

THESE

En vue de l'obtention du grade de
Docteur de l'Université de Lille
Ecole Doctorale biologie - santé

Discipline : physiologie, physiopathologie, biologie systémique médicale

Spécialité : biochimie et biologie moléculaire

**Identification et caractérisation de nouveaux déterminants
moléculaires à l'origine de la résistance des tumeurs pulmonaires
au cisplatine et de ses effets néphrotoxiques**

Soutenue par

Edmone Dewaeles

Le 05 novembre 2019

Devant le jury composé de:

Madame le Professeur Xuefen Lebourhis	Examineur
Madame le Docteur Ingrid Struman	Rapporteur
Monsieur le Professeur Mickael Naassila	Rapporteur
Monsieur le Professeur Alexandre Hertig	Président
Monsieur le Docteur Nicolas Pottier	Directeur de thèse
Monsieur le Docteur David Blum	Directeur de thèse

THESE

En vue de l'obtention du grade de
Docteur de l'Université de Lille
Ecole Doctorale biologie - santé

Discipline : physiologie, physiopathologie, biologie systémique médicale

Spécialité : biochimie et biologie moléculaire

**Identification et caractérisation de nouveaux déterminants
moléculaires à l'origine de la résistance des tumeurs pulmonaires
au cisplatine et de ses effets néphrotoxiques**

Soutenue par

Edmone Dewaeles

Le 05 novembre 2019

Devant le jury composé de:

Madame le Professeur Xuefen Lebourhis	Examineur
Madame le Docteur Ingrid Struman	Rapporteur
Monsieur le Professeur Mickael Naassila	Rapporteur
Monsieur le Professeur Alexandre Hertig	Président
Monsieur le Docteur Nicolas Pottier	Directeur de thèse
Monsieur le Docteur David Blum	Directeur de thèse

Avant-Propos

La réponse aux médicaments est parfois variable d'un individu à l'autre en termes d'efficacité et de tolérance, ce qui rend dans certains cas leur utilisation difficile. En particulier, les anomalies de réponse aux agents anti-cancéreux exposent les patients soit à la survenue d'effets indésirables graves potentiellement mortels, soit à une perte d'efficacité de leurs propriétés anti-tumorales. Dans ce contexte, il apparaît particulièrement important de mener des projets de recherche translationnelle visant à optimiser leur utilisation. Depuis l'obtention de la première séquence de l'ADN humain au début des années 2000, puis son annotation, l'utilisation des outils de génomique à grande échelle s'est largement développée et a permis d'identifier en particulier de nouvelles classes d'ARN non codants, transcrits mais non traduits. Ces acides nucléiques représentent actuellement de nouveaux outils non seulement à visée diagnostique et pronostique mais également thérapeutique. En parallèle, les progrès fondamentaux en biologie ont permis de mieux comprendre les anomalies de réponse aux médicaments survenant chez certains patients et de proposer de nouvelles pistes pharmacologiques pour optimiser leur prise en charge.

Les travaux réalisés au cours de ma thèse s'inscrivent dans ce contexte de médecine personnalisée et visent notamment à mieux comprendre les mécanismes moléculaires à l'origine des anomalies de réponse au cisplatine, un anticancéreux largement utilisé en clinique, afin de proposer de nouvelles stratégies thérapeutiques permettant une meilleure prise en charge des patients traités par cette molécule. Deux axes ont ainsi été développés en parallèle au cours de cette thèse. Le premier concerne la résistance des tumeurs pulmonaires au cisplatine et l'identification d'un miARN impliqué dans ce processus. Le second, quant à lui, porte sur une méthode pharmacologique basée sur l'antagonisme du récepteur à l'adénosine A_{2A} permettant de limiter la néphrotoxicité du cisplatine.

Le manuscrit de cette thèse est organisé en deux grandes parties. La première partie, après une présentation générale du cancer du poumon, est focalisée sur le cisplatine, en particulier ses propriétés anti-tumorales ainsi que les mécanismes moléculaires et cellulaires susceptibles de limiter son utilisation (chimiorésistance et

effets indésirables). La deuxième partie présente les principaux résultats de nos travaux.

Cette thèse a été réalisée en cotutelle dans deux équipes de recherche : (i) l'EA4483 « Impact de l'environnement chimique sur la santé humaine » (Jean-Marc Lo Guidice) et (ii) l'UMR-S 1172 « Equipe Alzheimer et tauopathies » (Luc Buée). Ce travail a été financé en partie par la SATT Nord, le conseil régional des Hauts-de-France et la Ligue Régionale contre le Cancer.

Résumé

Le cancer du poumon est l'une des principales causes de décès par cancer dans le monde. Le cancer du poumon non à petites cellules est la forme la plus fréquente puisqu'elle représente 80% des cancers pulmonaires. Le traitement de référence pour cette pathologie est la chimiothérapie à base de dérivés du platine, en particulier le cisplatine. Malheureusement, l'utilisation de cette molécule peut être limitée par l'apparition de deux inconvénients majeurs : une chimiorésistance et des effets secondaires notamment néphrotoxiques.

Dans ce travail de thèse, nous avons cherché à identifier et caractériser de nouveaux déterminants moléculaires impliqués dans la chimiorésistance et/ou la toxicité rénale du cisplatine. Dans un premier temps, à l'aide d'un criblage fonctionnel dans la lignée cellulaire d'adénocarcinome pulmonaire humaine A549, nous avons identifié un miARN dont la surexpression diminue la sensibilité des cellules au cisplatine. Puis, nous avons étudié le mécanisme moléculaire à l'origine de ce phénomène de chimiorésistance et démontré son implication dans la régulation de voies de signalisation associées au processus apoptotique et au métabolisme de la vitamine B 6. Dans un second temps, nous avons évalué le rôle du récepteur à l'adénosine A_{2A} dans la toxicité rénale induite par le cisplatine. Nos résultats montrent en particulier que l'expression rénale de ce récepteur est augmentée dans un modèle murin de néphrotoxicité induite par le cisplatine et que sa modulation pharmacologique, à l'aide d'antagonistes sélectifs, diminue ses effets néphrotoxiques. De plus, dans un modèle de greffes syngéniques, nous avons montré que l'utilisation d'un antagoniste sélectif du récepteur à l'adénosine A_{2A} n'atténue pas les propriétés anti-tumorales du cisplatine.

Au total, ce travail nous a permis d'identifier de nouvelles stratégies thérapeutiques qui pourraient augmenter la sensibilité des adénocarcinomes pulmonaires au cisplatine et limiter ses effets néphrotoxiques.

Mots-clefs : cancer du poumon, chimiorésistance, microRNA, cisplatine, récepteurs à l'adénosine, néphrotoxicité

Abstract

Lung cancer is one of the leading causes of cancer death worldwide. Non-small cell lung cancer (NSCLC) is the most common form of cancer, accounting for 80% of lung cancer. Cisplatin combination therapy represents the cornerstone of NSCLC treatment. Unfortunately, its clinical use is limited by two major issues: chemoresistance and the occurrence of serious adverse side effects, such as renal toxicity. In this thesis work, we have sought to identify and characterize new molecular determinants involved in the chemoresistance and/or renal toxicity of cisplatin. First, using a functional screening in the human lung adenocarcinoma cell line A549, we identified a miRNA whose overexpression decreases cell sensitivity to cisplatin. Then, we studied the molecular mechanisms underlying chemoresistance and demonstrated involvement of this miRNA in the regulation of signaling pathways associated with the apoptotic process and the metabolism of vitamin B 6. Secondly, we evaluated the role of the adenosine A_{2A} receptor in cisplatin-induced renal toxicity. Our results showed that renal expression of this receptor is increased in a mouse model of cisplatin-induced nephrotoxicity and that pharmacological modulation of A_{2A}R, using selective antagonists, reduced cisplatin nephrotoxic effects. Lastly, using syngenic graft model, we showed that the administration of the selective A_{2A}R antagonist did not compromise the anti-tumor properties of cisplatin; Overall, this work uncovered new therapeutic strategies that could either increase the sensitivity of lung adenocarcinoma to cisplatin or limit its nephrotoxic effects.

Keywords: lung cancer, chemoresistance, microRNA, cisplatin, adenosine receptors, nephrotoxicity

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier les membres du jury d'avoir accepté d'examiner ce travail de thèse. Je remercie le Pr Mickael Naassila et le Dr Ingrid Struman qui ont accepté d'être mes rapporteurs.

Je remercie également le Pr Alexandre Hertig et le Dr Xuefen Lebourhis, qui ont suivi l'évolution de ce travail par l'intermédiaire des comités de suivi de thèse. Je les remercie particulièrement pour leur disponibilité et leur bienveillance.

Je tiens à remercier mes directeurs de thèse le Dr Nicolas Pottier, le Dr Christelle Cauffiez et le Dr David Blum qui ont accepté cette codirection. Je les remercie sincèrement pour leur compréhension, leur soutien, leur disponibilité.

Je remercie le Dr Jean-Marc Lo Guidice, directeur de l'EA4483 et Pr Luc Buée directeur de l'UMR1172 pour m'avoir permis de réaliser cette thèse au sein de leur laboratoire respectif.

Je remercie l'ensemble des membres des équipes EA4483 et UMR1172 pour leur soutien. Je remercie en particulier Julie et Emilie pour leur aide et les échanges précieux que nous avons partagés.

Je tiens également à remercier chaleureusement, le Dr Laurent Dubuquoy et le Dr Thierry Jouault pour leurs conseils et leurs encouragements.

Je remercie Emmanuel Graj pour son aide matérielle et logistique.

Enfin, j'adresse mille mercis à ma famille pour leur patience, leurs encouragements et leur tolérance.

Valorisation des travaux de thèse et travaux collaboratifs

Brevet

Pottier N, Cauffiez C, Savary G, **Dewaeles E**, Van der Hauwaert C, Mari B. Agents for the treatment of patients with NSCLC and methods to predict response, accepté le 31 mai 2018 (WO-2018096060-A1)

Articles scientifiques

2019

Hamroun A, Lenain R, Bigna JJ, Speyer E, Bui L, Chamley P, Pottier N, Cauffiez C, **Dewaeles E**, Dhalluin X, Scherpereel A, Hazzan M, Maanaoui M, Glowacki F2. Prevention of Cisplatin-Induced Acute Kidney Injury: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Drugs*. (IF 2017: 4.69)

Savary G, **Dewaeles E**, Diazzi S, Buscot M, Nottet N, Fassy J, Courcot E, Henaoui I-S, Lemaire J, Martis N, Van der Hauwaert C, Pons N, Magnone V, Leroy S, Plantier L, Lebrigand K, Paquet A, Lino Cardenas CL, Vassaux G, Crestani B, Wallaert B, Rezzonico R, Brousseau T, Glowacki F, Bellusci S, Perrais M, Broly F, Barbry P, Marquette C-H, Cauffiez C, Mari B, Pottier N. The long non-coding RNA DNMT3OS is a reservoir of fibromiRs with major functions in lung fibroblast response to TGF- β and pulmonary fibrosis. *Am J Respir Crit Care Med*. (IF 2017: 15.24)

2018

Vandenbussche C*, Van der Hauwaert C*, **Dewaeles E**, Franczak J, Hennino MF, Gnemmi V, Savary G, Tavernier Q, Nottet N, Paquet A, Perrais M, Blum D, Mari B, Pottier N, Glowacki F, Cauffiez C. Tacrolimus-induced nephrotoxicity in mice is associated with microRNA deregulation. *Arch Toxicol*. 2018, 92, 1539-1550 (IF 2016: 5.901)

2013

Henaoui IS, Cauffiez C, Aubert S, Buscot M, **Dewaeles E**, Copin MC, Marquette CH, Barbry P, Perrais M, Pottier N, Mari B. miR-199a-5p in idiopathic pulmonary fibrosis. *Med Sci*. 2013 May;29(5):461-3

Lino Cardenas CL, Henaoui IS, Courcot E, Roderburg C, Cauffiez C, Aubert S, Copin MC, Wallaert B, Glowacki F, **Dewaeles E**, Milosevic J, Maurizio J, Tedrow J, Marcet B, Lo-Guidice JM, Kaminski N, Barbry P, Luedde T, Perrais M, Mari B, Pottier N.. miR-199a-5p is upregulated during fibrogenic response to tissue injury and mediates TGFbeta-induced lung fibroblast activation by targeting caveolin-1. *PLoS Genet*. 2013 Feb;9(2):e1003291

Posters

2019

Julie Lemaire, Cynthia Van der Hauwaert, Grégoire Savary, **Edmone Dewaeles**, Corentin De Sousa, Christelle Cauffiez, Nicolas Pottier. Role and therapeutic potential of polycistronic ncRNA MIR17HG in pulmonary carcinogenesis. JDD, CANTHER, March 2019.

2018

Cauffiez C, Savary G, **Dewaeles E**, Lemaire J, Glowacki F, Pottier N. DN3OS non-coding RNA as a new therapeutic target in the context of renal fibrosis. ASN Kidney Week, San Diego, CA, October 2018.

Van Der Hauwaert C, Hennino MF, Vandenbussche C, **Dewaeles E**, Gnemmi V, Savary G, Pottier N, Glowacki F, Cauffiez C. Implication de miR-21 dans les agressions rénales. 3^{ième} Congrès de la Société Francophone de Néphrologie, Dialyse et Transplantation. Lille, France, October 2018.

Van der Hauwaert C, **Dewaeles E**, Savary G, Lemaire J, Cauffiez C, Pottier N. Identification de nouveaux déterminants moléculaires à l'origine de la résistance des tumeurs pulmonaires non à petites cellules aux inhibiteurs de l'activité tyrosine

kinase de l'EGFR. 11èmes journées scientifiques du canceropôle nord-ouest, Deauville, France, May 2018.

Dewaeles E, Lemaire J, Van der Hauwaert C, Savary G, Blum D, Cauffiez C, Pottier N. Identification and characterization of new determinants of cisplatin resistance in lung adenocarcinoma, The multiple facets of RNA in development and disease, Nice, France, february 2018.

2012

Henaoui IS, Lino Cardenas CL, Roderburg C, **Dewaeles E**, Cauffiez C, Aubert S, Copin MC, Glowacki F, Marcet B, Kaminski N, Barbry P, Luedde T, Perrais M, Pottier N, Mari B. miR-199a-5p is dysregulated during the fibrogenic response to tissue injury and mediates multiple components of the TGFbeta pathway in lung fibroblasts. 4th EMBO meeting, Nice, France, September 2012

SOMMAIRE

Avant-Propos	1
Résumé	3
Abstract	4
Remerciements	5
Valorisation des travaux de thèse et travaux collaboratifs.....	6
SOMMAIRE	9
ABBREVIATIONS.....	12
I. Introduction.....	16
A. Les cancers du poumon.....	16
1. Epidémiologie.....	16
2. Diagnostic	16
3. Classification histologique et stades	17
a) Sous types histologiques	17
(1) Les adénocarcinomes	17
(2) Les carcinomes épidermoïdes	18
(3) Les carcinomes à large cellules.....	19
b) Stades	19
4. Traitements	20
a) Cancers Pulmonaires à Petites Cellules (CPPC)	20
b) Cancers Pulmonaires Non à Petites Cellules (CPNPC).....	21
(1) Tumeurs résécables.....	21
(2) Tumeurs localement avancées, non résécables et non métastatiques	21
(3) Tumeurs métastatiques.....	21
B. Le cisplatine	23
1. Mode d'action du cisplatine	23
a) Mécanismes génotoxiques	24
b) Mécanismes extranucléaires	26
c) Mort cellulaire induite par le cisplatine	26
(1) Voie des récepteurs de mort.....	26
(2) Voie mitochondriale	27
2. Mécanismes moléculaires à l'origine de la résistance au cisplatine	29

a)	Mécanismes de résistance en amont de la cible.....	30
(1)	Diminution de l'accumulation du cisplatine.....	30
(a)	Les transporteurs de cuivre CRT1 et CRT2 (transporteurs d'influx).....	30
(b)	Les transporteurs P-type ATPase (transporteurs d'efflux).....	30
(c)	Les transporteurs de type ATP-binding cassette (ABC) (transporteurs d'efflux) ..	31
(2)	Diminution de la forme active du cisplatine	31
b)	Résistance liée aux dommages moléculaires (effet « on target »)	32
(1)	Activation des complexes protéiques impliqués dans les réparations de l'ADN	32
(a)	Réparation par excision de nucléotides (système NER).....	33
(b)	Les altérations du MMR	34
(2)	Tolérance aux lésions nucléotidiques induites par le cisplatine : mécanisme de synthèse translésionnelle.....	35
(3)	Altérations des systèmes de réparation des cassures double brin	36
c)	Résistance due à l'altération des voies de signalisation (post target)	37
d)	Résistance « off target ».....	38
3.	Toxicité du cisplatine	39
a)	Neurotoxicité périphérique.....	39
b)	Ototoxicité.....	40
c)	Néphrotoxicité.....	40
II.	Travaux personnels	42
A.	Objectifs.....	42
B.	Implication des miARN dans la résistance des tumeurs pulmonaires au cisplatine	43
1.	Généralités	43
a)	Classification des ARN non codants	43
b)	Découverte des microARN	43
c)	Biogenèse	44
d)	Mécanisme d'action des miARN.....	46
(1)	Reconnaissance de l'ARNm cible par le miARN.....	46
(2)	Mécanisme de répression	47
e)	Fonctions biologiques.....	48
2.	Contexte des travaux.....	50
3.	Objectifs des travaux.....	51
4.	Matériel et méthodes.....	51
5.	Résultats	56

6. Discussion	69
C. Prévention et traitement des effets néphrotoxiques du cisplatine grâce au blocage du récepteur adénoenergique A_{2A}	72
1. Généralités	72
a) L'adénosine.....	72
(1) Biosynthèse de l'adénosine.....	73
b) Les récepteurs à l'adénosine	74
c) Le récepteur A_{2A}	76
(1) Fonction du récepteur A_{2A}	76
(2) Le récepteur A_{2A} et pathologie rénale.....	77
2. Contexte des travaux.....	79
3. Matériel et méthodes.....	80
4. Résultats	86
5. Discussion	100
III. Discussion générale et perspectives	103
Références Bibliographiques.....	111
ANNEXES.....	Erreur ! Signet non défini.

ABBREVIATIONS

ADN: acide désoxyribonucléique

AIF: apoptosis inducing factor

AK: adenosine kinase

AKT: protein kinase B

ALK: anaplastic lymphoma kinase

AMM: autorisation de mise sur le marché

AMP: adenosine monophosphate

Antago: antagonistes A_{2A}

AOX1: aldehyde oxidase 1

APN: aminopeptidase N

ARNlnc: acide ribonucléique long no codant

ARNm: acide ribonucléique messenger

ARNr: acide ribonucléique ribosomique

ARNt: acide ribonucléique de transfert

ATM: Ataxia telangiectasia mutated serine / threonine kinase

ATP: adenosine tri phosphate

ATP7A/B: copper transporting P-type adenosine triphosphatase 7A/B

ATR: ataxia telangiectasia mutated and Rad3 related serine / threonine kinase

Bak: Bcl2-homologous antagonist killer

Bax: Bcl2-associated X protein

BCA: bicinchoninic acid assay

Bcl2: B cell lymphoma protein

Bid: BH3 interacting domain death agonist

BRAF: B-Raf proto-oncogene

BRCA1/2: breast cancer 1/2

BSA: bovine serum albumin

Caf: cafeine

Caspase: cysteine aspartate specific proteinase

CCBL: cysteine S conjugate beta lyase
CDDP: cis-diaminedichloroplatine (II) ou cisplatine
CDK: cyclin dependent kinase
CEEA: comité d'éthique du bien-être animal
CHK1/2: checkpoint kinase ½
Cis: cisplatine
CPNPC: carcinomes pulmonaires non à petites cellules
CPPC: carcinomes pulmonaires à petites cellules
Ct: cycle threshold
CTP: cellules tubulaires proximales
CTR1: copper transporter receptor 1
DDR: Dna damage response
DGCR8: digoxerges critical region gene 8
DNA-PK: DNA dependent protein kinase
DSBs: double strand breaks
Ecto-ADA: ecto-adenosine desaminase
EGFR: epidermal growth factor recptor
Endo-ADA: endo-adenosine desaminase
ER: endoplasmic reticulum
ERCC: excision repair cross complementation
ERK: Extracellular signal – regulated kinase
FADD: Fas associated death domain
FasL: Fas ligand
FDA: Food & Drug administration
FDR: False Discovery Rate
FOXO: Forkhead box O
GGT: gamma glutamyl transpeptidase
H&E: hematoxylin & eosin
HR: homologous recombination

IL-6: interleukin 6
IMS: mitochondria intermembrane space
KIM: kidney injury molecule
KRAS: Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog
KW: KW6002, istradefylline
LLC: lewis lung cancer
MATE: multidrug and toxin extrusion
Mcl1: myeloid cell leukemia protein 1
MEK: mitogen activated extracellular signal regulated protein kinase
MET: hepatocyte growth factor receptor
miARN: microARN
MLH: mutL homolog
MMR: mismatch repair
MOMP: mitochondria outer membrane permeability
MRN: MRE11:Rad50:NSB1 sensor complex
MRP2: multidrug resistance related protein 2
MSH: mutS homolog2
NER: nucleotide excision repair
NGAL: neutrophil gelatinase associated lipocalin
NHEJ: non homologous end joining
NSAID: non steroid anti-inflammatory drug
OCT2: organic cation transporter 2
PARP: poly(ADP-ribose) polymerase
PCA: principal component analysis
PCNA: proliferating cell nuclear antigen
PI3K: phosphatidyl inositol 3 kinase
PIKK: phosphatidyl inositol kinase related protein kinase
piRNA: piwi-interacting ribonucleic acid
PMS: post meiotic segregation gene

PN: pyridoxine
PNPO: pyridoxamine 5'-phosphate oxidase
PPIA: cyclophilin A
PTPC: permeability transition pore complex
PUMA: p53 regulated mediator of apoptosis
Raf: rapidly accelerated fibrosarcoma
Ras: Rat Sarcoma viral oncogene
RFC: replication factor
RISC: RNA induced silencing complex
RLU: relative light unit
RNAi: ribonucleic acid interference
ROS: reactive oxygen species
RPA: replication protein A
SAH: S-adénosylhomocystéine
SAM: S-adénosylméthionine
SDS: sodium dodecyl sulfate
SEM: Standard error of the mean
siRNA: small interfering RNA
tBid: truncated Bid
TBS: tris(hydroxymethyl)amino methane buffered saline
TCGA: the cancer genome atlas
TFIIH: transcriptor factor II H complex
TNF: tumor necrosis factor
TRADD: TNFR-associated death domain
TRBP: Transactivating response (TAR) RNA binding protein
UTR: untranslated transcribed region
VDAC: voltage-dependent anion channel
XPA/C/F/G: xeroderma pigmentosum complementation group A/C/F/G
 $\Delta\Psi_m$: mitochondrial transmembrane potential

I. Introduction

A. Les cancers du poumon

1. Epidémiologie

Le cancer du poumon est le cancer le plus fréquent et le plus meurtrier à travers le monde. Il constitue en effet la première cause de décès par cancer chez les hommes et la seconde cause de décès par cancer (après le cancer du sein) chez les femmes à l'échelle mondiale (Bray *et al.*, 2018). En France, les cancers broncho-pulmonaires, avec 45 000 nouveaux cas diagnostiqués chaque année, font partie des cancers les plus fréquents. L'incidence en France des cancers du poumon est stable chez les hommes, mais est en nette progression chez les femmes (De Groot *et al.*, 2018). Le tabac représente le principal facteur de risque de cancer du poumon avec près de 90% des cas liés au tabagisme (Doll and Hill, 1950; Wynder and Graham, 1950; De Groot and Munden, 2012). La fumée de tabac contient en effet près de 7000 substances chimiques dont près de 70 sont connues pour être cancérigènes (IARC, 2004; Meyers *et al.*, 2017). Le risque du cancer du poumon est de plus proportionnel à la quantité de cigarettes consommées. D'autres facteurs environnementaux sont significativement associés à la survenue de cancers pulmonaires, en particulier la pollution atmosphérique, l'exposition à l'amiante ou au radon (De Groot and Munden, 2012).

2. Diagnostic

Le cancer du poumon est dans la plupart des cas difficile à diagnostiquer à un stade précoce car les patients restent longtemps asymptomatiques (Spiro, Gould and Colice, 2007). Les premiers symptômes tels qu'une toux persistante, une dyspnée ou la présence d'hémoptysies apparaissent alors que la maladie s'est déjà développée et a disséminé localement ou dans tout l'organisme. Le diagnostic des cancers broncho-pulmonaires repose sur l'imagerie thoracique (radiographie ou scanner), qui permet de détecter la tumeur, en précisant sa localisation, sa taille et l'étendue des lésions, ainsi que l'étude anatomopathologique d'une biopsie tumorale pour

confirmer le diagnostic, et établir son type histologique (Silvestri *et al.*, 2003).

3. Classification histologique et stades

a) Sous types histologiques

Les cancers du poumon sont divisés en deux entités distinctes : les cancers du poumon non à petites cellules (CPNPC, 85% des cas) et les cancers du poumon à petites cellules (CPPC, 15% des cas) (Fujimoto and Wistuba, 2014).

Les CPNPC, comprennent trois principaux sous-types histologiques: les adénocarcinomes, les carcinomes épidermoïdes (ou squameux) et les carcinomes à grandes cellules (Travis *et al.*, 2011) (**Figure 1**).

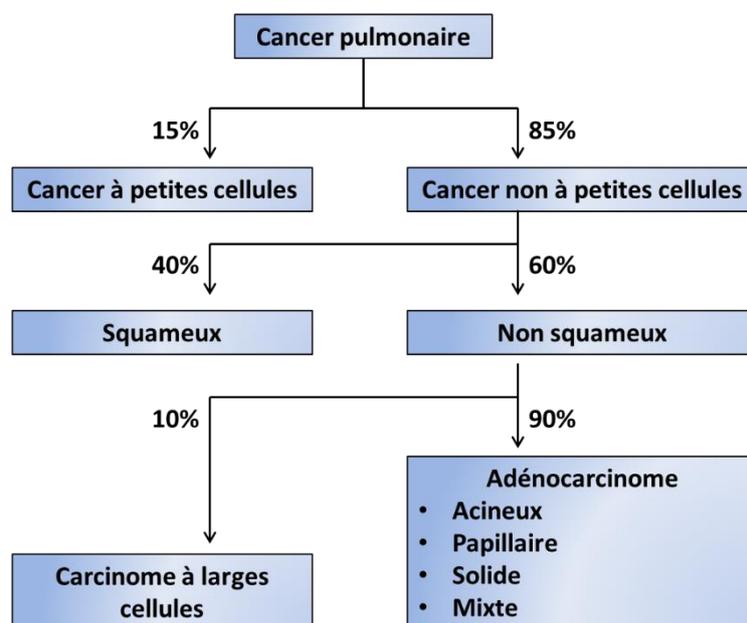


Figure 1: Répartition des différents types histologiques dans le cancer du poumon, d'après Gridelli *et al.*, 2015

(1) Les adénocarcinomes

L'adénocarcinome est la forme la plus fréquente des CPNPC. Il représente 60% des CPNPC et 40% des cancers du poumon (Dela Cruz, Tanoue and Matthay, 2011). L'adénocarcinome est défini comme une tumeur épithéliale maligne à différenciation glandulaire. L'adénocarcinome peut-être de type acineux, papillaire ou solide (**Figure 2**). La forme mixte représente 80 % des adénocarcinomes pulmonaires (Travis *et al.*, 2013, 2015).

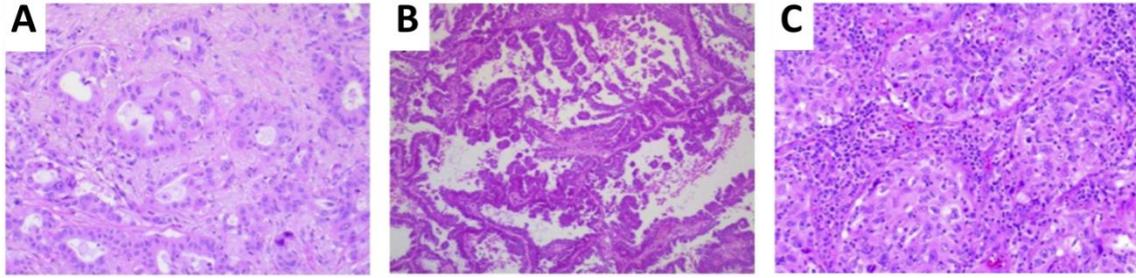


Figure 2: Coupes histologiques d'adénocarcinomes pulmonaires. (A) Adénocarcinome acineux (H&E, grossissement X200). (B) Adénocarcinome papillaire (H&E, grossissement X200). (C) Adénocarcinome solide (H&E, grossissement X100) d'après Zheng, 2016.

(2) Les carcinomes épidermoïdes

Les carcinomes épidermoïdes représentent 20% des cancers du poumon (Dela Cruz, Tanoue and Matthay, 2011) et sont définis comme des tumeurs épithéliales malignes présentant une kératinisation et/ou des ponts intercellulaires ou exprimant des marqueurs de différenciation de cellules squameuses en immunohistochimie (Travis *et al.*, 2015) (**Figure 3**).

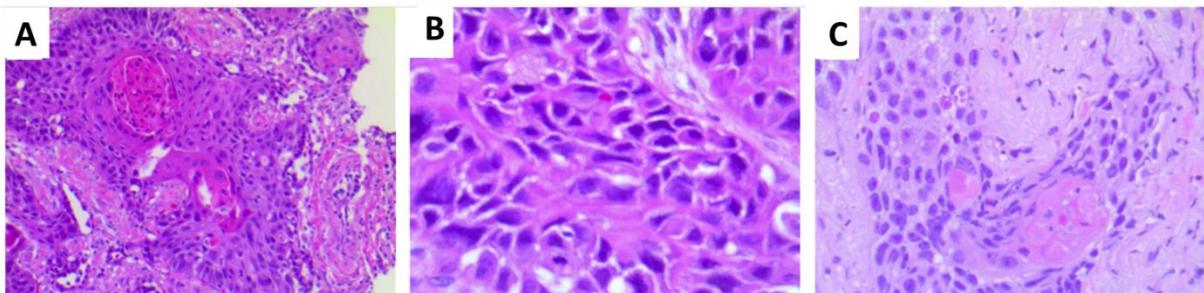


Figure 3: Coupes histologiques de carcinomes épidermoïdes pulmonaires. (A) Carcinome épidermoïde kératinisant (H&E, grossissement X200). (B) Formation de pont intercellulaire (H&E, grossissement X400). (C) Carcinome épidermoïde non kératinisant (H&E, grossissement X400) d'après Zheng, 2016.

(3) Les carcinomes à larges cellules

Définis comme des carcinomes indifférenciés dépourvus de composante épidermoïde ou glandulaire, ils représentent la forme minoritaire des CPNPC et 3% de l'ensemble des cancers du poumon (Dela Cruz, Tanoue and Matthay, 2011; Travis *et al.*, 2015) (**Figure 4**).

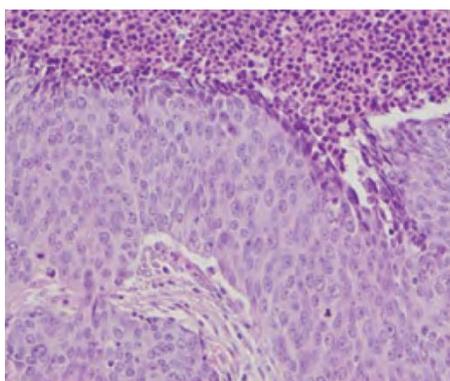


Figure 4: Coupe histologique d'un carcinome pulmonaire à larges cellules (H&E, grossissement X400) d'après Sholl, 2014.

b) Stades

Le stade de la tumeur est déterminé à partir de la classification TNM. Celle-ci s'appuie sur trois paramètres : la taille et la propagation de la tumeur sur le site primitif (T), la propagation aux ganglions lymphatiques environnants (N) et la présence ou non de métastases (M). Quatre stades sont ainsi définis, le stade IV correspondant à la forme la plus avancée pour laquelle le pronostic est le plus défavorable (**Tableau 1**). La classification TNM présente un intérêt pronostique majeur et oriente la décision thérapeutique du clinicien. Plusieurs révisions de cette classification ont déjà été réalisées pour améliorer la prise en charge des patients et leur survie (Goldstraw *et al.*, 2016).

Tableau 1 : Classification des cancers pulmonaires non à petites cellules, selon la 7ème édition de la classification TNM , d'après Goldstraw *et al.*, 2007.

stade	Tumeur (T)	Ganglions lymphatiques (N)	Métastases (M)
0	T in situ	N0 (pas d'atteinte ganglionnaire)	M0 (pas de métastase à distance)
Ia	T1a (T < 2cm) T1b (2cm < T < 3cm)	N0 N0	M0 M0
Ib	T2a (3cm < T < 5cm)	N0	M0
IIa	T1a, T1b T2a T2b (5cm < T < 7cm)	N1 (ganglions péribronchiques ou hilaires et intrapulmonaires) N1 N0	M0 M0 M0
IIb	T2b T3 (T > 7cm)	N1 N0	M0 M0
IIIa	T1, T2 T3 T4 (dissémination)	N2 (ganglions médiastinaux) N1, N2 N0, N1	M0 M0 M0
IIIb	T4 Plusieurs tumeurs	N2 N3 (ganglions médiastinaux, hilaires ou supraclaviculaires)	M0 M0
IV	Plusieurs tumeurs Plusieurs tumeurs	Plusieurs ganglions Plusieurs ganglions	M1a (métastases lobaires ou pleurales) M1b (métastases à distance)

4. Traitements

La prise en charge des patients atteints de cancers broncho-pulmonaires inclut différentes options thérapeutiques notamment la chirurgie, la chimiothérapie, la radiothérapie, ainsi que le recours aux thérapies ciblées ou encore à l'immunothérapie. Ces différents traitements peuvent être administrés seuls ou en combinaison. Leur utilisation varie en fonction du type de cancer, du stade tumoral et de l'état général du patient.

a) Cancers Pulmonaires à Petites Cellules (CPPC)

Les CPPC représentent un type de cancer particulièrement agressif se caractérisant par une croissance tumorale rapide et un fort potentiel métastatique. De ce fait, les patients atteints sont fréquemment diagnostiqués à un stade disséminé où la chirurgie n'est plus applicable et sont inclus dans des protocoles chimiothérapeutiques à base de sels de platine (cisplatine ou carboplatine) associés à l'étoposide (Altan and Chiang, 2015). Malgré une chimio-sensibilité initiale

importante, ces patients développent rapidement une résistance aux agents anti-cancéreux (Alvarado-luna and Morales-espinoza, 2016) et leur pronostic est de ce fait particulièrement défavorable. Aucune thérapie ciblée n'est à l'heure actuelle recommandée dans la prise en charge des CPPC.

b) Cancers Pulmonaires Non à Petites Cellules (CPNPC)

Les CPNPC forment un groupe de pathologies hétérogènes. Leur traitement dépend de l'état clinique du patient, du stade de la maladie et du profil moléculaire de la tumeur. Au diagnostic, environ 20% des patients présentent des tumeurs localisées résécables (stade I ou II), 30% des patients présentent des tumeurs localement avancées (stade IIIA et IIIB) et environ la moitié des patients présentent un stade avancé métastatique (stade IV).

(1) Tumeurs résécables

La chirurgie reste le traitement curatif le plus efficace car il permet l'exérèse de la tumeur. Ce traitement ne concerne cependant que les patients atteints d'un cancer pulmonaire à un stade précoce (stades I ou II, voire IIIA), soit une minorité de patients. Le traitement consiste alors en une lobectomie, pouvant être étendue selon le cas à une pneumonectomie, et d'un curage ganglionnaire. Une chimiothérapie post-opératoire est également administrée pour les stades II et IIIA, celle-ci augmente de 5 à 10% la survie à 5 ans du patient (Dunant, Pignon and Le Chevalier, 2005). Une radiothérapie peut-être également proposée selon l'étendue des lésions.

(2) Tumeurs localement avancées, non résécables et non métastatiques

Selon la classification TNM, il s'agit des tumeurs pulmonaires de stade III non opérables. Ces patients sont éligibles à un traitement associant chimiothérapie et radiothérapie de manière simultanée ou séquentielle. Des protocoles de chimiothérapie associant cisplatine et étoposide ou vinorelbine sont couramment utilisés (Vansteenkiste *et al.*, 2013). Des traitements alternatifs notamment à base de taxol peuvent également être prescrits (Socinski, 2014).

(3) Tumeurs métastatiques

Pour ces tumeurs de stade IV, les cliniciens ont le plus souvent recours à des traitements systémiques tels que chimiothérapie conventionnelle, immunothérapie, radiothérapie ou encore thérapie ciblée. En effet, des progrès récents concernant les

mécanismes moléculaires à l'origine du cancer du poumon ont permis l'avènement de plusieurs médicaments ciblant certains récepteurs ou protéines impliqués dans des voies de signalisation jouant un rôle important dans le processus tumoral. La prise en charge des patients atteints de CPNPC inclut donc actuellement une analyse moléculaire de la tumeur pour déterminer l'intérêt d'un traitement associant une thérapie ciblée (Pao and Girard, 2011). Ces analyses portent essentiellement sur l'identification d'altérations structurales au niveau des gènes *EGFR* (Epidermal Growth Factor Receptor), *HER2* (Erb-B2 Receptor Tyrosine Kinase 2), *MET* (MET Proto-oncogene, Receptor Tyrosine Kinase), *PI3KCA* (Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase Catalytic Subunit Alpha), *KRAS* (KRAS proto-oncogene, GTPase), *BRAF* (B-Raf proto-oncogene, serine/threonine kinase), *ALK* (Anaplastic Lymphoma Receptor tyrosine kinase) et *ROS1* (ROS proto-oncogene 1, Receptor Tyrosine Kinase) (Pao and Hutchinson, 2012) (**Figure 5**).

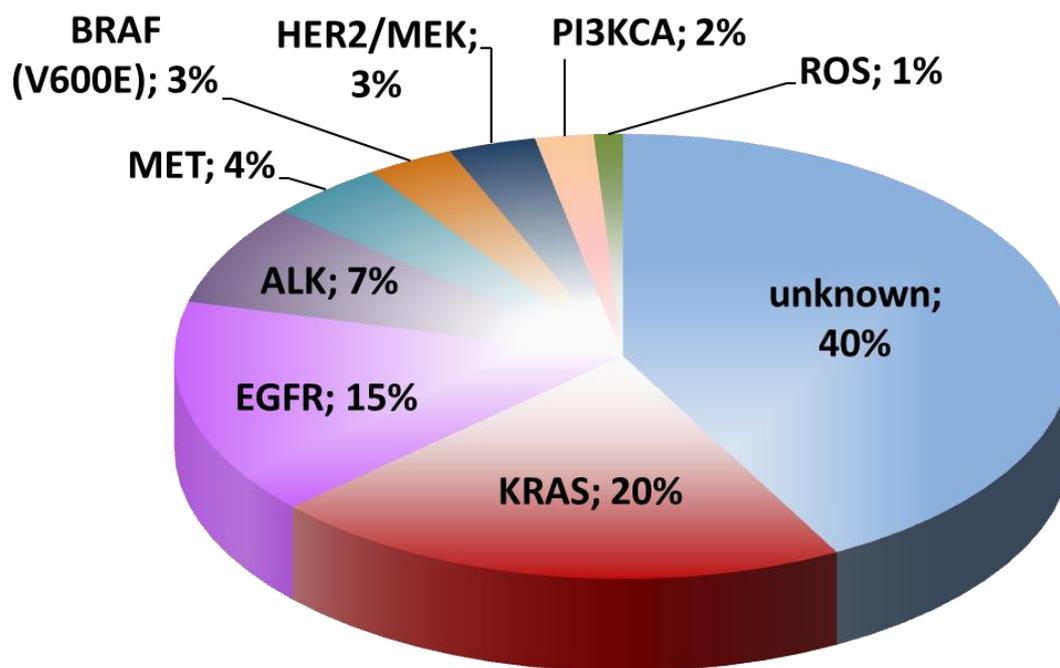


Figure 5: Distribution des altérations moléculaires identifiées dans les cancers pulmonaires non à petites cellules. EGFR (Epidermal Growth Factor Receptor), HER2 (Erb-B2 Receptor Tyrosine Kinase 2), MET (MET Proto-oncogene, Receptor Tyrosine Kinase), PI3KCA (Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase Catalytic Subunit Alpha), KRAS (KRAS proto-oncogene, GTPase), BRAF (B-Raf proto-oncogene, serine/threonine kinase), ALK (Anaplastic Lymphoma Receptor tyrosine kinase) et ROS1 (ROS proto-oncogene 1, Receptor Tyrosine Kinase) d'après Pao and Hutchinson, 2012.

B. Le cisplatine

Le cis-diaminedichloroplatine (II) (CDDP ou cisplatine) a été synthétisé pour la première fois en 1845 par le chimiste Michele Peyrone (Peyrone, 1845). Cependant, il s'écoulera plus de 120 ans avant que Rosenberg ne découvre ses propriétés anti prolifératives sur des cultures de bactéries puis sur des tumeurs solides (Rosenberg, Van Camp and Thomas, 1965; Rosenberg *et al.*, 1969). Ainsi, le cisplatine recevra une autorisation de mise sur le marché aux Etats-Unis en 1978 pour le traitement du cancer des testicules et de l'ovaire (Kelland, 2007). Il est encore de nos jours l'agent anti-néoplasique le plus largement utilisé pour le traitement des cancers (Galanski, 2006).

Les chercheurs ont développé des dérivés du cisplatine dans le but de limiter certains inconvénients liés à sa très grande réactivité chimique. Ainsi, le carboplatine et l'oxaliplatine sont deux analogues du cisplatine également approuvés dans le monde pour le traitement des cancers (Wheate *et al.*, 2010; Bowden, 2014; Galluzzi *et al.*, 2014).

1. Mode d'action du cisplatine

Le CDDP est caractérisé par une configuration en plan carré composé d'un atome de platine central, de deux groupements amine et deux groupements chlorure (**Figure 6**). Ce dérivé, administré par voie intraveineuse, est inerte dans la circulation sanguine car la concentration en ions chlorure y est relativement élevée, ce qui empêche son hydrolyse.

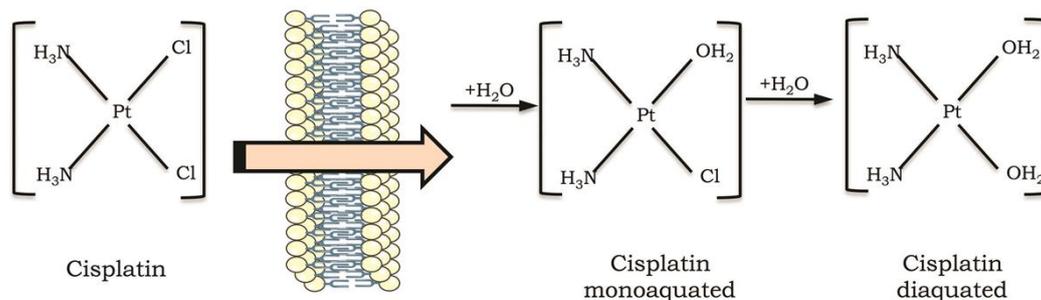


Figure 6: Hydrolyse du cisplatine. D'après Rocha *et al.*, 2018

Lors de son entrée dans le cytoplasme par diffusion passive ou à l'aide de transporteurs du cuivre tels que CRT1 (copper transporter receptor 1), les groupements chlorures sont substitués par des molécules d'eau (**Figure 6**). Ce processus spontané « d'aquation », dû à la faible concentration en chlorure dans le cytoplasme des cellules, aboutit à la formation de cisplatine chargé positivement hautement électrophile et très réactif vis-à-vis des substances nucléophiles telles que les acides nucléiques, les protéines, les molécules contenant des thiols comme le glutathion, les cystéines ou les méthionines (Kelland, 2000; Wang and Lippard, 2005). Ces différentes interactions sont responsables des effets cytotoxiques du cisplatine (**Figure 7**).

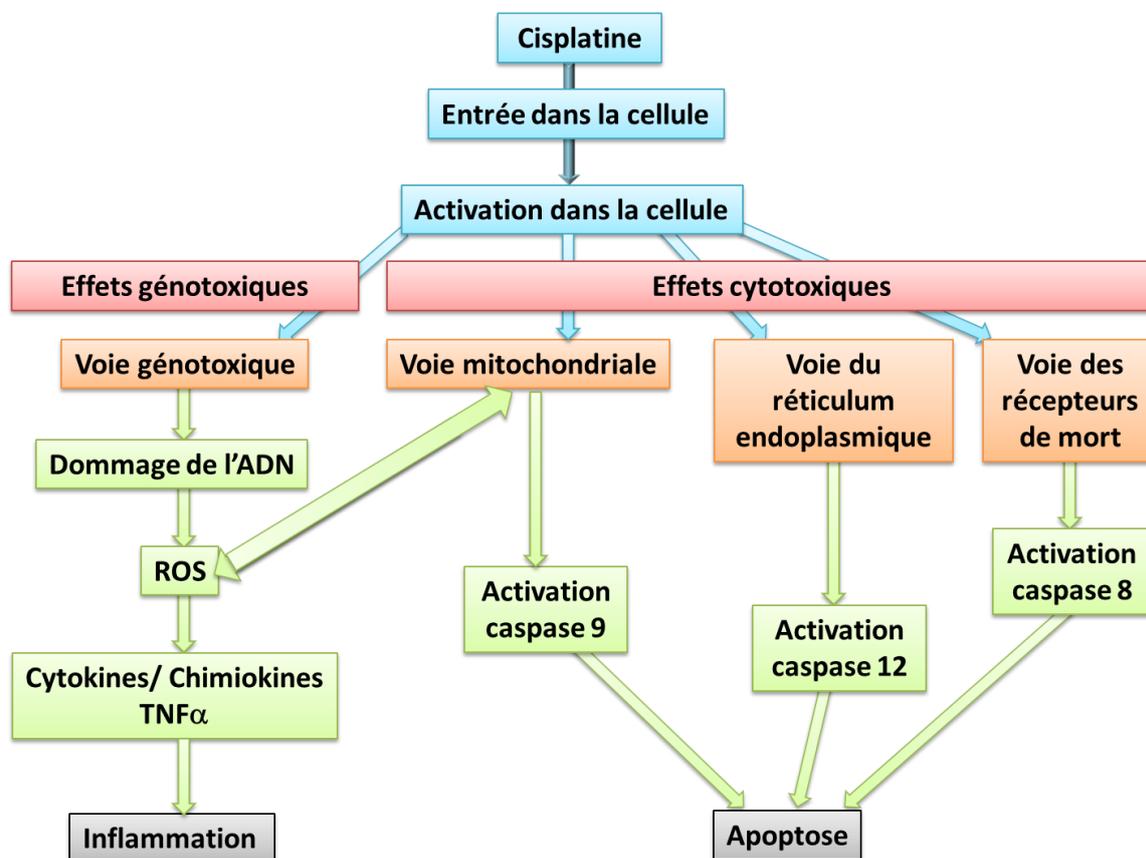


Figure 7: Schéma résumant les principales voies d'action du cisplatine d'après Manohar and Leung, 2018. ROS, reactive oxygen species, TNF α , tumor necrosis factor alpha.

a) Mécanismes génotoxiques

Le cisplatine appartient à la classe des agents alkylants. En effet, les dérivés électrophiles du cisplatine se fixent de manière covalente aux sites N7 des bases

puriques de l'ADN pour former des adduits principalement intra- ou inter-brins ainsi que des adduits intermoléculaires composés de complexes ADN-protéine (Takahara *et al.*, 1995; Wang and Lippard, 2005) (**Figure 8**). Lorsque les dommages à l'ADN dépassent un seuil critique, les cellules entrent soit en sénescence, soit activent le processus de mort cellulaire par apoptose. A l'inverse, lorsque les lésions de la molécule d'ADN sont limitées, les adduits formés entraînent des distorsions de la double hélice d'ADN, à l'origine d'un arrêt du cycle cellulaire en phases S et G2 pour permettre de mobiliser les voies de signalisation nécessaires au processus de réparation de l'ADN et éviter ainsi un processus de mitose abortif (Sorenson and Eastman, 1988; Mailand *et al.*, 2002; Nyberg *et al.*, 2002). De manière plus précise, la réponse aux dommages à l'ADN est initiée par le recrutement au niveau des sites lésés de trois kinases de la famille des PIKKs (phosphatidyl inositol kinase related protein kinase) : ATR (Ataxia telangiectasia mutated - and Rad3- related), ATM (Ataxia telangiectasia mutated) et DNA-PK (DNA dependent protein kinase). Ces kinases vont ensuite permettre l'activation de plusieurs systèmes de réparation des altérations de l'ADN, notamment la voie de réparation par excision des nucléotides (NER) et le système de réparation des bases mésappariées (MMR, mismatch repair) (Blackford and Jackson, 2017).

