21 are specific markers for HNSCC and ESCC. *Oncol Rep* 2010;23(6):1625–33.

75. Fletcher AM, Heaford AC, Trask DK. Detection of metastatic head and neck squamous cell carcinoma using the relative expression of tissue-specific mir- 205. *Transl Oncol* 2008;1(4):202–8.
76. Molinolo AA, Amornphimoltham P, Squarize CH, Castilho RM, Patel V, Gutkind JS (2009). Dysregulated molecular networks in head and neck carcinogenesis. *Oral Oncol* 45: 324–334.
77. Estilo CL, O-charoenrat P, Ngai I, Patel SG, Reddy G, Dao S, et al. The role of novel oncogenes squamous cell carcinoma-related oncogene and phosphatidylinositol 3-kinase p110a in squamous cell carcinoma of the oral tongue. *Clin Cancer Res* 2003;9:2300-6.
- 78, Watanabe S, Sato K, Okazaki Y, Tonogi M, Tanaka Y, Yamane GY (2009). Activation of PI3K-AKT pathway in oral epithelial dysplasia and early cancer of tongue. *Bull Tokyo Dent Coll* 50: 125–133.
79. Skinner HD, Giri U, Yang LP, et al. Integrative Analysis Identifies a Novel AXL-PI3 Kinase-PD-L1 Signaling Axis Associated with Radiation Resistance in Head and Neck Cancer. *Clin Cancer Res*. 2017;23(11):2713-2722.
80. Renner, O.; Blanco-Aparicio, C.; Carnero, A. Genetic modelling of the PTEN/AKT pathway in cancer research. *Clin. Transl. Oncol.* **2008**, *10*, 618–627.
81. Salvesen, H.B.; MacDonald, N.; Ryan, A.; Jacobs, I.J.; Lynch, E.D.; Akslen, L.A.; Das, S. PTEN methylation is associated with advanced stage and microsatellite instability in endometrial carcinoma. *Int. J. Cancer* **2001**, *91*, 22–26.
82. Soria, J.C.; Lee, H.Y.; Lee, J.I.; Wang, L.; Issa, J.P.; Kemp, B.L.; Liu, D.D.; Kurie, J.M.; Mao, L.; Khuri, F.R. Lack of PTEN expression in non-small cell lung

cancer could be related to promoter methylation. *Clin. Cancer Res.* **2002**, *8*, 1178–1184.

83. Kurasawa, Y.; Shiiba, M.; Nakamura, M.; Fushimi, K.; Ishigami, T.; Bukawa, H.; Yokoe, H.; Uzawa, K.; Tanzawa, H. PTEN expression and methylation status in oral squamous cell carcinoma. *Oncol. Rep.* **2008**, *19*, 1429–1434.

84. Díez-Pérez, R.; Campo-Trapero, J.; Cano-Sánchez, J.; López-Durán, M.; Gonzalez-Moles, M.A.; Bascones-Ilundain, J.; Bascones-Martinez, A. Methylation in oral cancer and pre-cancerous lesions (Review). *Oncol. Rep.* **2011**, *25*, 1203–1209.

85. Selcuklu SD, Donoghue MTA, Spillane C. MiR-21 as a key regulator of oncogenic processes. *Biochemical Society Transactions* 2009;37:918–25.

86. Park NJ, Zhou H, Elashoff D, Henson BS, Kastratovic DA, Abemayor E, et al. Salivary microRNA: discovery, characterization, and clinical utility for oral cancer detection. *Clin Cancer Res* 2009;15(17):5473–7.

87. Liu CJ, Kao SY, Tu HF, Tsai MM, Chang KW, Lin SC. Increase of microRNA miR-31 level in plasma could be a potential marker of oral cancer. *Oral Dis* 2010;16(4):360–4.

88. Wong TS, Ho WK, Chan JYW, Ng RWM, Wei WI. Mature miR-184 and squamous cell carcinoma of the tongue. *The scientific world journal* 2009;9:130–2.

89. Kota SK, Balasubramanian S. Cancer therapy via modulation of micro RNA levels: a promising future. *Drug Discov Today* 2010;15(17–18):733–40.

90. Bader AG, Brown D, Winkler M. The promise of microRNA replacement

therapy. *Cancer Res* 2010;70(18):7027–30.

91. Kozaki K, Imoto I, Mogi S, Omura K, Inazawa J. Exploration of tumor-suppressive microRNAs silenced by DNA hypermethylation in oral cancer. *Cancer Res* 2008;68(7):2094–105.

92. Yu ZW, Zhong LP, Ji T, Zhang P, Chen WT, Zhang CP. MicroRNAs contribute to the chemoresistance of cisplatin in tongue squamous cell carcinoma lines. *Oral Oncol* 2010;46(4):317–22.