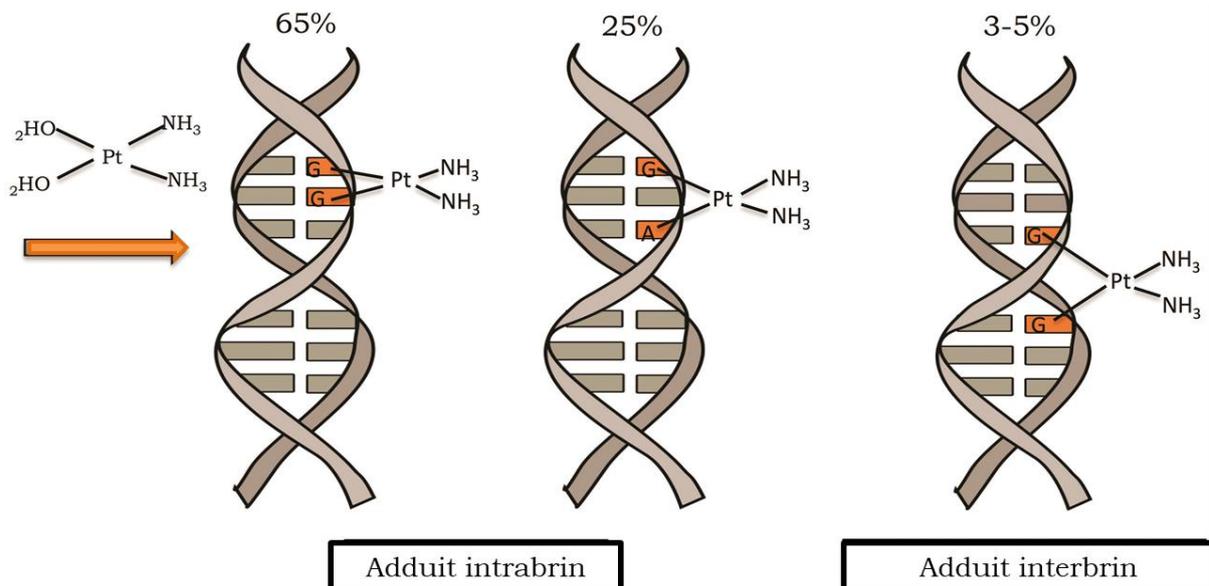


Figure 8: Effets génotoxiques du cisplatine. Formation des adduits à l'ADN par le cisplatine. 65% des adduits sont intrabrin entre deux guanines (GpG), 25% sont intrabrin entre une guanine et une adénosine (GpA) et 25% des adduits sont interbrins (GpG), d'après Rocha *et al.*, 2018.

b) Mécanismes extranucléaires

Il est désormais clairement établi que les effets cytostatiques et cytotoxiques du cisplatine ne sont pas uniquement médiés par son activité génotoxique mais font également intervenir des voies de signalisation cytoplasmiques. En effet, seul 1% du CDDP intracellulaire interagit avec l'ADN nucléaire (Gonzalez *et al.*, 2001). Au niveau cytoplasmique, le cisplatine établit des interactions avec les résidus cystéines de nombreuses protéines, en particulier la forme réduite du glutathion, des métallothionéines et des méthionines. Les liaisons covalentes ainsi formées participent aux effets cytotoxiques du cisplatine, notamment par l'augmentation du stress oxydatif qui renforce les dommages à l'ADN. De plus, elles favorisent la perméabilité mitochondriale et participent à l'activation du stress du réticulum endoplasmique (Mandic *et al.*, 2003; Martins *et al.*, 2011).

c) Mort cellulaire induite par le cisplatine

Les mécanismes moléculaires, à la base du potentiel cytotoxique du CDDP cytoplasmique, impliquent deux voies principales pour induire l'apoptose : la voie extrinsèque impliquant l'activation des récepteurs de mort, et la voie intrinsèque mitochondriale (Rebillard, Lagadic-Gossmann and Dimanche-Boitrel, 2008).

(1) Voie des récepteurs de mort

Dans cette voie dite extrinsèque, le cisplatine active des récepteurs de mort, tels que le récepteur TNF α et Fas, induisant le recrutement et l'activation de la caspase 8, qui à son tour permet l'activation des caspases effectrices 3, 6 et 7 du processus apoptotique (**Figure 9A**) (Dasari and Tchounwou, 2014).

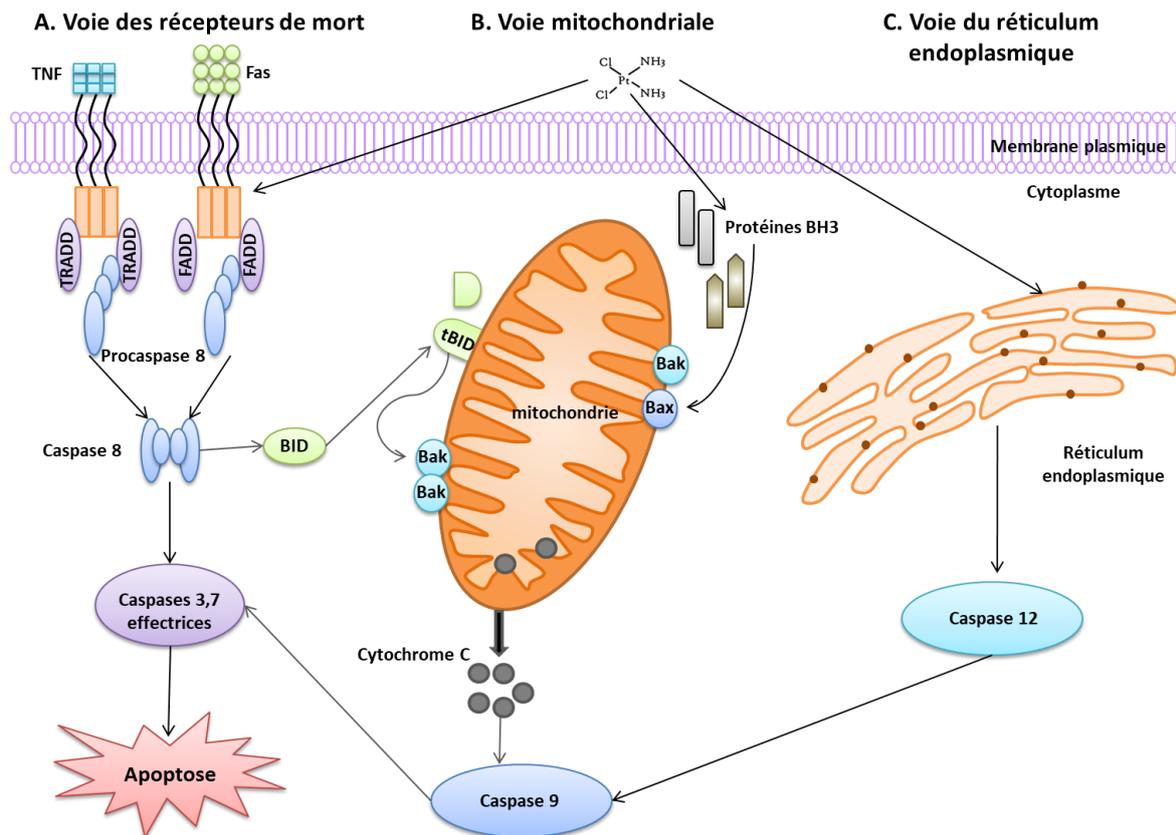


Figure 9: Voies d'induction de l'apoptose par le cisplatine. (A) Voie des récepteurs de mort. (B) Voie mitochondriale et (C) Voie du réticulum endoplasmique. TNF: Tumor necrosis factor receptor, TRADD: TNFR-associated death domain, FADD: Fas-associated death domain, tBID: truncated BH3 interacting domain death agonist, Bak: Bcl2-homologous antagonist/killer, Bax: Bcl2-associated X protein. D'après Hougardy *et al.*, 2005

(2) Voie mitochondriale

Dans cette voie, le cisplatine, *via* différents *stimuli* dont l'augmentation des espèces réactives de l'oxygène (ROS), induit un changement de conformation de Bax et Bak et leur migration au niveau de la membrane externe de la mitochondrie (Kroemer, Galluzzi and Brenner, 2007). L'activation de ces deux protéines est cruciale pour induire la perméabilisation de la membrane externe mitochondriale et permettre ainsi la libération de molécules apoptogènes telles que le cytochrome c dans le cytosol qui est à l'origine du recrutement et de l'activation de la caspase 9 (**Figure 9B**). Des protéines de la famille BH3 only, comme BIM et PUMA, peuvent aussi activer Bax et Bak et induire la libération du cytochrome c. Les caspases effectrices, notamment la caspase 3, seront ensuite activées pour aboutir au processus d'apoptose (Kroemer, Galluzzi and Brenner, 2007). De plus, le cisplatine peut induire la mort des cellules tumorales en agissant sur le canal VDAC (voltage dependant anion chanel) présent

au niveau de la membrane externe mitochondriale (**Figure 10**). Ce composant du PTPC (permeability transition pore complex) est en effet impliqué dans le changement de perméabilité de la membrane mitochondriale en favorisant l'activation de Bax (Tajeddine *et al.*, 2008).

L'activation de la voie du réticulum endoplasmique induit également la mort des cellules par apoptose (**Figure 9C**) (Szegezdi *et al.*, 2006). En effet, le CDDP induit un stress du réticulum entraînant l'activation de la caspase 12 pour aboutir à l'apoptose (Mandic *et al.*, 2003).

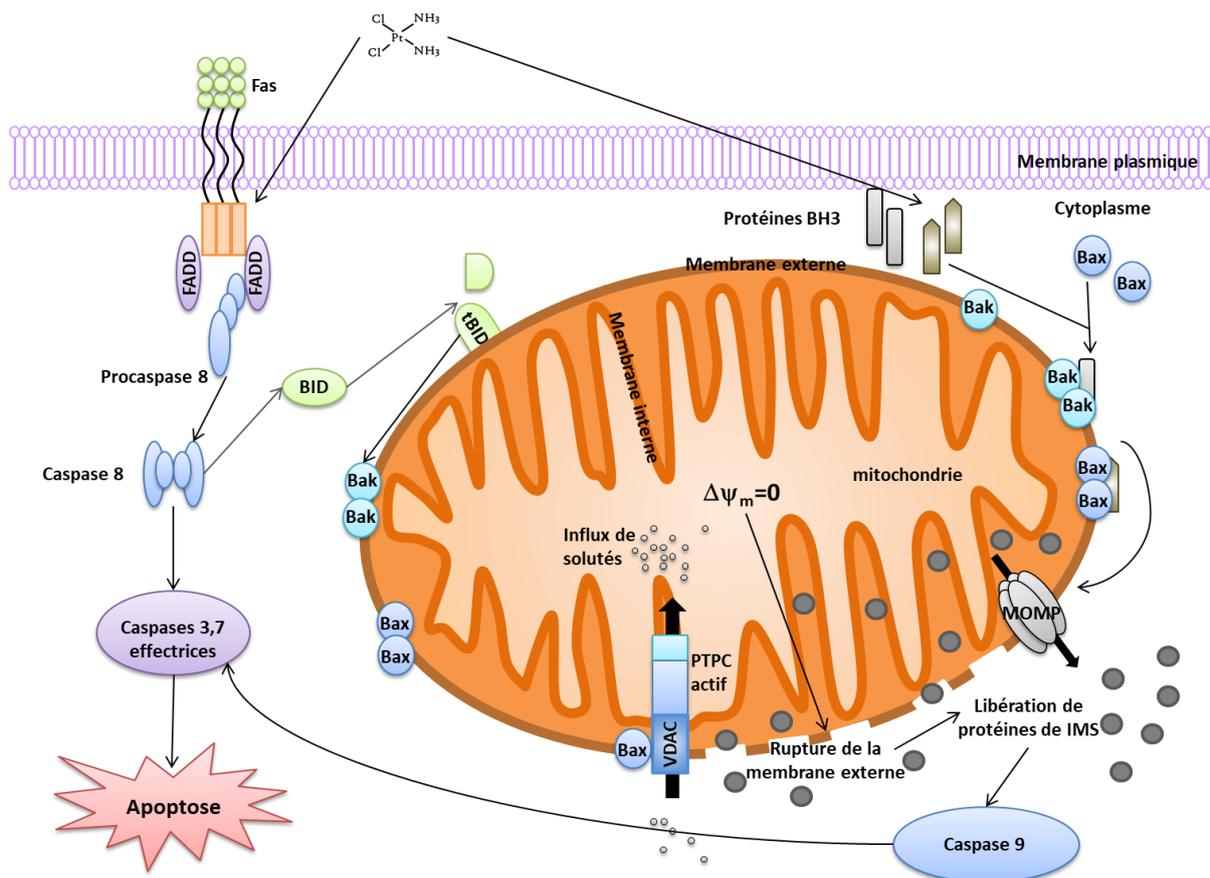


Figure 10: Voie mitochondriale d'induction de l'apoptose. Cette voie correspond à une perte de la perméabilité de la membrane externe mitochondriale. FADD: Fas-associated death domain, tBid: truncated BH3 interacting domain death agonist, Bak: Bcl2-homologous antagonist/killer, Bax: Bcl2-associated X protein, MOMP: mitochondria outer membrane permeability, IMS: mitochondrial intermembrane space, PTPC: Permeability transition pore complex, VDAC: voltage-dependent anion channel, $\Delta\Psi_m$: mitochondrial transmembrane perméability. D'après Fulda, Galluzzi and Kroemer, 2010.

2. Mécanismes moléculaires à l'origine de la résistance au cisplatine

Les protocoles de chimiothérapie à base de sels de platine utilisés dans les CPNPC présentent dans la majorité des cas des taux de réponse limités, principalement à cause du phénomène de chimiorésistance qui peut être soit acquis, soit intrinsèque (Kartalou and Essigmann, 2001). Les mécanismes à l'origine de ce phénomène de chimiorésistance sont nombreux et impactent soit (i) les processus situés en amont de l'interaction du cisplatine avec ses cibles qu'elles soient cytoplasmiques ou nucléaires, (ii) les dommages moléculaires directement induits par cette molécule (mécanisme de résistance « on-target »), (iii) les voies de signalisation létales faisant directement suite aux lésions moléculaires induites par le cisplatine (mécanismes de résistance en aval de la cible) et (iv) les circuits biologiques indirectement associés aux signaux induits par le cisplatine (mécanismes « off targets ») (Galluzzi *et al.*, 2014). Ces principaux mécanismes sont illustrés **Figure 11**. En général, la résistance est multifactorielle et plusieurs mécanismes peuvent coexister au sein d'une même cellule tumorale (Siddik, 2003).

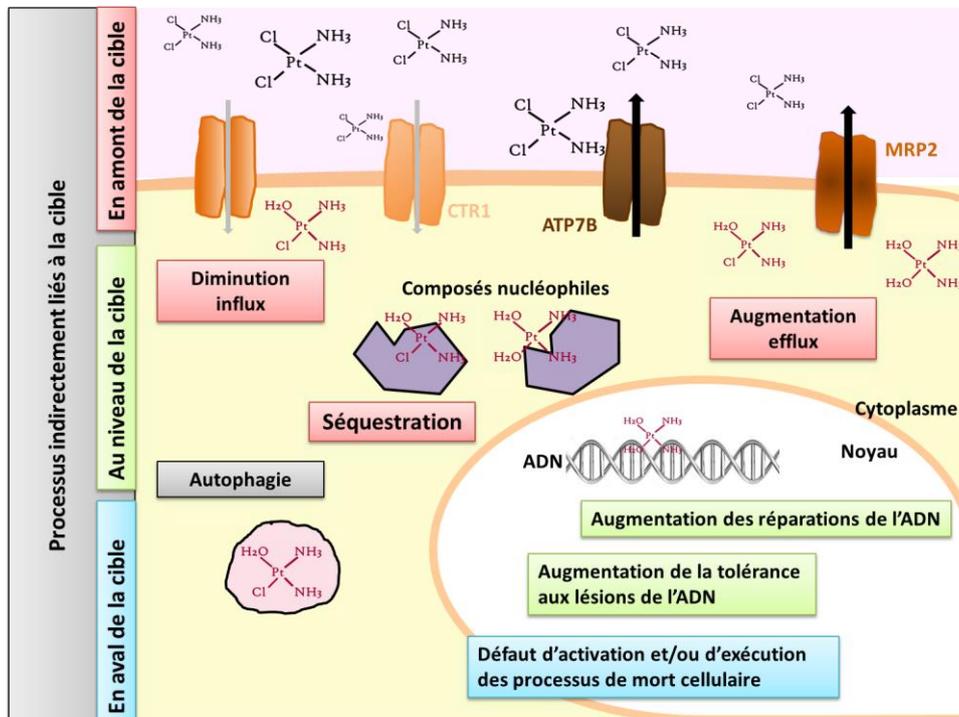


Figure 11: Mécanismes moléculaires à l'origine de la résistance au cisplatine. ATP7B: copper-transporting P-type adenosine triphosphatase 7B, CTR1: copper transporter receptor 1, MRP2: multidrug resistance associated transporter protein 2. D'après Galluzzi *et al.*, 2014.

a) Mécanismes de résistance en amont de la cible

La résistance au cisplatine peut se développer soit par inactivation de sa forme active, soit par diminution de sa concentration intracellulaire suite à un défaut de son entrée ou par augmentation de son export (Köberle, Tomicic, *et al.*, 2010).

(1) Diminution de l'accumulation du cisplatine

Il est désormais largement admis que le cisplatine pénètre dans la cellule par deux voies: la diffusion passive d'une part et par l'intermédiaire de transporteurs membranaires d'autre part (Kelland, 2000; Ishida *et al.*, 2002).

(a) Les transporteurs de cuivre CRT1 et CRT2 (transporteurs d'influx)

Alors qu'initialement on pensait que le cisplatine entrait dans la cellule uniquement par simple diffusion, il est maintenant bien démontré que les transporteurs au cuivre CRT1 et CRT2 (Copper Transporter 1 et 2) jouent un rôle majeur dans ce processus (Ishida *et al.*, 2002; Blair *et al.*, 2009; Pabla *et al.*, 2009). CRT1 est un transporteur de haute affinité pour le cuivre, codé par le gène *SLC31A1* (solute carrier 31 A) et dont l'expression est ubiquitaire alors que CRT2 (*SCL31A2*), également ubiquitaire, présente une affinité plus faible pour le cuivre (Zhou and Gitschier, 1997; J. Lee *et al.*, 2002; Rees, Lee and Thiele, 2004). Comparé à CRT1, CRT2 ne possède qu'une partie de sa séquence N-terminale lui permettant de fixer le cuivre et le cisplatine extracellulaire. Il possède cependant les séquences transmembranaires nécessaires au transport du cisplatine (Blair *et al.*, 2009). Sur le plan fonctionnel, la surexpression de CRT1 que ce soit *in vitro* ou *in vivo* est associée à une accumulation accrue du cisplatine intracellulaire se traduisant par une augmentation de la sensibilité des cellules tumorales à cette molécule (Ishida *et al.*, 2002; Holzer *et al.*, 2004). A l'inverse, il semblerait que CRT2 joue un rôle opposé à CRT1 en limitant l'accumulation du cisplatine dans la cellule, induisant de ce fait une résistance des tumeurs (Blair 2010, Huang, 2014).

(b) Les transporteurs P-type ATPase (transporteurs d'efflux)

Ces transporteurs, en particulier ATP7A et ATP7B, appartiennent à la sous-famille des P_{1B} des ATPases de type P (Tanzi *et al.*, 1993; Vulpe *et al.*, 1993). Ils participent à l'homéostasie du cuivre en facilitant son export hors de la cellule grâce à l'énergie

produite par hydrolyse de l'ATP. ATP7A et ATP7B sont homologues au niveau structural et fonctionnel (Petrukhin *et al.*, 1994). Ils possèdent 8 domaines transmembranaires avec un domaine N-terminal contenant 6 sites de liaison pour des cations ainsi qu'une séquence permettant la fixation de l'ATP (Petrukhin *et al.*, 1994; La Fontaine, Ackland and Mercer, 2010).

ATP7B a été le premier transporteur décrit comme étant associé à la résistance au cisplatine des cellules cancéreuses (Komatsu *et al.*, 2000). Plusieurs études ont en effet démontré que la surexpression de ATP7B dans les cellules cancéreuses, que ce soit *in vivo* ou *in vitro*, augmentait la résistance au cisplatine et diminuait son accumulation dans les cellules tumorales (Komatsu *et al.*, 2000; Kanzaki *et al.*, 2002; Nakayama *et al.*, 2002; Katano *et al.*, 2003). A l'inverse, l'inhibition de l'expression du gène *ATP7B in vitro* dans des cellules de carcinomes ovariens est associée à une augmentation de la sensibilité au cisplatine (Mangala *et al.*, 2009). Des résultats similaires ont également été obtenus pour le transporteur ATP7A (Samimi *et al.*, 2003; S. Zhu *et al.*, 2017).

*(c) Les transporteurs de type ATP-binding cassette (ABC)
(transporteurs d'efflux)*

Ces transporteurs, de par leur capacité à exporter des médicaments en dehors de la cellule, jouent un rôle déterminant dans la réponse des cellules tumorales à de nombreux agents anticancéreux (Szakacs *et al.*, 2004). Dans le cas du cisplatine, certaines études ont montré que ABCC2 participe au phénomène de chimiorésistance en favorisant l'export de ce composé (Taniguchi *et al.*, 1996; Sprowl, Ness and Sparreboom, 2012). Néanmoins, bien que son importance soit clairement démontrée *in vitro* (Januchowski *et al.*, 2016), les données concernant son implication réelle dans la résistance des CPNPC au cisplatine n'est pas à l'heure actuelle clairement établie (Filipits *et al.*, 2007; Sprowl *et al.*, 2012).

(2) Diminution de la forme active du cisplatine

L'interaction des dérivés électrophiles du cisplatine avec des composés nucléophiles intracellulaires notamment le glutathion et les métallothionéines a pour conséquence de restreindre l'accès du cisplatine au noyau, limitant ainsi ses effets génotoxiques directs (Kelley *et al.*, 1988; Chen and Kuo, 2010). Il a ainsi été démontré que des niveaux élevés de glutathion ou des enzymes impliqués dans sa biosynthèse tels

que les gamma-glutamylcysteine synthetase et glutathione S-transferase sont associés, à la fois *in vitro* et *in vivo*, à une résistance des cellules tumorales au cisplatine (Lewis, Hayes and Wolf, 1988; Mistry *et al.*, 1991).

De même, des niveaux élevés de métallothionéines, protéines riches en thiols intervenant dans la détoxification des métaux, ont été corrélés *in vitro* à la sensibilité des cellules tumorales au cisplatine (Si and Lang, 2018). Néanmoins, cette association n'est pas encore clairement démontrée *in vivo* (Tuzel *et al.*, 2015).

b) Résistance liée aux dommages moléculaires (effet « on target »)

(1) Activation des complexes protéiques impliqués dans les réparations de l'ADN

Les effets génotoxiques du cisplatine, en partie responsables de son activité cytotoxique, sont contrebalancés par l'activation des systèmes de réparation des lésions de l'ADN notamment le NER (Nucleotide Excision Repair) et le MMR (Mismatch Repair) (Furuta *et al.*, 2002; Kunkel and Erie, 2005) (**Figure 12**).

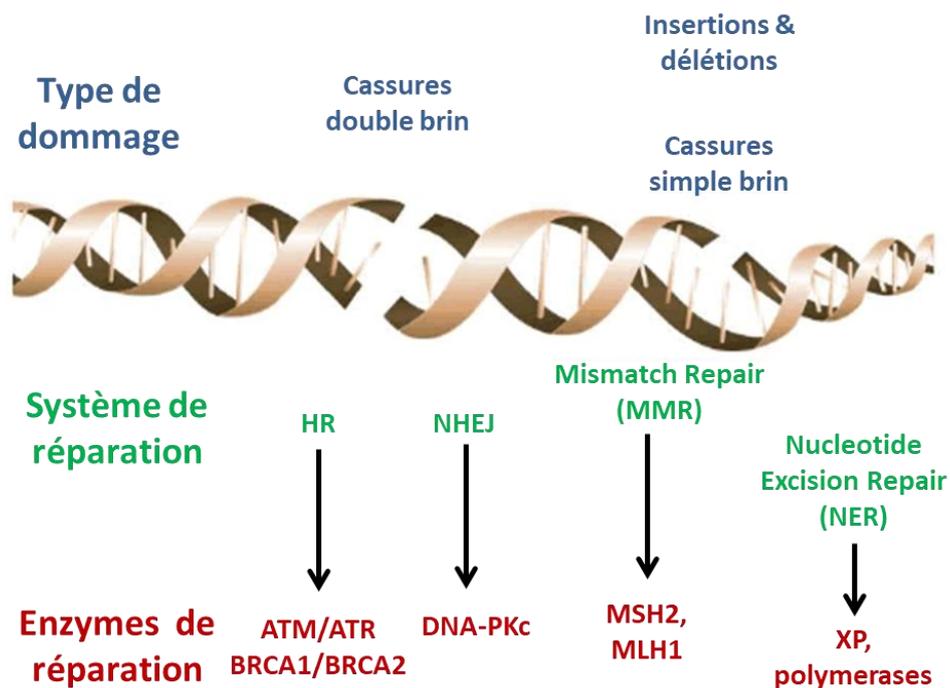


Figure 12: Les différents types de dommages à l'ADN et leurs systèmes de réparation. Les cassures simple brin sont résolues par le système de réparation par excision de nucléotide (NER) grâce aux enzymes Xeroderma pigmentosum (XP) et des polymérase et par le système de réparation MMR impliquant MLH1 (mutL homolog 1) et MSH2 (mutS homolog 2). Les cassures double brin sont corrigées par recombinaison homologue (HR) grâce à plusieurs enzymes incluant ATM, ATR et BRCA1/2 et le système NHEJ (Non-Homologous End Joining) grâce à la kinase DNA-PKc (DNA-dependent protein kinase), d'après Toss and Cortesi, 2013.

(a) Réparation par excision de nucléotides (système NER)

Plus de 30 protéines interviennent au sein du système NER (**Figure 13**). Dans un premier temps, les protéines XPE et XPC-HHR23F reconnaissent spécifiquement les adduits intrabrans N7-d(CpG) et les N7-d(ApG) formés par liaison du cisplatine sur la molécule d'ADN (Bowden, 2014). Ensuite, le recrutement du facteur de transcription TFIIH permet l'assemblage du complexe de pré-incision au niveau du site lésé et l'ouverture de la double hélice d'ADN. Des endonucléases, dont ERCC1-XPF, permettent l'excision d'un fragment nucléotidique encadrant les adduits ADN-cisplatine. Le fragment éliminé est ensuite resynthétisé et à nouveau lié à l'ADN par l'ADN ligase 1 (Xiong, Huang and Yin, 2017).

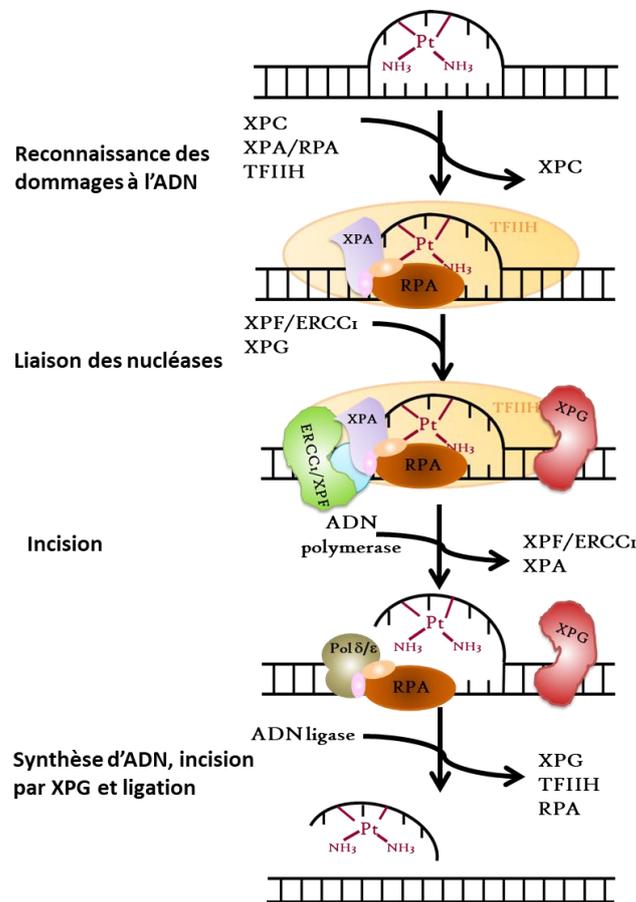


Figure 13: Mécanisme de réparation des lésions de l'ADN par le système NER. ERCC1: excision repairs cross-complementing group 1, RPA: replication protein A, XPA/C/F/G: xeroderma pigmentosum group A/C/F/G, TFIIH: transcription factor II H complex, d'après Xiong, Huang and Yin, 2017.

Une augmentation de l'activité du système NER a été associée à une résistance au cisplatine *in vitro* et *in vivo* (Köberle *et al.*, 1999; Ferry, Hamilton and Johnson, 2000). En particulier, de nombreuses études ont établi un lien entre l'expression d'ERCC1 et la résistance au cisplatine des cellules cancéreuses (Olaussen *et al.*, 2006; Handra-Luca *et al.*, 2007; Jun *et al.*, 2008; Chen *et al.*, 2010; Friboulet *et al.*, 2013). D'autres études suggèrent également que d'autres membres du système NER tels que XPA, XPB ou XPF pourraient constituer des biomarqueurs pertinents pour prédire la résistance des tumeurs au cisplatine (Dabholkar *et al.*, 2000; Köberle *et al.*, 2010; Liu *et al.*, 2012).

(b) *Les altérations du MMR*

Le système MMR, un complexe multi-enzymatique composé principalement des enzymes MSH, MLH et PMS, intervient dans la réparation des mésappariements de bases nucléotidiques survenant au cours de la réplication de l'ADN (**Figure 14**), et à ce titre, joue un rôle déterminant dans le maintien de l'intégrité du génome (Hopfner and Tainer, 2000; Modrich, 2006). Ce système joue également un rôle dans la détection des lésions de l'ADN induites par les dérivés du platine, en reconnaissant en particulier les adduits CpG interbrin, mais, n'étant pas en mesure de les réparer, transmet un signal pro-apoptotique à la cellule tumorale (Fink, Aebi and Howell, 1998). De ce fait, une déficience du système MMR est associée à une diminution de la sensibilité des cellules tumorales au cisplatine. Ainsi, des mutations délétères affectant les gènes MSH2 ou MLH1 ou leur sous-expression sont fréquemment retrouvées dans des tumeurs présentant une résistance au cisplatine (Aebi *et al.*, 1996; Martin, Hamilton and Schilder, 2008; Kamal *et al.*, 2010).

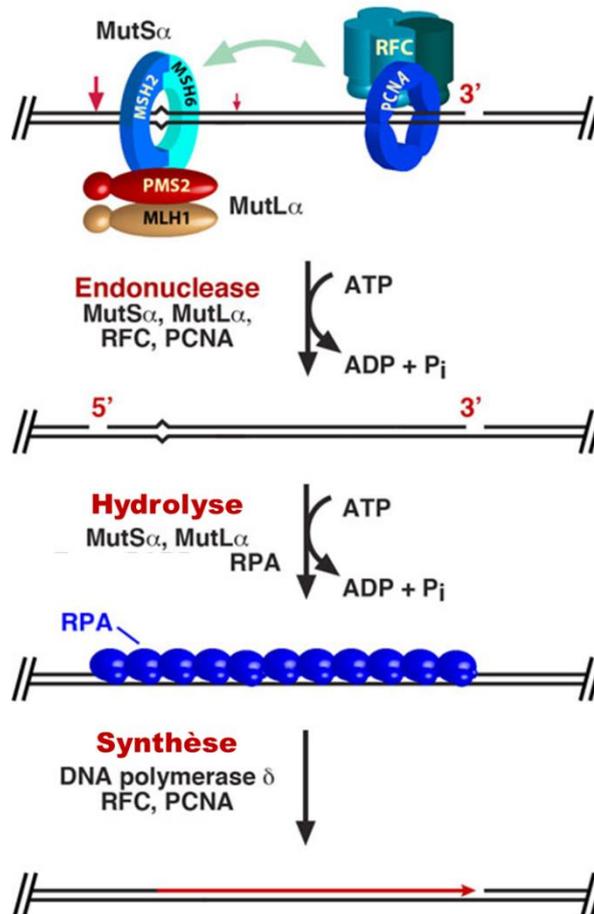


Figure 14 : Mécanisme de réparation des lésions de l'ADN par le système MMR. MSH 2 /6: Mut S homolog2/6, RFC: replication factor C, PCNA: proliferating cell nuclear antigen, PMS2: post meiotic segregation gene2, MLH1: mut L homolog 1, RPA: replication protein A, d'après Modrich, 2006.

(2) *Tolérance aux lésions nucléotidiques induites par le cisplatine :
mécanisme de synthèse translésionnelle*

La formation d'adduits intrabrin au sein de l'ADN tumoral lors de l'exposition des cellules cancéreuses aux dérivés du platine, en interférant avec la machinerie nécessaire à la réplication de l'ADN, entraîne l'arrêt du processus réplcatif et, en conséquence, aboutit à des lésions irréversibles de l'ADN pouvant être responsables de la mort de la cellule tumorale (Nyberg *et al.*, 2002). Pour pallier à ces évènements, la cellule cancéreuse dispose du mécanisme de synthèse translésionnel qui lui permet de répliquer l'ADN lésé grâce à des ADN polymérase dépourvues d'activité « proofreading » telles que PolZ, PolH, PolI et rev1 (Masutani *et al.*, 2000; Alt *et al.*, 2007; Lange, Takata and Wood, 2011). Certaines études ont démontré un lien entre l'efficacité du mécanisme de synthèse translésionnelle et la sensibilité des cellules tumorales au cisplatine (Zander and Bemark, 2004; Sokol *et*

al., 2013; Zhou *et al.*, 2013). En effet, des mutations inactivatrices du gène codant pour PolH ont été associées à une meilleure sensibilité au cisplatine dans des lignées fibroblastiques humaines (Albertella *et al.*, 2005). De même, un ciblage par RNAi du transcrit codant pour PolZ dans des lignées de glioblastomes a permis d'améliorer les effets cytotoxiques du cisplatine (Wang *et al.*, 2009).

(3) *Altérations des systèmes de réparation des cassures double brin*

Le cisplatine est également responsable de coupures double brin de l'ADN dont la détection fait intervenir principalement le complexe MRN (MRE11-RAD50-NBS1) composé des protéines Rad50, Mre11, Nbs1, qui en se fixant sur la région lésée, permet le recrutement des protéines kinases ATM (Ataxia Telangiectasia Mutated) et ATR (ATM and Rad3-related) (**Figure 15**). Ces kinases vont alors coordonner l'activation des protéines effectrices de la réponse aux dommages de l'ADN, les principales étant CHK1 et CHK2 (à l'origine de l'arrêt du cycle cellulaire permettant la réparation), p53 (responsable de l'arrêt du cycle cellulaire ou du processus d'apoptose), BRCA1-2/DNA-PK/complexe MRN (impliqués dans les mécanismes de réparation NHEJ et HR) et H2AX (histone intervenant dans la modification de la structure de la chromatine) (Smith *et al.*, 2010).

De manière intéressante, certaines études ont démontré que les tumeurs présentant des mutations inactivatrices des gènes *BRCA1* et *BRCA2* présentent une sensibilité accrue aux dérivés du platine (Farmer *et al.*, 2005). A l'inverse, une augmentation de l'efficacité de la voie HR a été associée au développement de la résistance acquise des cellules tumorales au cisplatine (Chen *et al.*, 2016).

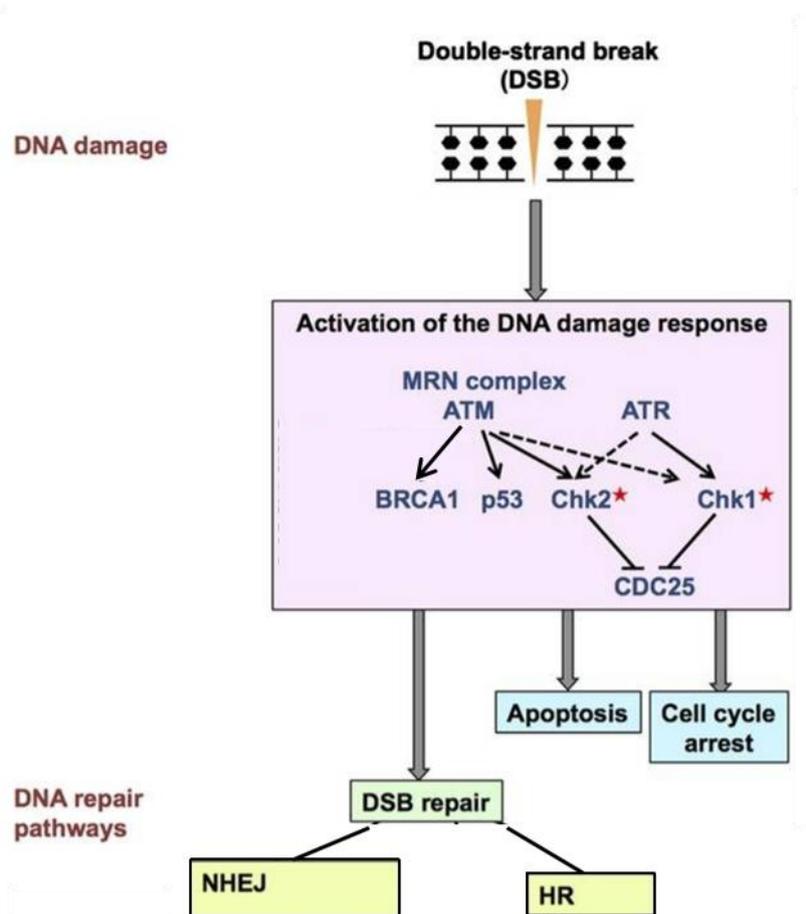


Figure 15: Système de réparation des cassures double brin et protéines associées. MRN: MRE11-Rad50-Nsb1, ATM: ataxia telangiectasia mutated serine/threonine kinase, ATR: ataxia telangiectasia mutated and Rad3 related serine/threonine kinase, BRCA1: breast cancer 1, Chk: checkpoint kinase, NHEJ: non-homologous end-joining, HR: homologous recombination. D'après Hosoya and Miyagawa, 2014.

c) Résistance due à l'altération des voies de signalisation (post target)

La résistance des tumeurs aux dérivés du platine peut également être induite par défaut d'un ou de plusieurs acteurs moléculaires impliqués dans le processus de mort cellulaire. En particulier, de nombreuses études ont démontré une altération soit dans la transduction du signal apoptotique, soit dans son exécution (Brozovic and Osmak, 2007). Un des mécanismes les mieux connus à l'heure actuelle concerne un défaut d'activation du gène suppresseur de tumeurs p53 (Vousden and Lane, 2007). En effet, lors d'un stress génotoxique modéré, p53 provoque un arrêt transitoire du cycle cellulaire, permettant ainsi la réparation des lésions. A l'inverse, en cas de stress plus intense ou prolongé, p53 inhibe cette fois la prolifération cellulaire par un mécanisme le plus souvent irréversible tel que la sénescence ou déclenche le

processus apoptotique (Offer *et al.*, 2002). De ce fait, l'inactivation de p53 dans les cellules tumorales représente un mécanisme d'échappement au stress apoptotique induit par les dérivés du platine (**Figure 16**). Ainsi, de nombreuses études ont établi que la sensibilité des cellules tumorales au cisplatine est étroitement corrélée au statut mutationnel du gène codant pour p53 (Branch *et al.*, 2000; Hientz *et al.*, 2017).

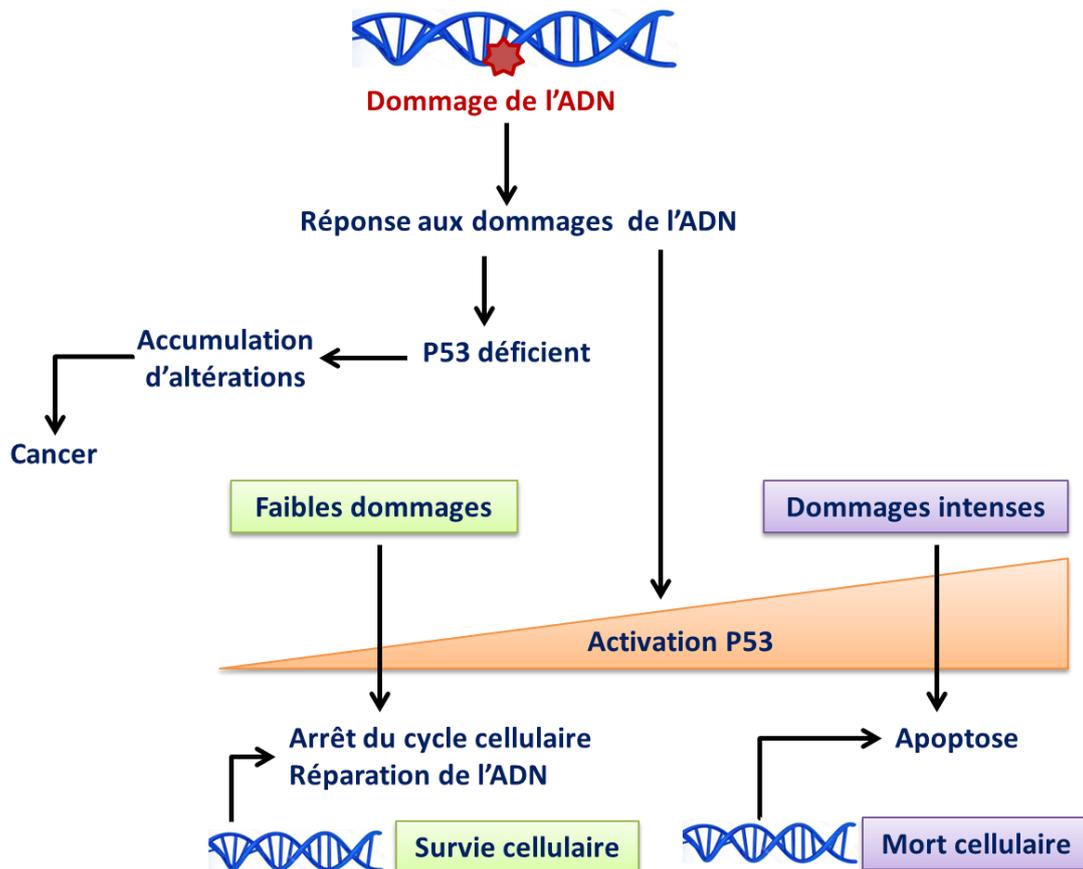


Figure 16: Influence de P53 sur le devenir de la cellule. Le déficit en P53 induit une accumulation d'altérations pouvant conduire à la carcinogenèse. L'activation de p53 par un stress constitutif contribue à la survie et au développement normal de la cellule. Au contraire, un stress aigu contribue à une induction plus robuste de p53 aboutissant à l'activation de la mort de la cellule par apoptose et donc à l'élimination de la cellule lésée. D'après Vousden and Lane, 2007.

d) Résistance « off target »

La résistance au cisplatine peut également résulter de l'activation indirecte de signaux biologiques compensant le signal apoptotique induit par les dérivés du platine (L. Galluzzi *et al.*, 2012). L'autophagie, un processus cellulaire permettant la dégradation par le lysosome de constituants cytoplasmiques tels que des protéines ou des organites (**Figure 17**), représente un des mécanismes compensateurs les mieux décrits à l'heure actuelle (Wang and Wu, 2014; Bao *et al.*, 2015). Les liens

entre apoptose et autophagie sont particulièrement complexes et dépendent à la fois du type cellulaire étudié et du contexte cellulaire (Chen, Kang and Fu, 2018). Par exemple, dans des lignées de cancer de l’ovaire et de CPNPC, des études ont pu montrer que l’acquisition du phénotype de résistance des cellules tumorales au cisplatine était concomitante de l’augmentation de l’activité autophagique (Ren *et al.*, 2010; Yu *et al.*, 2011). En accord avec ces données, d’autres études ont montré que l’inhibition de l’autophagie pouvait restaurer la sensibilité au cisplatine dans plusieurs types de cancers notamment le NSCLC (Ren *et al.*, 2010; Circu *et al.*, 2017; Yuwen *et al.*, 2017), le cancer de l’ovaire (Qiu *et al.*, 2017), le carcinome nasopharyngé (Su *et al.*, 2017), le cancer de la prostate (Q. Zhu *et al.*, 2017) ou encore le cholangiocarcinome (Qu *et al.*, 2017).

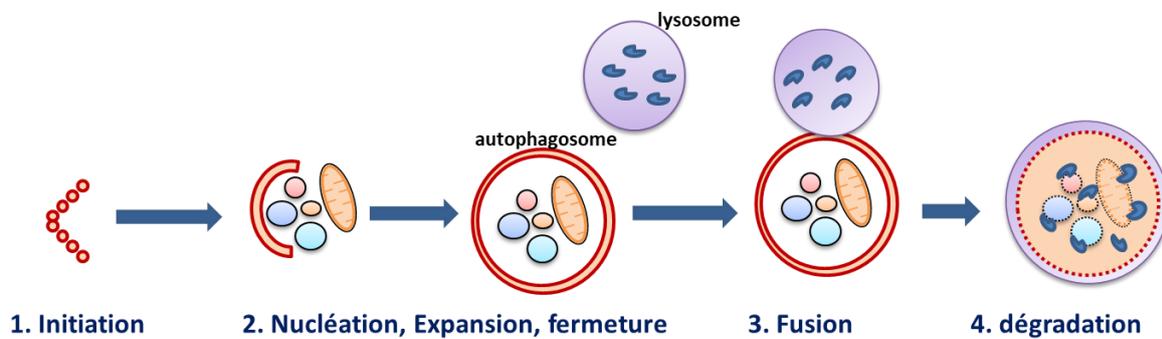


Figure 17: Mécanisme de l'autophagie. Le mécanisme de l'autophagie se divise en 4 étapes : l'initiation qui correspond à la formation des membranes d'isolement à partir des membranes plasmiques ou organelles cytoplasmiques ; la nucléation, l'expansion de la fermeture de l'autophagosome qui correspond au transport de lipides vers la membrane d'isolement ; la fusion entre l'autophagosome et les lysosomes ; la dégradation des protéines, organelles cytosoliques par les enzymes lysosomales. D'après Chen, Kang and Fu, 2018.

3. Toxicité du cisplatine

Les chimiothérapies à base de cisplatine exposent les patients à la survenue d'effets indésirables potentiellement graves pouvant limiter l'utilisation de cette molécule et par conséquent réduire les taux de réponse des tumeurs aux traitements (Astolfi *et al.*, 2013). On distingue notamment les effets neurotoxiques, ototoxiques et néphrotoxiques généralement dose dépendants et cumulatifs.

a) Neurotoxicité périphérique

La neuropathie périphérique est un effet toxique fréquent du cisplatine qui concerne 30-40% des patients (Staff *et al.*, 2017), et ayant été rapportée pour la première fois

par Kedar *et al* en 1978. Cette toxicité résulte de la production de ROS au niveau du ganglion de la racine dorsale de la moelle épinière et se manifeste par des troubles sensitifs tels que des paresthésies des membres (McDonald *et al.*, 2005; Podratz *et al.*, 2011). Diverses molécules telles que la vitamine E, l'acétylcystéine, le calcium ou encore le magnésium ont été testées dans la prévention des neuropathies induites par le cisplatine mais aucune n'a encore à ce jour démontré son efficacité (Albers *et al.*, 2014).

b) Ototoxicité

La toxicité auditive est un autre effet indésirable fréquent survenant chez les patients exposés au cisplatine (23 à 54% des adultes et au moins 50% des enfants) (Rybak and Whitworth, 2005). Ce phénomène toxique s'explique par la production de ROS au niveau des cellules ciliées externes de l'oreille interne qui, à terme, entraîne une perte d'audition d'autant plus sévère qu'elle touche les jeunes enfants. En effet, l'intégrité de l'oreille interne est essentielle pour les enfants en phase d'apprentissage et de socialisation (Li, Womer and Silber, 2004). Actuellement, il n'existe pas d'antidote contre la toxicité auditive induite par le cisplatine et la prévention des risques se limite à la mesure de la fonction auditive avant et pendant le traitement pour évaluer son impact sur l'audition et l'adapter en conséquence. Différentes molécules anti-oxydantes sont néanmoins actuellement en cours d'étude notamment le thiosulfate de sodium (Broch *et al.*, 2018).

c) Néphrotoxicité

La toxicité rénale du cisplatine n'est plus à démontrer bien que son incidence réelle soit difficile à évaluer. En effet, 20 à 40% des patients pourraient présenter une néphrotoxicité lors d'une chimiothérapie à base de cisplatine (Miller *et al.*, 2010). Cette toxicité est cumulative, s'observe le plus souvent pour des doses excédant 50mg/m^2 , et survient préférentiellement chez des patients déshydratés ou recevant un traitement néphrotoxique tel que les anti-inflammatoires non stéroïdiens (Higuchi and Yanagawa, 2019). Elle se caractérise par une insuffisance rénale à diurèse conservée de profil tubulo-interstitiel le plus souvent transitoire et réversible. Le mécanisme de toxicité rénale, encore imparfaitement compris, repose sur une atteinte préférentielle des cellules du tube contourné proximal (CTP) et s'accompagne d'un dysfonctionnement de certains organites cellulaires comme le réticulum endoplasmique et la mitochondrie (**Figure 18**) (Pabla and Dong, 2008).

Le cisplatine circule dans l'organisme sous forme conjuguée au glutathion et est principalement éliminé par voie urinaire (filtration glomérulaire et sécrétion tubulaire). Le cisplatine est ensuite capté par les CTP principalement par l'intermédiaire du transporteur membranaire OCT2 (organic cation transporter 2). Dans le milieu intracellulaire, le cisplatine conjugué au glutathion est métabolisé successivement par les enzymes GGT (gamma glutamyl transpeptidase), APN (aminopeptidase N) et CCBL (cysteine S conjugate beta lyase) en composés thiols hautement réactifs et néphrotoxiques (Hanigan *et al.*, 1994; Townsend *et al.*, 2003). S'en suit des effets génotoxiques au niveau de l'ADN ainsi qu'un dysfonctionnement des mitochondries et du réticulum endoplasmique. L'ensemble de ces altérations aboutit à la formation d'espèces réactives de l'oxygène et à l'activation de plusieurs voies entraînant la mort des CTP par apoptose, nécrose et nécroptose (Linkermann *et al.*, 2014).

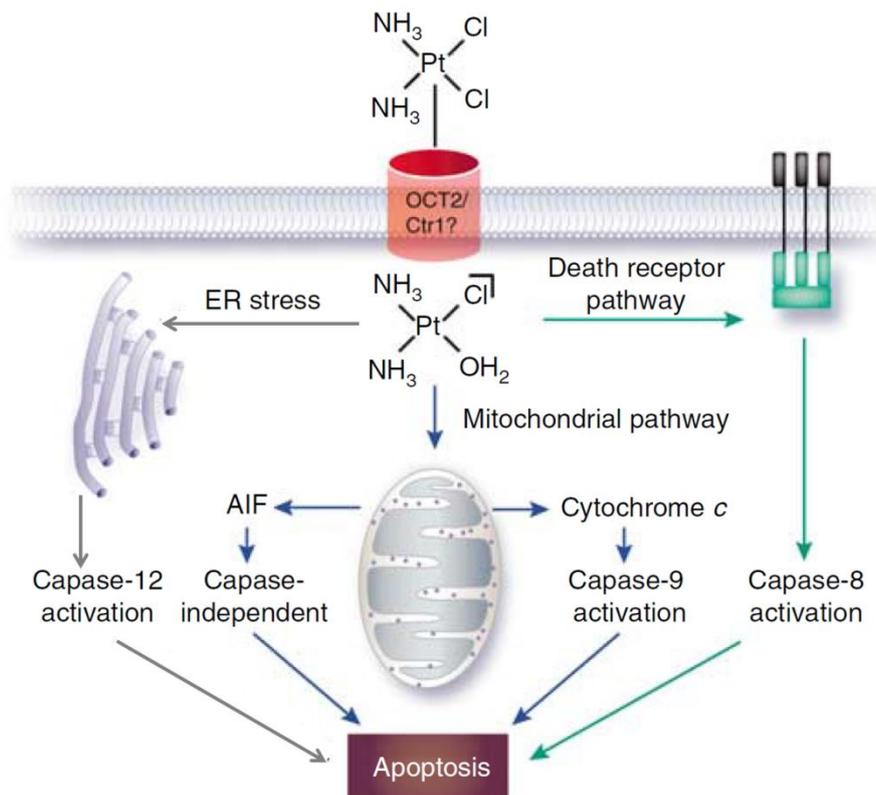


Figure 18: Les voies de l'apoptose induites par le cisplatine dans les cellules tubulaires proximales rénales. Le cisplatine induit l'apoptose *via* la voie intrinsèque mitochondriale (bleu) et la voie extrinsèque des récepteurs de mort (vert). De plus, le stress du réticulum endoplasmique (ER stress) peut être impliqué (gris). L'activation de ces voies conduit à l'apoptose dépendante ou indépendante des caspases. OCT2: organic cation transporter 2, CTR1: copper transporter 1, ER: endoplasmic reticulum, AIF: apoptosis inducing factor. D'après Pabla and Dong, 2008.

II. Travaux personnels

A. Objectifs

Dans ce contexte, le projet de thèse visait à identifier de nouveaux déterminants moléculaires soit à l'origine de la résistance des tumeurs pulmonaires au cisplatine, soit impliqués dans ses effets néphrotoxiques. Ainsi, deux axes principaux ont été développés durant la thèse :

Axe 1: Implication des microARN (miARN) dans la résistance des tumeurs pulmonaires au cisplatine

Axe 2: Prévention et traitement des effets néphrotoxiques du cisplatine grâce au blocage du récepteur A_{2A}

B. Implication des miARN dans la résistance des tumeurs pulmonaires au cisplatine

1. Généralités

a) Classification des ARN non codants

Il est désormais clairement établi que, bien que seuls 2% de l'ADN humain codent pour des protéines, 80% de la fraction non codante du génome humain est biologiquement active. En particulier, les ARN non codants (ARNnc) participent à la régulation génique (Djebali *et al.*, 2012). Les ARNnc sont généralement classés par famille selon leurs structures et fonctions, définissant ainsi 3 classes (**Figure 19**) : les ARNnc intervenant dans la traduction (ARNt et ARNr), les ARNnc de plus de 200 nucléotides (ARNlnc) et enfin la classe des petits ARNnc, comprenant les siARN (small interfering RNA), les piARN (piwi-interacting RNA) et les miARN (microARN) (Diamantopoulos, Tsiakanikas and Scorilas, 2018).

		Function		
RNAs	Coding RNAs	mRNAs	Protein expression	
	Non coding RNAs	rRNAs	Protein synthesis	
		tRNAs	Protein synthesis	
		Long Non coding RNAs	Regulation of chromatin structure Post-transcriptional regulation Regulation of transcription	
		Small non coding RNAs	microRNAs (miRNAs)	Regulation of target mRNAs
			small interfering RNAs (siRNAs)	Post-transcriptional silencing
			small nucleolar RNAs (snoRNAs)	Chemical modifications of other RNAs
			small nuclear RNAs (snRNAs)	Maturation of RNAs
PIWI-interacting RNAs (piRNAs)	Silencing of transposon activity during germline development			

Figure 19: Classification et fonctions des ARN non codants (ARNnc). D'après Van der Hauwaert *et al.*, 2019.

b) Découverte des microARN

Le premier miARN, lin-4, a été identifié en 1993 chez le nématode *Caenorhabditis elegans* lors de l'étude de son développement (Lee, Feinbaum and Ambros, 1993).

Par la suite, la découverte d'un deuxième miARN, let-7, également essentiel au développement de *Caenorhabditis elegans*, a permis de généraliser le mode d'action de lin-4 (Reinhart *et al.*, 2000). Des homologues du gène let-7 ont ensuite été découverts dans plusieurs autres organismes dont l'homme, démontrant ainsi leur importance biologique (Pasquinelli *et al.*, 2000). Ces premières études ont ainsi permis d'identifier les miARN comme une nouvelle classe de petits ARNnc d'environ 20 nucléotides agissant comme régulateurs négatifs de l'expression des gènes (Bartel, 2004). Chez l'homme, on dénombre actuellement plus de 2000 miARN matures, répertoriés dans la base de données miRBase (<http://www.mirbase.org/>).

c) Biogenèse

La localisation génomique des miARN est variable. Les gènes de miARN peuvent se situer dans des régions intergéniques et possèdent ainsi leur propre unité transcriptionnelle. D'autres miARN sont présents dans les introns de gènes codant pour des protéines. Dans ce cas, ils sont transcrits simultanément avec leur gène hôte ou ils peuvent être sous le contrôle d'un promoteur spécifique (Rodriguez *et al.*, 2004; Baskerville and Bartel, 2005; Griffiths-Jones *et al.*, 2008). Certains miARN sont organisés en cluster et partagent ainsi un même transcrit primaire dit polycistronique (Y. Lee *et al.*, 2002; Bartel, 2004; Altuvia *et al.*, 2005).

La biogenèse des miARN est illustrée dans la **Figure 20**. Les gènes de miARN sont initialement transcrits par l'ARN polymérase de type II en un long transcrit primaire possédant une structure en épingle à cheveux (ou tige boucle) appariée de manière imparfaite, une coiffe methyl-7-guanine à l'extrémité 5' et une queue polyadénylée en 3' (Lee *et al.*, 2003; Cai, Hagedorn and Cullen, 2004).

La première étape de maturation des miARN correspond au clivage du transcrit primaire ou pri-miARN par un complexe multiprotéique appelé microprocesseur (Denli *et al.*, 2004; Gregory *et al.*, 2004). Ce complexe est constitué de l'endonucléase de type Rnase III DROSHA (Y. Lee *et al.*, 2002) responsable du clivage du pri-miARN, et de la protéine de liaison aux ARN double brin DGCR8 (DiGeorges critical region gene 8) permettant le positionnement précis du complexe sur le pri-miARN (Denli *et al.*, 2004; Gregory *et al.*, 2004; Han *et al.*, 2004). Le pre-miARN généré, d'environ 70 nucléotides, possède un groupement phosphate en 5' et 2 nucléotides « flottants » en 3' (Okada *et al.*, 2009).

Le pre-miARN est ensuite exporté dans le cytoplasme grâce à un transporteur de la famille des Ran GTPase : l'exportine 5 (Yi *et al.*, 2003; Lund *et al.*, 2004). Dans le cytoplasme, le pre-miARN est ensuite pris en charge par un deuxième complexe protéique formé de l'endonucléase de type RNase III DICER et de ses co-facteurs notamment TRBP (Transactivating response (TAR) RNA binding protein) (Chendrimada *et al.*, 2005). TRBP est une protéine se liant au pre-miARN et permettant le positionnement de DICER qui peut alors exercer son activité endonucléasique et cliver la boucle terminale du pre-miARN (Chendrimada *et al.*, 2005; Park *et al.*, 2015). L'ARN double brin généré, d'une longueur de 18 à 23 nucléotides, comprend un brin guide dit « miARN mature » et son brin antisens dit « passager ». Alors que le miARN mature est intégré au complexe RISC (RNA-induced silencing complex), le brin passager est le plus souvent dégradé (Schwarz *et al.*, 2003; Gregory *et al.*, 2005; Lin, Chang and Ying, 2005). D'autres voies de maturation indépendantes de DROSHA et/ou DICER ont été décrites et sont regroupées sous le terme de maturation non canonique (Ha and Kim, 2014).

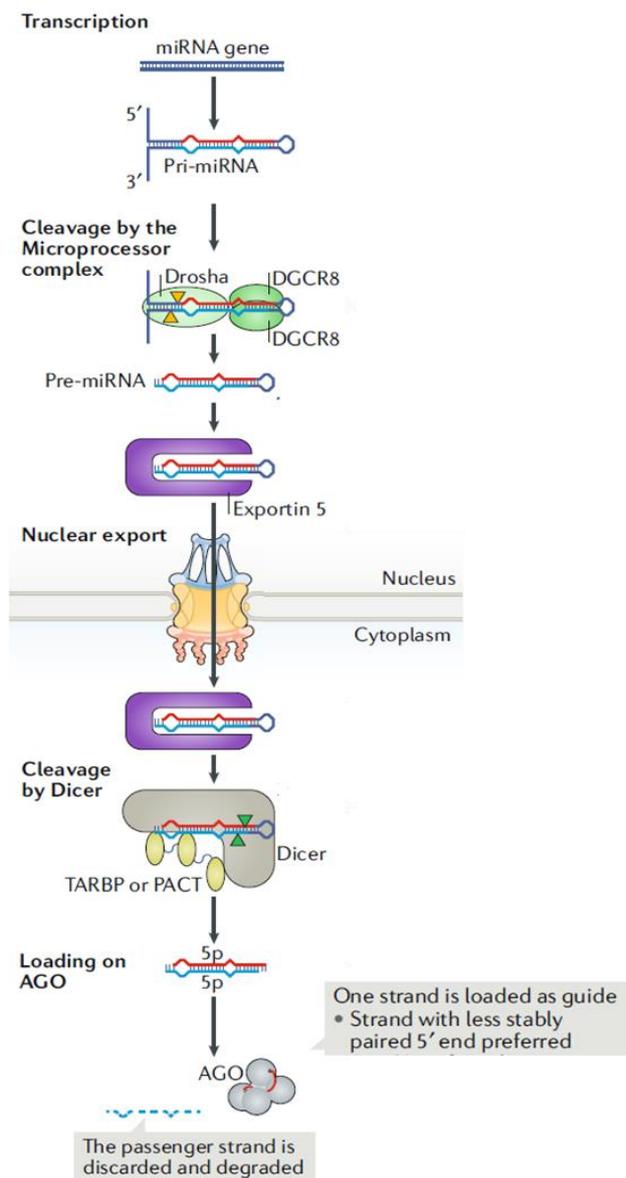


Figure 20 : Biogenèse des microARN. La biogenèse des microARN est un processus comprenant plusieurs étapes. Les miARN sont transcrits principalement par l'ARN polymérase II en transcrit primaire (pri-miRNA). Le pri-miARN est excisé par le microprocesseur comprenant l'endonucléase RNase III, Drosha et la protéine DGCR8 (DiGeorge syndrome critical region 8) pour donner un précurseur de miARN (pre-miARN). L'exportine 5 transporte le pre-miARN du noyau vers le cytoplasme. Dans le cytoplasme, l'enzyme Dicer de type RNase III clive le pre-miARN pour donner naissance au duplex de miARN matures. Chez les vertébrés, le clivage par Dicer est modulé par TRBP (TAR RNA-binding protein). Un brin du miARN mature (le brin guide) est pris en charge par les protéines Argonautes (AGO) alors que l'autre (le brin passager) est généralement dégradé. D'après Gebert and MacRae, 2019.

d) Mécanisme d'action des miARN

(1) Reconnaissance de l'ARNm cible par le miARN

Au niveau de leur région 5', les miARN possèdent une séquence de reconnaissance minimale d'environ 6 pb (nucléotides 2 à 7), dénommée séquence « seed », complémentaire de la région 3'UTR des ARNm qu'ils ciblent (Bartel, 2009). Parfois, l'extrémité 3' du miARN joue également un rôle dans la fixation du miARN sur son ARNm cible, notamment lorsqu'il existe un ou plusieurs mésappariements entre la région « seed » du miARN et son ARNm cible (Friedman *et al.*, 2009). En conséquence, chaque miARN est capable de réguler théoriquement plusieurs centaines de gènes (Lewis, Burge and Bartel, 2005; Friedman *et al.*, 2009).

Néanmoins, outre ces règles d'interaction entre le miARN et son gène cible, d'autres facteurs influencent la fixation des miARN à leur séquence cible tels que la structure secondaire des ARNm ou la présence de protéines de liaison à l'ARN (Gebert and MacRae, 2019).

(2) Mécanisme de répression

Le duplex formé par les deux miARN matures doit ensuite être incorporé au sein du complexe RISC (RNA-induced silencing complex) pour pouvoir exercer sa fonction. Chez l'homme, ce complexe est notamment composé de 4 protéines argonautes (AGO 1-4), AGO 2 étant la seule protéine douée d'activité endonucléasique vis-à-vis des ARNm. Après intégration du duplex de miARN au sein du complexe RISC, le brin passager est éliminé. Une complémentarité parfaite entre la séquence du miARN et sa cible induit une dégradation directe de l'ARNm par AGO 2. Ce mécanisme est néanmoins minoritaire, car dans la majorité des cas, il existe un mésappariement central au niveau du duplex miARN/ARNm (Meister and Tuschl, 2004). Lorsque l'ARNm n'est pas directement clivé, les protéines AGO interagissent avec d'autres protéines permettant d'inhiber la traduction, puis d'induire la désadénylation, l'ablation de la coiffe en 5' et enfin la dégradation de l'ARNm (**Figure 21**) (Liu *et al.*, 2005; Jonas and Izaurralde, 2015).

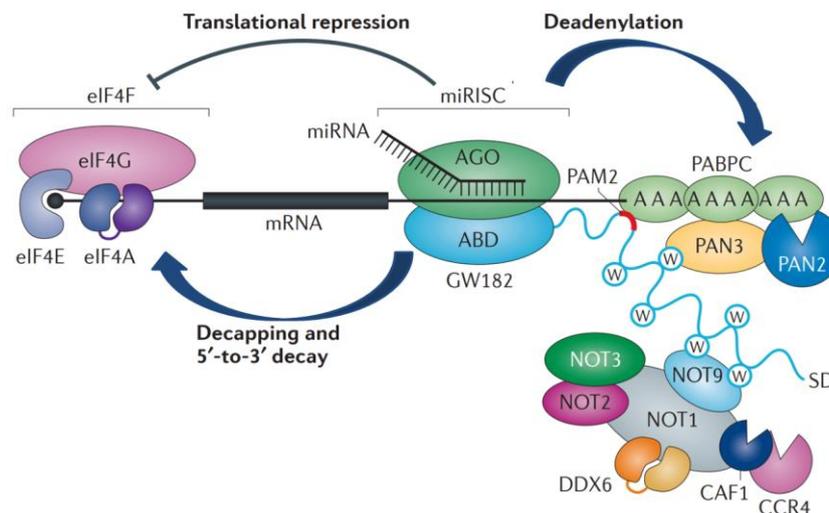


Figure 21 : Mécanisme de répression des miARN chez l'animal. Le microARN lié à la protéine Argonaute (AGO) dans le complexe RISC (miRNA-induced silencing complex, miRISC) reconnaît son ARN messager (ARNm) cible. La protéine AGO interagit avec une protéine GW182 pour recruter à son tour des protéines permettant l'inhibition de la traduction (inhibition du complexe eIF4F), la désadénylation (PABPC, complexe de désadénylation), le décoiffage et la dégradation de l'ARNm. D'après Jonas and Izaurralde, 2015.

e) Fonctions biologiques

Les connaissances actuelles concernant le rôle biologique des miARN distinguent trois mécanismes principaux permettant une régulation extrêmement fine des processus biologiques (Ebert and Sharp, 2012). D'une part, les miARN peuvent interagir au sein de boucles d'anticipation dans lesquelles ils régulent la même cible que leur inducteur (**Figure 22A**) (Pulikkan JA *et al.*, 2010). D'autre part, ils peuvent également participer à la régulation d'un signal biologique au sein d'une boucle de régulation négative dans lesquelles le miARN réprime son inhibiteur (**Figure 22B**) (Fazi *et al.*, 2005). Enfin, les miARN sont souvent impliqués dans la formation de boucle de rétrocontrôle positif dans lesquelles ils régulent positivement leur inducteur (**Figure 22C**) (Yoo and Greenwald, 2005).

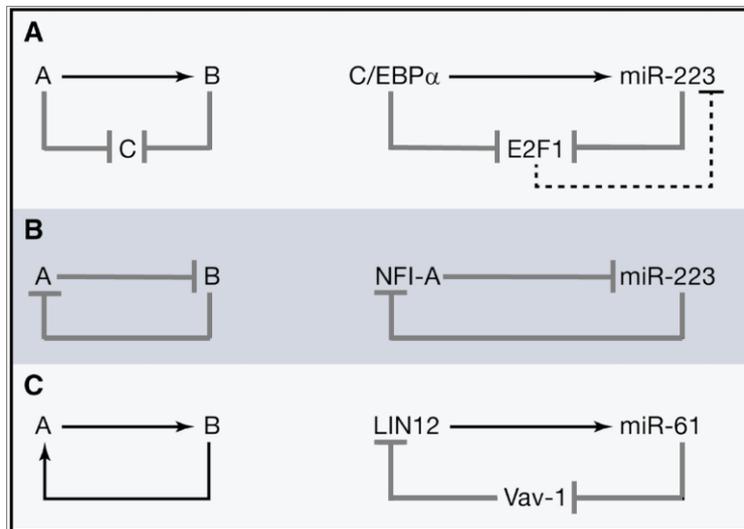


Figure 22: Boucles de régulation des miARN. (A) boucle d'anticipation illustrée par l'inhibition directe ou indirecte d'E2F1, un régulateur du cycle cellulaire impliqué dans la granulopoïèse. (B) boucle de régulation négative illustrée par l'inhibition de NFI-A et mir-223 permettant le maintien de l'équilibre entre les précurseurs myéloïdes et les granulocytes. (C) boucle de rétrocontrôle positive illustrée par le renforcement de la différenciation des cellules vulvaires chez le nématode. D'après Ebert and Sharp, 2012.

Les miARN constituent donc une classe de petits ARN non codants endogènes qui régulent l'expression post-transcriptionnelle des gènes (Ambros, 2004; Bartel, 2009). Les miARN ont été décrits pour leur implication dans la régulation de nombreux processus cellulaires et le développement (Kloosterman and Plasterk, 2006; Bushati and Cohen, 2007). De plus, la dérégulation des miARN est une caractéristique commune de nombreuses pathologies dont le cancer, les troubles du SNC, l'inflammation, les maladies cardiovasculaires et les troubles métaboliques, ce qui

suggère que les miARN pourraient servir de cibles d'intervention thérapeutique (Van Rooij *et al.*, 2007; Ventura and Jacks, 2009; Rayner *et al.*, 2010; Grueter *et al.*, 2012; Rottiers and Näär, 2012; Salta and De Strooper, 2012; Van Rooij and Olson, 2012). C'est pourquoi de nombreux efforts sont actuellement axés sur le développement de thérapies à base de miARN pour le traitement d'un large éventail de maladies humaines. Ainsi, des oligonucléotides dirigés contre des miARN sont actuellement en essai clinique (Gebert *et al.*, 2014; Gomez *et al.*, 2015).

2. Contexte des travaux

Bien que des progrès notables aient été réalisés dans le traitement du CPNPC au cours de la dernière décennie, ce cancer est toujours associé à de faibles taux de réponse au traitement ainsi qu'à un pronostic sombre pour la plupart des patients (Chang, 2011). La variabilité de la réponse médicamenteuse chez les patients atteints de CPNPC est multifactorielle, et comprend des déterminants (épi)génétiques de la tumeur ainsi que certains facteurs environnementaux comme l'hypoxie (Chang, 2011). Par conséquent, l'élucidation des mécanismes moléculaires à l'origine de la résistance des cellules cancéreuses aux traitements constitue une voie de recherche importante. Bien que des progrès majeurs aient été réalisés dans la compréhension de la résistance aux médicaments utilisés dans la prise en charge du CPNPC, le rôle des ARN non codants, et en particulier les miARN, reste peu documenté. Dans ce contexte, notre étude vise à mieux comprendre l'importance des miARN dans la résistance aux traitements des adénocarcinomes pulmonaires.

En effet, de nombreuses études ont montré l'implication des miARN dans la plupart des processus oncogéniques (Zhang *et al.*, 2007; Olson *et al.*, 2009; Yuan *et al.*, 2018; Zhuang *et al.*, 2018). De plus, environ 50% des miARN sont localisés au niveau de régions fragiles ou fréquemment altérées dans les cancers (Calin *et al.*, 2004). Plusieurs études ont également démontré que les miARN sont exprimés de façon aberrante dans la majorité des tumeurs (Zhang *et al.*, 2007). L'expression des miARN au niveau tumoral peut être dérégulée par divers mécanismes tels que des anomalies chromosomiques, des modifications épigénétiques ou encore des anomalies dans la biosynthèse des miARN (Iorio and Croce, 2012). Ainsi, les miARN joueraient un rôle non seulement dans l'initiation et la progression des cancers mais aussi dans les phénomènes de chimiorésistance (Frixia, Donzelli and Blandino, 2015). Par conséquent, leur modulation pharmacologique représente une nouvelle voie thérapeutique prometteuse (Shah and Cali, 2014).

3. Objectifs des travaux

L'objectif de nos travaux a consisté dans un premier temps à identifier par criblage fonctionnel, les miARN impliqués dans la résistance au cisplatine dans une lignée humaine d'adénocarcinome pulmonaire (A549) puis à caractériser sur le plan moléculaire les mécanismes à l'origine de cette résistance.

4. Matériel et méthodes

Culture cellulaire

Les cellules d'adénocarcinomes pulmonaires humaines (A549, H1299, H1975, HCC827) et murines (LLC) sont cultivées dans le milieu DMEM Glutamax (Thermofisher) supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal (SVF) et 1% de pénicilline/streptomycine.

Criblage fonctionnel

Une banque de près de mille microARN (AMO39T3) a été transfectée dans la lignée humaine d'adénocarcinome pulmonaire A549 (concentration finale 10nM) en plaques 96 puits. 48h après transfection, les cellules ont été exposées au cisplatine à 60 μ M (soit deux fois la DL50, dose létale pour 50% des cellules) pendant 3 jours. La viabilité a été mesurée à l'aide du kit Cell Titer Glo (Promega). La normalisation a été effectuée en divisant la valeur de chaque échantillon par la moyenne des valeurs de l'ensemble des échantillons de la plaque. La normalisation et les statistiques sont réalisées à l'aide du logiciel R. Deux transfactions indépendantes ont été réalisées.

Les miARN candidats ont été sélectionnés sur des critères statistiques ($p < 0,01$) et en fonction du niveau de résistance induite. Seuls les candidats exprimés dans la lignée A549 à l'état basal ont été considérés.

Transfection

Les cellules A549, H1299, H1975 et HCC827 sont transfectées par des pre-miR, siARN ainsi que des inhibiteurs de miARN à une concentration finale de 10 nM (40% - 50% de confluence) dans des plaques 6, 12 ou 96 puits à l'aide de la lipofectamine

RNAiMAX (Life Technologies). Les siARN, les pre-miR et leurs contrôles sont fournis par Life Technologies. Les inhibiteurs de miARN et leur contrôle proviennent de la société Exiqon.

Viabilité cellulaire

Vingt-quatre heures après ensemencement (40000 cellules/puits) dans des plaques 96 puits, les cellules A549 sont stimulées avec des doses croissantes de cisplatine (0.3 à 200µg/mL). La viabilité cellulaire est évaluée en utilisant le kit Cell Titer Glo (Promega).

Marquage à l'annexine V

L'activité apoptotique est détectée par l'utilisation du kit AnnexinV-FITC (Life Technologies). Les cellules sont recueillies et incubées avec de l'Annexine V et du diiodure de propidium pendant 15 min à l'abri de la lumière. L'annexine V est déterminée par cytométrie en flux (longueur d'onde d'excitation 488 nm, longueur d'onde d'émission 530 nm) en utilisant le détecteur pour le FITC FL1 ; l'iodure de propidium est détecté grâce à l'émission de la phycoérythrine (longueur d'onde d'excitation 488 nm, longueur d'onde d'émission 578 nm) en utilisant le détecteur FL2.

Mesure de l'activité luciférase

La validation des interactions entre miR-24-3p et ses cibles potentielles est réalisée par clonage de leur séquence 3'UTR, sauvage ou mutée, en amont du gène de la luciférase dans le plasmide psiCHECK (Promega). Les constructions plasmidiques et les pre-miR sont transfectés dans des cellules HEK 293T en plaque 96 puits à l'aide de lipofectamine 2000 (Invitrogen). 48 heures après transfection, l'activité luciférase est mesurée en utilisant le kit Dual Glo Luciferase assay (Promega).

Extraction protéique et immunoblotting

Les cellules sont lysées dans un tampon de lyse (RIPA, Sigma) auquel est ajouté un cocktail d'inhibiteurs de protéases et de phosphatases (Pierce). Les lysats sont quantifiés à l'aide d'un test de BCA (BiCinchoninic acid Assay) (Thermo Scientific).

Les protéines (10 µg par échantillon) sont séparées par électrophorèse sur gel SDS-polyacrylamide (Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide) et transférées sur des membranes de nitrocellulose. Les membranes sont bloquées dans une solution saline de Tris tamponnée (TBS) contenant 0,1% de Tween 20 (TBST) et 5% de lait écrémé puis incubées avec les anticorps primaires (**Tableau 2**) sur la nuit à 4°C. Après plusieurs lavages, les membranes sont incubées avec les anticorps secondaires couplés à la peroxydase pendant 1 heure puis de nouveau lavées dans du TBST pendant 30 min. La révélation est réalisée à l'aide du kit ECL select (Amersham) sur l'imager ImageQuant™ LAS 4000 (GE Healthcare). Pour s'assurer d'une charge protéique égale, les membranes ont été incubées avec des anticorps anti β-actin (#4970, Cell Signaling) ou anti-HSP60 (sc 1052, Santa Cruz).

Tableau 2: Liste des anticorps primaires utilisés pour les immunoblots.

Anticorps	Référence	Fournisseur
akt	#9272	cell signaling
Pakt	#4058	cell signaling
Bak	#6947	cell signaling
Bax	#5023	cell signaling
Bcl-xL	#2764	cell signaling
β-Actin	#4970	cell signaling
BIM	#2933	cell signaling
Caspase3	#9662	cell signaling
caspase3 clivé	#9661	cell signaling
caspase 9	#9502	cell signaling
Caspase 9 clivée	#9501	cell signaling
EGFR	#4267	cell signaling
pEGFR	#3777	cell signaling
ERK1/2	#9102	cell signaling
pERK1/2	#9106	cell signaling
HSP60	sc-1052	santa cruz
Mcl-1	#5453	cell signaling
PARP	#9542	cell signaling
PARP clivé	#5625	cell signaling
PDXK	AV53615	sigma
PDXP	#4686	cell signaling
PNPO	sc-366898	santa cruz
PUMA	#4976	cell signaling
p53	#2527	cell signaling
Pp53(ser15)	#9286	cell signaling

Immunofluorescence

Les cellules A549 sont cultivées sur des lamelles de verre de 16 mm de diamètre (Thermo Scientific) placées au fond de plaques 12 puits. Les lamelles sont lavées par une solution saline de phosphate tamponnée et fixées par du paraformaldéhyde 4% pendant 15 min. Les cellules sont ensuite perméabilisées en utilisant une solution de Triton X-100 à 0,1% (Agilent Technologies) pendant 10 min. La lamelle est ensuite saturée pendant 30 min avec une solution de PBS contenant 3% d'albumine de sérum de veau (BSA). L'incubation avec les anticorps primaires Bax (ab5714, Abcam), cytochrome c (#12963, cell signaling), p-ATM (05-740, millipore) ou γ H2AX (#9718, cell signaling) a été réalisée dans une solution de blocage contenant 1% de BSA pendant 1 heure à 37°C. Après trois lavages dans du PBS, les cellules sont incubées avec les anticorps secondaires pendant 45 min. Les lamelles sont ensuite fixées sur des lames en utilisant le Prolong Gold Antifade Reagent contenant du DAPI (Invitrogen). La fluorescence est visualisée avec un microscope confocal Olympus FV10i.

Détection des adduits à l'ADN de type cisplatine-GpG

Le marquage par immunofluorescence et la mesure des produits spécifiques de platination de l'ADN a été réalisé en se basant les travaux de Liedert (Liedert *et al.*, 2006), en utilisant un anticorps primaire de rat qui reconnaît spécifiquement les adduits à l'ADN cisplatine-GpG (RC-18, Oncolyse).

Quantification du platine intracellulaire

Les cellules sont lavées plusieurs fois dans du PBS froid, puis lysées dans le tampon RIPA. La concentration de platine intracellulaire est déterminée par spectrométrie d'absorption atomique. La quantité de platine est normalisée par la quantité de protéines par échantillon.

Extraction des ARN totaux

L'extraction des ARN totaux cellulaires est effectuée à l'aide du kit miRNeasy (Qiagen). Brièvement, les cellules sont lysées à l'aide de 700 μ L de Qiazol. Après ajout de chloroforme et centrifugation, la phase aqueuse contenant les acides nucléiques est récupérée. Les acides nucléiques sont précipités par ajout

d'isopropanol puis lavés 3 fois avec une solution contenant de l'éthanol à 70%. L'éluion est réalisée par ajout d'eau « RNase free ».

Expression des miARN matures

La rétro-transcription (RT) est effectuée à partir de 5ng d'ARN totaux à l'aide du kit TaqMan microRNA reverse Transcription (Life Technologies). La rétro-transcription a été réalisée avec une sonde TaqMan spécifique du microARN hsa-miR-24-3p (assay 000402, Life Technologies) et une sonde TaqMan spécifique du petit ARN RNU44 (assay 001094, Life Technologies) servant de normalisateur. La rétro-transcription est effectuée dans un thermocycleur Verity (Life Technologies).

La PCR quantitative est réalisée en chimie TaqMan à partir du produit de RT, de tampon TaqMan Universal Master Mix II, no UNG et d'une sonde spécifique TaqMan. La réaction d'amplification est réalisée sur l'appareil StepOne Plus Real Time PCR System (Life Technologies) selon les recommandations du fournisseur. Les échantillons sont déposés en duplicat. L'analyse des résultats est réalisée par la méthode de comparaison des ddCt. Le Cycle Threshold (Ct) correspond au seuil à partir duquel le niveau de fluorescence est significativement différent de celui du bruit de fond. Le nombre de transcrits est normalisé par rapport au petit ARN de référence par la formule suivante : $Ct^{miARN\ d'intérêt} - Ct^{RNU44} = dCt$. La relation mathématique 2^{-ddCt} dans laquelle $ddCt = dCt^{échantillon\ cible} - dCt^{échantillon\ contrôle}$, permet d'exprimer les niveaux d'expression relative (RQ) d'un échantillon (Livak and Schmittgen, 2001)

Identification des gènes cibles de miARN

L'identification des cibles de miARN a été effectuée à l'aide du logiciel miRonTop (<http://www.microarray.fr:8080/miRonTop/index>) (Le Brigand *et al.*, 2010). Brièvement, MiRonTop classe les transcrits en deux catégories, « uprégulés » et « downrégulés », en fonction du niveau d'expression et de leur expression différentielle. Le logiciel calcule ensuite le nombre de cibles prédites pour chaque miARN en fonction du logiciel de prédiction sélectionné (Targetscan, MIRBase, PicTar), dans chaque lot de gènes. Un enrichissement en cibles du miARN, dans chaque catégorie, est ensuite testé en utilisant une fonction hypergéométrique.

5. Résultats

Identification des miARN associés à la résistance des adénocarcinomes pulmonaires au cisplatine par criblage fonctionnel.

Le criblage fonctionnel est une approche extrêmement pertinente pour la découverte et la validation de gènes de résistance aux médicaments anticancéreux (Iorns *et al.*, 2007). Par conséquent, nous avons utilisé cette stratégie pour identifier de manière exhaustive les miARN dont la surexpression dans la lignée d'adénocarcinome A549 induit une résistance au cisplatine en utilisant une banque d'environ 1000 précurseurs de miARN (miRbase version 16). Nos résultats indiquent que la surexpression transitoire de 10 miARN induit de façon reproductible une résistance au cisplatine (**Figure 23A**). Parmi ces 10 miARN, seuls cinq sont également exprimés à l'état basal dans les cellules A549 (**Figure 23B**). Nous avons choisi de nous focaliser sur miR-24-3p, un miRNA exprimé physiologiquement dans les cellules A549, et identifié comme étant le meilleur candidat d'après les critères de significativité statistique et le degré de résistance que lui confère sa surexpression. De manière intéressante, miR-24-3p est également connu pour être surexprimé dans les CPNPC (Zhao *et al.*, 2015).

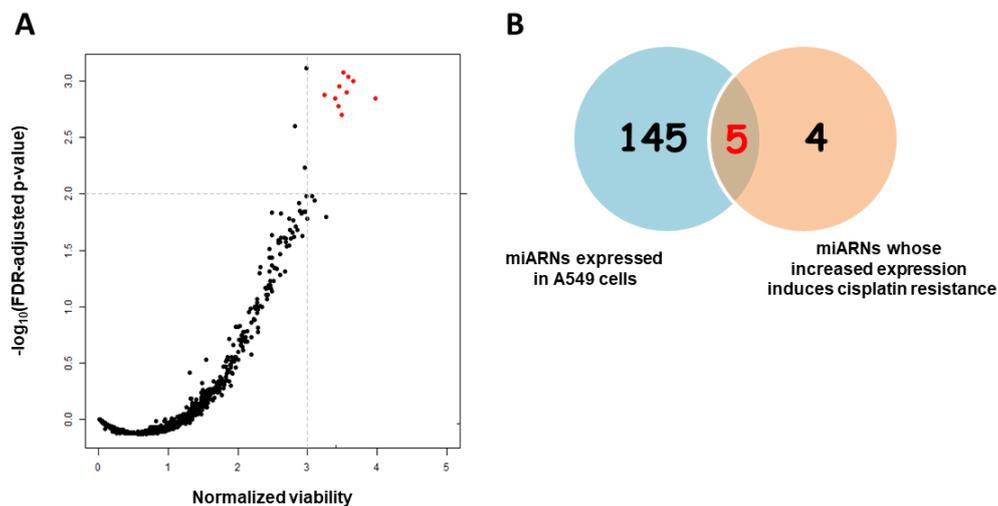


Figure 23: miR-24-3p, un régulateur potentiel de la sensibilité des adénocarcinomes pulmonaires aux dérivés du platine. (A) Représentation graphique de la viabilité normalisée par rapport à la valeur P ajustée par le FDR $-\log_{10}$ pour tous les miARN surexprimés dans les cellules A549. Les lignes pointillées verticales indiquent le seuil normalisé de viabilité sélectionné, tandis que la ligne horizontale indique le seuil de 0,01 de la valeur P ajustée. Chaque point représente un miRNA. Les points rouges dans le quadrant supérieur droit représentent les miARN associés à la résistance au cisplatine aux seuils choisis. **(B)** Diagramme de Venn montrant le chevauchement entre les miARN identifiés après criblage fonctionnel et ceux exprimés dans les cellules A549. L'expression a été déterminée par small RNA seq sur SOLiD 5500 WF (Life Technology).

miR-24-3p fait partie d'un cluster associant deux autres miARN, miR-23 et miR-27. L'analyse des données publiques de la base TCGA (The Cancer Genome Atlas) montre que l'expression du cluster miR-23/27a/24-2 est associée à un mauvais pronostic chez les patients atteints d'adénocarcinome pulmonaire de stade précoce (**Figure 24**).

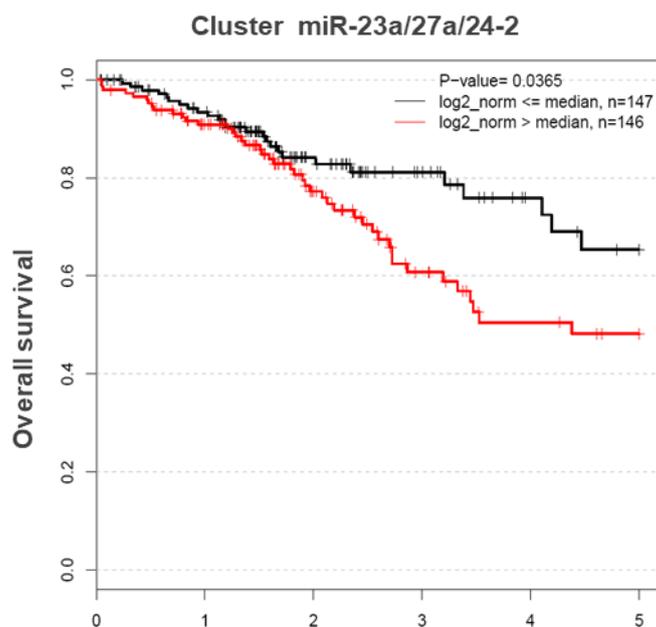


Figure 24: Expression du cluster miR-23a/27a/24-2 et survie des patients atteints d'adénocarcinome pulmonaire de stades I et II (n=295).

Les effets de miR-24-3p sur la sensibilité des cellules A549 au cisplatine ont été validés de manière indépendante par cytométrie en flux à l'aide du test Annexine V/Iodure de propidium (**Figure 25A**). De plus, les cellules A549 surexprimant miR-24-3p sont non seulement résistantes à d'autres composés à base de platine tels que le carboplatine et l'oxaliplatine (**Figure 25B**), mais également à d'autres anti-cancéreux utilisés en association avec les dérivés platine comme la vinorelbine et la gemcitabine (**Figure 25C**).

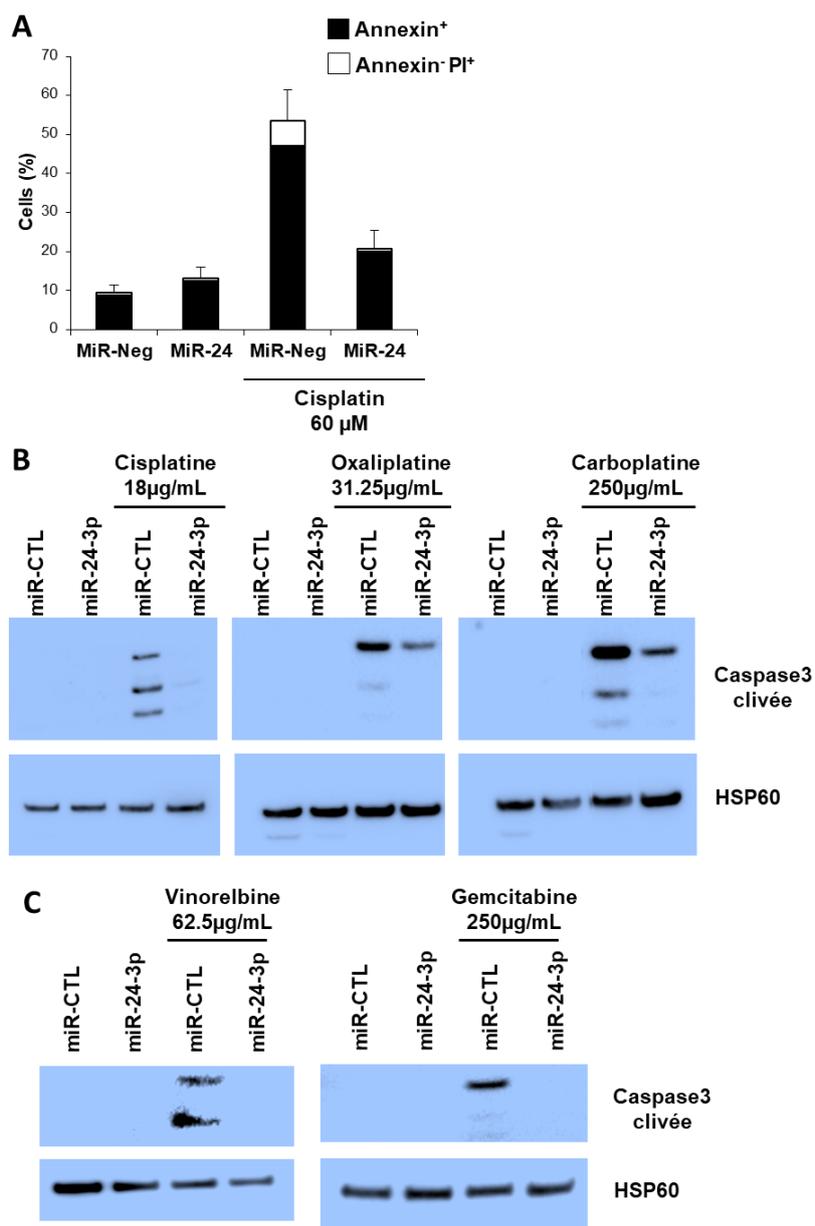


Figure 25: Effets de la surexpression de miR-24-3p dans les cellules A549 sur la mort cellulaire induite par le cisplatine, ses dérivés et d'autres anti-cancéreux. (A) Marquage à l'annexine V/iodure de propidium de cellules A549 surexprimant miR-24-3p et exposées au cisplatine à 60 μM pendant 24h. **(B)** Analyse par Western blot de l'expression de la caspase 3 clivée sur les cellules A549 surexprimant miR-24-3p et exposées au cisplatine ou à ses dérivés. **(C)** Analyse par Western blot de l'expression de la caspase 3 clivée sur les cellules A549 surexprimant miR-24-3p et exposées à la vinorelbine ou à la gemcitabine (n=3 manipulations indépendantes).

Identification des gènes cibles de miR-24-3p.

Pour identifier les gènes cibles de miR-24-3p, nous avons utilisé deux approches complémentaires distinctes (**Figure 26**):

-Les gènes cibles de miR-24-3p ont été identifiés à l'aide d'une combinaison d'approches bioinformatiques et expérimentales. Pour cela, nous avons déterminé le profil d'expression génique des cellules A549 surexprimant ou non ce miARN et effectué une recherche bioinformatique des gènes (i) dont la région 3'UTR contient un (ou plusieurs) site(s) de fixation pour miR-24-3p et (ii) dont l'annotation correspond aux termes GO (« gene ontology ») associés à la mort cellulaire, l'apoptose, la survie cellulaire, le cycle cellulaire et la sénescence. Ceci nous a permis d'identifier et de valider l'interaction entre miR-24-3p et deux protéines pro-apoptotiques de type BH3-only, BIM et PUMA.

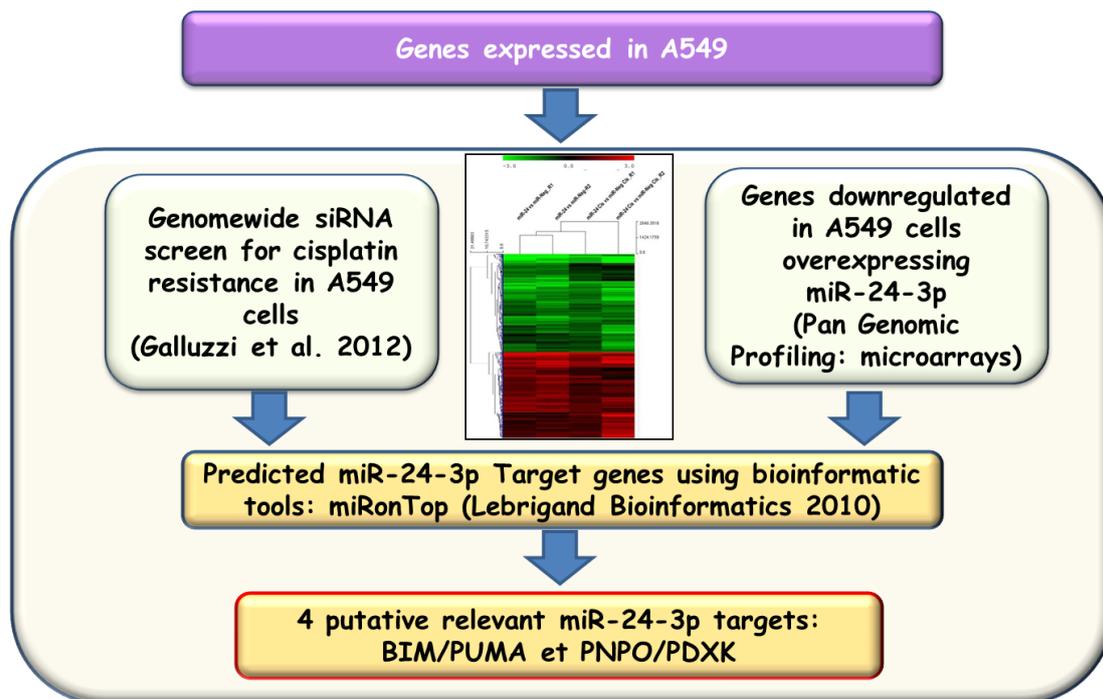


Figure 26: Stratégie d'identification des cibles de miR-24-3p.

-Une analyse comparative des données extraites à partir d'une étude de criblage par une approche siARN à l'échelle du génome (Lorenzo Galluzzi, Vitale, Senovilla, Eisenberg, *et al.*, 2012) a permis d'identifier les gènes pour lesquels l'inhibition induit une résistance au cisplatine dans les cellules A549 et dont la région 3'UTR contient un (ou plusieurs) site(s) de fixation pour miR-24-3p. Parmi les 32 gènes identifiés

dans cette étude, un seul remplit l'ensemble de ces critères : PDXK (pyridoxal kinase), une kinase impliquée dans le métabolisme de la vitamine B 6, connue pour jouer un rôle central dans la réponse des cellules tumorales au cisplatine (**Figure 27**) (Lorenzo Galluzzi, Vitale, Senovilla, Olaussen, *et al.*, 2012). De manière intéressante, un deuxième gène codant pour PNPO (pyridoxamine 5'-phosphateoxidase), une protéine également impliquée dans le métabolisme de la vitamine B 6, contient un site potentiel de fixation pour miR-24-3p dans sa région 3'UTR.

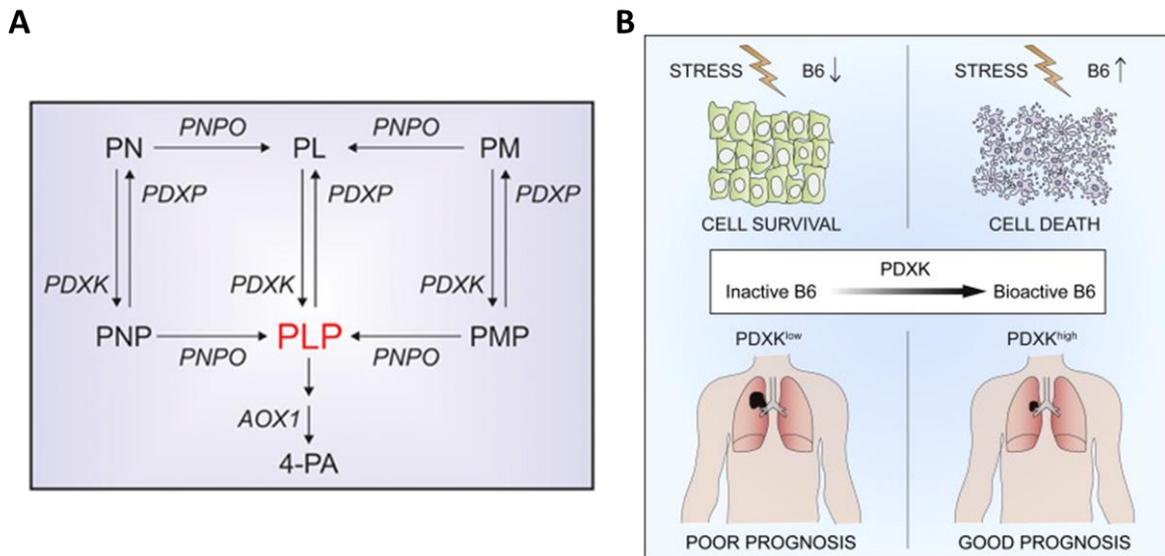


Figure 27: Rôle de la vitamine B 6 dans les CPNPC. (A) Schéma du métabolisme de la vitamine B 6 chez l'homme. La PLP (pyridoxine-5'-phosphate) est la forme active de la vitamine B 6, générée par phosphorylation de PL (pyridoxal), PN (pyridoxine), PM (pyridoxamine) par PDXK (pyridoxal kinase). Les formes phosphorylées ou non phosphorylées de la vitamine B 6 peuvent être converties l'une en l'autre par PNPO (PMP oxidase). Le catabolisme de PLP est réalisé par AOX1 (aldehyde oxidase 1). Le métabolite 4-PA (4-pyridoxic acid) est excrété dans les urines. (B) Les niveaux d'expression de PDXK influencent la progression de la maladie chez les patients atteints de CPNPC. D'après Lorenzo Galluzzi, Vitale, Senovilla, Olaussen, *et al.*, 2012; Galluzzi *et al.*, 2013.

L'interaction entre miR-24-3p et ses cibles a ensuite été validée fonctionnellement à l'aide de tests luciférase (**Figure 28**).

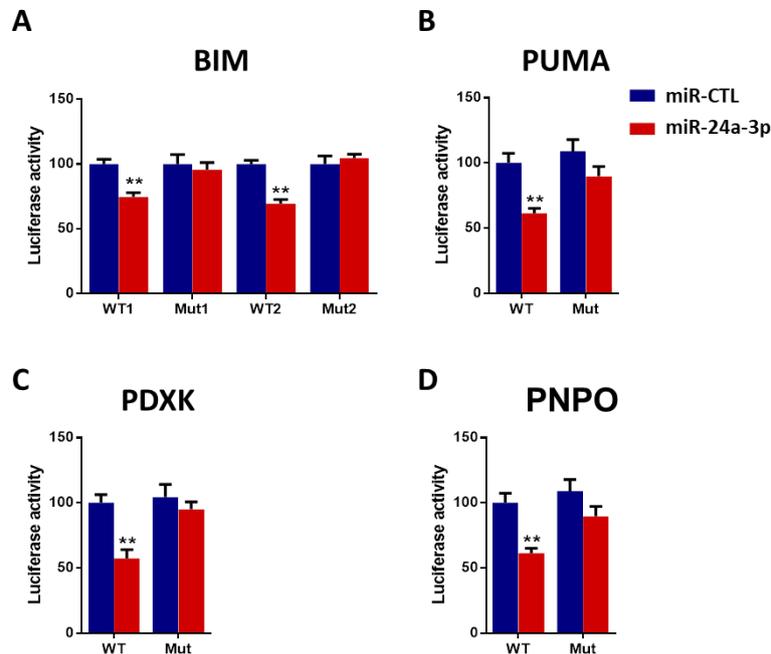


Figure 28: Validation fonctionnelle de BIM, PUMA, PDXK, PNPO en tant que cibles directes de miR-24-3p. Test luciférase pour évaluer l'interaction de miR-24-3p avec sa séquence cible sur (A) BIM, (B) PUMA, (C) PDXK et (D) PNPO. (n=3 expériences indépendantes). ** p<0,01

miR-24-3p, un régulateur majeur de la mort cellulaire induite par le cisplatine.

Pour mieux comprendre les effets anti-apoptotiques induits par miR-24-3p, nous avons étudié l'impact de sa modulation sur les 4 cibles identifiées dans notre étude (PDXK, PNPO, BIM et PUMA) et la réponse apoptotique induite par le cisplatine (**Figures 29-31**). La **Figure 29** présente l'ensemble des résultats obtenus en surexprimant miR-24-3p dans les cellules A549. Nous avons observé que la surexpression de miR-24-3p inhibe l'expression de BIM, PUMA (**Figure 29A**) et des enzymes impliquées dans la biosynthèse de la vitamine B 6, PDXK, PNPO (**Figure 29B**). Ces résultats confirment que ces 4 gènes sont régulés par miR-24-3p.

La stimulation des cellules avec des doses croissantes de pyridoxine (PN) nous a également permis de mettre en évidence que la PN augmente la sensibilité des cellules au cisplatine sauf lorsque celles-ci surexpriment miR-24-3p (**Figure 29C**). Concernant l'effet de la surexpression de miR-24-3p sur la réponse apoptotique

mitochondriale, nous avons démontré que miR-24-3p n'induit pas ou peu l'activation de Bax dans les cellules stimulées au cisplatine. De plus, nous n'observons pas de libération du cytochrome c (**Figure 29D**). Enfin, nous avons démontré que la surexpression de miR-24-3p inhibe l'expression de protéines impliquées dans la voie de l'apoptose mitochondriale telles que les caspase 9, caspase 3 et PARP clivées (**Figure 28E**).

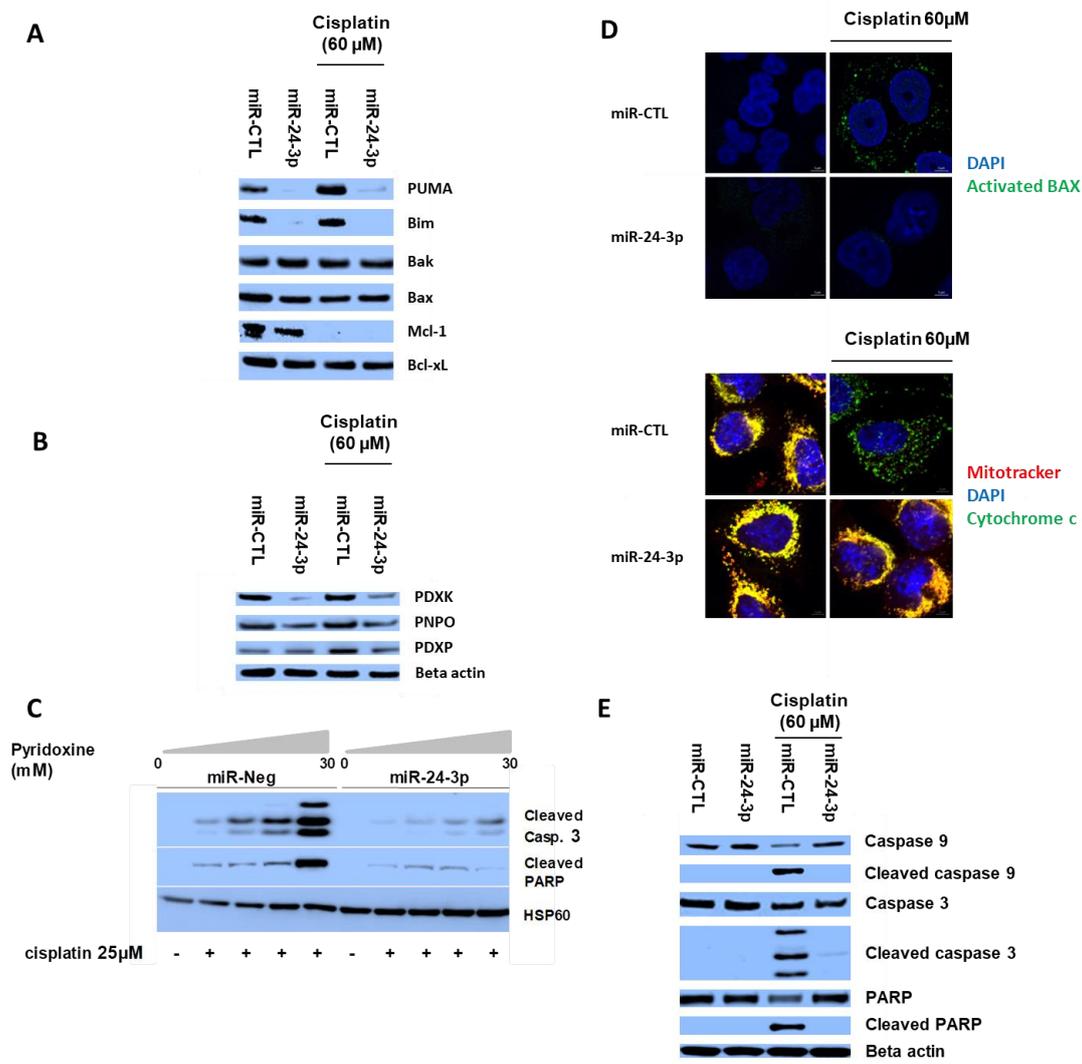


Figure 29: Effets de la surexpression de miR-24-3p dans les cellules A549 sur BIM, PUMA PNPO et PDXK et la réponse apoptotique dépendante de la mitochondrie induite par le cisplatine. (A) Western Blot montrant les effets de la surexpression de miR-24-3p sur BIM et PUMA en présence ou non de cisplatine. **(B)** Western Blot montrant les effets de la surexpression de miR-24-3p sur PDXK et PNPO en présence ou non de cisplatine. **(C)** Western Blot montrant les effets de miR-24-3p sur la réponse au cisplatine des cellules A549 exposées ou non à des doses croissantes de pyridoxine. **(D)** Images représentatives de microscopie confocale montrant les effets de la surexpression de miR-24-3p sur l'activation de Bax et la libération cytosolique du cytochrome c après exposition des cellules A549 au cisplatine. **(E)** Effets de la surexpression de miR-24-3p sur la voie mitochondriale apoptotique dépendante des caspases après exposition des cellules A549 au cisplatine. (n=3 manipulations indépendantes).

A l'inverse, l'inhibition de miR-24-3p induit une augmentation de l'expression de BIM, PUMA (**Figure 30A**), PDXK et PNPO (**Figure 30B**). De plus, l'inhibition de miR-24-3p augmente la sensibilité des cellules A549 au cisplatine (**Figure 30C**).

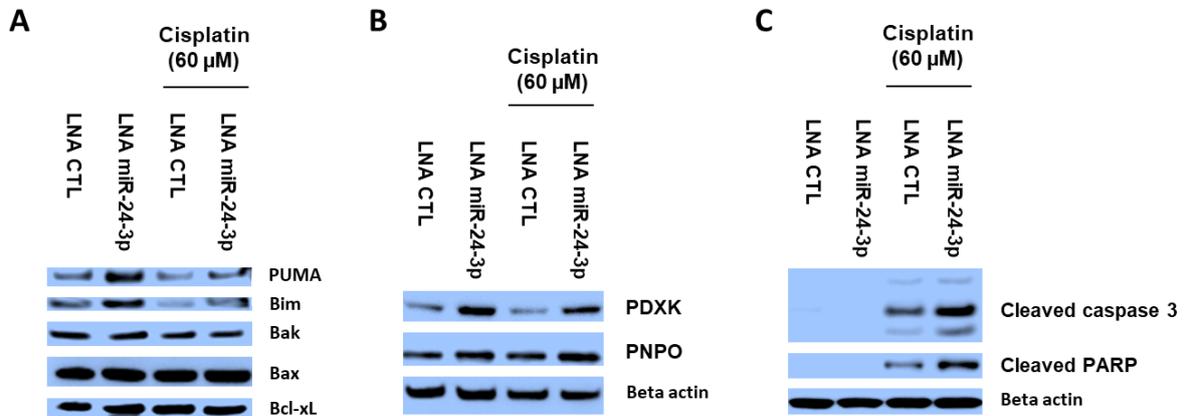


Figure 30: Effet de l'inhibition de miR-24-3p sur BIM, PUMA, PNPO, PDXK et la réponse apoptotique dépendante de caspase 3 induite par le cisplatine. (A) Western Blot montrant les effets de l'inhibition de miR-24-3p sur BIM et PUMA en présence ou non de cisplatine. **(B)** Western Blot montrant les effets de l'inhibition de miR-24-3p sur PDXK et PNPO en présence ou non de cisplatine. **(C)** Western Blot montrant les effets de l'inhibition de miR-24-3p sur la voie mitochondriale apoptotique dépendante des caspases après exposition des cellules A549 au cisplatine. (n=3 manipulations indépendantes).

L'importance des cibles de miR-24-3p que nous avons identifiées dans la réponse au cisplatine a également été évaluée à l'aide d'une approche siARN (**Figure 31**).

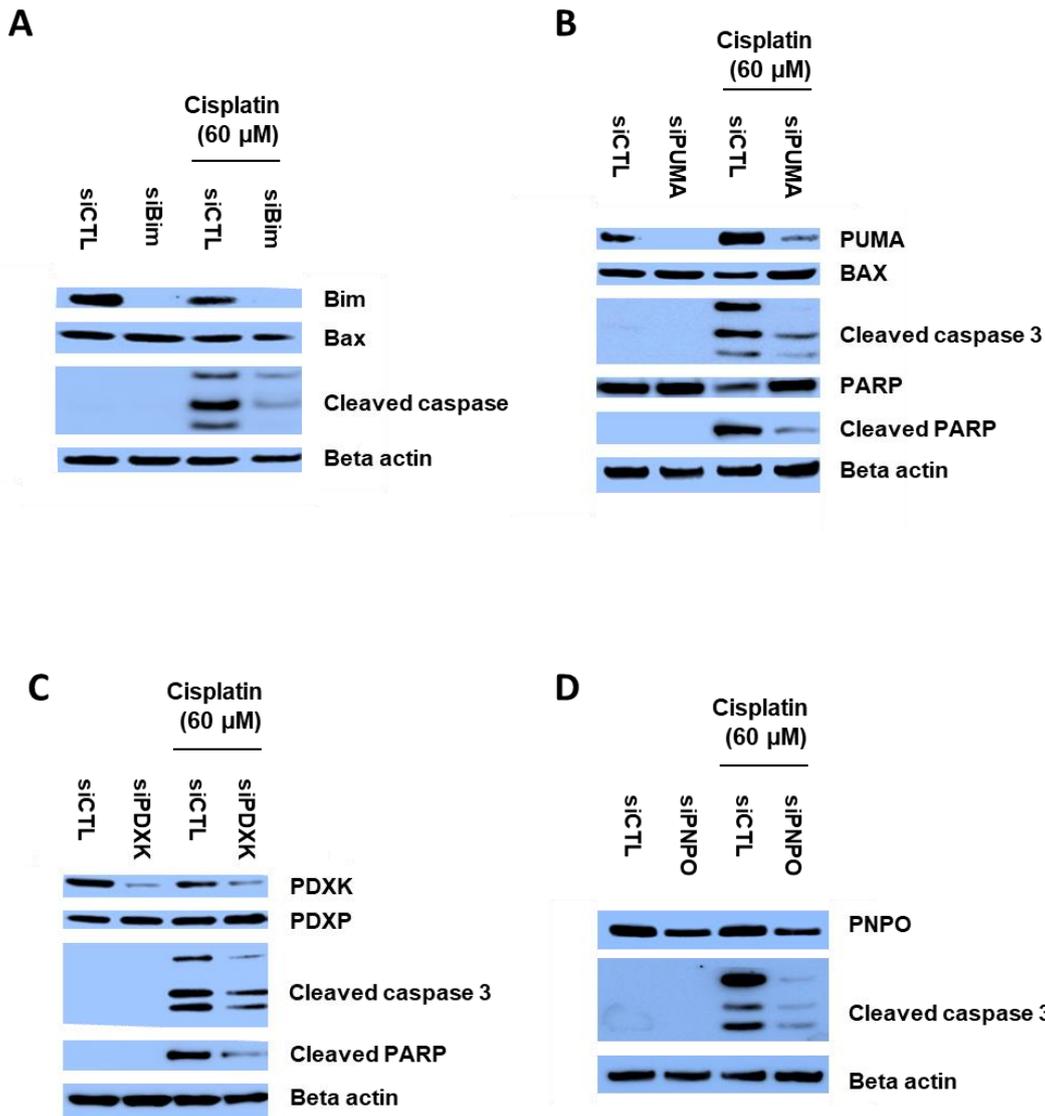


Figure 31: Effet de l'inhibition de BIM, PUMA, PDXK, et PNPO sur la réponse apoptotique dépendante de la caspase 3 induite par le cisplatine. Western Blot montrant les effets de l'inhibition de BIM (A), PUMA (B), PDXK (C) et PNPO (D) sur la voie mitochondriale apoptotique dépendante des caspases après exposition des cellules A549 au cisplatine. (n=3 manipulations indépendantes).

L'ensemble de ces résultats suggère que miR-24-3p, en ciblant BIM, PUMA, PDXK et PNPO, limite fortement la réponse apoptotique induite par le cisplatine.

De plus, étant donné que le cisplatine provoque la mort cellulaire principalement en induisant des lésions au niveau de l'ADN (Rocha *et al.*, 2018), nous avons également évalué si la surexpression de miR-24-3p dans les cellules A549 exposées au cisplatine influence la réponse aux dommages de l'ADN. Nos résultats ont montré que les cellules A549 surexprimant miR-24-3p présentent moins de lésions à l'ADN, évaluées par la quantification des adduits formés par le cisplatine (**Figure 32A**), des

foyers nucléaires exprimant γ H2AX (**Figure 32B**), la signalisation ATM (**Figure 32B**) et la phosphorylation de p53 sur son résidu serine 15 (**Figure 32C**). De plus, la modulation des niveaux d'expression de miR-24-3p n'affecte pas les concentrations intracellulaires de cisplatine dans les cellules tumorales (**Figure 32D**).

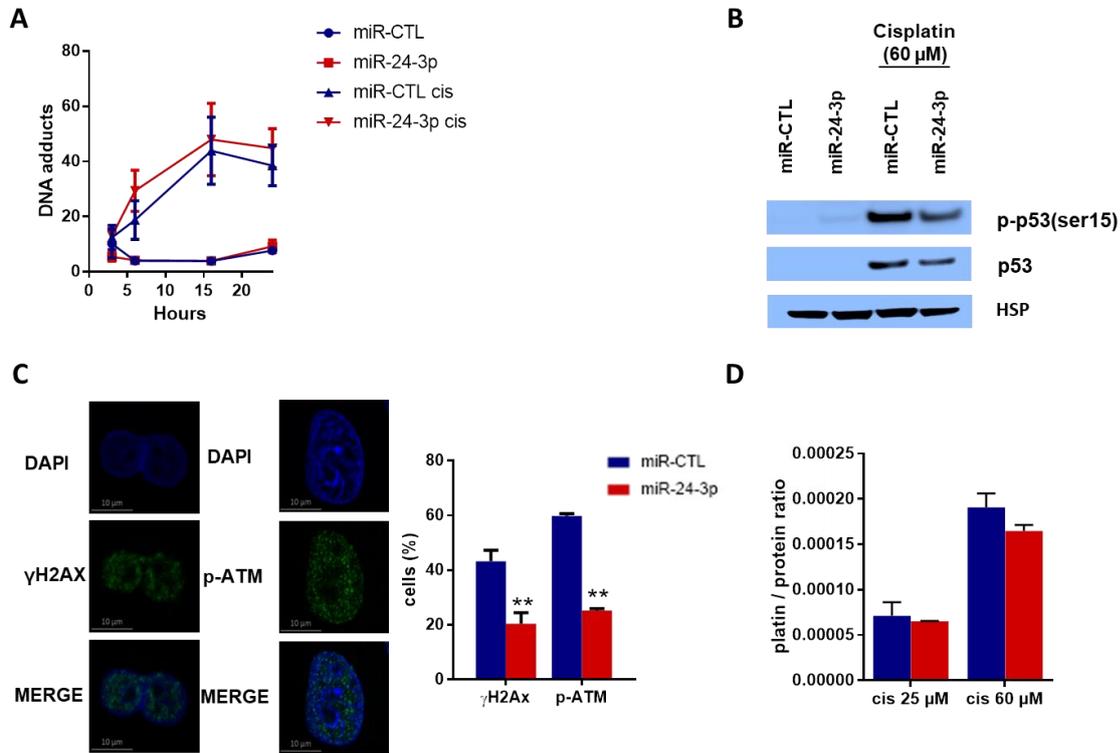


Figure 32: Effet de la surexpression de miR-24-3p sur la réponse aux lésions de l'ADN induites par le cisplatine. (A) Quantification des adduits à l'ADN formés après exposition des cellules A549 surexprimant miR-24-3p au cisplatine à différents temps. (B-C) Effet de la surexpression de miR-24-3p sur l'axe ATM- γ H2AX-p53. (B) Les cellules A549 surexprimant miR-24-3p ont été exposées au cisplatine à 60 μ M pendant 24h. L'expression de p53 et de sa forme phosphorylée en Serine 15 (p-p53(ser15)) a été évaluée par Western Blot. (C) Les cellules A549 surexprimant miR-24-3p ont été exposées au cisplatine à 25 μ M pendant 7h. Les foci nucléaires γ -H2AX et p-ATM ont été évalués par microscopie confocale ** p<0,01. (D) Concentration intracellulaire en platine des cellules A549 surexprimant miR-24-3p. (n=3 manipulations indépendantes).

Enfin, nous avons pu montrer que la surexpression de miR-24-3p affecte également la sensibilité d'autres lignées d'adénocarcinome pulmonaire présentant des anomalies structurales du gène TP53 (H1299, portant une délétion partielle homozygote du gène TP53 ; H1975, homozygote pour la mutation c.818G>A du gène TP53). Ces résultats suggèrent donc que miR-24-3p contribue à la résistance au cisplatine indépendamment du statut mutationnel du gène TP53 (**Figure 33**).

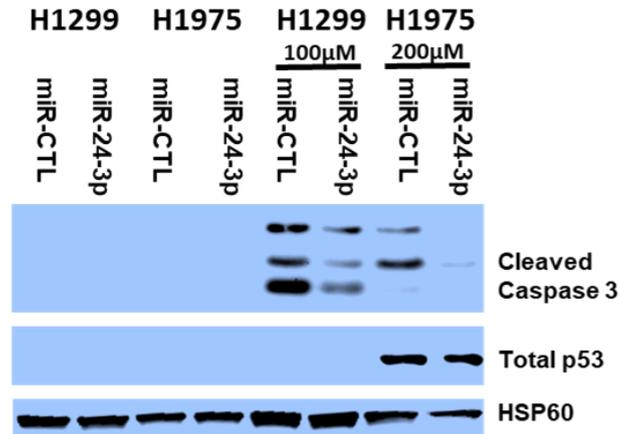


Figure 33: Effet du statut mutationnel de TP53 sur la résistance au cisplatine induite par miR-24-3p. Western Blot représentant l'effet de la surexpression de miR-24-3p dans les cellules H1299 et H1975 sur l'activation de la caspase 3 après exposition au cisplatine. (n=3 manipulations indépendantes).

miR-24-3p influence également la réponse au traitement ciblant l'EGFR

Il est maintenant bien établi qu'au moins deux cibles de miR-24-3p (PUMA et BIM) jouent un rôle fondamental dans la réponse des cellules tumorales pulmonaires aux traitements ciblant EGFR, tel que l'erlotinib (**Figure 34**) (Costa *et al.*, 2007; Takezawa *et al.*, 2011; Bean *et al.*, 2013).

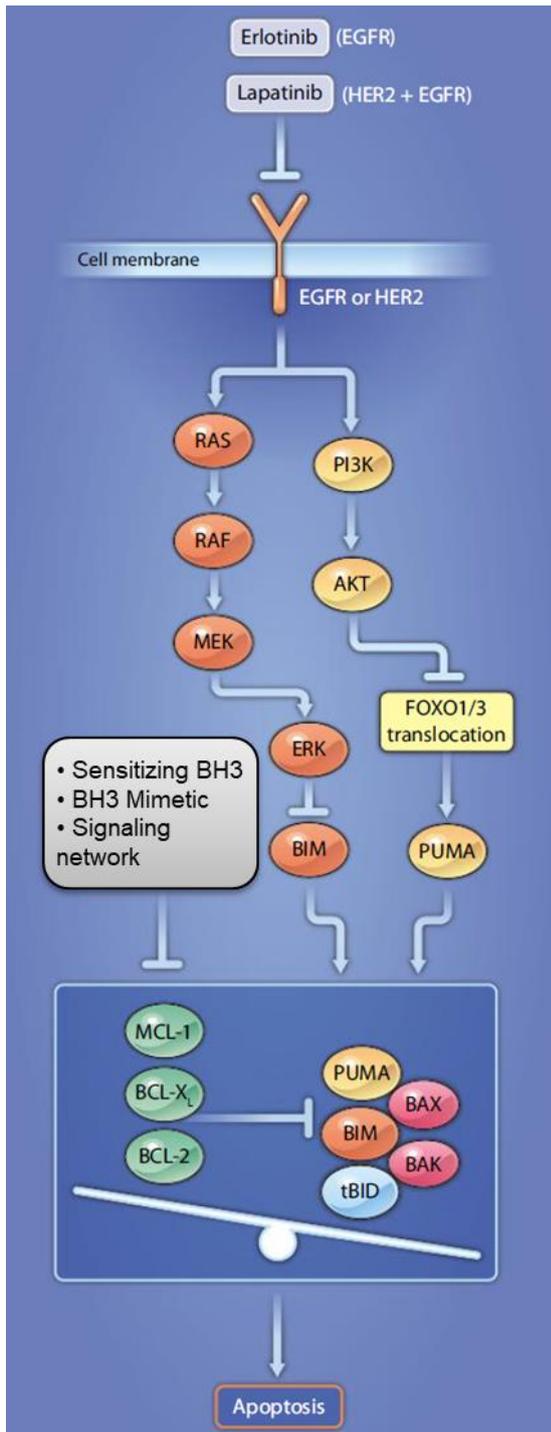


Figure 34: Rôle de BIM et PUMA dans la réponse apoptotique des thérapies ciblant EGFR. L'inhibition de la voie EGFR active les voies de signalisation RAS et PI3K qui conduisent à l'induction de BIM et PUMA respectivement pour déclencher l'apoptose. (PI3K: phosphatidyl inositol 3 kinase, RAS: Rat sarcoma protein, RAF: rapidly accelerated fibrosarcoma kinase, MEK: mitogen-activated extracellular signal regulated protein kinase, ERK: Extracellular signal-regulated kinase, AKT: protein kinase, FOXO: Forkhead Box O, Mcl-1: myeloid cell leukemia protein 1, Bcl: B cell lymphoma protein, tBid: truncated BH3 interacting

domain death agonist, Bak: Bcl2-homologous antagonist killer, Bax: Bcl2-associated X protein, PUMA: p53 regulated mediator of apoptosis). D'après Roulston, Muller and Shore, 2013.

Par conséquent, nous avons également évalué l'effet de la modulation de miR-24-3p sur la réponse à l'erlotinib de la lignée HCC827 présentant une mutation activatrice au niveau du gène codant pour l'EGFR. Nos résultats démontrent que la surexpression de miR-24-3p induit une résistance à ce composé, alors que son inhibition sensibilise les cellules (**Figure 35**). D'un point de vue mécanistique, nos résultats confirment que PUMA et BIM jouent un rôle dans la réponse des cellules tumorales pulmonaires aux traitements ciblant EGFR et montrent également pour la première fois l'importance de PDXK dans ce phénotype (**Figures 35-36**).

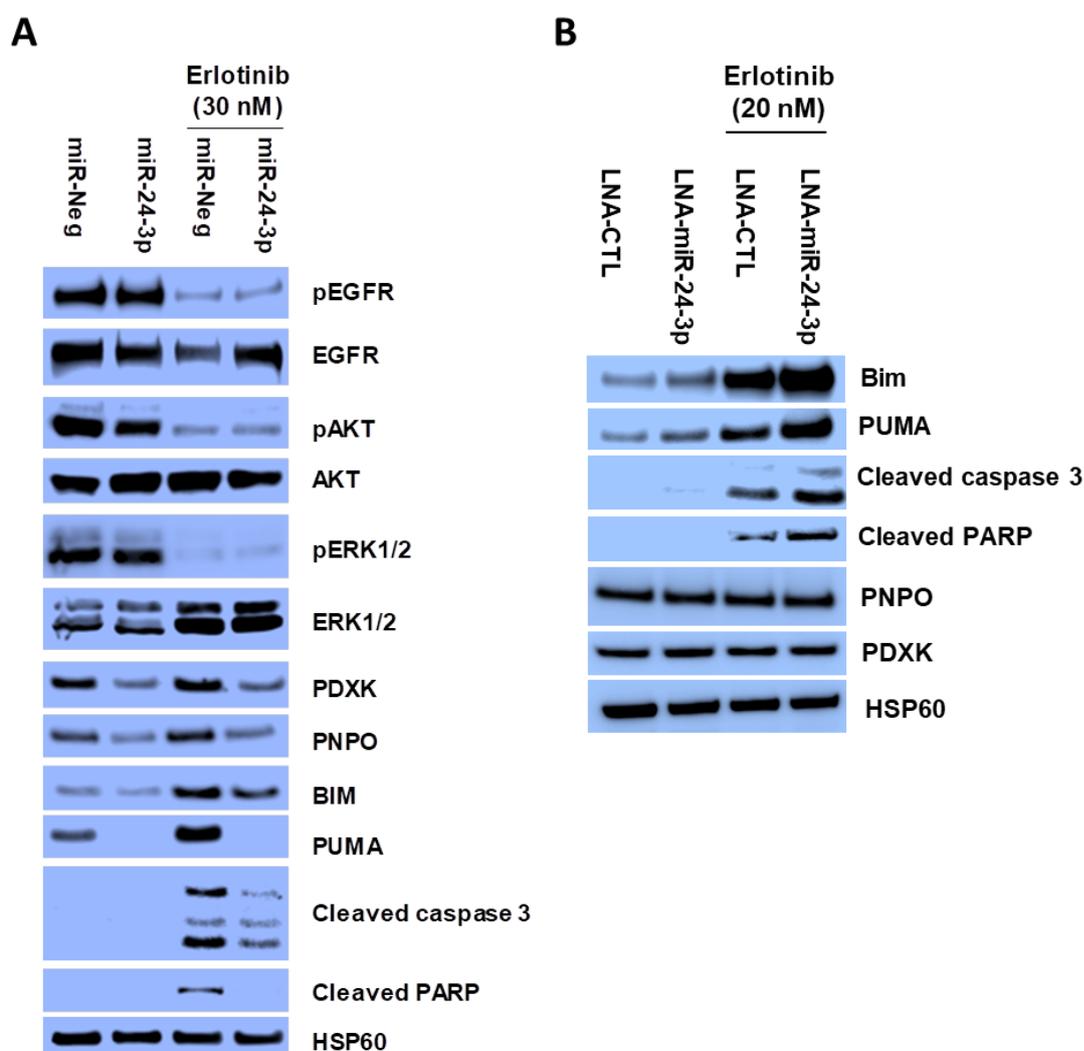


Figure 35: Effets de la modulation de miR-24-3p sur la sensibilité de la lignée HCC827 à l'erlotinib. (A) Western Blot montrant les effets de la surexpression de miR-24-3p sur ses cibles et la réponse apoptotique induite par l'erlotinib. **(B)** Western Blot montrant les effets de l'inhibition de miR-

24-3p sur ses cibles et la réponse apoptotique induite par l'erlotinib. (n=3 manipulations indépendantes).

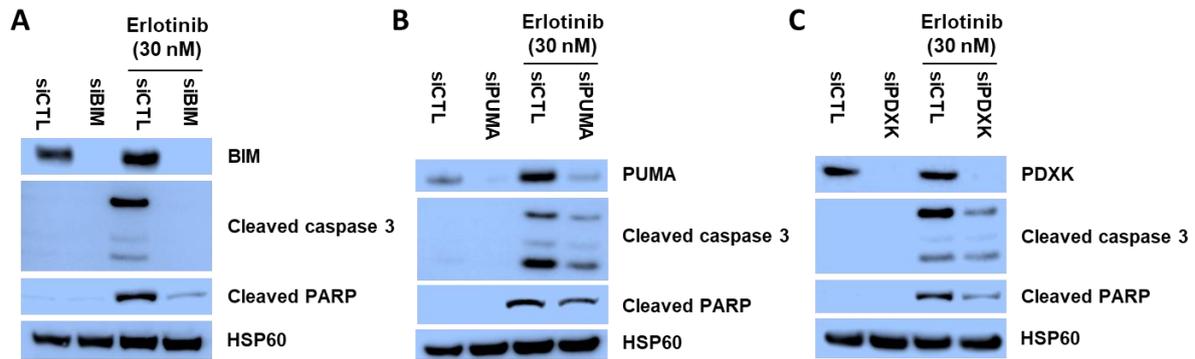


Figure 36: Effet de l'inhibition de BIM, PUMA et PDXK sur la réponse apoptotique dépendante de la caspase 3 induite par l'erlotinib. Western Blot montrant les effets de l'inhibition de BIM (A), PUMA (B) et PDXK (C) sur la voie mitochondriale apoptotique dépendante des caspases après exposition des cellules HCC827 à l'erlotinib. (n=3 manipulations indépendantes).

6. Discussion

La vision traditionnelle de l'organisation du génome a radicalement changé au cours de la dernière décennie avec la découverte d'une nouvelle classe d'ARN fonctionnels ne codant pas pour des protéines (Palazzo and Lee, 2015). Des études mécanistiques ayant établi un lien entre ces ARNnc et un large éventail de pathologies, les thérapies à base d'ARNnc offrent de ce fait de nouvelles possibilités prometteuses pour le traitement de maladies incurables (Lekka and Hall, 2018). Dans cette optique, nous avons émis l'hypothèse que les ARNnc, en particulier les miARN, jouent un rôle important dans les événements moléculaires conduisant à la résistance aux médicaments anticancéreux et ainsi, représentent de nouvelles cibles potentielles pour augmenter les taux de réponse des traitements anticancéreux. Dans cette étude, nous nous sommes concentrés sur la résistance au cisplatine dans le CPNPC et avons effectué un criblage fonctionnel pour identifier les miARN associés à la résistance au cisplatine. En particulier, nous avons identifié miR-24-3p comme un régulateur puissant de la réponse des cellules CPNPC à ce médicament.

miR-24-3p est codé sur les chromosomes 9 et 19 en association avec miR-23 et miR-27 (Y. Lee *et al.*, 2004; Yu *et al.*, 2006). Plusieurs études ont montré que miR-24-3p peut être soit un suppresseur de tumeur, soit un oncogène selon le type cellulaire étudié (Cheng *et al.*, 2005; Mishra *et al.*, 2007; Xie *et al.*, 2013). En

particulier, miR-24-3p est capable d'inhiber la prolifération et la migration des cellules dans le cancer de la prostate, le carcinome nasopharyngé ou encore le cancer de la vessie, mais favorise la croissance des gliomes, des cellules myéloïdes et des carcinomes squameux (Lin *et al.*, 2010; Chen *et al.*, 2013; Nguyen, Rich and Dahl, 2013; Zhang *et al.*, 2015; Lynch *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2016). Ce paradoxe peut s'expliquer par le fait que miR-24-3p, selon le contexte cellulaire, régule des cibles géniques distinctes dont l'inhibition influence de manière opposée le comportement cellulaire. Dans notre étude, nous avons démontré que miR-24-3p exerce un effet anti-apoptotique majeur et peut donc être considéré comme un oncogène dans le CPNPC. De plus, l'association entre le pronostic des patients et l'expression de miR-24-3p confirme le rôle oncogène de ce miRNA.

Sur le plan mécanistique, nous avons montré que miR-24-3p influence la réponse des cellules d'adénocarcinome pulmonaire au cisplatine en ciblant deux gènes pro-apoptotiques essentiels (BIM et PUMA) et deux gènes impliqués dans le métabolisme de la vitamine B 6 (PDXK et PNPO). En effet, le métabolisme de la vitamine B 6 a récemment été identifié comme un déterminant important des effets cytotoxiques du cisplatine dans le CPNPC (Lorenzo Galluzzi, Vitale, Senovilla, Olaussen, *et al.*, 2012; Aranda *et al.*, 2014). En accord avec cette étude, nous avons montré que miR-24-3p cible deux gènes critiques impliqués dans le métabolisme de la vitamine B 6 et que miR-24-3p inhibe la sensibilisation aux effets cytotoxiques du cisplatine induite par la pyridoxine. De plus, notre étude établit pour la première fois un lien moléculaire entre le métabolisme de la vitamine B 6 et la voie apoptotique médiée par BIM et PUMA.

Par ailleurs, les protéines tyrosine kinases de la famille ErbB/HER, qui comprennent le récepteur au facteur de croissance EGF (EGFR), jouent un rôle majeur dans le processus de cancérogenèse pulmonaire (Liu *et al.*, 2017). Dans les cellules tumorales, l'activité biologique d'EGFR peut être dérégulée par divers mécanismes tels que des mutations activatrices au niveau du gène *EGFR* ou sa surexpression (Gazdar, 2009). Cette dérégulation est responsable de la survie accrue des cellules tumorales, de leur prolifération et favorise l'apparition des métastases (Wee and Wang, 2017). Ainsi, la surexpression d'EGFR est observée dans plus de 60 % des patients atteints de CPNPC métastatique et est corrélée à un mauvais pronostic (Gazdar, 2009). Des inhibiteurs spécifiques du récepteur (TKI-EGFR) ont été

développés chez les patients atteints de CPNPC, en particulier ceux dont la tumeur est porteuse de mutations activatrices du gène *EGFR* (Cross *et al.*, 2014; Lee *et al.*, 2015). Comme PUMA et BIM sont les principaux effecteurs apoptotiques des TKI-EGFR (Bean *et al.*, 2013), nous avons examiné si miR-24-3p favorisait également la résistance aux traitements ciblant EGFR dans les CPNPC. Nos résultats ont démontré que la modulation des taux de miR-24-3p, comme dans le cas du cisplatine, affecte la réponse des cellules cancéreuses du poumon à l'erlotinib, un TKI-EGFR largement utilisé en clinique.

En conclusion, cette étude met en lumière le rôle central des miARN dans la régulation de l'apoptose des cellules cancéreuses pulmonaires. Nous avons identifié miR-24-3p comme un déterminant important de la réponse du CPNPC aux composés du platine et aux traitements ciblant l'EGFR en régulant les voies associées à l'apoptose. Ainsi, les stratégies visant à cibler miR-24-3p pourraient représenter une nouvelle option thérapeutique efficace pour traiter les CPNPC.

Ces travaux ont fait l'objet en particulier d'un brevet :

Pottier N, Cauffiez C, Savary G, **Dewaeles E**, Van der Hauwaert C, Mari B. Agents for the treatment of patients with NSCLC and methods to predict response, accepté le 31 mai 2018 (WO-2018096060-A1

(Voir annexe 1, p 137)

C. Prévention et traitement des effets néphrotoxiques du cisplatine grâce au blocage du récepteur adénoenergique

A_{2A}.

1. Généralités

a) L'adénosine

L'adénosine, un nucléoside composé d'une adénine et d'un ribose (**Figure 37**), est une molécule distribuée dans tous les tissus et essentielle à l'homéostasie cellulaire (Fredholm, Johansson and Wang, 2011; Antonioli *et al.*, 2013). Sattin et Rall ont en effet démontré en 1970 que l'adénosine était capable d'interagir avec des récepteurs spécifiques pour assurer la régulation de nombreuses fonctions physiologiques (Sattin and Rall, 1970). Son rôle est particulièrement bien décrit au niveau du système nerveux central, dans lequel l'adénosine joue un rôle de modulateur de la libération des neurotransmetteurs, participe à la plasticité synaptique et protège les neurones dans des situations pathologiques, en particulier celles liées à l'ischémie et au stress oxydant (Linden, 2005; Boison *et al.*, 2012). Outre son rôle dans l'homéostasie neuronale, l'adénosine a également des fonctions biologiques dans le système cardiovasculaire, en particulier dans la régulation du flux sanguin (Jacobson and Z.-G. Gao, 2006), et dans la régulation du système immunitaire (Haskó and Cronstein, 2004).

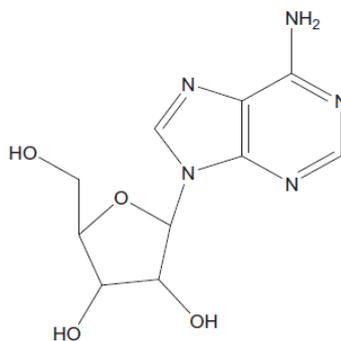


Figure 37: Structure de l'adénosine

(1) Biosynthèse de l'adénosine

La biosynthèse de l'adénosine a lieu grâce à plusieurs voies de synthèse intra et extracellulaire. Les principales sources intracellulaires d'adénosine sont le cycle de la méthionine, responsable de 30% de la production d'adénosine, et l'ATP, représentant 70% de sa production (**Figure 38**). L'ATP intracellulaire subit une série de déphosphorylations catalysées par l'apyrase et une endo-5'-nucléotidase pour aboutir à la molécule d'adénosine. Le cycle de la méthionine permet de produire de l'homocystéine et de l'adénosine sous l'effet de la S-adénylhomocystéine hydrolase à partir de la S-adénylhomocystéine (Antonioli *et al.*, 2008; Sachdeva and Gupta, 2013).

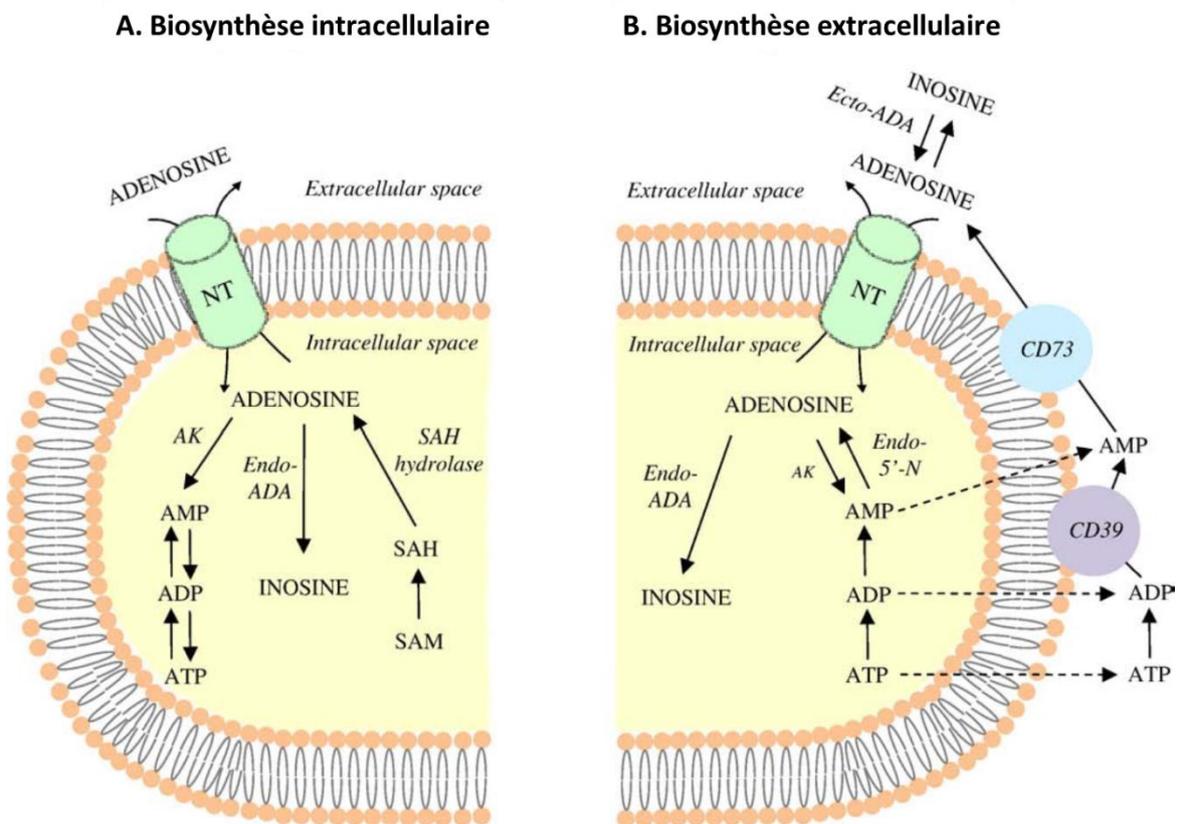


Figure 38: Biosynthèse et catabolisme de l'adénosine dans les compartiments intra et extracellulaire. (A) Dans le milieu intracellulaire, l'adénosine est principalement formée à partir de S-adenosylhomocystéine (SAH) par la S-adenosylhomocystéine hydrolase (SAH hydrolase). Après recaptage intracellulaire, l'adénosine subit une phosphorylation rapide en adénosine monophosphate (AMP) par l'adénosine kinase (AK), ou sa désamination en inosine par l'adénosine désaminase (ADA). (B) Dans le compartiment extracellulaire, l'adénosine est issue de la déphosphorylation de l'adénosine triphosphate (ATP) par l'ecto-apyrase (CD39) puis par l'ecto-5'-nucléotidase (CD73) et transportée à travers les membranes cellulaires par les transporteurs nucléosidiques (NT). L'endo-5'-nucléotidase (endo-5'-N), de même l'inhibition de l'adénosine kinase (AK), participent à l'augmentation des niveaux d'adénosine. Dans l'environnement extracellulaire, les concentrations d'adénosine sont contrôlées par l'ecto-adénosine désaminase (ecto-ADA), qui catalyse sa conversion en inosine. ADP: adénosine diphosphate, Endo-ADA: endo-adénosine désaminase, NT: transporteur nucléosidique ; SAM : S-adenosylméthionine. D'après Antonioli *et al.*, 2008.

Dans le compartiment extracellulaire, la synthèse d'adénosine est effectuée par l'action coordonnée de deux enzymes membranaires, CD39 et CD73, à partir de l'ATP extracellulaire (**Figure 38B**) (Deaglio *et al.*, 2007).

L'adénosine peut ensuite être rephosphorylée en AMP par l'adénosine kinase ou être dégradée en inosine par l'adénosine déaminase (Boison, 2013).

En condition physiologique, l'adénosine est présente en faible quantité dans les milieux intra et extracellulaire (Bertil B Fredholm *et al.*, 2001). Sa diffusion cellulaire dépend de transporteurs membranaires: les transporteurs de nucléosides équilibrateurs (ENT) et les transporteurs de nucléosides concentrateurs (CNT) (Young *et al.*, 2013). Les ENT sont des transporteurs bidirectionnels passifs qui transportent l'adénosine au travers de la membrane plasmique en fonction du gradient de concentration en adénosine (Baldwin *et al.*, 2004; Young *et al.*, 2008). Ces transporteurs sont principalement exprimés dans le système nerveux central (Baldwin *et al.*, 2004). Les CNT, quant à eux, sont des transporteurs actifs dépendant du sodium qui transportent l'adénosine contre son gradient de concentration (Gray, Owen and Giacomini, 2004; Pastor-Anglada *et al.*, 2008). Ces transporteurs sont retrouvés au niveau des organes périphériques comme le foie, les poumons, les reins et le tube digestif (Gray, Owen and Giacomini, 2004).

b) Les récepteurs à l'adénosine

Les purines extracellulaires, telles que l'adénosine, exercent leurs effets biologiques en se liant à des récepteurs purinergiques (Burnstock, 2007). Parmi eux, on distingue quatre sous-types de récepteurs à l'adénosine, les récepteurs membranaires couplés aux protéines G : A_1 , A_{2A} , A_{2B} et A_3 (**Figure 39**) (Fredholm *et al.*, 2000). Ces récepteurs présentent une expression ubiquitaire (Bertil B Fredholm *et al.*, 2001). Ils sont en effet exprimés au niveau du système nerveux central et également au niveau des tissus périphériques dont les systèmes cardiovasculaire, respiratoire, rénal et immunitaire (Bertil B Fredholm *et al.*, 2001; Fredholm *et al.*, 2011). Bien que le ligand principal de l'ensemble de ces récepteurs soit l'adénosine (Bertil B. Fredholm *et al.*, 2001), des différences dans leur affinité pour l'adénosine, leur distribution tissulaire et leur niveau d'expression ainsi que dans la nature des protéines G qui leur sont couplées ont été mises en évidence (**Tableau 3**) (Sheth *et al.*, 2014). Les récepteurs

à l'adénosine peuvent être divisés en deux groupes en fonction de leur homologie de séquence et du type de protéines G. Les récepteurs A₁ et A₃ présentent 49% d'homologie de séquence et sont préférentiellement couplés à des protéines G inhibitrices de la famille des Gi (Jacobson and Z. G. Gao, 2006). Leur activation inhibe ainsi l'activation de l'adénylate cyclase qui produit l'AMPc. A l'inverse, les récepteurs A_{2A} et A_{2B} (59% d'homologie) sont couplés à des protéines Gs qui stimulent l'activation de l'adénylate cyclase (Jacobson and Z. G. Gao, 2006).

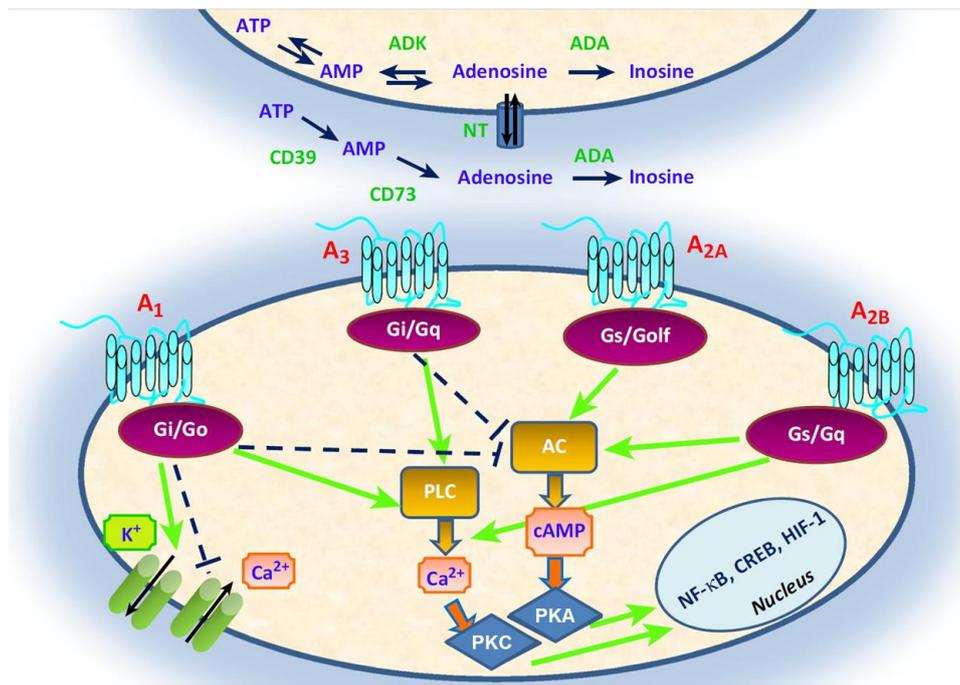


Figure 39: Voies de signalisation de l'adénosine. Les sous-types de récepteurs à l'adénosine A₁ et A₃ inhibent l'AC et induisent la stimulation de la PLC ; les récepteurs A₁ modulent également les canaux K⁺ et Ca²⁺. Les récepteurs A_{2A} et A_{2B} stimulent l'AC et augmentent ainsi les niveaux d'AMPc. Les récepteurs A_{2B} activent également la PLC, ce qui augmente les niveaux de Ca²⁺. La régulation de la PKA et de la PKC déclenche en aval une signalisation capable de moduler la transcription des gènes impliqués dans l'inflammation et la réponse cellulaire, comme NFκB, CREB et HIF1. AC: adénylate cyclase, ADA: adénosine deaminase, ADK: adénosine kinase, cAMP: cyclic AMP, CREB, response element protein, HIF-1: hypoxia-inducible factor, NF-κB: nuclear factor κB, NT: nucléoside transporter, PKA: protein kinase A, PKC: protein kinase C, PLC: phospholipase C. D'après Borea et al., 2016.

Tableau 3: Distribution, affinité et effets des récepteurs à l'adénosine

		Récepteur A1	Récepteur A2A	Récepteur A2B	Récepteur A3
distribution	forte expression	cortex, hippocampe, cervelet moelle épinière glande surrénale cœur	striatum plaquettes rate thymus leucocytes	tractus gastrintestinal vessie	testicule mastocytes
	expression intermédiaire	foie reins tissu adipeux	cœur poumons vaisseaux sanguins	poumon vaisseaux sanguins mastocytes	cervelet hippocampe
	faible expression	poumons pancréas	autres régions du cerveau	tissu adipeux glande surrénale cerveau reins	glande surrénale, thyroïde rate foie reins cœur
affinité pour l'adénosine		1-10nM (forte)	30nM (forte)	1000nM (faible)	100nM (forte)
protéines G		Gi/Go	Gs/ Golf	Gs/Gq	Gi/Gq
Effets		diminution AMPc	augmentation AMPc	augmentation AMPc	diminution AMPc

D'après Fredholm 2001.

c) Le récepteur A_{2A}

(1) Fonction du récepteur A_{2A}

Le récepteur A_{2A} (A_{2A}R) est présent de manière ubiquitaire dans l'ensemble de l'organisme (Bertil B Fredholm *et al.*, 2001). Il est notamment exprimé dans la majorité des tissus périphériques (foie, cœur, poumons et système immunitaire) et également au niveau du système nerveux central (Dixon *et al.*, 1996; Peterfreund *et al.*, 1996; Fredholm *et al.*, 2005).

Le gène du récepteur A_{2A} humain est localisé sur le chromosome 22. Il est composé de trois exons dont deux codent pour ses sept domaines transmembranaires (Le *et al.*, 1996; Fredholm *et al.*, 2000). La structure du gène est très conservée entre les espèces (Fredholm *et al.*, 2007). L'activation du récepteur A_{2A} stimule la voie AMPc-protéine kinase A (PKA) *via* la protéine Gs dans les tissus périphériques (Fredholm *et al.*, 2000; Schulte and Fredholm, 2003) ou la protéine Golf dans le cerveau (Kull, Svenningsson and Fredholm, 2000).

Dans le cerveau, les récepteurs A_{2A} interagissent avec des neurotransmetteurs pour réguler l'activité motrice, le comportement, le cycle du sommeil et la mort des cellules neuronales (Wei, Li and Chen, 2011). L'activation des récepteurs A_{2A} active

l'adénylate cyclase et la production d'AMPc *via* la protéine Golf, qui permet d'activer la PKA (Fredholm *et al.*, 2000; Schulte and Fredholm, 2003). En plus de la signalisation *via* la voie PKA, A_{2A}R peut également activer des voies dépendantes de la protéine kinase C (Cunha and Ribeiro, 2000) (**Figure 39**).

Dans les tissus périphériques, selon l'organe ou le type cellulaire, le récepteur A_{2A} joue un rôle différent. Par exemple, dans le cœur et les vaisseaux sanguins, il permet de réguler la pression sanguine et le rythme cardiaque (Schindler *et al.*, 2005) et peut également favoriser l'angiogenèse (Linden, 2005; Bahreyni *et al.*, 2018). Dans les leucocytes, il a un rôle anti-inflammatoire et protège les tissus lors d'une ischémie (Chhabra *et al.*, 2012). De plus, le récepteur A_{2A} est impliqué dans le processus de cancérogenèse (Antonioni *et al.*, 2013) notamment au niveau du microenvironnement tumoral où l'adénosine est retrouvée en concentration importante (Ohta *et al.*, 2006; Sitkovsky *et al.*, 2014). De plus, ces dernières années, plusieurs équipes ont montré une surexpression d'A_{2A}R dans les cellules cancéreuses où son activation favoriserait la croissance tumorale (Young *et al.*, 2016).

A ce jour, des modulateurs sélectifs des récepteurs de l'adénosine sont en cours d'étude dans plusieurs domaines thérapeutiques, notamment en cancérologie et dans les maladies neurodégénératives, cardiovasculaires et inflammatoires (Jacobson and Z. G. Gao, 2006). Des études ont en effet montré que l'utilisation d'antagonistes d'A_{2A}R est bénéfique dans la maladie de Parkinson (Pinna, 2014). En particulier, le KW6002 a reçu une autorisation de mise sur le marché (AMM) au Japon et aux Etats-Unis en 2019 dans cette indication (Dungo and Deeks, 2013). D'autres antagonistes, tels que le PBE-509 ont été décrits pour induire une réponse antitumorale *in vitro*, dans des modèles animaux et *ex vivo* (Mediavilla-Varela *et al.*, 2017). Des essais cliniques visant à évaluer l'effet des antagonistes A_{2A}R sont par ailleurs en cours pour le traitement de certains cancers et certaines maladies neurodégénératives comme Alzheimer.

(2) Le récepteur A_{2A} et pathologie rénale

Le rein assure trois fonctions principales : l'élimination des déchets par les urines, la régulation de l'équilibre hydro-électrolytique et la production d'hormones telles que l'érythropoïétine et la rénine. Le glomérule permet la filtration du sang en provenance des artérioles afférentes vers les tubules proximaux, puis les tubules intermédiaires

et distaux, où il va progressivement subir un appauvrissement en sels et en eau par réabsorption, jusqu'à l'excrétion finale des déchets restants *via* le tube collecteur (**Figure 40**). De nombreux métabolites et protéines directement ou indirectement liés à la voie de signalisation de l'adénosine sont retrouvés dans les différents segments rénaux, avec toutefois une prépondérance dans les tubes contournés proximaux (Chevalier, 2016).

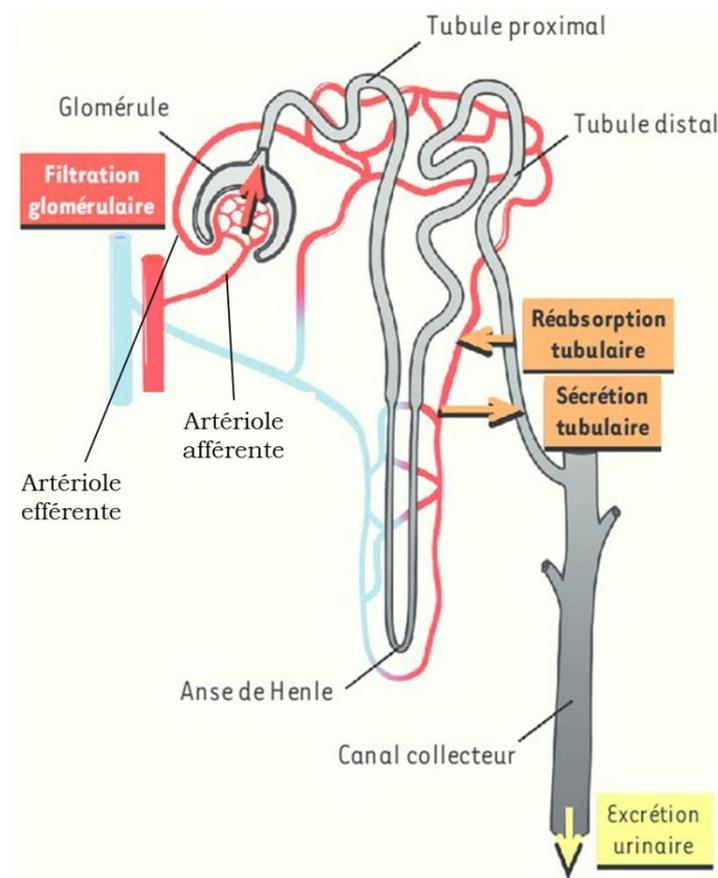


Figure 40: Le néphron, unité fonctionnelle et structurale du rein. D'après Gonzalez *et al.*, 2013.

Le rôle de l'adénosine et de ses récepteurs au niveau rénal est relativement complexe (Oyarzún *et al.*, 2017). Dans les cellules tubulaires proximales, l'adénosine stimule la réabsorption du Na^+ par l'intermédiaire des récepteurs A_1 (Welch, 2015). Au niveau de la zone corticale rénale, elle intervient également dans le rétrocontrôle tubulo-glomérulaire en induisant une vasoconstriction de l'artériole afférente en réponse à une augmentation de la concentration en Na^+ au niveau des cellules tubulaires distales, également *via* le récepteur A_1 (Vallon *et al.*, 2004). Elle entraîne ainsi une diminution du taux de filtration glomérulaire (Balakrishnan, Coles and

Williams, 1993; Vallone and Osswald, 2009). Néanmoins, l'adénosine, en se fixant sur les récepteurs A_{2A} , peut également augmenter le flux sanguin au niveau de la zone médullaire et moduler l'effet de la vasopressine au niveau du tube collecteur (Zou *et al.*, 1999; Vallon, Miracle and Thomson, 2008).

Par ailleurs, le rôle de l'adénosine et de ses récepteurs dans certaines néphropathies a été démontré. Par exemple, dans un modèle de rat atteint de glomérulonéphrite, le traitement par un agoniste d' $A_{2A}R$ entraîne une atténuation des lésions de fibrose rénale tandis qu'un traitement par un antagoniste de ce récepteur induit une aggravation des lésions rénales (Garcia *et al.*, 2011). Des résultats similaires ont été observés dans un modèle murin déficient pour le récepteur $A_{2A}R$ (Truong *et al.*, 2016). L'adénosine extracellulaire joue également un rôle anti-inflammatoire dans les glomérulonéphrites (Garcia *et al.*, 2008). En effet, l'administration d'un inhibiteur de la réabsorption de l'adénosine joue un rôle bénéfique chez la souris atteinte de glomérulonéphrite (Noji *et al.*, 2002).

2. Contexte des travaux

Les effets néphrotoxiques du cisplatine représentent un obstacle majeur à l'emploi de cet anticancéreux. Chez les patients exposés au cisplatine, la toxicité rénale s'exprime principalement par une diminution du taux de filtration glomérulaire soit dès la première cure soit lors de traitements successifs. La toxicité rénale du cisplatine est cumulative et dose dépendante, conduisant à une nécrose tubulaire associée ultérieurement à une fibrose interstitielle progressive. Elle se manifeste sous la forme d'une insuffisance rénale initialement transitoire et réversible mais susceptible d'évoluer vers une insuffisance rénale chronique définitive (Oh *et al.*, 2014). Cette toxicité justifie la mise en place de mesures de néphroprotection. Bien que de nombreuses mesures de prévention aient été proposées (Launay-Vacher *et al.*, 2008), la prévalence des cas de néphrotoxicité reste élevée et la problématique de la toxicité rénale du cisplatine demeure ainsi préoccupante. Actuellement, en pratique, la prévention de la toxicité rénale repose sur des traitements ou des mesures non spécifiques tels qu'une hyperhydratation systématique lors de l'administration de la chimiothérapie; l'éviction des médicaments néphrotoxiques ou potentiellement responsables d'une hypovolémie (diurétiques, anti-inflammatoires non stéroïdiens et inhibiteurs de l'enzyme de conversion notamment) et la surveillance régulière de la

fonction rénale (Hayati *et al.*, 2016). Par conséquent, l'identification de stratégies pharmacologiques visant à réduire significativement la néphrotoxicité du cisplatine permettrait d'améliorer la prise en charge des patients atteints de cancers.

Dans ce travail de thèse, nous avons proposé de limiter la néphrotoxicité du cisplatine grâce à la modulation pharmacologique du récepteur à l'adénosine A_{2A}.

3. Matériel et méthodes

Modèles animaux

Pour l'ensemble des procédures, des souris mâles C57BL6/J (Janvier Labs) âgées de 8 semaines, au début des expérimentations, ont été utilisées. Tous les protocoles de soins et d'expérimentation animale ont été approuvés par le comité d'éthique du bien-être animal (CEEA) de l'Université de Lille (Numéro de protocole : CEEA 201810121547473925).

Protocole d'administration aiguë du cisplatine

La néphrotoxicité est induite par l'injection intrapéritonéale d'une dose unique de cisplatine (solution injectable 1mg/mL, Accord) à 10 ou 20 mg/kg. Les animaux sont sacrifiés par dislocation cervicale, trois jours après l'injection.

Administration des antagonistes

Le KW6002 (Tocris) est dilué dans une solution contenant 15% de DMSO, 15% de cremophor (Sigma) et 70% de solution saline. Le MSX-3 (Sigma) est dilué en solution saline. La caféine (Sigma) est diluée dans l'eau de boisson.

- *Protocole d'administration aiguë du cisplatine et administration des antagonistes*

La néphrotoxicité est induite par une injection unique de cisplatine à 10 ou 20mg/kg (**Figure 41A**). La première injection d'antagoniste est réalisée un jour avant le traitement au cisplatine. Les souris sont traitées quotidiennement avec une injection intrapéritonéale de MSX-3 (5mg/kg), KW6002 (0,3 ; 1 ; 3 ; 10 ; 30mg/kg) ou ont un accès illimité à l'eau de boisson dans laquelle la caféine est diluée à 0,3g/L jusqu'au sacrifice (**Figure 41B**). Un intervalle d'au moins une heure est conservé entre les

injections de cisplatine et des antagonistes. Les animaux sont sacrifiés par dislocation cervicale, trois jours après la dernière injection. Les reins sont prélevés et stockés dans une solution de RNA later (Thermofisher), formolés ou congelés.

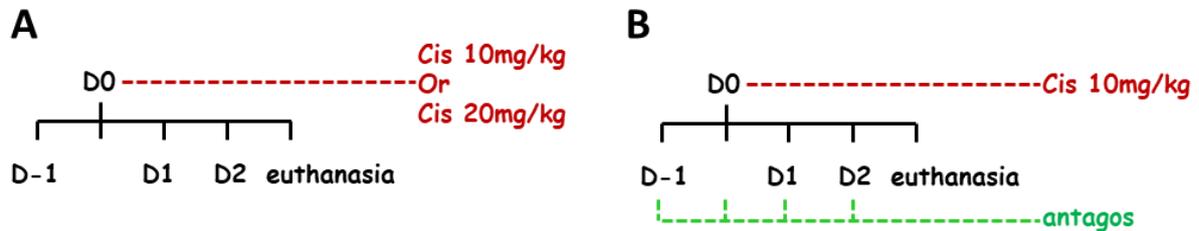


Figure 41: Protocole expérimental d'administration aiguë du cisplatine. (A) Administration unique de cisplatine à 10 ou 20mg/kg. (B) Administration des antagonistes et du cisplatine. Cis: cisplatin, D: day, antagos: antagonists

- *Protocole d'administration sub-chronique et administration des antagonistes*

Ce protocole consiste à injecter 8 doses consécutives de cisplatine à 2mg/kg ou 6 doses consécutives de cisplatine à 3mg/kg avec 24h d'intervalle. Les souris sont traitées quotidiennement avec du KW6002 (3mg/kg) jusqu'au sacrifice (**Figure 42**). La première injection de KW6002 est effectuée 4 jours avant la première injection de cisplatine. Un intervalle de 24h est maintenu entre chaque injection de KW6002. Les animaux sont sacrifiés par dislocation cervicale trois jours après la dernière injection de cisplatine. Les reins sont prélevés et stockés dans une solution de RNA later (Thermofisher), formolés ou congelés.

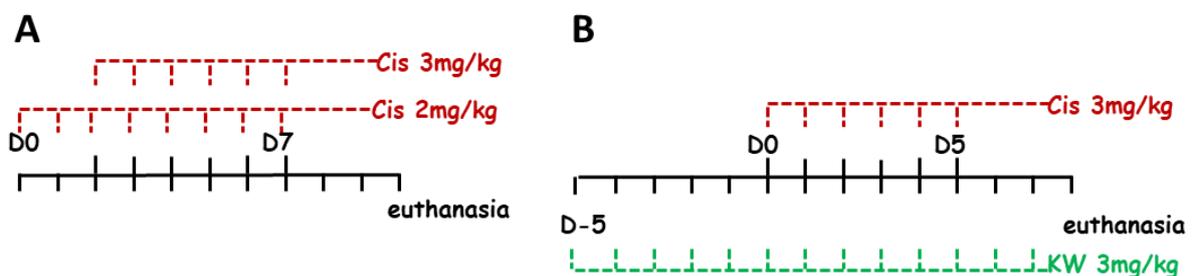


Figure 42: Protocole expérimental d'administration sub-chronique du cisplatine. (A) Administrations répétées de cisplatine à 2 ou 3mg/kg. (B) Administration du KW6002 (KW) et du cisplatine à 3mg/kg. Cis : cisplatin, D : day

- *Greffes syngéniques*

Les cellules LLC (Lewis Lung Cancer cells, ATCC) ont été cultivées dans du milieu DMEM supplémenté par 10% de sérum de veau fœtal et 1% de pénicilline-streptomycine. 10 millions de cellules sont mises en solution dans un mélange PBS : matrigel (1:1), puis sont injectées par voie sous-cutanée dans le flanc droit d'animaux anesthésiés. Les tumeurs sont mesurées à l'aide d'un pied à coulisse et les volumes tumoraux sont estimés à l'aide de l'équation $\frac{1}{2}$ (longueur x largeur²). Lorsque le volume tumoral atteint 100 mm³, les souris sont réparties de manière aléatoire en quatre groupes : un groupe témoin (véhicule), un groupe recevant le KW6002, un groupe cisplatine et un dernier groupe cisplatine + KW6002. Les souris sont ensuite soumises au protocole de lésions rénales subchroniques induites par le cisplatine (**Figure 43**). Les tumeurs et les reins sont prélevés et stockés dans une solution de RNA later (Thermofisher), formolés ou congelés.

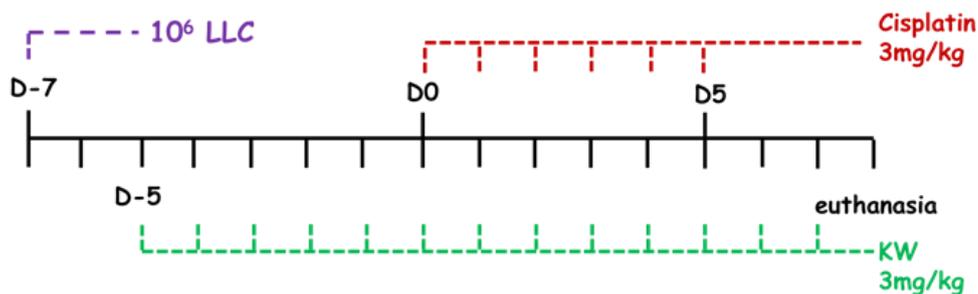


Figure 43: Protocole expérimental de greffes syngéniques.
 LLC: Lewis Lung Cancer cells , KW: KW6002, D: day.

Dosage de l'urée plasmatique

Avant le sacrifice par dislocation cervicale, des échantillons de sang sont collectés par prélèvement rétro-orbitaire. La fonction rénale est évaluée par le dosage de l'urée plasmatique à l'aide de l'automate AU480 (Beckman Coulter).

Dosage du platine dans les tissus

Les tissus rénaux ou tumoraux sont digérés par du HCl (acide chlorhydrique 30% Suprapur®, Merck). Le dosage du platine est ensuite déterminé par spectrophotométrie d'absorption atomique dans un four à graphite (GF-AAS) avec un instrument Analyst 800 (Perkin Elmer) équipé d'un Auto Sampler AS 800 (Perkin

Elmer). Les concentrations de platine sont exprimées en fonction du poids des tissus. La limite de détection pour le platine est inférieure à 10µg/L.

Histologie

Des coupes de 3 µm d'épaisseur des reins fixés au formol sont utilisées pour réaliser des colorations hématoxyline éosine et PAS (Periodic Acid Schiff). Les lames sont scorées en aveugle par un anatomopathologiste, selon le score préalablement décrit par Pellegrini *et al.*, 2014:

0 = pas de lésion

1 = dommages minimum caractérisés par la présence de nécrose et de débris

2 = légers dommages avec des cellules isolées nécrotiques, pycnotiques ou apoptotiques

3 = dommages modérés caractérisés par une distension, une vacuolisation tubulaire et des débris cellulaires.

4 = dommages sévères avec d'occasionnels dépôts hyalins, de la nécrose épithéliale éparse ainsi qu'un affinement de l'épithélium tubulaire.

5 = dommages très sévères caractérisés par une nécrose épithéliale tubulaire étendue à tous les segments, perte de la partie épithéliale des tubules avec des débris cellulaires intraluminaux étendus et des dépôts hyalins fréquents particulièrement dans la région médullaire.

Culture cellulaire

Les cellules épithéliales tubulaires proximales rénales (RPTEC/hTERT1) immortalisées par le rétrovirus pLXSN-hTERT (ATCC CRL-4031) sont cultivées dans du milieu DMEM/F12 (Dulbecco's modified Eagle's medium and Ham's F12 medium, Thermofisher) supplémenté avec 1% de pénicilline/streptomycine, 5pmol/L de triiodo-L-thyronine, 10ng/mL EGF humain recombinant, 3,5µg/mL d'acide ascorbique, 5µg/mL de transferrine humaine, 5µg/mL d'insuline, 25ng/mL de prostaglandine E1, 25ng/mL hydrocortisone ; 8,65ng/mL de sélénite ; 0,1mg/mL G418 et 1,2g/L de bicarbonate de sodium (Sigma). Les cellules sont cultivées à 37°C en milieu humide avec 5% de CO₂.

Les cellules sont cultivées en plaque 6 puits (250 000 cellules/puits) et exposées au cisplatine à 50 μM seul ou en combinaison avec les antagonistes du récepteur A_{2A} KW6002 à 50 μM ou SCH58261 à 25 μM pendant 48 heures.

Extraction des ARN totaux

ARN tissulaires

L'extraction des ARN totaux tissulaires est réalisée à partir d'un quart de rein. Les échantillons sont plongés dans 5mL de Trizol (Invitrogen) contenu dans des tubes M (Miltenyi Biotec). La dissociation est effectuée à l'aide du dissociateur gentleMACS (Miltenyi Biotec). Le chloroforme est ajouté en respectant la proportion 0,2mL de chloroforme / mL de Trizol. Les échantillons sont vortexés pendant 15 secondes puis incubés à température ambiante pendant 2 à 3 minutes. Après centrifugation à 4°C, pendant 45 minutes à 4000g, la phase aqueuse contenant les ARN est récupérée. L'isopropanol est ajouté en respectant la proportion 0,5 mL d'isopropanol/mL de Trizol. Les échantillons sont incubés 10 minutes à température ambiante, puis centrifugés à 4°C, pendant 45 minutes à 4000g. Après élimination du surnageant, le culot est lavé successivement par de l'éthanol 75% froid, suivi d'une centrifugation (4°C, 15 minutes, 4000g). Les culots sont séchés à l'air libre puis repris dans 300 μL d'eau RNase-free. Le dosage des ARN totaux est effectué par spectrophotométrie à l'aide du Biotech Spec-nano (Shimadzu Biotech).

ARN cellulaires

L'extraction des ARN totaux cellulaires est effectuée à l'aide du kit miRNeasy (Qiagen) selon les recommandations du fournisseur.

Expression des ARNm

La rétro-transcription (RT) est effectuée sur 1 μg d'ARN total à l'aide du kit High capacity cDNA Reverse Transcription (Thermofisher) selon les recommandations du fournisseur.

La PCR quantitative est réalisée en duplicat en chimie TaqMan à partir de 5 μL de produits de RT dilué au 5^{ème}, 10 μL de tampon TaqMan Universal Master Mix II, no UNG et de 1 μL de sondes TaqMan (fournisseur). Les essais utilisés sont les suivants : Neutrophil Gelatinase Associated Lipocalin Hu-NGAL (Assay ID

Hs00194353_m1), Mm-NGAL (Assay ID Mm01324470_m1), Kidney Injury Molecule-1 Hu-Kim-1 (Assay ID Hs00273334_m1), Mm-Kim (Assay ID Mm00506686_m1), Tumor Necrosis Factor alpha Hu-TNF (Assay ID Hs00174128_m1), Mm-TNF (Assay ID Mm00443258_m1), Interleukin-6 Hu-IL6 (Assay ID Hs00174131_m1), Mm-IL6 (Assay ID Mm00446190_m1), Hu-A2AR (Assay ID Hs00169123_m1), Mm-A2AR (Assay ID Mm00802075_m1), Hu-Bax (Assay ID Hs00180269_m1), Mm-Bax (Assay ID Mm00432051_m1), Hu-Bcl2 (Assay ID Hs00608023_m1), Mm-Bcl2 (Assay ID Mm00477631_m1), Hu-CTR1 (Assay ID Hs00741015_m1), Mm-CTR1 (Assay ID Mm00612987_m1), Hu-OCT2 (Assay ID Hs00533907_m1), Mm-OCT2 (Assay ID Mm00457295_m1), Hu-ATP7A (Assay ID Hs00163707_m1), Mm-ATP7A (Assay ID Mm00437663_m1), Hu-ATP7B (Assay ID Hs00163739_m1), Mm-ATP7B (Assay ID Mm00599675_m1), Hu-MATE1 (Assay ID Hs00979028_m1), Mm-MATE1 (Assay ID Mm00840361_m1). L'amplification est réalisée dans l'appareil StepOne Plus Real Time PCR System. L'analyse des résultats est réalisée par la méthode comparative des ddCt. La normalisation est effectuée grâce à l'expression du gène de référence de la cyclophiline A (gène PPIA, assay Mm02342430 et assay Hu99999904).

Extraction protéique et immunoblotting

Les cellules sont lysées dans un tampon de lyse (RIPA, Sigma) auquel est ajouté un cocktail d'inhibiteurs de protéases et de phosphatases (Pierce). Les lysats sont quantifiés à l'aide d'un test de BCA (BiCinchoninic acid Assay) (Thermo Scientific). Les protéines (10µg par échantillon) sont séparées par électrophorèse sur gel SDS-polyacrylamide (Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide) et transférées sur des membranes de nitrocellulose. Les membranes sont bloquées dans une solution saline de Tris tamponnée (TBS) contenant 0,1% de Tween 20 (TBST) et 5% de lait écrémé puis incubées avec les anticorps primaires dirigés contre «cleaved caspase 3 » (#9661, Cell Signaling) et « cleaved PARP » (#5625, Cell Signaling) sur la nuit à 4°C. Après plusieurs lavages, les membranes sont incubées avec les anticorps secondaires couplés à la peroxydase pendant 1 heure puis de nouveau lavées dans du TBST pendant 30min. La révélation est réalisée à l'aide du kit ECL select (Amersham) sur l'imager ImageQuant™ LAS 4000 (GE Healthcare)

Pour s'assurer d'une charge protéique égale, les membranes ont été également incubées avec des anticorps anti-HSP60 (sc 1052, Santa Cruz).

Séquençage ARN

Le séquençage a été réalisé par la plateforme GenomEast de l'Institut de Génétique et de Biologie Moléculaire et Cellulaire (UMR 7104 CNRS-UdS / INSERM U964). L'analyse de données a été réalisée grâce au logiciel DAVID (<https://david.ncicrf.gov/>).

Viabilité cellulaire

Vingt-quatre heures après ensemencement (40000 cellules/puits) dans des plaques 96 puits, les cellules RPTEC/hTERT1 sont exposées au cisplatine à 50µM (en combinaison avec des doses croissantes de KW6002 ou SCH58261 comprises entre 0 et 64µM pendant 48 heures. La viabilité cellulaire est mesurée à l'aide du kit Celltiter glo (Promega).

Activité des caspases 3/7

Les cellules sont cultivées en plaques 96 puits (40000 cellules / puits) et sont exposées au cisplatine à 50µM en combinaison avec des doses croissantes de KW6002 ou de SCH58261 comprises entre 0 et 64µM pendant 48 heures. La mesure de l'activité caspase 3/7 est réalisée à l'aide du kit caspase 3/7 glo (Promega).

Analyses statistiques

Les résultats sont exprimés sous la forme des moyennes \pm SEM. Les statistiques sont réalisées en utilisant un test ANOVA, ou un test de Kruskal Wallis suivi d'une correction post-hoc Fisher's LSD en utilisant le logiciel GraphPad Prism. Les résultats sont considérés significatifs quand $p < 0,05$.

4. Résultats

Modèles *in vivo* de toxicité rénale induite par le cisplatine

A partir des données de la littérature, nous avons mis au point deux modèles de néphrotoxicité induite par le cisplatine. Les souris soumises à l'administration aiguë ou sub-chronique de cisplatine présentent une altération de leur fonction rénale, marquée par une augmentation dose-dépendante de l'urée plasmatique (**Figure 44A-B**) et la présence de lésions histologiques rénales sévères, principalement de type nécrotique (**Figure 44C-D**). De plus, l'expression des marqueurs de souffrance

rénale NGAL (Neutrophil Gelatinase Associated Lipocalin) (**Figure 44E-F**) et KIM-1 (Kidney Injury Molecule 1) (**Figure 44G-H**) augmente significativement en fonction de la dose de cisplatine.

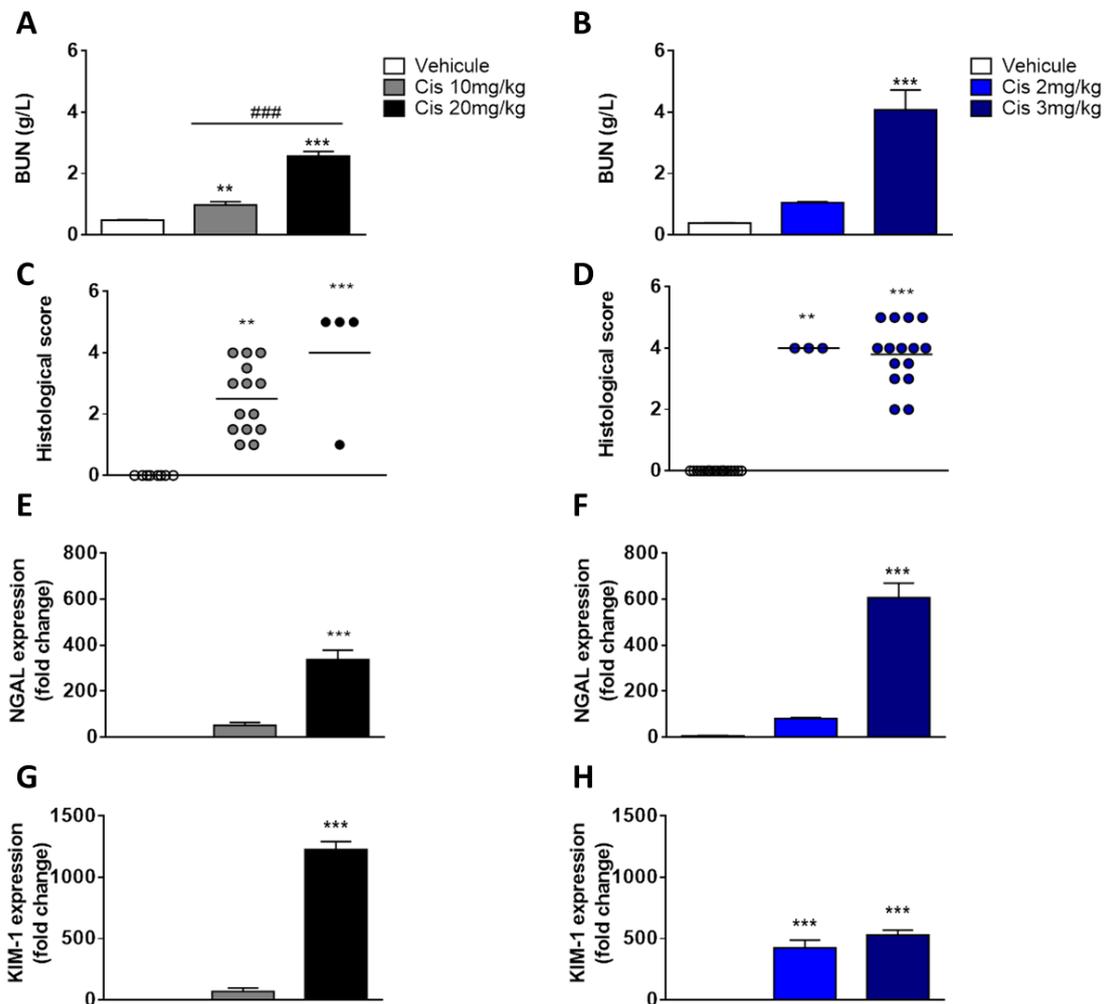


Figure 44: Néphrotoxicité induite par le cisplatine. L'administration aiguë (**A, C, E, G**) ou sub-chronique (**B, D, F, H**) de cisplatine induit des lésions rénales. (**A-B**) Dosage de la concentration en urée. (**C-D**) Score histologique des lésions rénales. (**E-F**) Expression génique du marqueur de souffrance rénale NGAL. (**G-H**) Expression génique du marqueur de souffrance rénale KIM-1. Résultats exprimés en moyenne \pm SEM. BUN: blood urea nitrogen, NGAL: neutrophil gelatinase activated lipocalin, KIM-1: kidney molecule 1. ** $p < 0,01$ versus véhicule; *** $p < 0,001$ versus véhicule; ### $p < 0,001$ versus cis10. (n=6-8 animaux/ groupe). Cis: cisplatine.

De manière intéressante, nous avons mis en évidence pour la première fois que l'expression rénale d'A_{2A}R est significativement induite par le cisplatine (**Figure 45A-B**). De plus, l'expression relative de ce récepteur est corrélée à la concentration d'urée plasmatique (**Figure 45C**) et à l'expression rénale de NGAL (**Figure 45D**) et KIM-1 (**Figure 45E**).

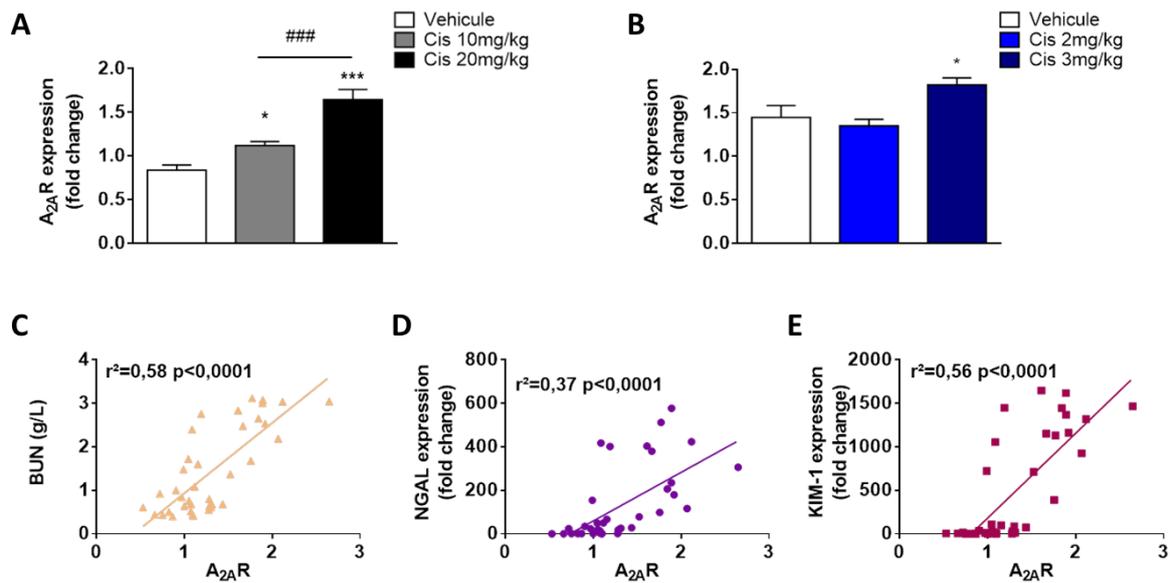


Figure 45: Modulation de l'expression du récepteur A_{2A} par le cisplatine. (A) Expression relative du récepteur A_{2A} dans le modèle de néphrotoxicité induite par l'administration aiguë de cisplatine. (B) Expression relative du récepteur A_{2A} dans le modèle de néphrotoxicité induite par l'administration répétée de cisplatine. Résultats exprimés en moyenne \pm SEM. (C-E) Corrélation entre l'expression d'A_{2A}R et (C) l'urée, (D) NGAL et (E) KIM-1. * $p<0,05$ versus véhicule ; *** $p<0,001$ versus véhicule ; ### $p<0,001$ versus cis10. $n=6-8$ animaux / groupe. BUN: blood urea nitrogen, NGAL: neutrophil gelatinase activated lipocalin, KIM-1: kidney molecule 1.

Effet de l'inhibition pharmacologique du récepteur A_{2A} sur la toxicité rénale induite par le cisplatine

Afin d'évaluer l'effet protecteur potentiel de l'inhibition pharmacologique d'A_{2A}R sur les lésions rénales induites par le cisplatine, l'urée plasmatique, considérée comme l'un des principaux marqueurs de la fonction rénale, et les lésions histologiques ont été évaluées dans un modèle expérimental aigu. L'inhibition d'A_{2A}R, à l'aide d'un antagoniste sélectif, le KW6002, a permis d'observer une amélioration de la fonction rénale (**Figure 46A**) associée à la présence de lésions rénales moins sévères (**Figure 46B**). De plus, l'administration de KW6002 a également permis de limiter la surexpression de NGAL et de KIM-1 induite par le cisplatine (**Figure 46C-D**). L'expression relative de deux marqueurs inflammatoires, l'IL-6 et le TNF α , a également été significativement réduite lorsque l'antagoniste sélectif de l'A_{2A}R a été administré conjointement avec le cisplatine (**Figure 46E-F**).

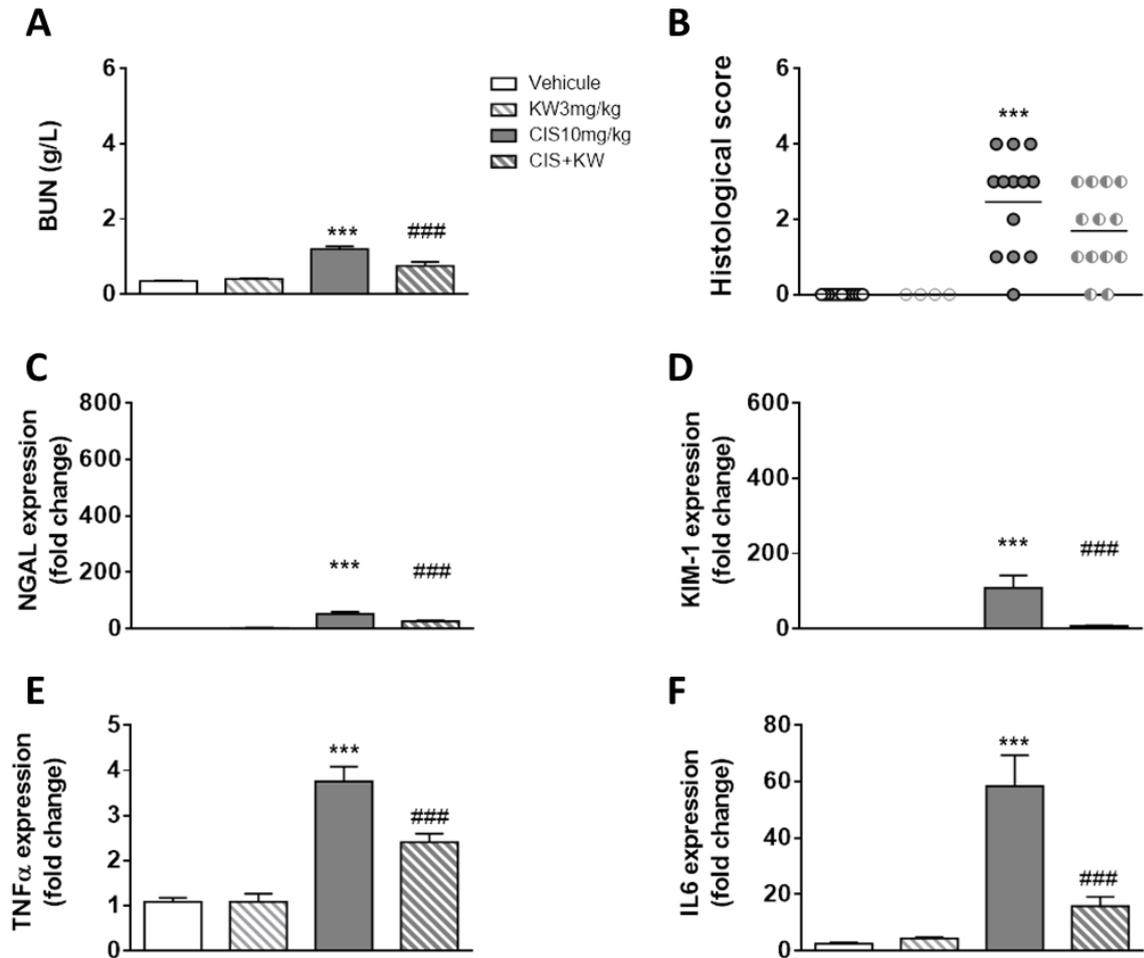


Figure 46: L'inhibition pharmacologique du récepteur A_{2A} par le KW6002 atténue la toxicité rénale induite par l'administration aiguë de cisplatine. (A) Dosage de l'urée plasmatique (B) Score histologique des lésions rénales. (C-D) Expression génique des marqueurs de souffrance rénale (C) NGAL et (D) KIM-1. (E-F) Expression génique des marqueurs inflammatoires (E) TNF α et (F) IL6. Résultats exprimés en moyenne \pm SEM *** $p < 0,001$ versus véhicule ; ### $p < 0,001$ versus cis10. $n = 8$ animaux /groupe. BUN: blood urea nitrogen, NGAL: neutrophil gelatinase activated lipocalin, KIM-1: kidney molecule 1, TNF α : Tumor Necrosis Factor α , IL6: Interleukin 6, KW: KW6002, Cis: cisplatine.

Ces données ont été complétées par la réalisation d'une étude dose / effet du KW6002. Les doses de 1 et 3mg/kg sont les doses permettant d'obtenir l'effet néphroprotecteur le plus important dans le modèle de toxicité rénale aiguë induite par le cisplatine (**Figure 47**). De plus, nous avons observé que le KW6002 n'exerce plus son effet protecteur à des concentrations plus élevées, de l'ordre de 10 à 30mg/kg (**Figure 47**).

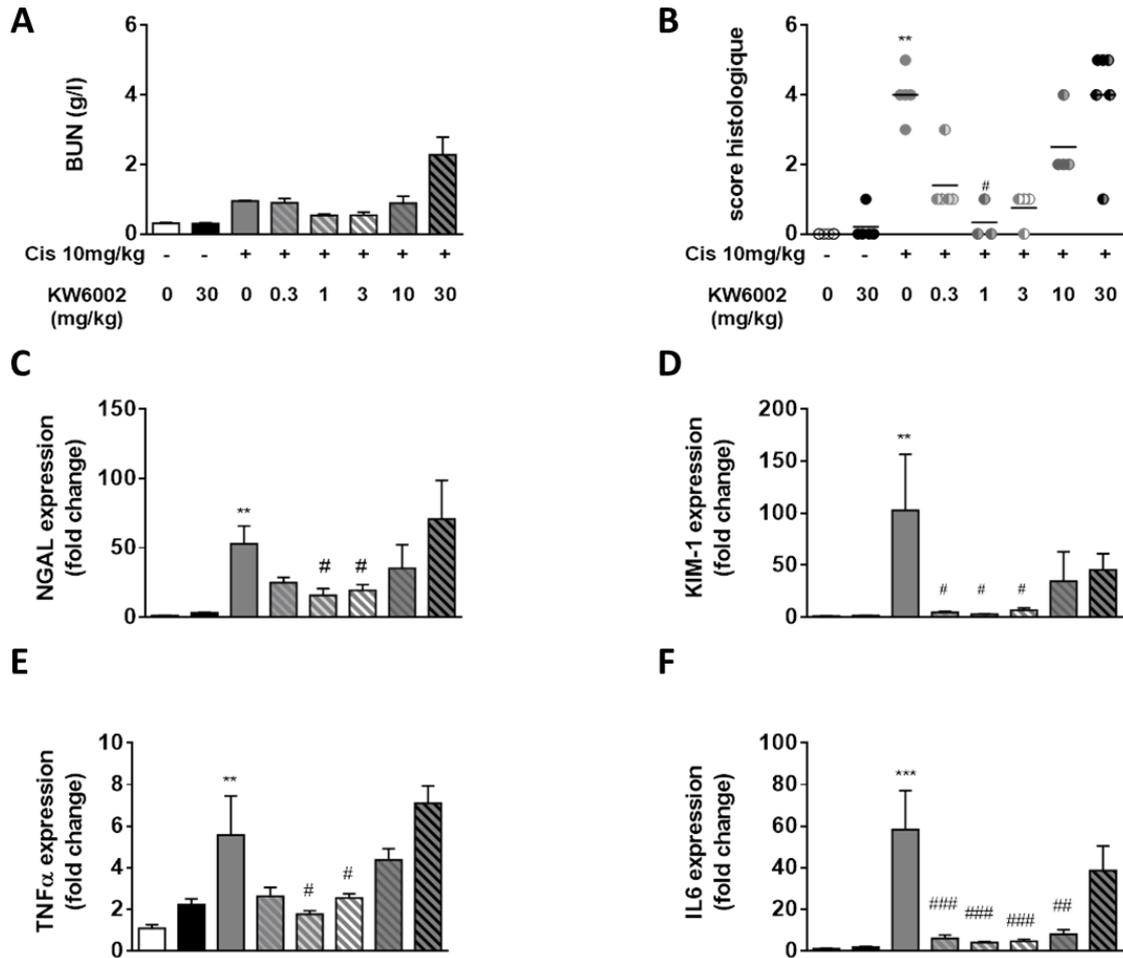


Figure 47: Effet de la dose de KW6002 administrée sur la néphrotoxicité du cisplatine. (A) Dosage de l'urée plasmatique. (B) Score histologique des lésions rénales **p<0,01 versus véhicule ; # p<0,05 versus cis10. (C-D) Expression génique des marqueurs de souffrance rénale (C) NGAL et (D) KIM-1 **p<0,01 versus véhicule ; # p<0,05 versus cis10. (E-F) Expression génique des marqueurs inflammatoires (E) TNFα **p<0,01 versus véhicule ; # p<0,05 versus cis10 et (F) IL6 *** p<0,001 versus véhicule ; ### p<0,001 versus cis10 ; ## p<0,01. Résultats exprimés en moyenne +/- SEM. n=6 animaux /groupe. BUN: blood urea nitrogen, NGAL: neutrophil gelatinase activated lipocalin, KIM-1: kidney molecule 1, TNFα: Tumor Necrosis Factor α, IL6: Interleukin 6, Cis: cisplatine.

Par ailleurs, l'utilisation d'un autre antagoniste sélectif d'A_{2A}R, MSX-3, a également permis d'observer une tendance à la réduction des altérations rénales induites par une seule injection de cisplatine à 10 mg/kg (**Figure 48**). En revanche, la caféine, un antagoniste non sélectif des récepteurs de l'adénosine, n'a démontré aucun effet bénéfique (**Figure 48**).

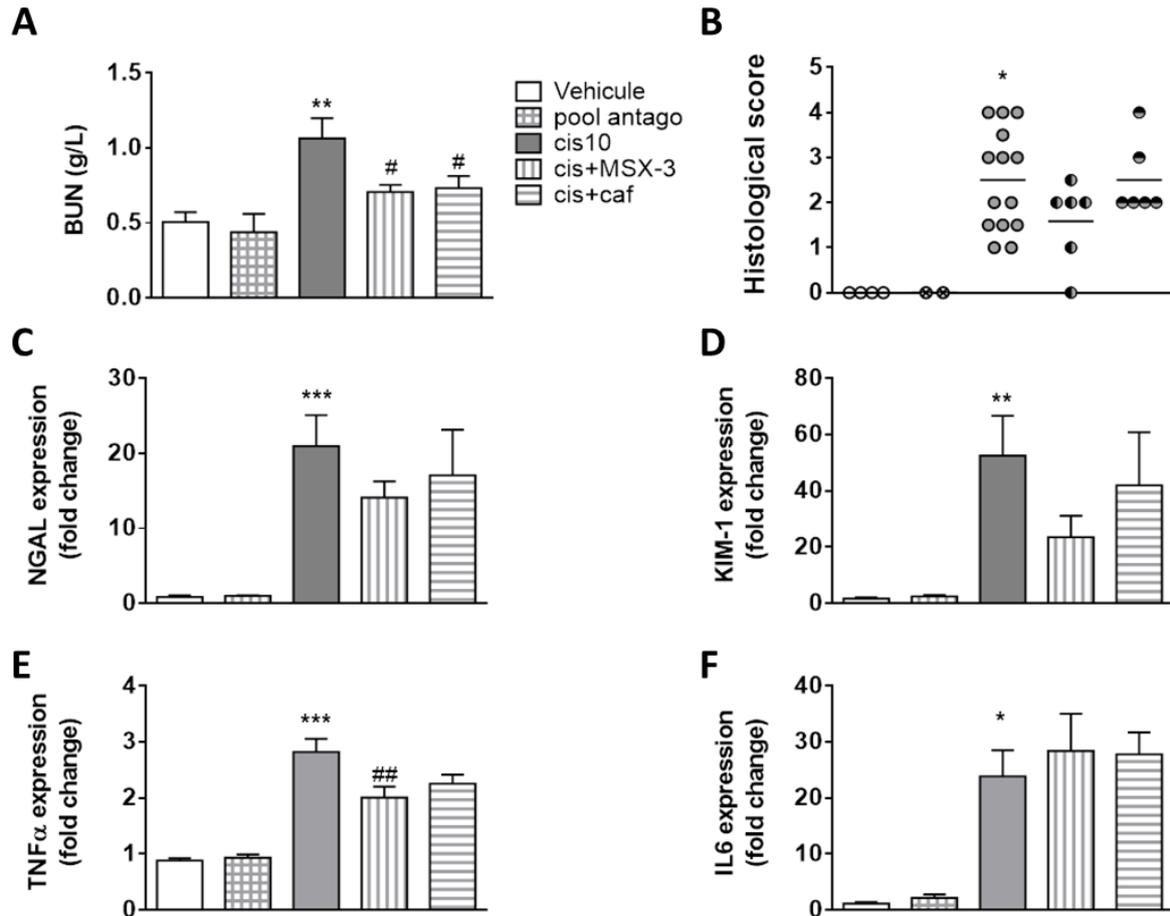


Figure 48: Effet de l'administration du MSX-3 et de la caféine sur la toxicité rénale induite par le cisplatine. (A) Dosage de l'urée plasmatique (B) Score histologique des lésions rénales. (C-D) Expression génique des marqueurs de souffrance rénale (C) NGAL et (D) KIM-1. (E-F) Expression génique des marqueurs inflammatoires (E) TNF α et (F) IL6. Moyenne \pm SEM. * $p < 0.05$ versus véhicule, ** $p < 0.01$ versus véhicule, *** $p < 0,001$ versus véhicule ; # $p < 0.05$ versus cis10, ## $p < 0.01$ versus cis10. $n = 6-8$ animaux /groupe. BUN: blood urea nitrogen, NGAL: neutrophil gelatinase activated lipocalin, KIM-1: kidney molecule 1, TNF α : Tumor Necrosis Factor α , IL6: Interleukin 6, pool antago: antagonist pool, caf: caffeine.

Enfin, le KW6002 a également montré un effet néphroprotecteur dans un modèle d'administration sub-chronique de cisplatine (6 jours à 3 mg/kg) (**Figure 49**).

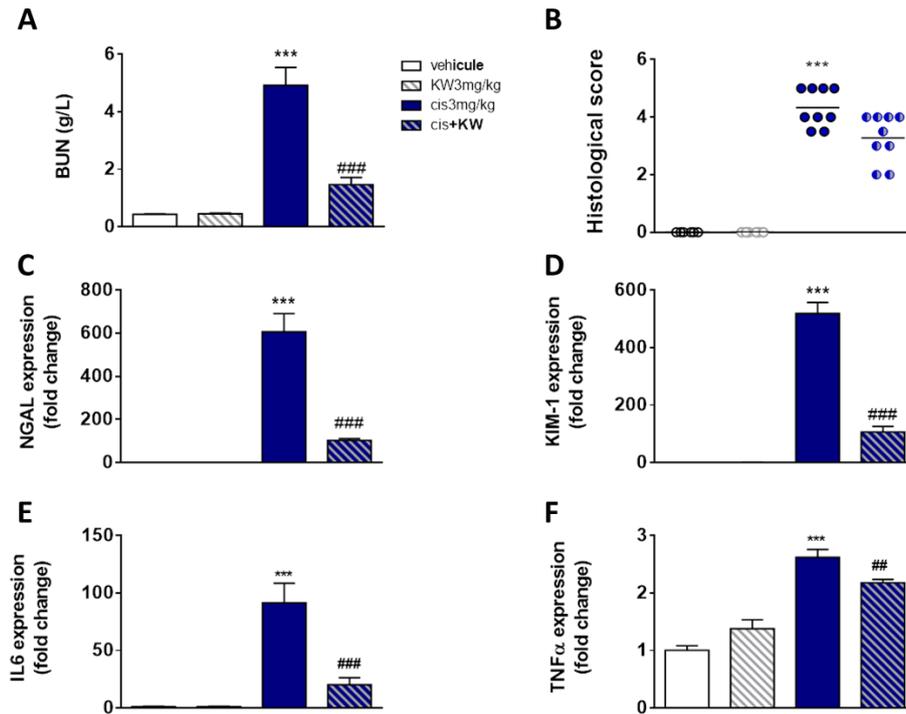


Figure 49: L'inhibition pharmacologique du récepteur A_{2A} par le KW6002 atténue la toxicité rénale induite par l'administration sub-chronique du cisplatine. (A) Dosage de l'urée plasmatique. **(B)** Score histologique des lésions rénales. **(C-D)** Expression génique des marqueurs de souffrance rénale **(C)** NGAL et **(D)** KIM-1. **(E-F)** Expression génique des marqueurs inflammatoires **(E)** TNF α et **(F)** IL6. Moyenne \pm SEM *** $p < 0,001$ versus véhicule ; ## $p < 0,01$ versus cis10, ### $p < 0,001$ versus cis10. $n = 6-8$ animaux /groupe. BUN: blood urea nitrogen, NGAL: neutrophil gelatinase activated lipocalin, KIM-1: kidney molecule 1, TNF α : Tumor Necrosis Factor α , IL6: Interleukin 6, Cis: cisplatine, KW: KW6002.

Analyse transcriptomique

Afin de mieux comprendre les événements moléculaires qui sous-tendent les effets bénéfiques de l'inhibition d'A_{2A}R par ses antagonistes sur la toxicité rénale du cisplatine, nous avons utilisé une approche transcriptomique. L'analyse PCA (principal component analysis) a mise en évidence des profils d'expression très similaires entre les gènes des groupes véhicule (VEH) et KW6002 (KW). Les gènes des groupes cisplatine (CIS) et cisplatine KW6002 (CIS+KW), quant à eux, présentent des profils différents des groupes contrôles et différents entre eux (**Figure 50A**). Au total, 4649 gènes différentiellement exprimés ont été identifiés en réponse au cisplatine selon les critères de sélection retenus (valeur P ajustée <0,01, fold change >1) (**Figure 50B**). Le KW6002 a tendance à diminuer le nombre de gènes modulés par le cisplatine. En effet, seuls 2515 gènes sont encore dérégulés dans l'analyse des groupes CIS KW versus VEH (**Figure 50B**) ; ce qui correspond à près de 50% du nombre de gènes dérégulés par le cisplatine. En utilisant le logiciel DAVID (Database Annotation, Visualization and Integrated Discovery), nous avons analysé séparément les gènes à la fois surexprimés par le cisplatine (analyse CIS versus VEH) et sous-exprimés par le KW6002 en condition de stress (analyse CIS+KW versus CIS) (**Figure 50C**) et inversement (**Figure 50D**). L'annotation des gènes modulés (selon les termes GO) indique que les gènes surexprimés par le cisplatine et réversés par le KW6002 sont associés aux processus d'adhésion et de prolifération cellulaire (**Figure 50C**) tandis que les gènes sous exprimés par le cisplatine et « réversés » par le KW6002 sont principalement associés aux processus d'oxydo-réduction et de transport (**Figure 50D**)

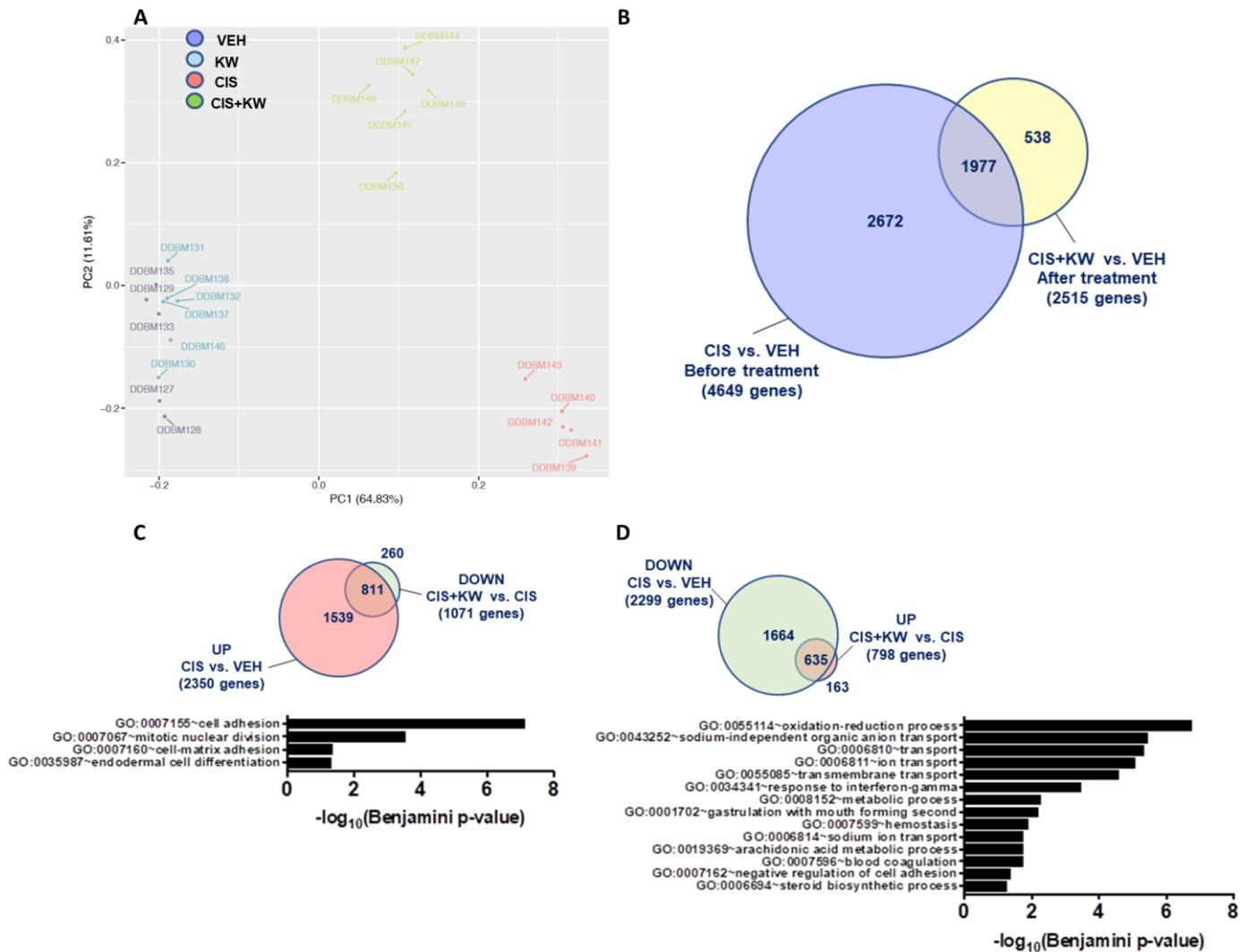


Figure 50: Analyse transcriptomique de l'effet protecteur du KW6002 sur la toxicité rénale induite par l'administration sub-chronique de cisplatine. (A) Analyse PCA (n=6 par groupe). **(B)** Diagramme de Venn représentant les nombres de gènes dérégulés par le cisplatine et le KW6002 en présence de cisplatine. **(C)** Diagramme de Venn et analyse « Gene Ontology »(GO) des gènes à la fois surexprimés par le cisplatine et réprimés par le KW6002 effectuée en fonction du paramètre « Biological Process ». **(D)** Diagramme de Venn et analyse « Gene Ontology » (GO) des gènes à la fois réprimés par le cisplatine et reversés par le KW6002 effectuée en fonction du paramètre « Biological Process ». PCA: principal component analysis.

Effet de l'inhibition d'A_{2A}R sur l'accumulation du cisplatine dans les reins des souris

Afin d'évaluer l'effet de la modulation d'A_{2A}R sur l'accumulation rénale du cisplatine, nous avons quantifié le platine dans les reins de souris. Cette analyse indique que la concentration de cisplatine est plus faible chez les souris ayant reçu à la fois du cisplatine et du KW6002. De manière intéressante, nous avons mis en évidence que le KW6002 ne modifie pas l'expression des transporteurs CTR1 (SLC31A1) et OCT2 (SLC22A2). Cependant, il atténue la sous-expression du transporteur SLC47A1 (MATE1) induite par le cisplatine et maintient ainsi probablement la capacité des reins à sécréter le cisplatine dans l'urine (**Figure 51**).

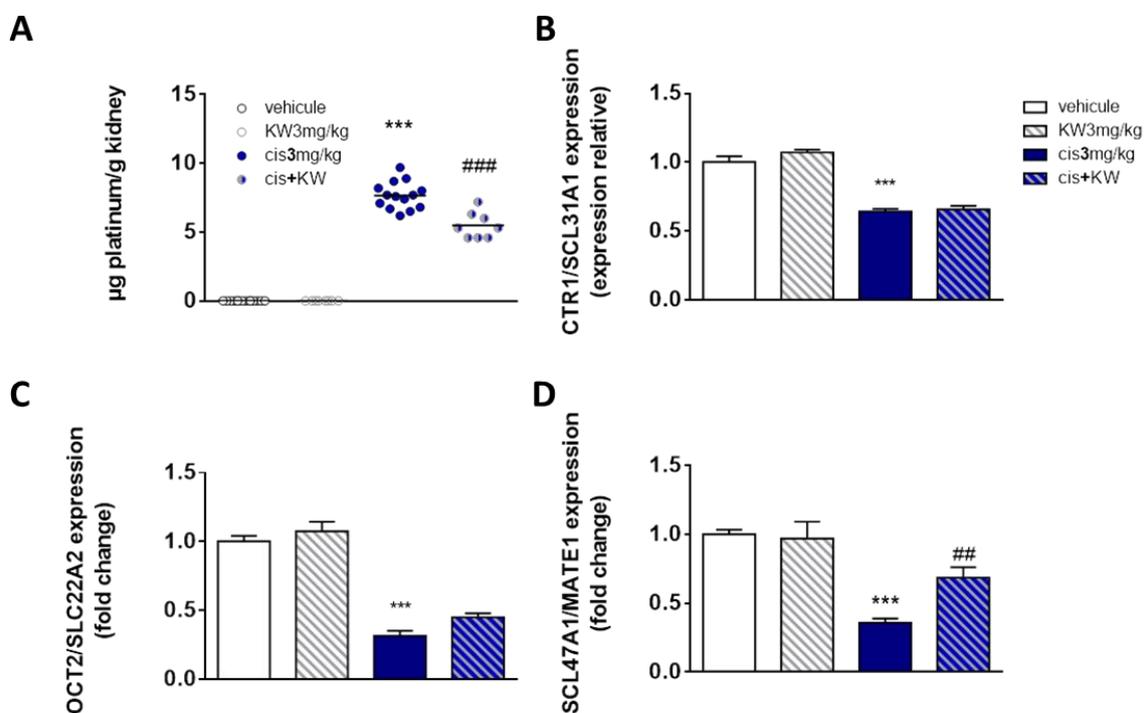


Figure 51: L'inhibition d'A_{2A}R par le KW6002 limite l'accumulation rénale du cisplatine. (A) Concentration rénale en platine. (B-C-D) Expression rénale du gène (B) CTR1/SLC31A1, (C) OCT2/SLC22A2, (D) SLC47A1/MATE1. *** p<0,001 versus véhicule ; ### p<0,001 versus cis3 ; ## p<0,01 versus cis3. n=8 animaux/groupe. CTR1/SLC31A1: copper transporter/ solute carrier 31A1, OCT2/SLC22A2: organic cationic transporter 2/ solute carrier 22A2, SLC47A1/MATE1: solute carrier 47A1/multidrug and toxin extrusion 1.

Effet de l'inhibition d'A_{2A}R sur l'apoptose induite par le cisplatine *in vitro*.

Afin de mieux appréhender les mécanismes par lesquels le blocage d'A_{2A}R exerce des effets néphroprotecteurs, nous avons évalué l'effet de deux antagonistes sélectifs d'A_{2A}R sur des cellules RPTEC/hTERT1, une culture primaire de cellules épithéliales tubulaires proximales immortalisées, exposées au cisplatine. Le choix de ces cellules réside dans le fait que les cellules épithéliales tubulaires proximales présentent un métabolisme et une capacité d'accumulation de xénobiotiques élevés (Van der Hauwaert *et al.*, 2014; George *et al.*, 2017). C'est pourquoi, ces cellules comptent parmi les modèles *in vitro* les plus pertinents pour évaluer les effets délétères des xénobiotiques (Aschauer *et al.*, 2015; Simon-friedt *et al.*, 2015; Vandebussche *et al.*, 2018). Les effets cytotoxiques du cisplatine diminuent de façon significative lorsque les cellules tubulaires RPTEC / hTERT1 sont exposées à des doses croissantes de KW6002 (**Figure 52A**) ou de SCH58261 (**Figure 52B**). L'induction de l'activité de la caspase 3/7 par le cisplatine (50 µM) diminue de façon significative et proportionnelle à la dose lorsque les cellules RPTEC / hTERT1 sont traitées conjointement avec le KW6002 (**Figure 52C**) ou le SCH58261 (**Figure 52D**). De plus, les deux antagonistes ont réduit de façon significative le rapport Bax (pro-apoptotique) / Bcl2 (anti-apoptotique) induit par le cisplatine (**Figure 52E-F**). Ces résultats ont été confirmés par l'analyse Western blot de la caspase 3 clivée et de PARP clivé (**Figure 52G-H**).

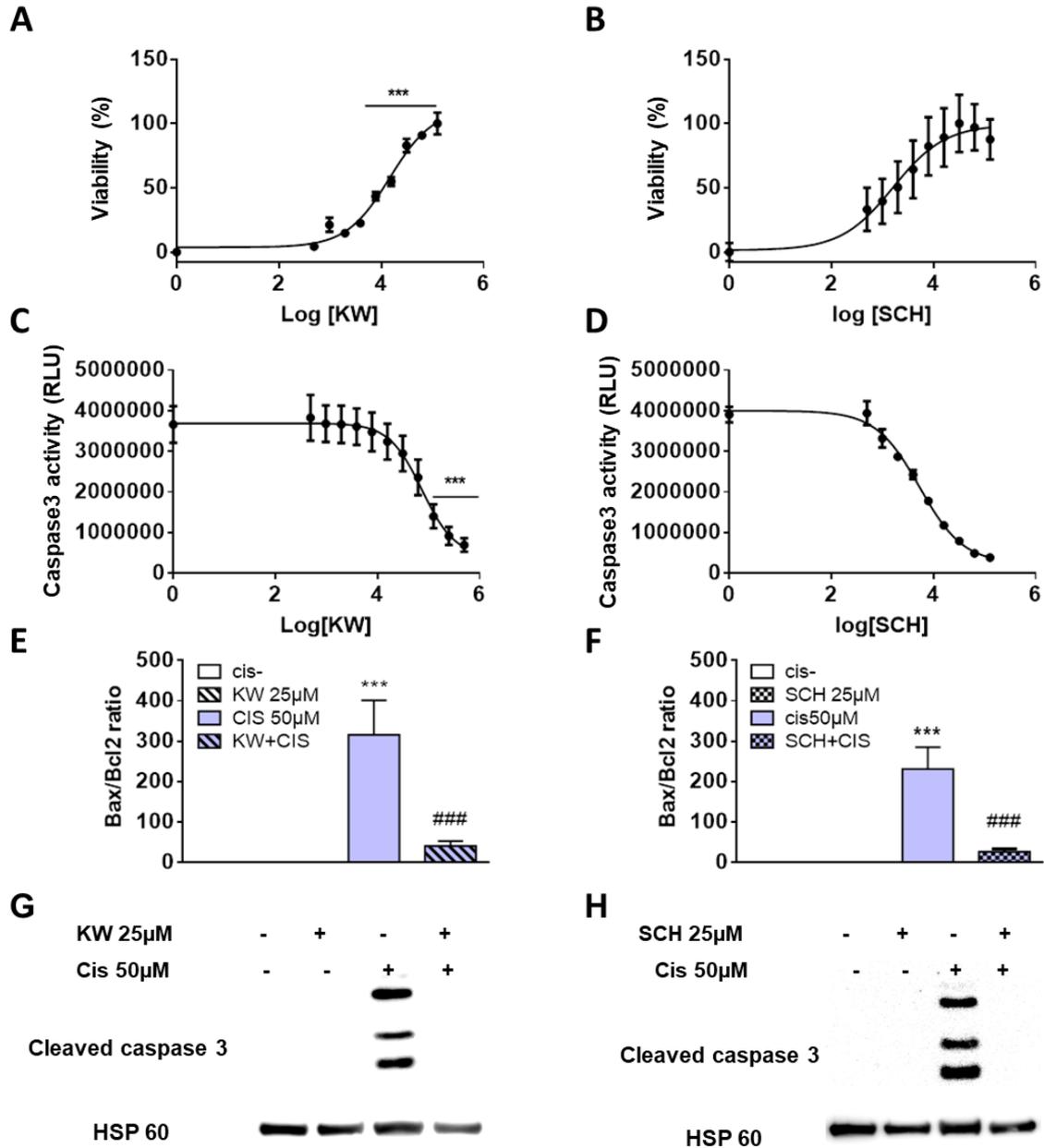


Figure 52: La modulation pharmacologique d'A_{2A}R limite l'apoptose induite par le cisplatine *in vitro*. Les cellules RPTEC / hTERT1 ont été co-exposées au cisplatine à 50µM et à des doses croissantes d'antagonistes. **(A-B)** Viabilité cellulaire déterminée 72h après costimulation avec **(A)** le KW6002 ou **(B)** le SCH58261. **(C-D)** Activité caspase 3 déterminée 72h après costimulation avec **(C)** le KW6002 et **(D)** le SCH58261. Résultats exprimés en moyenne +/- SEM de 2 expérimentations indépendantes réalisées en triplicat. *** p<0,001 versus cis 50µM. **(E-F)** Rapport Bax/Bcl2 évalué avec **(E)** le KW6002 ou **(F)** le SCH58261. *** p< 0,001 versus cis-. **(G-H)** Western blot illustrant l'expression de la caspase 3 clivée sur les cellules costimulées avec **(G)** le KW6002 à 25µM ou **(H)** le SCH58261 à 25µM. HSP 60 est le normalisateur. Cis: cisplatine, KW: KW6002, RLU: relative light units, KW: KW6002, BCL: BH: B cell lymphoma protein, Bax: Bcl2 associated X protein.

Effet des antagonistes du récepteur A_{2A} sur les propriétés anti-tumorales du cisplatine

Afin d'évaluer si l'antagonisme d'A_{2A}R préserve la fonction rénale après exposition au cisplatine sans compromettre son efficacité antitumorale, nous avons utilisé un modèle de greffes syngéniques de cellules tumorales pulmonaires, les LLC. Des tumeurs sous-cutanées ont été induites chez des souris C57BL6. Les souris ont ensuite été traitées avec du cisplatine, du KW6002 ou les deux molécules. Les résultats de la **Figure 53** montrent de manière intéressante qu'outre ses effets néphroprotecteurs, le KW6002 n'affecte pas la réponse antitumorale du cisplatine.

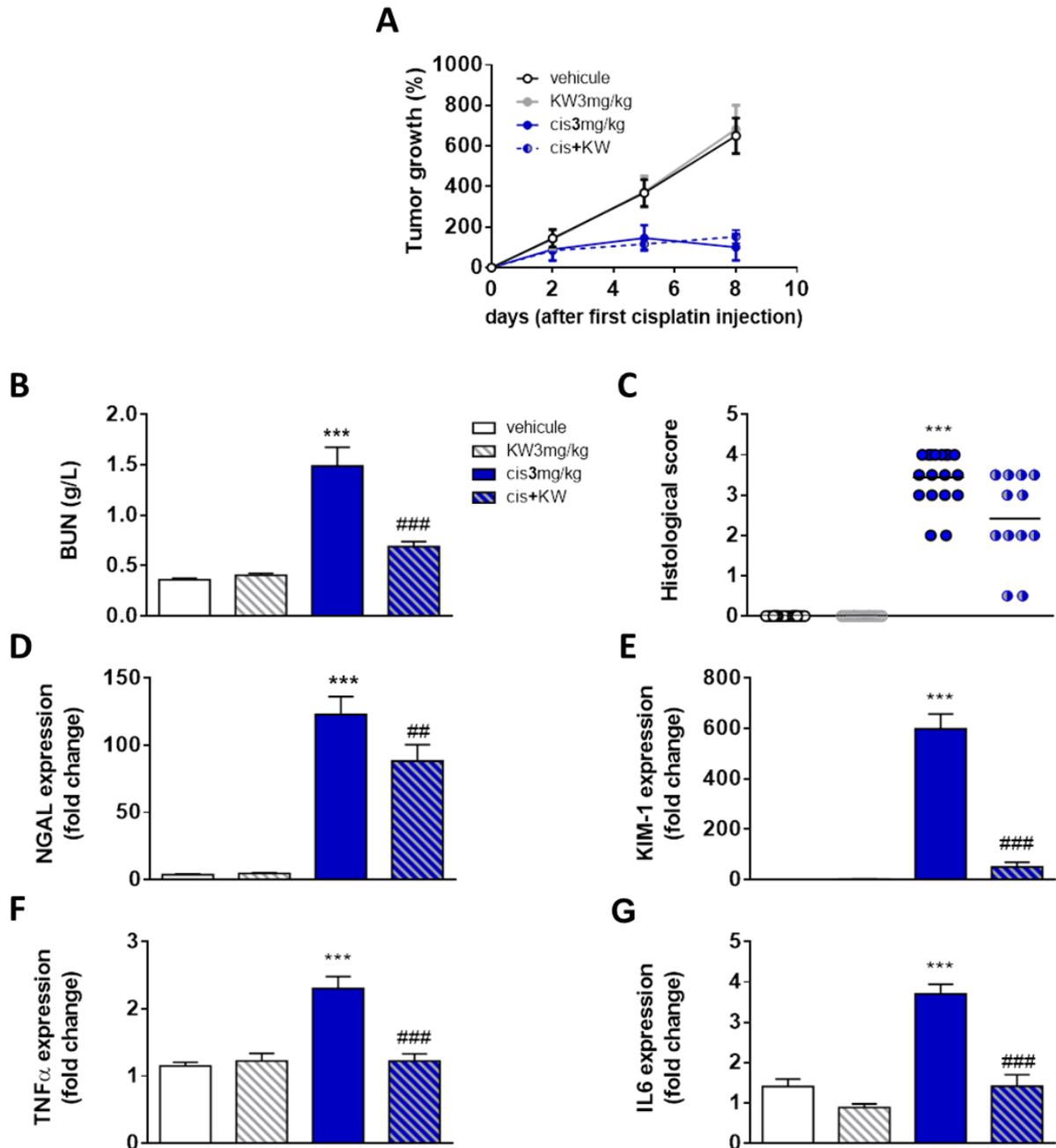


Figure 53: La modulation pharmacologique d'A_{2A}R n'interfère pas avec les propriétés antitumorales du cisplatine. (A) Croissance des tumeurs chez les souris soumises à 6 injections de cisplatine à 3mg/kg et/ou traitées au KW6002 à 3mg/kg. (B) Dosage de l'urée plasmatique. (C) Score histologique des lésions rénales. (D-E) Expression génique des marqueurs de souffrance rénale (D) NGAL et (E) KIM-1. (F-G) Expression génique des marqueurs inflammatoires (F) TNF α et (G) IL6. *** p<0,001 versus véhicule ; ## p<0,01 versus cis3, ### p<0,001 versus cis3. n=6-8 animaux/groupe. BUN: blood urea nitrogen, NGAL: neutrophil gelatinase activated lipocalin, KIM-1: kidney molecule 1, TNF α : Tumor Necrosis Factor α , IL6: Interleukin 6, Cis: cisplatine, KW: KW6002.

Par ailleurs, le dosage du platine dans les reins et les tumeurs semble indiquer que le KW6002 ne modifierait pas l'accumulation du platine au niveau tumoral mais uniquement dans les reins (Figure 54)

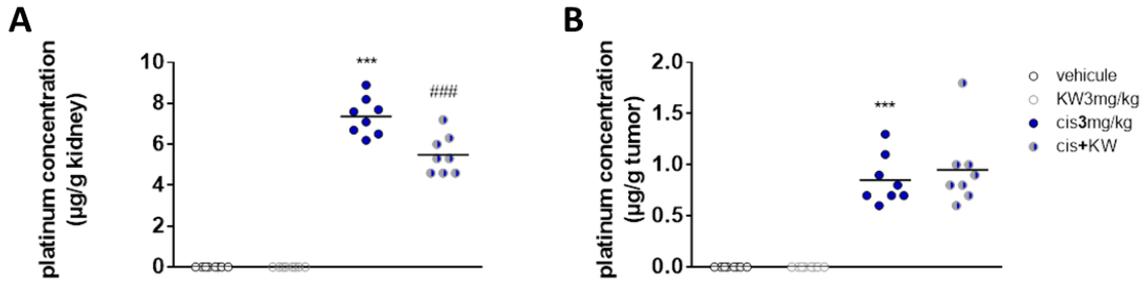


Figure 54: Le KW6002 limite l'accumulation rénale mais ne modifie pas les concentrations intra-tumorales. Dosage du platine dans (A) les reins et (B) les tumeurs de souris soumises au cisplatine et ou KW6002. N=8 animaux / groupe. *** p<0,001 versus vehicule, ### p<0,001 versus cis 3mg/kg.

5. Discussion

La toxicité rénale du cisplatine reste un effet indésirable grave qui touche environ un tiers des patients exposés, et ce malgré les méthodes de prévention actuellement recommandées (Hayati *et al.*, 2016). Dans cette étude, nous nous sommes attachés à tester le potentiel bénéfique apporté par la co-administration d'antagonistes du récepteur à l'adénosine A_{2A} dans la prévention de cette toxicité.

L'adénosine joue un rôle majeur dans l'homéostasie cellulaire et tissulaire (Antonioli *et al.*, 2013). La concentration d'adénosine augmente de façon significative en situation d'inflammation et d'hypoxie, principalement suite à l'hydrolyse de l'adénosine triphosphate (ATP), libérée par les cellules lésées ou mourantes. De manière générale, l'adénosine ainsi semble exercer un rôle de protection et de réparation des tissus grâce notamment à ses propriétés anti-inflammatoires (Ohta and Sitkovsky, 2001; Bauerle *et al.*, 2011). Les effets de l'adénosine sont principalement médiés par ses interactions avec quatre récepteurs membranaires, appartenant à la famille des récepteurs couplés à des protéines G, et nommés A_1 , A_{2A} , A_{2B} et A_3 (Borea *et al.*, 2016). Dans des contextes pathologiques particuliers, quelques études semblent indiquer que l'activation des récepteurs A_1 , A_{2A} et A_{2B} aurait un rôle protecteur au niveau rénal (H. T. Lee *et al.*, 2004; Grenz *et al.*, 2008; Park *et al.*, 2012; Roberts *et al.*, 2014; Sheth *et al.*, 2014). En revanche, l'inhibition du récepteur A_3 serait bénéfique en situation d'ischémie – reperfusion (H. T. Lee *et al.*, 2002). Très peu de données sont disponibles concernant l'implication de ces quatre

récepteurs dans la toxicité rénale induite par le cisplatine (Gill *et al.*, 2009; Cao *et al.*, 2019).

De manière intéressante, nous avons initialement observé une augmentation de l'expression du récepteur A_{2A} dans un modèle murin de néphrotoxicité induite par le cisplatine. Ces données préliminaires nous ont alors conduits à tester l'effet de la modulation pharmacologique de ce récepteur. Au total, il apparaît que l'antagoniste sélectif du récepteur A_{2A} , KW6002, limite significativement la toxicité rénale induite par le cisplatine. Les souris ayant bénéficié d'un co-traitement présentent en particulier une meilleure fonction rénale et des lésions histologiques moins sévères.

De plus, afin de mieux comprendre les événements moléculaires sous-jacents aux effets bénéfiques de l'antagonisme de $A_{2A}R$, nous avons utilisé une approche transcriptomique par RNASeq à partir de reins de souris traitées par du cisplatine seul ou en combinaison avec l'antagoniste sélectif de $A_{2A}R$, le KW6002. Les premières données obtenues indiquent que le cisplatine affecte profondément l'expression génique rénale. En particulier, 2350 gènes sont régulés positivement et 2298 négativement. Le cisplatine module de nombreuses voies biologiques distinctes, notamment l'activation de l'apoptose, la prolifération cellulaire et l'inflammation, ainsi que l'inhibition du transport et du métabolisme des lipides. De manière intéressante, la co-administration de KW6002 avec le cisplatine induit un phénotype intermédiaire. Suite aux données générées par le RNASeq, une étude mécanistique a été abordée dans une culture primaire immortalisée de cellules tubulaires proximales (RPTEC / hTERT1). La pertinence de ce modèle a pu être établie. En effet, des résultats similaires aux données obtenues dans le modèle murin ont pu être observés en termes de cytotoxicité et de processus apoptotique.

Les données obtenues grâce au RNASeq nous ont permis de sélectionner certaines des voies sur lesquelles nous souhaitons nous focaliser. Dans un premier temps, nous avons évalué la modulation des systèmes de transport grâce au dosage du platine intracellulaire et à la mesure de l'expression des principaux transporteurs d'influx et d'efflux du cisplatine tels que CTR1, OCT2 ou MATE-1. Une étude plus approfondie du métabolisme cellulaire semble également être une piste intéressante. En particulier, nous nous intéresserons au métabolisme des lipides. En effet, les lipides représentent une ressource énergétique indispensable pour la production

d'ATP dans les cellules tubulaires proximales (Chau *et al.*, 2012; Kang *et al.*, 2015; Simon and Hertig, 2015). Cependant, leur accumulation cellulaire peut entraîner des conséquences néfastes notamment en induisant une mort cellulaire programmée accrue (Kang *et al.*, 2015; Izquierdo-Lahuerta, Martínez-García and Medina-Gómez, 2016).

Afin d'obtenir une preuve de concept définitive, le développement d'un modèle préclinique de greffe syngénique nous a également permis de nous assurer que l'administration d'un antagoniste du récepteur A_{2A} n'altérerait pas l'efficacité anti-tumorale du cisplatine. A l'heure actuelle, très peu de données ont été publiées concernant les effets du KW6002, antagoniste sélectif d' $A_{2A}R$, sur les propriétés des cellules tumorales (Kjaergaard *et al.*, 2018). Nous envisageons ainsi de compléter ces données *in vivo* dans le même modèle de greffe syngénique, en injectant des cellules cancéreuses murines LLC parentales ou transfectées stablement par un sh $A_{2A}R$. Cette étude permettrait alors d'observer les effets du KW6002 associé à un traitement au cisplatine, d'une part au niveau des cellules tumorales en présence du microenvironnement tumoral et d'autre part uniquement sur le microenvironnement tumoral.

III. Discussion générale et perspectives

La réponse aux médicaments, définie par un bénéfice thérapeutique, une absence d'efficacité ou la survenue d'effets indésirables, est extrêmement variable d'un individu à l'autre (Petros and Evans, 2004). Cette variabilité de réponse est un obstacle majeur à l'utilisation des médicaments, particulièrement en oncologie, compte tenu de la fenêtre thérapeutique étroite de ces molécules et des alternatives possibles entre les différents protocoles de chimiothérapie (Petros and Evans, 2004). Outre des erreurs inhérentes à l'administration, la posologie ou encore l'indication des molécules prescrites, les causes de la variabilité de réponse aux médicaments sont en partie liées à des facteurs physiopathologiques (âge, grossesse, comorbidités...), environnementaux (alimentation, tabagisme, polymédication...), génétiques (variations structurales au niveau des gènes codant, par exemple, pour des protéines impliquées dans le métabolisme, le transport des médicaments ainsi que leurs cibles) (Evans WE and Relling MV., 1999). De plus, l'identification des patients non répondeurs ou à risque de développer des effets indésirables à un traitement présente un intérêt réel dans la maîtrise des dépenses de santé, en évitant la prescription de traitements inutiles ou dangereux pour un certain nombre de patients. De ce fait, il est donc particulièrement important de développer de nouvelles approches permettant d'optimiser l'efficacité et la tolérance des traitements notamment anticancéreux (Evans WE and Relling MV., 1999).

Le cisplatine, depuis son introduction sur le marché il y a plus de 40 ans, reste l'un des anticancéreux les plus puissants et l'un des rares médicaments curatifs à l'heure actuelle (Johnstone, Suntharalingam and Lippard, 2016). Augmenter son activité antitumorale tout en diminuant le risque de survenue d'effets indésirables graves est un axe de recherche particulièrement important en oncologie (Johnstone, Suntharalingam and Lippard, 2016). Dans ce contexte, en se focalisant sur les CPNPC, nous avons orienté nos travaux vers l'identification de nouvelles approches permettant d'une part de prévenir la toxicité rénale du cisplatine, et d'autre part d'augmenter son efficacité cytotoxique.

1/ Ciblage des miRNA pour augmenter la sensibilité des CPNPC au cisplatine

De par leur rôle clé dans la plupart des processus physiopathologiques, les miARN représentent de nouvelles cibles thérapeutiques prometteuses (Pottier *et al.*, 2014). La comparaison des niveaux d'expression des miARN entre tissus lésés et sains est un élément fondamental pour définir l'approche thérapeutique adaptée à la situation pathologique d'intérêt (Pottier *et al.*, 2014). En effet, le ciblage pharmacologique de ces molécules se décompose en deux stratégies distinctes : d'une part la restauration de l'expression d'un miARN déficient dans une situation pathologique donnée, d'autre part la séquestration et par conséquent l'inhibition d'un miARN surexprimé en condition pathologique (Pottier *et al.*, 2014). Le développement des biothérapies ciblant les miARN les plus avancées est largement basé sur l'utilisation de molécules oligonucléotidiques portant des modifications chimiques pour permettre leur administration *in vivo* (**Figure 55**). Le Miravirsén en est un exemple. En effet, cet oligonucléotide de type LNA (locked nucleic acid) est désormais utilisé en clinique pour inhiber miR-122, un miARN impliqué dans le développement du virus de l'hépatite C (Janssen *et al.*, 2013; Gebert *et al.*, 2014). Néanmoins, ces modifications chimiques pouvant dans certains cas considérablement modifier les interactions miARN-gènes cibles, les approches permettant la surexpression de miARN sont encore peu développées car mal maîtrisées à l'heure actuelle (van Rooij and Kauppinen, 2014). De ce fait, ce travail de thèse s'est focalisé sur l'étude des miARN dont la surexpression induit un phénotype de résistance au cisplatine et plus particulièrement miR-24-3p.

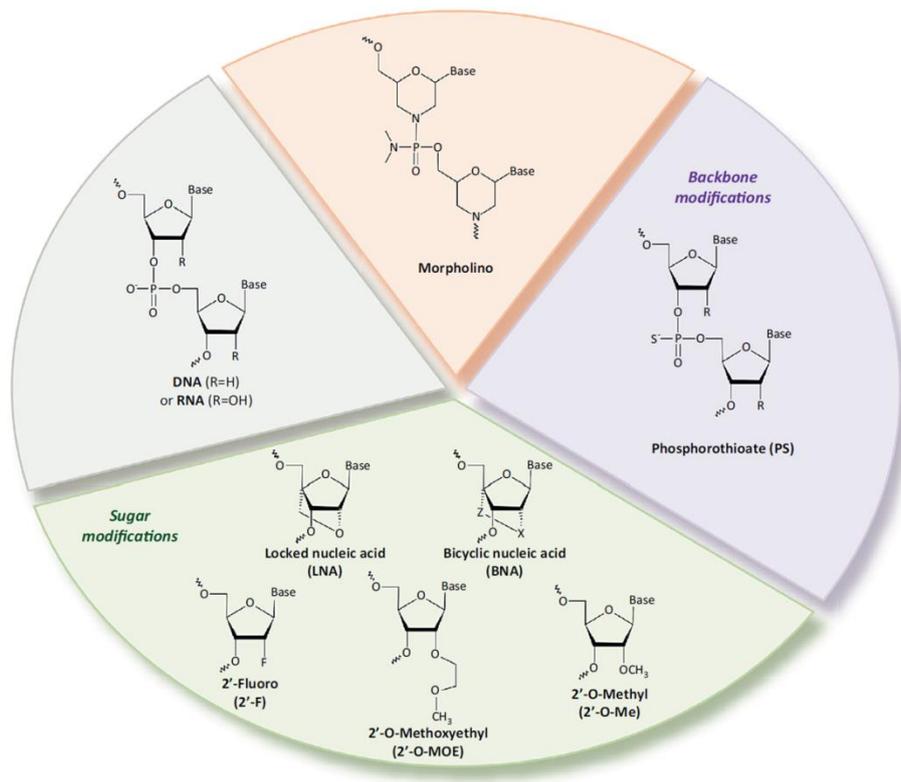


Figure 55: Modifications chimiques améliorant les propriétés pharmacologiques et pharmacocinétiques des oligonucléotides utilisés en thérapeutique. Les modifications du ribose en position 2' telles que 2'-O- Methyl, 2'-O-Methoxyethyl ou l'incorporation d'un acide nucléique verrouillé (LNA, locked nucleic acid) améliorent la spécificité, l'affinité, la résistance aux nucléases et la délivrance *in vivo* des oligonucléotides. D'après Pottier *et al.*, 2014.

MiR-24-3p fait partie des miARN qui ont été largement décrits pour leur effet sur la différenciation des cellules hématopoïétiques (Wang *et al.*, 2008; Roy *et al.*, 2015). MiR-24-3p est aussi connu pour jouer un rôle sur la prolifération cellulaire en modulant l'expression de points de contrôle et d'inhibiteurs du cycle cellulaire (Cheng *et al.*, 2005; Lal *et al.*, 2008, 2009). MiR-24-3p a également un effet sur l'apoptose. Ainsi, Qin *et al.* ont mis en évidence qu'une diminution de l'expression de miR-24-3p est associée à une augmentation de l'apoptose dans certaines cellules (Qin *et al.*, 2010). De par ses effets sur la différenciation, la prolifération et l'apoptose, le rôle de miR-24-3p a été étudié dans les différents événements moléculaires inhérents au processus de tumorigenèse (Wu *et al.*, 2010). Les résultats obtenus durant ce travail de thèse indiquent que le ciblage de miR-24-3p représente une alternative prometteuse pour augmenter la sensibilité des tumeurs pulmonaires au cisplatine. En effet, nous avons pu montrer *in vitro*, à l'aide de différentes lignées de CPNPC, que miR-24-3p est un puissant répresseur du processus apoptotique en ciblant deux

gènes impliqués dans le métabolisme de la vitamine B 6 (PDXK et PNPO) ainsi que deux protéines pro-apoptotiques (BIM et PUMA). Néanmoins, notre étude se limite actuellement uniquement à des tests *in vitro* et doit être validée dans des modèles précliniques de CPNPC. En effet, la recherche préclinique sur modèles animaux est aujourd'hui une étape indispensable pour améliorer notre compréhension des pathologies cancéreuses et pour évaluer l'innocuité et l'efficacité des nouvelles thérapies.

D'un point de vue clinique, de nombreuses études suggèrent une utilisation possible des miARN comme outil diagnostique ou pronostique (Kosaka, Iguchi and Ochiya, 2010; Qin *et al.*, 2015; Van der Hauwaert *et al.*, 2019). En effet, grâce à l'avènement des techniques d'analyse à haut débit, l'expression aberrante de certains miARN a été identifiée dans la plupart des tumeurs humaines, et plusieurs profils d'expression tissulaire ont pu être associés à un pronostic évolutif défavorable des patients (Dragomir *et al.*, 2018). De plus, les miRNA présentant une bonne stabilité dans les fluides biologiques comme le sérum ou le plasma, l'étude de leur expression dans ces milieux biologiques offre de nouvelles perspectives non invasives pour le développement de nouveaux biomarqueurs diagnostiques ou pronostiques (Solé *et al.*, 2019). Dans ce cadre, il serait également intéressant d'évaluer plus précisément si les niveaux plasmatiques de miR-24-3p, mesurés au diagnostic, sont prédictifs de la réponse à la chimiothérapie ou de la survie des patients atteints d'adénocarcinome pulmonaire.

Enfin, étant donné que miR-24-3p est associé à deux autres miARN, miR-23 et miR-27, il paraît particulièrement intéressant d'étudier leur éventuelle implication dans la réponse au cisplatine. En effet, compte tenu de leur co-expression, il est probable que les miARN de ce cluster participent à ce processus de manière synergique soit en régulant les mêmes gènes cibles, soit en ciblant des gènes distincts appartenant à une même voie de signalisation ou des voies fonctionnellement liées. Si tel est le cas, il serait alors possible de définir une nouvelle stratégie thérapeutique visant à cibler directement l'ARN polycistronique regroupant ces trois miARN à l'aide d'un seul oligonucléotide de type gapmer. En effet, cette approche a déjà été précédemment utilisée avec succès au laboratoire dans le cas de l'ARN polycistronique DNM3OS (Savary *et al.*, 2019).

2/ Prévention et traitement des effets néphrotoxiques du cisplatine grâce au blocage du récepteur adénosinergique A2A

Actuellement, plus de 50% des patients atteints de cancer reçoivent au cours de leur traitement un sel de platine, dont le cisplatine (Wheate *et al.*, 2010). Son utilisation est cependant confrontée à différents effets toxiques, au premier rang desquels la néphrotoxicité (Pabla and Dong, 2008). Au cours de la dernière décennie, un grand nombre d'études expérimentales ont permis une meilleure compréhension des mécanismes moléculaires et cellulaires à l'origine de la néphrotoxicité induite par le cisplatine (Pabla and Dong, 2008; Miller *et al.*, 2010; Dos Santos *et al.*, 2012). Il est en effet établi que le cisplatine exerce ses effets toxiques sur le rein en affectant différentes voies de signalisation impliquées notamment dans la survie cellulaire, le métabolisme et la réponse immunitaire (Volarevic *et al.*, 2019). Cependant, ces voies étant également impliquées de manière cruciale dans l'activité cytotoxique du cisplatine, le développement de traitements néphroprotecteurs les ciblant pourrait interférer avec l'efficacité antitumorale de cette molécule. De ce fait, la prévention de la néphrotoxicité induite par les dérivés du platine repose sur un équilibre entre mesures de néphroprotection et activité antitumorale.

Actuellement en clinique, la prévention de la néphrotoxicité induite par les dérivés du platine ne fait l'objet d'aucun consensus et se limite à la mise en place d'une hydratation intraveineuse par sérum salé (Hayati *et al.*, 2016). Ainsi compte tenu de la fréquence et de la gravité des événements néphrotoxiques induits par le cisplatine, nous avons mené une revue systématique de la littérature afin de recenser les différentes méthodes de prévention de ses effets, utilisées chez l'homme depuis son approbation en 1978, et d'évaluer l'efficacité de ces méthodes. Cette étude nous a permis de souligner l'intérêt d'une supplémentation en magnésium (**annexe 2 page 178**) (Hamroun *et al.*, 2019).

Par ailleurs, l'utilisation de modèles expérimentaux *in vitro* et *in vivo* a permis d'identifier diverses molécules limitant la toxicité rénale du cisplatine, telles que le dichloroacétate, la cilastatine (Humanes *et al.*, 2012; Galgamuwa *et al.*, 2016; Oh *et al.*, 2017; Wang *et al.*, 2018). Cependant, peu d'entre elles ont fait l'objet d'études portant sur leur innocuité vis-à-vis de l'activité anticancéreuse du cisplatine

(Humanes *et al.*, 2012; Galgamuwa *et al.*, 2016). De manière intéressante, nous avons montré pour la première fois dans ce travail de thèse que l'utilisation d'antagonistes sélectifs du récepteur à l'adénosine A_{2A} permettait de limiter la toxicité rénale du cisplatine tout en préservant son efficacité antitumorale à l'aide d'un modèle de greffe syngénique.

Parmi les différents antagonistes du récepteur à l'adénosine A_{2A}, nos travaux ont essentiellement porté sur la molécule KW6002, également connue sous la dénomination istradefylline. En effet, ce composé, disposant d'une autorisation de mise sur le marché au Japon et aux Etats-Unis comme traitement d'appoint de la maladie de Parkinson depuis 2013 et août 2019 respectivement, pourrait probablement faire l'objet d'une étude clinique approfondie dans le cadre de la réduction de la toxicité du cisplatine. De plus, les essais cliniques réalisés à ce jour n'ont pas mis en évidence d'effets indésirables majeurs lors d'un traitement au long cours avec cette molécule (LeWitt *et al.*, 2008; Kondo and Mizuno, 2015). Enfin, l'utilisation d'antagonistes sélectifs du récepteur A_{2A} pourrait également être transférable à d'autres types de cancers traités par le cisplatine, tels que le cancer de l'ovaire, du testicule ou de l'œsophage (Alberts *et al.*, 1996; Chaudhary and Haldas, 2003; Ilson, 2008).

Ce résultat est d'autant plus remarquable que l'adénosine participe à un large éventail de fonctions physiologiques. Dans le système cardiovasculaire, elle intervient dans la régulation du flux sanguin (Jacobson and Z. G. Gao, 2006). Elle a la capacité de réguler l'immunité (Haskó and Cronstein, 2004). Dans le système nerveux central, l'adénosine joue un rôle de modulateur de la libération des neurotransmetteurs, de la plasticité synaptique, et de neuroprotection dans des situations d'ischémie, l'hypoxie et le stress oxydant (Linden, 2005; Boison *et al.*, 2012). Le bénéfice de l'utilisation d'un antagoniste du récepteur A_{2A} dans la prévention des effets neurotoxiques du cisplatine vient aussi d'être très récemment suggéré (Oliveros *et al.*, 2019).

Au total, les effets néphroprotecteurs du KW6002 pourraient permettre ainsi de proposer une nouvelle option thérapeutique à visée néphroprotectrice aux cliniciens dans un large spectre de néoplasies afin d'améliorer la prise en charge des patients.

Conclusion et Perspectives

Les modèles précliniques de cancer ont pour but de reproduire le plus fidèlement possible les mécanismes intervenant en pathologie humaine afin de pouvoir prédire l'efficacité clinique des nouvelles molécules anticancéreuses. Différents modèles ont été mis en place. L'implantation ectopique ou orthotopique de cellules ou de tissus tumoraux humains (xénogreffe) chez la souris immunodéficiente permet d'atteindre cet objectif, mais ces modèles rencontrent de nombreuses difficultés techniques et présentent des limites inhérentes telles que l'absence de système immunitaire ou des incompatibilités au niveau des récepteurs et des ligands entre tissu tumoral humain et tissu stromal murin (Varna, Bertheau and Legrès, 2014; Simons and Brayton, 2017). Les greffes syngéniques, quant à elles, ont l'avantage de permettre l'étude des relations entre tumeur et système immunitaire de l'hôte. Néanmoins, de fréquentes disparités d'efficacité thérapeutique sont observées du fait de l'implantation de cellules murines, très différentes d'un point de vue biologique de leurs équivalents chez l'homme (Murphy, 2015). Les modèles de greffe restent néanmoins les modèles les plus courants en raison de leur faible coût, de leur simplicité et de leur rapidité.

Depuis l'identification des mutations responsables des cancers pulmonaires, plusieurs types de modèles transgéniques ont été mis au point pour mieux comprendre la progression du cancer du poumon et développer de nouvelles thérapies, les tumeurs obtenues étant génétiquement et histologiquement plus proches des tumeurs humaines (Kwon and Berns, 2013). Dans cette optique, nous envisageons par la suite d'évaluer (i) l'efficacité antitumorale d'un anti-miR dirigé contre miR-24-3p en association avec le cisplatine et (ii) le bénéfice des inhibiteurs sélectifs du récepteur A_{2A} pour prévenir la néphrotoxicité induite par cet anticancéreux dans un modèle de souris transgénique permettant le développement d'un adénocarcinome pulmonaire : la lignée LSL-K-RasG12D (Jackson *et al.*, 2001). Celle-ci permet en effet l'expression conditionnelle d'un variant muté du gène *KRAS* (p.Gly12Asp) spécifiquement dans les cellules alvéolaires de type II de manière inductible. L'expression de la forme oncogénique de K-ras est contrôlée par un élément excisable de terminaison de la transcription flanquée par des sites loxP (Lox-STOP-Lox). L'allèle, dénommé LSL-K-RasG12D, est inséré au locus K-Ras endogène, permettant, après élimination de l'élément STOP par la recombinaison Cre,

une expression de l'oncogène K-ras à des niveaux endogènes (DuPage, Dooley and Tyler, 2009). Pour permettre une excision spécifique et contrôlée de l'élément STOP au niveau des cellules épithéliales de type II, les souris porteuses de l'allèle LSL-K-RasG12D sont croisées avec une lignée de souris transgénique exprimant la recombinase Cre sous le contrôle du promoteur du gène *SFTPC* contenant un domaine de liaison à l'ADN du récepteur aux œstrogènes (ER) (Brocard *et al.*, 1997; Metzger and Chambon, 2001). De ce fait, l'administration de tamoxifène (un antagoniste des récepteurs aux estrogènes) conditionne l'expression de la forme oncogénique de K-ras spécifiquement au niveau des cellules alvéolaires de type II (Xu *et al.*, 2012). Ce type d'approche représente un modèle expérimental de choix pour l'étude des adénocarcinomes pulmonaires chez l'homme et notamment leur réponse au cisplatine (Oliver *et al.*, 2010).

L'ensemble des travaux réalisés au cours de cette thèse nécessite d'être complétés. Néanmoins, ils apportent d'ores et déjà de nombreuses possibilités thérapeutiques qui pourraient permettre d'améliorer la sensibilité des adénocarcinomes pulmonaires au cisplatine et de limiter ses effets néphrotoxiques.

Références Bibliographiques

- Aebi, S. *et al.* (1996) 'Loss of DNA mismatch repair in acquired resistance to cisplatin', *Cancer Research*, 56(13), pp. 3087–3090.
- Albers, J. W. *et al.* (2014) 'Interventions for preventing neuropathy caused by cisplatin and related compounds', *Cochrane Database of Systematic Reviews*, 3(1), pp. 1–97. doi: 10.1002/14651858.CD005228.pub4.
- Albertella, M. R. *et al.* (2005) 'A role for polymerase η in the cellular tolerance to cisplatin-induced damage', *Cancer Research*, 65(21), pp. 9799–9806. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-1095.
- Alberts, D. S. *et al.* (1996) 'Intraperitoneal Cisplatin Plus Intravenous Cyclophosphamide Versus Intravenous Cisplatin Plus Intravenous Cyclophosphamide for Stage III Ovarian Cancer', *The New England Journal of Medicine*, 335(26), pp. 1950–1955. doi: 10.1056/NEJM199612263352603.
- Alt, A. *et al.* (2007) 'Bypass of DNA Lesions Generated During Anticancer Treatment with Cisplatin by DNA Polymerase η ', *Sciences*, 318(5852), pp. 967–970. doi: 10.1126/science.1148242.
- Altan, M. and Chiang, A. C. (2015) 'Management of Small Cell Lung Cancer', *The Cancer Journal*, 21(5), pp. 425–433. doi: 10.1097/PPO.000000000000148.
- Altuvia, Y. *et al.* (2005) 'Clustering and conservation patterns of human microRNAs', *Nucleic Acids Research*, 33(8), pp. 2697–2706. doi: 10.1093/nar/gki567.
- Alvarado-luna, G. and Morales-espinoza, D. (2016) 'Treatment for SCLC, where are we now', *Translational lung cancer research*, 5(1), pp. 26–38. doi: 10.3978/j.issn.2218-6751.2016.01.13.
- Ambros, V. (2004) 'The functions of animal microRNAs', *Nature*, 431(7006), pp. 350–355. doi: 10.1038/nature02871.
- Antonioli, L. *et al.* (2008) 'Regulation of enteric functions by adenosine: Pathophysiological and pharmacological implications', *Pharmacology and Therapeutics*. Elsevier Inc., 120(3), pp. 233–253. doi: 10.1016/j.pharmthera.2008.08.010.
- Antonioli, L. *et al.* (2013) 'Immunity, inflammation and cancer: A leading role for adenosine', *Nature Reviews Cancer*. Nature Publishing Group, 13(12), pp. 842–857. doi: 10.1038/nrc3613.
- Aranda, F. *et al.* (2014) 'Vitamin B 6 improves the immunogenicity of cisplatin-induced cell death', *oncoimmunology*, 3(9), pp. 1–3. doi: 10.4161/21624011.2014.955685.
- Aschauer, L. *et al.* (2015) 'Expression of xenobiotic transporters in the human renal proximal tubule cell line RPTEC/TERT1', *Toxicology in Vitro*. Elsevier Ltd, 30(1), pp. 95–105. doi: 10.1016/j.tiv.2014.12.003.

- Astolfi, L. *et al.* (2013) 'Correlation of adverse effects of cisplatin administration in patients affected by solid tumours: A retrospective evaluation', *Oncology Reports*, 29(4), pp. 1285–1292. doi: 10.3892/or.2013.2279.
- Bahreyni, A. *et al.* (2018) 'Therapeutic potency of pharmacological adenosine receptor agonist/antagonist in angiogenesis, current status and perspectives', *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 70(2), pp. 191–196. doi: 10.1111/jphp.12844.
- Balakrishnan, V. S., Coles, G. A. and Williams, J. D. (1993) 'A potential role for endogenous adenosine in control of human glomerular and tubular function', *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 265(4), pp. F504–F510. doi: 10.1152/ajprenal.1993.265.4.f504.
- Baldwin, S. A. *et al.* (2004) 'The equilibrative nucleoside transporter family, SLC29', *Pflugers Archiv European Journal of Physiology*, 447(5), pp. 735–743. doi: 10.1007/s00424-003-1103-2.
- Bao, L. *et al.* (2015) 'Induction of autophagy contributes to cisplatin resistance in human ovarian cancer cells', *Molecular Medicine Reports*, 11(1), pp. 91–98. doi: 10.3892/mmr.2014.2671.
- Bartel, D. P. (2004) 'MicroRNAs : Genomics , Biogenesis , Mechanism , and Function', *Cell*, 116(2), pp. 281–297. doi: 10.1016/S0092-8674(04)00045-5.
- Bartel, D. P. (2009) 'MicroRNA Target Recognition and regulatory Functions', *Cell*, 132(2), pp. 215–233. doi: 10.1016/j.cell.2009.01.002.
- Baskerville, S. and Bartel, D. P. (2005) 'Microarray profiling of microRNAs reveals frequent coexpression with neighboring miRNAs and host genes', *Rna*, 11(3), pp. 241–247. doi: 10.1261/rna.7240905.
- Bauerle, J. D. *et al.* (2011) 'Adenosine Generation and Signaling during Acute Kidney Injury', *Journal of the American Society of Nephrology*, 22(1), pp. 14–20. doi: 10.1681/asn.2009121217.
- Bean, G. R. *et al.* (2013) 'PUMA and BIM are required for oncogene inactivation-induced apoptosis', *Sciences Signaling*, 6(268), pp. 1–23. doi: 10.1126/scisignal.2003483.
- Blackford, A. N. and Jackson, S. P. (2017) 'ATM, ATR, and DNA-PK: The Trinity at the Heart of the DNA Damage Response', *Molecular Cell*. Elsevier Inc., 66(6), pp. 801–817. doi: 10.1016/j.molcel.2017.05.015.
- Blair, B. G. *et al.* (2009) 'Copper transporter 2 regulates the cellular accumulation and cytotoxicity of cisplatin and carboplatin', *Clinical Cancer Research*, 15(13), pp. 4312–4321. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-09-0311.
- Boison, D. *et al.* (2012) 'Adenosine hypothesis of schizophrenia-opportunities for pharmacotherapy', *Neuropharmacology*, 62(3), pp. 1527–1543. doi: 10.1016/j.neuropharm.2011.01.048.
- Boison, D. (2013) 'Adenosine Kinase: Exploitation for Therapeutic Gain', *Pharmacological Reviews*, 65(3), pp. 906–943. doi: 10.1124/pr.112.006361.

Borea, P. A. *et al.* (2016) 'Adenosine as a Multi-Signalling Guardian Angel in Human Diseases: When, Where and How Does it Exert its Protective Effects?', *Trends in Pharmacological Sciences*. Elsevier Ltd, 37(6), pp. 419–434. doi: 10.1016/j.tips.2016.02.006.

Bowden, N. A. (2014) 'Nucleotide excision repair: Why is it not used to predict response to platinum-based chemotherapy?', *Cancer Letters*. Elsevier Ireland Ltd, 346(2), pp. 163–171. doi: 10.1016/j.canlet.2014.01.005.

Branch, P. *et al.* (2000) 'Spontaneous development of drug resistance: Mismatch repair and p53 defects in resistance to cisplatin in human tumor cells', *Oncogene*, 19(28), pp. 3138–3145. doi: 10.1038/sj.onc.1203668.

Bray, F. *et al.* (2018) 'Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries.', *CA: a cancer journal for clinicians*, 68(6), pp. 394–424. doi: 10.3322/caac.21492.

Le Brigand, K. *et al.* (2010) 'MiRonTop: Mining microRNAs targets across large scale gene expression studies', *Bioinformatics*, 26(24), pp. 3131–3132. doi: 10.1093/bioinformatics/btq589.

Brocard, J. *et al.* (1997) 'Spatio-temporally controlled site-specific somatic mutagenesis in the mouse', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(26), pp. 14559–14563. doi: 10.1073/pnas.94.26.14559.

Broch, P. R. *et al.* (2018) 'Sodium thiosulfate for protection from cisplatin-induced hearing loss', *New England Journal of Medicine*, 378(25), pp. 2376–2385. doi: 10.1056/NEJMoa1801109.

Brozovic, A. and Osmak, M. (2007) 'Activation of mitogen-activated protein kinases by cisplatin and their role in cisplatin-resistance', *Cancer Letters*, 251(1), pp. 1–16. doi: 10.1016/j.canlet.2006.10.007.

Burnstock, G. (2007) 'Purine and pyrimidine receptors', *Cellular and Molecular Life Sciences*, 64(12), pp. 1471–1483. doi: 10.1007/s00018-007-6497-0.

Bushati, N. and Cohen, S. M. (2007) 'microRNA Functions', *Annual Review of Cell and Developmental Biology*, 23(1), pp. 175–205. doi: 10.1146/annurev.cellbio.23.090506.123406.

Cai, X., Hagedorn, C. H. and Cullen, B. R. (2004) 'Human microRNAs are processed from capped, polyadenylated transcripts that can also function as mRNAs', *Rna*, 10(12), pp. 1957–1966. doi: 10.1261/rna.7135204.

Calin, G. A. *et al.* (2004) 'Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101(9), pp. 2999–3004. doi: 10.1073/pnas.0307323101.

Cao, W. *et al.* (2019) 'Adenosine kinase inhibition protects against cisplatin-induced nephrotoxicity', *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 317(1), pp. F107–F115. doi: 10.1152/ajprenal.00385.2018.

Chang, A. (2011) 'Chemotherapy, chemoresistance and the changing treatment landscape for NSCLC', *Lung Cancer*. Elsevier Ireland Ltd, 71(1), pp. 3–10. doi:

10.1016/j.lungcan.2010.08.022.

Chau, B. N. *et al.* (2012) 'MicroRNA 21 promotes fibrosis of the kidney by silencing metabolic pathways', *Science Translational Medicine*, 4(121), pp. 1–20. doi: 10.1126/scitranslmed.3003205.

Chaudhary, U. B. and Haldas, J. R. (2003) 'Long-Term Complications of Chemotherapy for Germ Cell Tumours', *Drugs*, 63(15), pp. 1565–1577. doi: 10.2165/00003495-200363150-00004.

Chen, H. H. W. and Kuo, M. T. (2010) 'Role of glutathione in the regulation of cisplatin resistance in cancer chemotherapy', *Metal-Based Drugs*, pp. 1–7. doi: 10.1155/2010/430939.

Chen, L. *et al.* (2013) 'MiR-24 regulates the proliferation and invasion of glioma by ST7L via β -catenin/Tcf-4 signaling', *Cancer Letters*. Elsevier Ireland Ltd, 329(2), pp. 174–180. doi: 10.1016/j.canlet.2012.10.025.

Chen, P. *et al.* (2016) 'The functional status of DNA repair pathways determines the sensitization effect to cisplatin in non-small cell lung cancer cells', *Cellular Oncology*. Cellular Oncology, 39(6), pp. 511–522. doi: 10.1007/s13402-016-0291-7.

Chen, Q., Kang, J. and Fu, C. (2018) 'The independence of and associations among apoptosis, autophagy, and necrosis', *Signal Transduction and Targeted Therapy*. Springer US, 3(1), pp. 1–11. doi: 10.1038/s41392-018-0018-5.

Chen, S. *et al.* (2010) 'The platinum-based treatments for advanced non-small cell lung cancer, is low/negative ERCC1 expression better than high/positive ERCC1 expression? A meta-analysis', *Lung Cancer*. Elsevier Ireland Ltd, 70(1), pp. 63–70. doi: 10.1016/j.lungcan.2010.05.010.

Chendrimada, T. P. *et al.* (2005) 'TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing', *Nature*, 436(7051), pp. 740–744. doi: 10.1038/nature03868.

Cheng, A. M. *et al.* (2005) 'Antisense inhibition of human miRNAs and indications for an involvement of miRNA in cell growth and apoptosis', *Nucleic Acids Research*, 33(4), pp. 1290–1297. doi: 10.1093/nar/gki200.

Chevalier, R. L. (2016) 'The proximal tubule is the primary target of injury and progression of kidney disease: Role of the glomerulotubular junction', *American Journal of Physiology - Renal Physiology*, 311(1), pp. F145–F161. doi: 10.1152/ajprenal.00164.2016.

Chhabra, P. *et al.* (2012) 'The Immunosuppressive Role of Adenosine A2A Receptors in Ischemia Reperfusion Injury and Islet Transplantation', *Current Diabetes Reviews*, 8(6), pp. 419–433. doi: 10.2174/157339912803529878.

Circu, M. *et al.* (2017) 'Modulating lysosomal function through lysosome membrane permeabilization or autophagy suppression restores sensitivity to cisplatin in refractory non-small-cell lung cancer cells', *PloS one*, 12(9), pp. 1–23. doi: 10.1371/journal.pone.0184922.

Costa, D. B. *et al.* (2007) 'BIM Mediates EGFR Tyrosine Kinase Inhibitor-Induced

Apoptosis in Lung Cancers with Oncogenic EGFR Mutations', *PLoS Medicine*, 4(10), pp. 1669–1679. doi: 10.1371/journal.pmed.0040315.

Cross, D. A. E. *et al.* (2014) 'AZD9292, an irreversible EGFR TKI, overcomes T790M-mediated resistance to EGFR inhibitors in lung cancer', *Cancer Discovery*, 4(9), pp. 1046–1061. doi: 10.1158/2159-8290.CD-14-0337.

Dela Cruz, C., Tanoue, L. and Matthay, R. (2011) 'Lung Cancer: Epidemiology, Etiology, and prevention', *Clinics in Chest Medicine*, 32(4), pp. 604–644. doi: 10.1016/j.ccm.2011.09.001.Lung.

Cunha, R. A. and Ribeiro, J. A. (2000) 'Adenosine A(2A) receptor facilitation of synaptic transmission in the CA1 area of the rat hippocampus requires protein kinase C but not protein kinase A activation', *Neuroscience Letters*, 289(2), pp. 127–130. doi: 10.1016/S0304-3940(00)01295-7.

Dabholkar, M. *et al.* (2000) 'Increased mRNA levels of xeroderma pigmentosum complementation group B (XPB) and Cockayne's syndrome complementation group B (CSB) without increased mRNA levels of multidrug-resistance gene (MDR1) or metallothionein-II (MT-II) in platinum-resistant human', *Biochemical Pharmacology*, 60(11), pp. 1611–1619. doi: 10.1016/S0006-2952(00)00448-2.

Dasari, S. and Tchounwou, P. B. (2014) 'Cisplatin in cancer therapy: Molecular mechanisms of action', *European Journal of Pharmacology*, 740(1), pp. 364–378. doi: 10.1016/j.ejphar.2014.07.025.Cisplatin.

Deaglio, S. *et al.* (2007) 'Adenosine generation catalyzed by CD39 and CD73 expressed on regulatory T cells mediates immune suppression', *The Journal of Experimental Medicine*, 204(6), pp. 1257–1265. doi: 10.1084/jem.20062512.

Denli, A. M. *et al.* (2004) 'Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex.', *Nature*, 432(7014), pp. 231–235. doi: 10.1038/nature03049.

Diamantopoulos, M. A., Tsiakanikas, P. and Scorilas, A. (2018) 'Non-coding RNAs: the riddle of the transcriptome and their perspectives in cancer', *Annals of Translational Medicine*, 6(12), pp. 241–241. doi: 10.21037/atm.2018.06.10.

Dixon, A. K. *et al.* (1996) 'Tissue distribution of adenosine receptor mRNAs in the rat', *British Journal of Pharmacology*, 118(6), pp. 1461–1468. doi: 10.1111/j.1476-5381.1996.tb15561.x.

Djebali, S. *et al.* (2012) 'Landscape of transcription in human cells', *Nature*, 489(7414), pp. 101–108. doi: 10.1038/nature11233.

Doll, R. and Hill, B. A. (1950) 'Smoking and carcinoma of the lung preliminary report', *British Medical Journal*, 2(4682), pp. 739–748. doi: 10.1136/bmj.2.4682.739.

Dragomir, M. *et al.* (2018) 'Using microRNA networks to understand cancer', *International Journal of Molecular Sciences*, 19(7), pp. 1–18. doi: 10.3390/ijms19071871.

Dunant, A., Pignon, J.-P. and Le Chevalier, T. (2005) 'Adjuvant chemotherapy for non-small cell lung cancer: contribution of the International Adjuvant Lung Trial.', *Clinical Cancer Research*, 11(13 Pt 2), pp. 5017s-5021s.

Dungo, R. and Deeks, E. D. (2013) 'Istradefylline: First global approval', *Drugs*, 73(8), pp. 875–882. doi: 10.1007/s40265-013-0066-7.

DuPage, M., Dooley, A. L. and Tyler, J. (2009) 'Conditional mouse lung cancer models using adenoviral or lentiviral delivery of cre recombinase', *Nature Protocol*, 4(7), pp. 1064–1072. doi: 10.1038/nprot.2009.95.

Ebert, M. S. and Sharp, P. A. (2012) 'Roles for microRNAs in conferring robustness to biological processes', *Cell*, 149(3), pp. 515–524. doi: 10.1016/j.cell.2012.04.005.

Evans WE and Relling MV. (1999) 'Pharmacogenomics: Translating Functional Genomics into Rational Therapeutics', *Science*, 286(5439), pp. 487–491. doi: 10.1126/science.286.5439.487.

Farmer, H. *et al.* (2005) 'Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy', *Nature*, 434(7035), pp. 917–921. doi: 10.1038/nature03445.

Fazi, F. *et al.* (2005) 'A minicircuitry comprised of microRNA-223 and transcription factors NFI-A and C/EBP α regulates human granulopoiesis', *Cell*, 123(5), pp. 819–831. doi: 10.1016/j.cell.2005.09.023.

Ferry, K. V., Hamilton, T. C. and Johnson, S. W. (2000) 'Increased nucleotide excision repair in cisplatin-resistant ovarian cancer cells: Role of ERCC1-XPF', *Biochemical Pharmacology*, 60(9), pp. 1305–1313. doi: 10.1016/S0006-2952(00)00441-X.

Filipits, M. *et al.* (2007) 'Multidrug Resistance Proteins Do Not Predict Benefit of Adjuvant Chemotherapy in Patients with Completely Resected Non-Small Cell Lung Cancer: International Adjuvant Lung Cancer Trial Biologic Program', *Clinical Cancer Research*, 13(13), pp. 3892–3899. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-06-2446.

Fink, D., Aebi, S. and Howell, S. B. (1998) 'The role of DNA mismatch repair in drug resistance', *Clinical Cancer Research*, 4(1), pp. 1–6.

La Fontaine, S., Ackland, M. L. and Mercer, J. F. B. (2010) 'Mammalian copper-transporting P-type ATPases, ATP7A and ATP7B : Emerging roles', *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 42(2), pp. 206–209. doi: 10.1016/j.biocel.2009.11.007.

Fredholm, B. B. *et al.* (2000) 'Structure and function of adenosine receptors and their genes', *Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 362(4–5), pp. 364–374. doi: 10.1007/s002100000313.

Fredholm, Bertil B. *et al.* (2001) 'Comparison of the potency of adenosine as an agonist at human adenosine receptors expressed in Chinese hamster ovary cells', *Biochemical Pharmacology*, 61(4), pp. 443–448. doi: 10.1016/S0006-2952(00)00570-0.

Fredholm, Bertil B *et al.* (2001) 'International Union of Pharmacology. XXV. Nomenclature and Classification of Adenosine Receptors', *Pharmacological Reviews*, 53(4), pp. 527–552.

Fredholm, B. B. *et al.* (2005) 'Adenosine and Brain Function', *International Review of Neurobiology*, 63, pp. 191–270. doi: 10.1016/S0074-7742(05)63007-3.

- Fredholm, B. B. *et al.* (2007) 'Aspects of the general biology of adenosine A2A signaling', *Progress in Neurobiology*, 83(5), pp. 263–276. doi: 10.1016/j.pneurobio.2007.07.005.
- Fredholm, B. B. *et al.* (2011) 'International Union of Pharmacology.LXXXI. Nomenclature and classification of adenosine receptors - An update', *Pharmacological Reviews*, 63(1), pp. 1–34. doi: 10.1124/pr.110.003285.1.
- Fredholm, B. B., Johansson, S. and Wang, Y. Q. (2011) 'Adenosine and the Regulation of Metabolism and Body Temperature', *Advances in Pharmacology*, 61, pp. 77–94. doi: 10.1016/B978-0-12-385526-8.00003-5.
- Friboulet, L. *et al.* (2013) 'ERCC1 Isoform Expression and DNA Repair in Non–Small-Cell Lung Cancer', *New England Journal of Medicine*, 368(12), pp. 1101–1110. doi: 10.1056/NEJMoa1214271.
- Friedman, R. C. *et al.* (2009) 'Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs', *Genome Research*, 19(1), pp. 92–105. doi: 10.1101/gr.082701.108.
- Frixa, T., Donzelli, S. and Blandino, G. (2015) 'Oncogenic MicroRNAs: Key players in malignant transformation', *Cancers*, 7(4), pp. 2466–2485. doi: 10.3390/cancers7040904.
- Fujimoto, J. and Wistuba, I. (2014) 'Current concepts on the molecular pathology of NSCLC', *Seminars in Diagnostic Pathology*, 31(4), pp. 306–313. doi: 10.1053/j.semdp.2014.06.008.Current.
- Fulda, S., Galluzzi, L. and Kroemer, G. (2010) 'Targeting Mitochondria for Cancer Therapy', *Nature Reviews Drug Discovery*. Nature Publishing Group, 9(6), pp. 447–464. doi: 10.1038/nrd3137.
- Furuta, T. *et al.* (2002) 'Transcription-coupled nucleotide excision repair as a determinant of cisplatin sensitivity of human cells', *Cancer Research*, 62(17), pp. 4899–4902.
- Galanski, M. (2006) 'Recent developments in the field of anticancer platinum complexes.', *Recent patents on anti-cancer drug discovery*, 1(2), pp. 285–95.
- Galgamuwa, R. *et al.* (2016) 'Dichloroacetate prevents cisplatin-induced nephrotoxicity without compromising cisplatin anticancer properties', *Journal of the American Society of Nephrology*, 27(11), pp. 3331–3344. doi: 10.1681/ASN.2015070827.
- Galluzzi, Lorenzo, Vitale, I., Senovilla, L., Eisenberg, T., *et al.* (2012) 'Independent transcriptional reprogramming and apoptosis induction by cisplatin', *Cell Cycle*, 11(18), pp. 3472–3480. doi: 10.4161/cc.21789.
- Galluzzi, L. *et al.* (2012) 'Molecular mechanisms of cisplatin resistance', *Oncogene*. Nature Publishing Group, 31(15), pp. 1869–1883. doi: 10.1038/onc.2011.384.
- Galluzzi, Lorenzo, Vitale, I., Senovilla, L., Olaussen, K. A., *et al.* (2012) 'Prognostic Impact of Vitamin B 6 Metabolism in Lung Cancer', *Cell Reports*, 2(2), pp. 257–269. doi: 10.1016/j.celrep.2012.06.017.

- Galluzzi, L. *et al.* (2013) 'Effects of vitamin B6 metabolism on oncogenesis, tumor progression and therapeutic responses', *Oncogene*. Nature Publishing Group, 32(42), pp. 4995–5004. doi: 10.1038/onc.2012.623.
- Galluzzi, L. *et al.* (2014) 'Systems biology of cisplatin resistance: Past, present and future', *Cell Death and Disease*. Nature Publishing Group, 5(5), pp. e1257-18. doi: 10.1038/cddis.2013.428.
- Garcia, G. E. *et al.* (2008) 'Adenosine A2A receptor activation and macrophage-mediated experimental glomerulonephritis', *The FASEB Journal*, 22(2), pp. 445–454. doi: 10.1096/fj.07-8430com.
- Garcia, G. E. *et al.* (2011) 'Adenosine A2A receptor activation prevents progressive kidney fibrosis in a model of immune-associated chronic inflammation', *Kidney International*. Elsevier Masson SAS, 80(4), pp. 378–388. doi: 10.1038/ki.2011.101.
- Gazdar, A. (2009) 'Activating and resistance mutation of EGFR in non-small-cell lung cancer: role in clinical response to EGFR tyrosine kinase inhibitors', *Oncogene*, 28(Suppl 1), pp. S24–S31. doi: 10.1038/onc.2009.198.
- Gebert, L. F. R. *et al.* (2014) 'Miravirsin (SPC3649) can inhibit the biogenesis of miR-122', *Nucleic Acids Research*, 42(1), pp. 609–621. doi: 10.1093/nar/gkt852.
- Gebert, L. F. R. and MacRae, I. J. (2019) 'Regulation of microRNA function in animals', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 20(1), pp. 21–37. doi: 10.1038/s41580-018-0045-7.
- George, B. *et al.* (2017) 'Xenobiotic transporters and kidney injury', *Advanced Drug Delivery Reviews*, 116, pp. 73–91. doi: 10.1016/j.addr.2017.01.005.
- Gill, A. *et al.* (2009) 'Protective effect of tonapofylline (BG9928), an adenosine A1 receptor antagonist, against cisplatin-induced acute kidney injury in rats', *American Journal of Nephrology*, 30(6), pp. 521–526. doi: 10.1159/000248762.
- Goldstraw, P. *et al.* (2007) 'The IASLC lung cancer staging project: Proposals for the revision of the TNM stage groupings in the forthcoming (seventh) edition of the TNM classification of malignant tumours', *Journal of Thoracic Oncology*. International Association for the Study of Lung Cancer, 2(8), pp. 706–714. doi: 10.1097/JTO.0b013e31812f3c1a.
- Goldstraw, P. *et al.* (2016) 'The IASLC lung cancer staging project: Proposals for revision of the TNM stage groupings in the forthcoming (eighth) edition of the TNM Classification for lung cancer', *Journal of Thoracic Oncology*, 11(1), pp. 39–51. doi: 10.1016/j.jtho.2015.09.009.
- Gomez, I. G. *et al.* (2015) 'Anti-microRNA-21 oligonucleotides prevent Alport nephropathy progression by stimulating metabolic pathways', *The Journal of Clinical Investigation*, 125(1), p. 505. doi: 10.1172/JCI75852.
- Gonzalez, J. *et al.* (2013) 'un nouveau rôle pour le shear stress dans les néphropathies', *Médecine Sciences*, 29(3), pp. 279–285. doi: 10.1051/medsci/2013293014.
- Gonzalez, V. M. *et al.* (2001) 'Is Cisplatin-Induced Cell Death Always Produced by

Apoptosis?', *Molecular Pharmacology*, 59(4), pp. 657–663. doi: <https://doi.org/10.1124/mol.59.4.657>.

Gray, J. H., Owen, R. P. and Giacomini, K. M. (2004) 'The concentrative nucleoside transporter family, SLC28', *Pflugers Archiv European Journal of Physiology*, 447(5), pp. 728–734. doi: 10.1007/s00424-003-1107-y.

Gregory, R. I. *et al.* (2004) 'The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs', *Nature*, 432(7014), pp. 235–240. doi: 10.1038/nature03120.

Gregory, R. I. *et al.* (2005) 'Human RISC couples microRNA biogenesis and posttranscriptional gene silencing', *Cell*, 123(4), pp. 631–640. doi: 10.1016/j.cell.2005.10.022.

Grenz, A. *et al.* (2008) 'The reno-vascular A2B adenosine receptor protects the kidney from ischemia', *PLoS Medicine*, 5(6), pp. 0968–0986. doi: 10.1371/journal.pmed.0050137.

Gridelli, C. *et al.* (2015) 'Non-small cell lung cancer', *Nature reviews Disease primers*, 1, pp. 1–16. doi: 10.1038/nrdp.2015.9.

Griffiths-Jones, S. *et al.* (2008) 'miRBase: Tools for microRNA genomics', *Nucleic Acids Research*, 36, pp. 154–158. doi: 10.1093/nar/gkm952.

De Groot, P. and Munden, R. F. (2012) 'Lung Cancer Epidemiology, Risk Factors, and Prevention', *Radiologic Clinics of North America*. Elsevier Inc, 50(5), pp. 863–876. doi: 10.1016/j.rcl.2012.06.006.

De Groot, P. M. *et al.* (2018) 'The epidemiology of lung cancer', *Translational lung cancer research*, 7(3), pp. 220–233. doi: 10.21037/tlcr.2018.05.06.

Grueter, C. E. *et al.* (2012) 'A cardiac microRNA governs systemic energy homeostasis by regulation of MED13', *Cell*, 149(3), pp. 671–683. doi: 10.1016/j.cell.2012.03.029.

Ha, M. and Kim, V. N. (2014) 'Regulation of microRNA biogenesis', *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. Nature Publishing Group, 15(8), pp. 509–524. doi: 10.1038/nrm3838.

Hamroun, A. *et al.* (2019) 'Prevention of cisplatin-induced acute kidney injury : a systematic review and meta-analysis', *Drugs*. doi: 10.1007/s40265-019-01182-1.

Han, J. *et al.* (2004) 'The Drosha–DGCR8 complex in primary microRNA processing', *Genes & development*, 18(24), pp. 3016–3027. doi: 10.1101/gad.1262504.

Handra-Luca, A. *et al.* (2007) 'Excision repair cross complementation group 1 immunohistochemical expression predicts objective response and cancer-specific survival in patients treated by cisplatin-based induction chemotherapy for locally advanced head and neck squamous cell carcinoma', *Clinical Cancer Research*, 13(13), pp. 3855–3859. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-07-0252.

Hanigan, M. H. *et al.* (1994) 'Inhibition of γ -Glutamyl Transpeptidase Activity by Acivicin in Vivo Protects the Kidney from Cisplatin-induced Toxicity', *Cancer Research*, 54(22), pp. 5925–5929.

- Haskó, G. and Cronstein, B. N. (2004) 'Adenosine: An endogenous regulator of innate immunity', *Trends in Immunology*, 25(1), pp. 33–39. doi: 10.1016/j.it.2003.11.003.
- Van der Hauwaert, C. *et al.* (2014) 'Expression profiles of genes involved in xenobiotic metabolism and disposition in human renal tissues and renal cell models', *Toxicology and Applied Pharmacology*, 279(3), pp. 409–418. doi: 10.1016/j.taap.2014.07.007.
- Van der Hauwaert, C. *et al.* (2019) 'Non-Coding RNAs as New Therapeutic Targets in the Context of Renal Fibrosis', *International journal of molecular sciences*, 20(8). doi: 10.3390/ijms20081977.
- Hayati, F. *et al.* (2016) 'Prevention of cisplatin nephrotoxicity', *Journal of Nephro pharmacology*, 5(1), pp. 57–60.
- Hientz, K. *et al.* (2017) 'The role of p53 in cancer drug resistance and targeted chemotherapy', *Oncotarget*, 8(5), pp. 8921–8946. doi: 10.18632/oncotarget.13475.
- Higuchi, K. and Yanagawa, T. (2019) 'Evaluating dose of cisplatin responsible for causing nephrotoxicity', *PLoS ONE*, 14(4), pp. 1–10. doi: 10.1371/journal.pone.0215757.
- Holzer, A. K. *et al.* (2004) 'The Copper Influx Transporter Human Copper Transport Protein 1 Regulates the Uptake of Cisplatin in Human Ovarian Carcinoma Cells', *Molecular Pharmacology*, 66(4), pp. 817–823. doi: 10.1124/mol.104.001198.
- Hopfner, K. P. and Tainer, J. A. (2000) 'DNA mismatch repair: The hands of a genome guardian', *Structure*, 8(12), pp. R237–R241. doi: 10.1016/S0969-2126(00)00545-1.
- Hosoya, N. and Miyagawa, K. (2014) 'Targeting DNA damage response in cancer therapy', *Cancer Science*, 105(4), pp. 370–388. doi: 10.1111/cas.12366.
- Hougardy, B. M. T. *et al.* (2005) 'Clinical potential of inhibitors of survival pathways and activators of apoptotic pathways in treatment of cervical cancer: Changing the apoptotic balance', *Lancet Oncology*, 6(8), pp. 589–598. doi: 10.1016/S1470-2045(05)70281-3.
- Humanes, B. *et al.* (2012) 'Cilastatin protects against cisplatin-induced nephrotoxicity without compromising its anticancer efficiency in rats', *Kidney International*, 82(6), pp. 652–663. doi: 10.1038/ki.2012.199.
- IARC (2004) 'World Health Organization International Agency For Research On Cancer IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans VOLUME 83 Tobacco Smoke and Involuntary Smoking', *Iarc*, 83.
- Ilson, D. H. (2008) 'Esophageal cancer chemotherapy: recent advances.', *Gastrointestinal cancer research : GCR*, 2(2), pp. 85–92.
- Iorio, M. V. and Croce, C. M. (2012) 'MicroRNA dysregulation in cancer: Diagnostics, monitoring and therapeutics. A comprehensive review', *EMBO Molecular Medicine*, 4(3), pp. 143–159. doi: 10.1002/emmm.201100209.

- Iorns, E. *et al.* (2007) 'Utilizing RNA interference to enhance cancer drug discovery', *Nature Reviews Drug Discovery*, 6(7), pp. 556–568. doi: 10.1038/nrd2355.
- Ishida, S. *et al.* (2002) 'Uptake of the anticancer drug cisplatin mediated by the copper transporter Ctr1 in yeast and mammals', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(22), pp. 14298–14302. doi: 10.1073/pnas.162491399.
- Izquierdo-Lahuerta, A., Martínez-García, C. and Medina-Gómez, G. (2016) 'Lipototoxicity as a trigger factor of renal disease', *Journal of Nephrology*, 29(5), pp. 603–610. doi: 10.1007/s40620-016-0278-5.
- Jackson, E. L. *et al.* (2001) 'Analysis of lung tumor initiation and progression using conditional expression of oncogenic K-ras', *Genes & development*, 15(24), pp. 3243–3248. doi: 10.1101/gad.943001.
- Jacobson, K. A. and Gao, Z.-G. (2006) 'Adenosine receptors as therapeutic targets', *Nature reviews drug discovery*, 5(3), pp. 247–264. doi: 10.1038/nrd1983.
- Jacobson, K. A. and Gao, Z. G. (2006) 'Adenosine receptors as therapeutic targets', *Nature Reviews Drug Discovery*, 5(3), pp. 247–264. doi: 10.1038/nrd1983.
- Janssen, H. L. A. *et al.* (2013) 'Treatment of HCV infection by targeting microRNA', *New England Journal of Medicine*, 368(18), pp. 1685–1694. doi: 10.1056/NEJMoa1209026.
- Januchowski, R. *et al.* (2016) 'Analysis of MDR genes expression and cross-resistance in eight drug resistant ovarian cancer cell lines', *Journal of Ovarian Research*, 9(1), pp. 1–11. doi: 10.1186/s13048-016-0278-z.
- Johnstone, T. C., Suntharalingam, K. and Lippard, S. J. (2016) 'The Next Generation of Platinum Drugs: Targeted Pt(II) Agents, Nanoparticle Delivery, and Pt(IV) Prodrugs Timothy', *Chemical Reviews*, 116(5), pp. 3436–3486. doi: 10.1021/acs.chemrev.5b00597.The.
- Jonas, S. and Izaurralde, E. (2015) 'Towards a molecular understanding of microRNA-mediated gene silencing', *Nature Reviews Genetics*. Nature Publishing Group, 16(7), pp. 421–433. doi: 10.1038/nrg3965.
- Jun, H. J. *et al.* (2008) 'ERCC1 expression as a predictive marker of squamous cell carcinoma of the head and neck treated with cisplatin-based concurrent chemoradiation', *British Journal of Cancer*, 99(1), pp. 167–172. doi: 10.1038/sj.bjc.6604464.
- Kamal, N. S. *et al.* (2010) 'MutS homologue 2 and the long-term benefit of adjuvant chemotherapy in lung cancer', *Clinical Cancer Research*, 16(4), pp. 1206–1215. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-09-2204.
- Kang, H. M. *et al.* (2015) 'Defective fatty acid oxidation in renal tubular epithelial cells plays a key role in kidney fibrosis development', *Nature Medicine*, 21(1), pp. 37–46. doi: 10.1038/nm.3762.
- Kanzaki, A. *et al.* (2002) 'Copper-transporting P-Type Adenosine Triphosphatase (ATP7B) Is Expressed in Human Breast Carcinoma', *Japanese Journal of Cancer Research*, 93(1), pp. 70–77. doi: 10.1111/j.1349-7006.2002.tb01202.x.

- Kartalou, M. and Essigmann, J. M. (2001) 'Mechanisms of resistance to radiation', *Mutation Research*, 478, pp. 23–43. doi: 10.1016/S0027-5107(01)00141-5.
- Katano, K. *et al.* (2003) 'The Copper Export Pump ATP7B Modulates the Cellular Pharmacology of Carboplatin in Ovarian Carcinoma Cells', *Molecular Pharmacology*, 64(2), pp. 466–473. doi: 10.1124/mol.64.2.466.
- Kelland, L. (2007) 'The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy', *Nature Reviews Cancer*, 7(8), pp. 573–584. doi: 10.1038/nrc2167.
- Kelland, L. R. (2000) 'Preclinical Perspectives on Platinum Resistance', *Drugs*, 59(Supplement 4), pp. 1–8. doi: 10.2165/00003495-200059004-00001.
- Kelley, S. L. *et al.* (1988) 'Overexpression of metallothionein confers resistance to anticancer drugs', *Science*, 241(4874), pp. 1813–1815. doi: 10.1126/science.3175622.
- Kjaergaard, J. *et al.* (2018) 'A2A adenosine receptor gene-deletion or synthetic A2A antagonist liberate tumor-reactive CD8+ T-cells from tumor-induced immunosuppression', *Journal of Immunology*, 201(2), pp. 782–791. doi: 10.4049/jimmunol.1700850.
- Kloosterman, W. P. and Plasterk, R. H. A. (2006) 'The Diverse Functions of MicroRNAs in Animal Development and Disease', *Developmental Cell*, 11(4), pp. 441–450. doi: 10.1016/j.devcel.2006.09.009.
- Köberle, B. *et al.* (1999) 'Defective repair of cisplatin-induced DNA damage caused by reduced XPA protein in testicular germ cell tumors', *Current Biology*, 9(5), pp. 273–276.
- Köberle, B., Tomicic, M. T., *et al.* (2010) 'Cisplatin resistance: Preclinical findings and clinical implications', *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer*. Elsevier B.V., 1806(2), pp. 172–182. doi: 10.1016/j.bbcan.2010.07.004.
- Köberle, B., Ditz, C., *et al.* (2010) 'Metastases of squamous cell carcinoma of head and neck show increased levels of nucleotide excision repair protein XPF in vivo that correlate with increased chemoresistance ex vivo', *International Journal of Oncology*, 36(5), pp. 1277–1284. doi: 10.3892/ijo_000006125.
- Komatsu, M. *et al.* (2000) 'Copper-transporting P-Type Adenosine Triphosphatase (ATP7B) Is Associated with Cisplatin Resistance', *Cancer Research*, 60(5), pp. 1312–1316.
- Kondo, T. and Mizuno, Y. (2015) 'A long-term study of istradefylline safety and efficacy in patients with parkinson disease', *Clinical Neuropharmacology*, 38(2), pp. 41–46. doi: 10.1097/WNF.0000000000000073.
- Kosaka, N., Iguchi, H. and Ochiya, T. (2010) 'Circulating microRNA in body fluid: A new potential biomarker for cancer diagnosis and prognosis', *Cancer Science*, 101(10), pp. 2087–2092. doi: 10.1111/j.1349-7006.2010.01650.x.
- Kroemer, G., Galluzzi, L. and Brenner, C. (2007) 'Mitochondrial Membrane Permeabilization in Cell Death', *Physiological Reviews*, 87(1), pp. 99–163. doi: 10.1152/physrev.00013.2006.

- Kull, B., Svenningsson, P. and Fredholm, B. B. (2000) 'Adenosine A_{2A} Receptors are Colocalized with and Activate G_o in Rat Striatum', *Molecular Pharmacology*, 58(4), pp. 771–777. doi: 10.1124/mol.58.4.771.
- Kunkel, T. A. and Erie, D. A. (2005) 'DNA Mismatch Repair', *Annual review of biochemistry*, 74, pp. 681–710. doi: 10.1146/annurev.biochem.74.082803.133243.
- Kwon, M. and Berns, A. (2013) 'Mouse models for lung cancer', *Molecular Oncology*, 7(2), pp. 165–177. doi: 10.1016/j.molonc.2013.02.010.
- Lal, A. *et al.* (2008) 'p16INK4a translation suppressed by miR-24', *PLoS ONE*, 3(3). doi: 10.1371/journal.pone.0001864.
- Lal, A. *et al.* (2009) 'miR-24 inhibits cell proliferation by suppressing expression of E2F2, MYC and other cell cycle regulatory genes by binding to "seedless" 3'UTR microRNA recognition elements', *Molecular Cell*, 35(5), pp. 610–625. doi: 10.1016/j.molcel.2009.08.020.miR-24.
- Lange, S. S., Takata, K. and Wood, R. D. (2011) 'DNA polymerase and cancer', *Nature Reviews Cancer*, 11(2), pp. 96–110. doi: 10.1038/nrc2998.
- Launay-Vacher, V. *et al.* (2008) 'Prevention of cisplatin nephrotoxicity: State of the art and recommendations from the European Society of Clinical Pharmacy Special Interest Group on Cancer Care', *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 61(6), pp. 903–909. doi: 10.1007/s00280-008-0711-0.
- Le, F. *et al.* (1996) 'Characterization and chromosomal localization of the human A_{2a} adenosine receptor gene: ADORA2A', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 223(2), pp. 461–467. doi: 10.1006/bbrc.1996.0916.
- Lee, H. T. *et al.* (2002) 'A₃ adenosine receptor knockout mice are protected against ischemia- and myoglobinuria-induced renal failure', *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 284(2), pp. F267–F273. doi: 10.1152/ajprenal.00271.2002.
- Lee, H. T. *et al.* (2004) 'A₁ Adenosine Receptor Activation Inhibits Inflammation, Necrosis, and Apoptosis after Renal Ischemia-Reperfusion Injury in Mice', *Journal of the American Society of Nephrology*, 15(1), pp. 102–111. doi: 10.1097/01.ASN.0000102474.68613.AE.
- Lee, J. *et al.* (2002) 'Biochemical characterization of the human copper transporter Ctr1', *Journal of Biological Chemistry*, 277(6), pp. 4380–4387. doi: 10.1074/jbc.M104728200.
- Lee, J. S. *et al.* (2015) 'Clinical activity and safety of the EGFR mutant-specific inhibitor, BI1482694, in patients with T790M-positive NSCLC', *Annals of oncology*, 26(Supplement 9). doi: 10.1093/annonc/mdv532.09.
- Lee, R. C., Feinbaum, R. L. and Ambros, V. (1993) 'The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*', *Cell*, 75(5), pp. 843–854. doi: 10.1016/0092-8674(93)90529-y.
- Lee, Y. *et al.* (2002) 'Micro Rna Maturation Stepwise Processing and subcellular localization', *The EMBO Journal*, 21(17), pp. 4663–4670. doi: 10.1093/emboj/cdf476.

- Lee, Y. *et al.* (2003) 'The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing', *Nature*, 425(6956), pp. 415–419. doi: 10.1038/nature01957.
- Lee, Y. *et al.* (2004) 'MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II', *EMBO Journal*, 23(20), pp. 4051–4060. doi: 10.1038/sj.emboj.7600385.
- Lekka, E. and Hall, J. (2018) 'Noncoding RNAs in disease', *FEBS Letters*, 592(17), pp. 2884–2900. doi: 10.1002/1873-3468.13182.
- Lewis, A. D., Hayes, J. D. and Wolf, C. R. (1988) 'Glutathione and glutathione-dependent enzymes in ovarian adenocarcinoma cell lines derived from a patient before and after the onset of drug resistance: Intrinsic differences and cell cycle effects', *Carcinogenesis*, 9(7), pp. 1283–1287. doi: 10.1093/carcin/9.7.1283.
- Lewis, B. P., Burge, C. B. and Bartel, D. P. (2005) 'Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets', *Cell*, 120(1), pp. 15–20. doi: 10.1016/j.cell.2004.12.035.
- LeWitt, P. A. *et al.* (2008) 'Adenosine A2A receptor antagonist istradefylline (KW-6002) reduces off time in Parkinson's disease: A double-blind, randomized, multicenter clinical trial (6002-US-005)', *Annals of Neurology*, 63(3), pp. 295–302. doi: 10.1002/ana.21315.
- Li, Y., Womer, R. B. and Silber, J. H. (2004) 'Predicting cisplatin ototoxicity in children: The influence of age and the cumulative dose', *European Journal of Cancer*, 40(16), pp. 2445–2451. doi: 10.1016/j.ejca.2003.08.009.
- Liedert, B. *et al.* (2006) 'Adduct-specific monoclonal antibodies for the measurement of cisplatin-induced DNA lesions in individual cell nuclei', *Nucleic Acids Research*, 34(6). doi: 10.1093/nar/gkl051.
- Lin, S. C. *et al.* (2010) 'miR-24 up-regulation in oral carcinoma: Positive association from clinical and in vitro analysis', *Oral Oncology*. Elsevier Ltd, 46(3), pp. 204–208. doi: 10.1016/j.oraloncology.2009.12.005.
- Lin, S. L., Chang, D. and Ying, S. Y. (2005) 'Asymmetry of intronic pre-miRNA structures in functional RISC assembly', *Gene*, 356, pp. 32–38. doi: 10.1016/j.gene.2005.04.036.
- Linden, J. (2005) 'Adenosine in Tissue Protection and Tissue Regeneration', *Molecular Pharmacology*, 67(5), pp. 1385–1387. doi: 10.1124/mol.105.011783.
- Linkermann, A. *et al.* (2014) 'Regulated Cell Death in AKI', *Journal of the American Society of Nephrology*, 25(12), pp. 2689–2701. doi: 10.1681/asn.2014030262.
- Liu, J. *et al.* (2005) 'A role for the P-body component GW182 in microRNA function', *Nature Cell Biology*, 7(12), pp. 1161–1166. doi: 10.1038/ncb1333.
- Liu, T. *et al.* (2017) 'Role of epidermal growth factor receptor in lung cancer and targeted therapies', *American Journal of Cancer Research*, 7(2), pp. 187–202.
- Liu, Y. *et al.* (2012) 'HIF1 α regulated expression of XPA contributes to cisplatin resistance in lung cancer', *Carcinogenesis*, 33(6), pp. 1187–1192. doi: 10.1093/carcin/bgs142.

- Livak, K. J. and Schmittgen, T. D. (2001) 'Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method', *Methods*, 25(4), pp. 402–408. doi: 10.1006/meth.2001.1262.
- Lund, E. *et al.* (2004) 'Nuclear Export of MicroRNA Precursors', *Science*, 303(5654), pp. 95–98. doi: 10.1126/science.1090599.
- Lynch, S. M. *et al.* (2016) 'miR-24 regulates CDKN1B/p27 expression in prostate cancer', *Prostate*, 76(7), pp. 637–648. doi: 10.1002/pros.23156.
- Mailand, N. *et al.* (2002) 'Regulation of G2/M events by Cdc25A through phosphorylation-dependent modulation of its stability', *EMBO Journal*, 21(21), pp. 5911–5920. doi: 10.1093/emboj/cdf567.
- Mandic, A. *et al.* (2003) 'Cisplatin induces endoplasmic reticulum stress and nucleus-independent apoptotic signaling', *Journal of Biological Chemistry*, 278(11), pp. 9100–9106. doi: 10.1074/jbc.M210284200.
- Mangala, L. S. *et al.* (2009) 'Therapeutic Targeting of ATP7B in Ovarian Carcinoma', *Clinical Cancer Research*, 15(11), pp. 3770–3780. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-08-2306.Therapeutic.
- Manohar, S. and Leung, N. (2018) 'Cisplatin nephrotoxicity: a review of the literature', *Journal of Nephrology*. Springer International Publishing, 31(1), pp. 15–25. doi: 10.1007/s40620-017-0392-z.
- Martin, L. P., Hamilton, T. C. and Schilder, R. J. (2008) 'Platinum resistance: The role of DNA repair pathways', *Clinical Cancer Research*, 14(5), pp. 1291–1295. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-07-2238.
- Martins, I. *et al.* (2011) 'Restoration of the immunogenicity of cisplatin-induced cancer cell death by endoplasmic reticulum stress', *Oncogene*. Nature Publishing Group, 30(10), pp. 1147–1158. doi: 10.1038/onc.2010.500.
- Masutani, C. *et al.* (2000) 'Mechanisms of accurate translesion synthesis by human DNA polymerase η ', *The EMBO Journal*, 19(12), pp. 3100–3109. doi: 10.1093/emboj/19.12.3100.
- McDonald, E. S. *et al.* (2005) 'Cisplatin preferentially binds to DNA in dorsal root ganglion neurons in vitro and in vivo: A potential mechanism for neurotoxicity', *Neurobiology of Disease*, 18(2), pp. 305–313. doi: 10.1016/j.nbd.2004.09.013.
- Mediavilla-Varela, M. *et al.* (2017) 'A Novel Antagonist of the Immune Checkpoint Protein Adenosine A2a Receptor Restores Tumor-Infiltrating Lymphocyte Activity in the Context of the Tumor Microenvironment', *Neoplasia*. The Authors, 19(7), pp. 530–536. doi: 10.1016/j.neo.2017.02.004.
- Meister, G. and Tuschl, T. (2004) 'Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA.', *Nature*, 431(7006), pp. 343–349. doi: 10.1038/nature02873.
- Metzger, D. and Chambon, P. (2001) 'Site- and time-specific gene targeting in the mouse', *Methods*, 24(1), pp. 71–80. doi: 10.1006/meth.2001.1159.
- Meyers, T. J. *et al.* (2017) 'Case-control study of cumulative cigarette tar exposure

- and lung and upper aerodigestive tract cancers', *International Journal of Cancer*, 140(9), pp. 2040–2050. doi: 10.1002/ijc.30632.
- Miller, R. P. *et al.* (2010) 'Mechanisms of cisplatin nephrotoxicity', *Toxins*, 2(11), pp. 2490–2518. doi: 10.3390/toxins2112490.
- Mishra, Prasad J *et al.* (2007) 'A miR-24 microRNA binding-site polymorphism in dihydrofolate reductase gene leads to methotrexate resistance', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(33), pp. 13513–13518. doi: 10.1073/pnas.0706217104.
- Mistry, P. *et al.* (1991) 'The relationships between glutathione, glutathione-S-transferase and cytotoxicity of platinum drugs and melphalan in eight human ovarian carcinoma cell lines', *British Journal of Cancer*, 64(2), pp. 215–220. doi: 10.1038/bjc.1991.279.
- Modrich, P. (2006) 'MECHANISMS IN EUKARYOTIC MISMATCH REPAIR', *Journal of Biological Chemistry biological chemistry*, 281(41), pp. 30305–30309.
- Murphy, J. F. (2015) 'Pre-Clinical Murine Models: Syngeneic Models for Immuno-Oncology', *MOJ Immunology*, 2(4), pp. 2–5. doi: 10.15406/moji.2015.02.00052.
- Nakayama, K. *et al.* (2002) 'Copper-Transporting P-Type Adenosine Triphosphatase (ATP7B) as a Cisplatin Based Chemoresistance Marker in Ovarian Carcinoma : Comparative Analysis with Expression', *International Journal of Cancer*, 101(5), pp. 488–495. doi: 10.1002/ijc.10608.
- Nguyen, T., Rich, A. and Dahl, R. (2013) 'MiR-24 Promotes the Survival of Hematopoietic Cells', *PLoS ONE*, 8(1), pp. 1–8. doi: 10.1371/journal.pone.0055406.
- Noji, T. *et al.* (2002) 'Treatment with an adenosine uptake inhibitor attenuates glomerulonephritis in mice', *European Journal of Pharmacology*, 449(3), pp. 293–300. doi: 10.1016/S0014-2999(02)02039-3.
- Nyberg, K. A. *et al.* (2002) 'Toward Maintaining the Genome: DNA Damage and Replication Checkpoints', *Annual Review of Genetics*, 36(1), pp. 617–656. doi: 10.1146/annurev.genet.36.060402.113540.
- Offer, H. *et al.* (2002) 'The onset of p53-dependent DNA repair or apoptosis is determined by the level of accumulated damaged DNA', *Carcinogenesis*, 23(6), pp. 1025–1032. doi: 10.1093/carcin/23.6.1025.
- Oh, C. J. *et al.* (2017) 'Pyruvate dehydrogenase kinase 4 deficiency attenuates cisplatin-induced acute kidney injury', *Kidney International*. Elsevier Inc, 91(4), pp. 880–895. doi: 10.1016/j.kint.2016.10.011.
- Oh, G. S. *et al.* (2014) 'Cisplatin-induced kidney dysfunction and perspectives on improving treatment strategies', *Electrolyte and Blood Pressure*, 12(2), pp. 55–65. doi: 10.5049/EBP.2014.12.2.55.
- Ohta, A. *et al.* (2006) 'A2A adenosine receptor protects tumors from antitumor T cells', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 103(35), pp. 13132–13137. doi: 10.1073/pnas.0605251103.
- Ohta, A. and Sitkovsky, M. (2001) 'Role of G protein coupled adenosine receptors in

downregulation of inflammation and protection tissue damage', *Nature*, 414(6866), pp. 916–920. doi: 10.1038/414916a.

Okada, C. *et al.* (2009) 'A high-Resolution structure of the pre-miRNA nuclear export machinery', *Science*, 326(5957), pp. 1275–1279. doi: 10.1126/science.1178705.

Olaussen, K. A. *et al.* (2006) 'DNA Repair by ERCC1 in Non-Small Cell Lung Cancer and Cisplatin-Based Adjuvant Chemotherapy', *New England Journal of Medicine*, 355(10), pp. 983–991. doi: 10.1056/NEJMoa060570.

Oliver, T. G. *et al.* (2010) 'Chronic cisplatin treatment promotes enhanced damage repair and tumor progression in a mouse model of lung cancer', *Genes and Development*, 24(8), pp. 837–852. doi: 10.1101/gad.1897010.

Oliveros, A. *et al.* (2019) 'Adora2a inhibition as novel therapeutic target for cisplatin-induced cognitive dysfunction', in. Available at: <https://www.abstractsonline.com/pp8/#!/7883/presentation/68543>.

Olson, P. *et al.* (2009) 'MicroRNA dynamics in the stages of tumorigenesis correlate with hallmark capabilities of cancer', *Genes and Development*, 23(18), pp. 2152–2165. doi: 10.1101/gad.1820109.

Oyarzún, C. *et al.* (2017) 'Adenosine contribution to normal renal physiology and chronic kidney disease', *Molecular Aspects of Medicine*, 55, pp. 75–89. doi: 10.1016/j.mam.2017.01.004.

Pabla, N. *et al.* (2009) 'The copper transporter Ctr1 contributes to cisplatin uptake by renal tubular cells during cisplatin nephrotoxicity', *American Journal of Physiology-Renal Physiology*, 296(3), pp. F505–F511. doi: 10.1152/ajprenal.90545.2008.

Pabla, N. and Dong, Z. (2008) 'Cisplatin nephrotoxicity: Mechanisms and renoprotective strategies', *Kidney International*. Elsevier Masson SAS, 73(9), pp. 994–1007. doi: 10.1038/sj.ki.5002786.

Palazzo, A. F. and Lee, E. S. (2015) 'Non-coding RNA : what is functional and what is junk ?', *Frontiers in Genetics*, 6(2), pp. 1–11. doi: 10.3389/fgene.2015.00002.

Pao, W. and Girard, N. (2011) 'New driver mutations in non-small-cell lung cancer', *The Lancet Oncology*. Elsevier Ltd, 12(2), pp. 175–180. doi: 10.1016/S1470-2045(10)70087-5.

Pao, W. and Hutchinson, K. E. (2012) 'Chipping away at the lung cancer genome', *Nature Medicine*. Nature Publishing Group, 18(3), pp. 349–351. doi: 10.1038/nm.2697.

Park, J.-E. *et al.* (2015) 'Dicer recognizes the 5' end of RNA for efficient and accurate processing', *Nature*, 475(7355), pp. 201–205. doi: 10.1038/nature10198.

Park, S. W. *et al.* (2012) 'Proximal tubule sphingosine kinase-1 has a critical role in A1 adenosine receptor-mediated renal protection from ischemia', *Kidney International*, 82(8), pp. 878–891. doi: 10.1038/ki.2012.224.

Pasquinelli, A. E. *et al.* (2000) 'Conservation of the sequence and temporal

expression of let-7 heterochronic regulatory RNA', *Nature*, 408(6808), pp. 86–89. doi: 10.1038/35040556.

Pastor-Anglada, M. *et al.* (2008) 'SLC28 genes and concentrative nucleoside transporter (CNT) proteins', *Xenobiotica*, 38(7–8), pp. 972–994. doi: 10.1080/00498250802069096.

Pellegrini, K. L. *et al.* (2014) 'MicroRNA-155 deficient mice experience heightened kidney toxicity when dosed with cisplatin', *Toxicological Sciences*, 141(2), pp. 484–492. doi: 10.1093/toxsci/kfu143.

Peterfreund, R. A. *et al.* (1996) 'Characterization and Expression of the Human A2a Adenosine Receptor Gene', *Journal of Neurochemistry*, 66(1), pp. 362–368. doi: 10.1046/j.1471-4159.1996.66010362.x.

Petros, W. P. and Evans, W. E. (2004) 'Pharmacogenomics in cancer therapy: Is host genome variability important?', *Trends in Pharmacological Sciences*, 25(9), pp. 457–464. doi: 10.1016/j.tips.2004.07.007.

Petrukhin, K. *et al.* (1994) 'Characterization of the wilson disease gene encoding a P-type copper transporting ATPase: Genomic organization, alternative splicing, and structure/function predictions', *Human Molecular Genetics*, 3(9), pp. 1647–1656. doi: 10.1093/hmg/3.9.1647.

Peyrone, M. (1845) 'Ueber die Einwirkung von Ammoniak auf Platinchlorür', *Annalen der Chemie und Pharmacie*, 55(2), pp. 205–213. doi: 10.1002/jlac.18450550206.

Pinna, A. (2014) 'Adenosine A2A receptor antagonists in Parkinson's disease: Progress in clinical trials from the newly approved istradefylline to drugs in early development and those already discontinued', *CNS Drugs*, 28(5), pp. 455–474. doi: 10.1007/s40263-014-0161-7.

Podratz, J. L. *et al.* (2011) 'Cisplatin induced Mitochondrial DNA damage in dorsal root ganglion neurons', *Neurobiology of Disease*, 41(3), pp. 661–668. doi: 10.1016/j.nbd.2010.11.017.

Pottier, N. *et al.* (2014) 'FibromiRs: Translating molecular discoveries into new anti-fibrotic drugs', *Trends in Pharmacological Sciences*. Elsevier Ltd, 35(3), pp. 119–126. doi: 10.1016/j.tips.2014.01.003.

Pulikkan JA *et al.* (2010) 'Cell-cycle regulator E2F1 and microRNA-223 comprise an autoregulatory negative feedback loop in acute myeloid leukemia', *Blood*, 115(9), pp. 1768–1778. doi: 10.1182/blood-2009-08-240101.

Qin, W. *et al.* (2010) 'miR-24 regulates apoptosis by targeting the Open Reading Frame (ORF) region of FAF1 in cancer cells', *PLoS ONE*, 5(2), pp. 1–8. doi: 10.1371/journal.pone.0009429.

Qin, X. *et al.* (2015) 'The tumor cytosol miRNAs, fluid miRNAs and exosome miRNAs in lung cancer', *Frontiers in Oncology*, 4, pp. 1–7. doi: 10.3389/fonc.2014.00357.

Qiu, S. *et al.* (2017) 'Silencing of BAG3 promotes the sensitivity of ovarian cancer cells to cisplatin via inhibition of autophagy', *Oncology Reports*, 38(1), pp. 309–316. doi: 10.3892/or.2017.5706.

- Qu, X. *et al.* (2017) 'Autophagy inhibitor chloroquine increases sensitivity to cisplatin in QBC939 cholangiocarcinoma cells by mitochondrial ROS', *PLoS ONE*, 12(3), pp. 1–18. doi: 10.1371/journal.pone.0173712.
- Rayner, K. *et al.* (2010) 'MicroRNA-33 contributes to the regulation of cholesterol homeostasis', *Science*, 328(5985), pp. 1570–1573. doi: 10.1126/science.1189862.
- Rebillard, A., Lagadic-Gossmann, D. and Dimanche-Boitrel, M.-T. (2008) 'Cisplatin Cytotoxicity: DNA and Plasma Membrane Targets', *Current Medicinal Chemistry*, 15(26), pp. 2656–2663. doi: 10.2174/092986708786242903.
- Rees, E. M., Lee, J. and Thiele, D. J. (2004) 'Mobilization of intracellular copper stores by the Ctr2 vacuolar copper transporter', *Journal of Biological Chemistry*, 279(52), pp. 54221–54229. doi: 10.1074/jbc.M411669200.
- Reinhart, B. *et al.* (2000) 'The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*.' , *Nature*, 403(6772), pp. 901–906. doi: 10.1038/35002607.
- Ren, J.-H. *et al.* (2010) 'Acquired Cisplatin Resistance in Human Lung Adenocarcinoma Cells Is Associated with Enhanced Autophagy', *Cancer Biotherapy and Radiopharmaceuticals*, 25(1), pp. 75–80. doi: 10.1089/cbr.2009.0701.
- Roberts, V. S. *et al.* (2014) 'The role of adenosine receptors A 2A and A 2B signaling in renal fibrosis', *Kidney International*. Elsevier Masson SAS, 86(4), pp. 685–692. doi: 10.1038/ki.2014.244.
- Rocha, C. *et al.* (2018) 'DNA repair pathways and cisplatin resistance: an intimate relationship', *Clinics*, 73(Suppl 1), pp. 1–10. doi: 10.6061/clinics/2018/e478s.
- Rodriguez, A. *et al.* (2004) 'Identification of mammalian microRNA host genes and transcription units', *Genome Research*, 14(10 A), pp. 1902–1910. doi: 10.1101/gr.2722704.
- Van Rooij, E. *et al.* (2007) 'Control of stress-dependent cardiac growth and gene expression by a microRNA', *Science*, 316(5824), pp. 575–579. doi: 10.1126/science.1139089.
- van Rooij, E. and Kauppinen, S. (2014) 'Development of microRNA therapeutics is coming of age', *EMBO Molecular Medicine*, 6(7), pp. 851–864. doi: 10.15252/emmm.201100899.
- Van Rooij, E. and Olson, E. N. (2012) 'MicroRNA therapeutics for cardiovascular disease: Opportunities and obstacles', *Nature Reviews Drug Discovery*. Nature Publishing Group, 11(11), pp. 860–872. doi: 10.1038/nrd3864.
- Rosenberg, B. *et al.* (1969) 'Platinum Compounds: a New Class of Potent Antitumour Agents', *Nature*, 222, pp. 385–386.
- Rosenberg, B., Van Camp, L. and Thomas, K. (1965) 'Inhibition of Cell Division in *Escherichia coli* by Electrolysis Products from a Platinum Electrode', *Nature*, 205, pp. 698–699.
- Rottiers, V. and Näär, A. (2012) 'MicroRNAs in Metabolism and Metabolic Disorders',

Nature Reviews in Molecular Cell Biology, 13(4), pp. 239–250. doi: 10.1038/nrm3313.

Roulston, A., Muller, W. J. and Shore, G. C. (2013) 'BIM, PUMA, and the achilles' heel of oncogene addiction', *Science Signaling*, 6(268), pp. 24–27. doi: 10.1126/scisignal.2004113.

Roy, L. *et al.* (2015) 'MiR-24 Is Required for Hematopoietic Differentiation of Mouse Embryonic Stem Cells', *PLoS Genetics*, 11(1), pp. 1–22. doi: 10.1371/journal.pgen.1004959.

Rybak, L. P. and Whitworth, C. A. (2005) 'Ototoxicity: Therapeutic opportunities', *Drug Discovery Today*, 10(19), pp. 1313–1321. doi: 10.1016/S1359-6446(05)03552-X.

Sachdeva, S. and Gupta, M. (2013) 'Adenosine and its receptors as therapeutic targets: An overview', *Saudi Pharmaceutical Journal*. King Saud University, 21(3), pp. 245–253. doi: 10.1016/j.jsps.2012.05.011.

Salta, E. and De Strooper, B. (2012) 'Non-coding RNAs with essential roles in neurodegenerative disorders', *The Lancet Neurology*. Elsevier Ltd, 11(2), pp. 189–200. doi: 10.1016/S1474-4422(11)70286-1.

Samimi, G. *et al.* (2003) 'Increase in Expression of the Copper Transporter ATP7A during Platinum Drug-Based Treatment Is Associated with Poor Survival in Ovarian Cancer Patients', *Clinical Cancer Research*, 9(16), pp. 5853–5859.

Dos Santos, N. A. G. *et al.* (2012) 'Cisplatin-induced nephrotoxicity and targets of nephroprotection: An update', *Archives of Toxicology*, 86(8), pp. 1233–1250. doi: 10.1007/s00204-012-0821-7.

Sattin, A. and Rall, T. W. (1970) 'The Effect of Adenosine and Adenine Nucleotides on the Cyclic Adenosine 3',5'-Phosphate Content of Guinea Pig Cerebral Cortex Slices', *Molecular Pharmacology*, 6(1), pp. 13–23. Available at: <http://molpharm.aspetjournals.org/content/6/1/13.abstract>.

Savary, G. *et al.* (2019) 'The DNMT3OS lncRNA is a reservoir of fibromiRs with major functions in lung fibroblast response to TGF- β and pulmonary fibrogenesis', *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 200(2), pp. 184–198. doi: 10.1164/rccm.201807-1237OC.

Schindler, C. W. *et al.* (2005) 'Role of central and peripheral adenosine receptors in the cardiovascular responses to intraperitoneal injections of adenosine A₁ and A_{2A} subtype receptor agonists', *British Journal of Pharmacology*, 144(5), pp. 642–650. doi: 10.1038/sj.bjp.0706043.

Schulte, G. and Fredholm, B. B. (2003) 'Signalling from adenosine receptors to mitogen-activated protein kinases', *Cellular Signalling*, 15(9), pp. 813–827. doi: 10.1016/S0898-6568(03)00058-5.

Schwarz, D. S. *et al.* (2003) 'Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex', *Cell*, 115(2), pp. 199–208. doi: 10.1016/S0092-8674(03)00759-1.

Shah, M. Y. and Cali, G. A. (2014) 'MicroRNA as therapeutic targets in human

cancers', *Wiley Interdisciplinary Reviews RNA*, 5(4), pp. 537–548. doi: 10.1002/wrna.1229.

Sheth, S. *et al.* (2014) 'Adenosine receptors: Expression, function and regulation', *International Journal of Molecular Sciences*, 15(2), pp. 2024–2052. doi: 10.3390/ijms15022024.

Sholl, L. M. (2014) 'Large-cell carcinoma of the lung: A diagnostic category redefined by immunohistochemistry and genomics', *Current Opinion in Pulmonary Medicine*, 20(4), pp. 324–331. doi: 10.1097/MCP.0000000000000068.

Si, M. and Lang, J. (2018) 'The roles of metallothioneins in carcinogenesis', *Journal of Hematology and Oncology*. *Journal of Hematology & Oncology*, 11(1), pp. 1–20. doi: 10.1186/s13045-018-0645-x.

Siddik, Z. H. (2003) 'Cisplatin: Mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance', *Oncogene*, 22(47 REV. ISS. 6), pp. 7265–7279. doi: 10.1038/sj.onc.1206933.

Silvestri, G. A. *et al.* (2003) 'Invasive Staging : The Guidelines Invasive Staging *', *CHEST*. The American College of Chest Physicians, 123(1), pp. 147S-156S. doi: 10.1378/chest.123.1.

Simon-friedt, B. R. *et al.* (2015) 'The RPTEC/TERT1 cell line as an improved tool in vitro nephrotoxicity assessments', *Biological Trace Element Research*, 166(1), pp. 66–71. doi: 10.1007/s12011-015-0339-y.

Simon, N. and Hertig, A. (2015) 'Alteration of Fatty Acid Oxidation in Tubular Epithelial Cells: From Acute Kidney Injury to Renal Fibrogenesis', *Frontiers in Medicine*, 2(52), pp. 1–8. doi: 10.3389/fmed.2015.00052.

Simons, B. W. and Brayton, C. (2017) *Challenges and limitations of mouse xenograft models of cancer, Patient Derived Tumor Xenograft Models: Promise, Potential and Practice*. Elsevier Inc. doi: 10.1016/B978-0-12-804010-2.00003-5.

Sitkovsky, M. V. *et al.* (2014) 'Hostile, Hypoxia-A2-Adenosinergic Tumor Biology as the Next Barrier to the Tumor Immunologists', *Cancer Immunology Research*, 2(7), pp. 598–605. doi: 10.1158/2326-6066.CIR-14-0075.

Smith, J. *et al.* (2010) *The ATM-Chk2 and ATR-Chk1 pathways in DNA damage signaling and cancer*. 1st edn, *Advances in Cancer Research*. 1st edn. Elsevier Inc. doi: 10.1016/B978-0-12-380888-2.00003-0.

Socinski, M. A. (2014) 'Update on taxanes in the first-line treatment of advanced non-small-cell lung cancer', *Current Oncology*, 21(5), pp. 691–703. doi: 10.3747/co.21.1997.

Sokol, A. M. *et al.* (2013) 'DNA polymerase η modulates replication fork progression and DNA damage responses in platinum-treated human cells', *Scientific Reports*, 3, pp. 1–9. doi: 10.1038/srep03277.

Solé, C. *et al.* (2019) 'The circulating transcriptome as a source of biomarkers for melanoma', *Cancers*, 11(1), pp. 1–18. doi: 10.3390/cancers11010070.

Sorenson, C. M. and Eastman, A. (1988) 'Mechanism of cis-Diamminedichloroplatinum (II) -induced Cytotoxicity : Role of G2', *cancer research*, 48(16), pp. 4484–4488.

Spiro, S. G., Gould, M. K. and Colice, G. L. (2007) 'Initial evaluation of the patient with lung cancer: Symptoms, signs, laboratory tests, and paraneoplastic syndromes. ACCP evidenced-based clinical practice guidelines (2nd edition)', *Chest*, 132(3 SUPPL.), pp. 149S-160S. doi: 10.1378/chest.07-1358.

Sprowl, J. *et al.* (2012) 'Association of ABCC2 polymorphisms with disposition and efficacy', *Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 91(6), pp. 1022–1026. doi: 10.1038/clpt.2011.330.

Sprowl, J. A., Ness, R. A. and Sparreboom, A. (2012) 'Polymorphic Transporters and Platinum Pharmacodynamics', *Drug Metabolism and Pharmacokinetics*, 28(1), pp. 19–27. doi: 10.2133/dmpk.dmpk-12-rv-073.

Staff, N. *et al.* (2017) 'chemotherapy induced peripheral neuropathy', *Annals of neurology*, 81(6), pp. 772–781. doi: 10.1002/ana.24951.

Su, Z. *et al.* (2017) 'Autophagy inhibition impairs the epithelial-mesenchymal transition and enhances cisplatin sensitivity in nasopharyngeal carcinoma', *Oncology Letters*, 13(6), pp. 4147–4154. doi: 10.3892/ol.2017.5963.

Szakacs, G. *et al.* (2004) 'Predicting drug sensitivity and resistance : Profiling ABC transporter genes in cancer cells', *Cancer Cell*, 6(2), pp. 129–137. doi: 10.1016/j.ccr.2004.06.026.

Szegezdi, E. *et al.* (2006) 'Mediators of endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis', *EMBO Reports*, 7(9), pp. 880–885. doi: 10.1038/sj.embor.7400779.

Tajeddine, N. *et al.* (2008) 'Hierarchical involvement of Bak , VDAC1 and Bax in cisplatin-induced cell death', *Oncogene*, 27(30), pp. 4221–4232. doi: 10.1038/onc.2008.63.

Takahara, P. M. *et al.* (1995) 'Crystal structure of double-stranded DNA containing the major adduct of the anticancer drug cisplatin', *Nature*, 377(6550), pp. 649–652. doi: 10.1038/377649a0.

Takezawa, K. *et al.* (2011) 'Role of ERK-BIM and STAT3-survivin signaling pathways in ALK inhibitor-induced apoptosis in EML4-ALK-positive lung cancer', *Clinical Cancer Research*, 17(8), pp. 2140–2148. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-10-2798.

Taniguchi, K. *et al.* (1996) 'A Human Canalicular Multispecific Organic Anion Transporter (cMOAT) Gene Is Overexpressed in Cisplatin-resistant Human Cancer Cell Lines with Decreased Drug Accumulation', *cancer Research*, 56, pp. 4124–4129.

Tanzi, R. E. *et al.* (1993) 'The Wilson disease gene is a copper transporting ATPase with homology to the Menkes disease gene', *Nature Genetics*, 5(4), pp. 344–350.

Toss, A. and Cortesi, L. (2013) 'Molecular mechanisms of PARP inhibitors In BRCA-related ovarian cancer', *Journal of Cancer Science and Therapy*, 5(11), pp. 409–416. doi: 10.4172/1948-5956.1000234.

- Townsend, D. M. *et al.* (2003) 'Metabolism of cisplatin to a Nephrotoxin in Proximal Tubule Cells', *Journal of the American Society of Nephrology*, 14(1), pp. 1–10. doi: 10.1097/01.asn.0000042803.28024.92.
- Travis, W. D. *et al.* (2011) 'International association for the study of lung cancer/American Thoracic Society/European Respiratory Society international multidisciplinary classification of lung adenocarcinoma', *Journal of Thoracic Oncology*. International Association for the Study of Lung Cancer, 6(2), pp. 244–285. doi: 10.1097/JTO.0b013e318206a221.
- Travis, W. D. *et al.* (2013) 'Diagnosis of lung adenocarcinoma in resected specimens: Implications of the 2011 International Association for the Study of Lung Cancer/American Thoracic Society/European respiratory society classification', *Archives of Pathology and Laboratory Medicine*, 137(5), pp. 685–705. doi: 10.5858/arpa.2012-0264-RA.
- Travis, W. D. *et al.* (2015) 'The 2015 World Health Organization Classification of Lung Tumors: Impact of Genetic, Clinical and Radiologic Advances since the 2004 Classification', *Journal of Thoracic Oncology*. International Association for the Study of Lung Cancer, 10(9), pp. 1243–1260. doi: 10.1097/JTO.0000000000000630.
- Truong, L. D. *et al.* (2016) 'Macrophage A2A Adenosine Receptors Are Essential to Protect from Progressive Kidney Injury', *American Journal of Pathology*. American Society for Investigative Pathology, 186(10), pp. 2601–2613. doi: 10.1016/j.ajpath.2016.06.017.
- Tuzel, E. *et al.* (2015) 'Association of metallothionein expression and clinical response to cisplatin based chemotherapy in testicular germ cell tumors', *Central European Journal of Urology*, 68(1), pp. 45–50. doi: 10.5173/ceju.2015.01.486.
- Vallon, V. *et al.* (2004) 'Functional consequences at the single-nephron level of the lack of adenosine A1 receptors and tubuloglomerular feedback in mice', *Pflügers Archiv European Journal of Physiology*, 448(2), pp. 214–221. doi: 10.1007/s00424-004-1239-8.
- Vallon, V., Miracle, C. and Thomson, S. (2008) 'Adenosine and kidney function: potential implications in atients with heart failure', *European Journal of Heart Failure*, 10(2), pp. 176–187. doi: 10.1016/j.ejheart.2008.01.010.
- Vallone, V. and Osswald, H. (2009) 'Adenosine Receptors and the kidney', *Handbook of Experimental Pharmacology*, 193, pp. 443–470. doi: 10.1007/978-3-540-89615-9_15.
- Vandenbussche, C. *et al.* (2018) 'Tacrolimus-induced nephrotoxicity in mice is associated with microRNA deregulation', *Archives of Toxicology*. Springer Berlin Heidelberg, 92(4), pp. 1539–1550. doi: 10.1007/s00204-018-2158-3.
- Vansteenkiste, J. *et al.* (2013) 'Early and locally advanced non-small-cell lung cancer (NSCLC): ESMO clinical practice guidelines for diagnosis, treatment and follow-up', *Annals of Oncology*, 24(SUPPL.6), pp. vi89–vi98. doi: 10.1093/annonc/mdt241.
- Varna, M., Bertheau, P. and Legrès, L. (2014) 'Tumor Microenvironment in Human Tumor Xenografted Mouse Models', *Journal of Analytical Oncology*, 3(3), pp. 159–

166. doi: 10.6000/1927-7229.2014.03.03.6.

Ventura, A. and Jacks, T. (2009) 'miRNAs and Cancer : short RNAs go a long way', *Cell*, 136(4), pp. 586–591. doi: 10.1016/j.cell.2009.02.005.

Volarevic, V. *et al.* (2019) 'Molecular mechanisms of cisplatin-induced nephrotoxicity: A balance on the knife edge between renoprotection and tumor toxicity', *Journal of Biomedical Science*. *Journal of Biomedical Science*, 26(1), pp. 1–14. doi: 10.1186/s12929-019-0518-9.

Vousden, K. H. and Lane, D. P. (2007) 'P53 in Health and Disease.', *Nature reviews. Molecular cell biology*, 8(4), pp. 275–83. doi: 10.1038/nrm2147.

Vulpe, C. *et al.* (1993) 'Isolation of a candidate gene for Menkes disease and evidence that it encodes a copper-transporting ATPase [published erratum appears in *Nat Genet* 1993 Mar;3(3):273] ', *Nat Genet*, 3(1), pp. 7–13.

Wang, C. *et al.* (2018) 'Loss of DEPTOR in renal tubules protects against cisplatin-induced acute kidney injury', *Cell Death and Disease*. Springer US, 9(5). doi: 10.1038/s41419-018-0483-3.

Wang, D. and Lippard, S. J. (2005) 'Cellular processing of platinum anticancer drugs', *Nature Reviews Drug Delivery*, 4(4), pp. 307–320. doi: 10.1038/nrd1691.

Wang, H. *et al.* (2009) 'REV3L confers chemoresistance to cisplatin in human gliomas: The potential of its RNAi for synergistic therapy', *Neuro-Oncology*, 11(6), pp. 790–802. doi: 10.1215/15228517-2009-015.

Wang, J. and Wu, G. S. (2014) 'Role of autophagy in cisplatin resistance in ovarian cancer cells', *Journal of Biological Chemistry*, 289(24), pp. 17163–17173. doi: 10.1074/jbc.M114.558288.

Wang, Q. *et al.* (2008) 'MicroRNA miR-24 inhibits erythropoiesis by targeting activin type I receptor ALK4', *Blood*, 111(2), pp. 588–595. doi: 10.1182/blood-2007-05-092718.

Wang, S. *et al.* (2016) 'Hsa-miR-24-3p increases nasopharyngeal carcinoma radiosensitivity by targeting both the 3'UTR and 5'UTR of Jab1/CSN5', *Oncogene*, 35(47), pp. 6096–6108. doi: 10.1038/onc.2016.147.

Wang, X. *et al.* (1999) 'Cisplatin-induced p53-independent growth arrest and cell death in cancer cells.', *International journal of oncology*, 15(6), pp. 1097–1102.

Wee, P. and Wang, Z. (2017) 'Epidermal Growth Factor Receptor Cell Proliferation signaling pathways', *Cancers*, 9(5), pp. 1–45. doi: 10.3390/cancers9050052.

Wei, C. J., Li, W. and Chen, J. F. (2011) 'Normal and abnormal functions of adenosine receptors in the central nervous system revealed by genetic knockout studies', *Biochimica et Biophysica Acta*. Elsevier B.V., 1808(5), pp. 1358–1379. doi: 10.1016/j.bbamem.2010.12.018.

Welch, W. J. (2015) 'Adenosine, type 1 receptors: role in proximal tubule Na⁺ reabsorption', *Acta Physiologica*, 213(1), pp. 242–248. doi: 10.1111/apha.12413.

- Wheate, N. J. *et al.* (2010) 'The status of platinum anticancer drugs in the clinic and in clinical trials', *Dalton Transactions*, 39(35), pp. 8113–8127. doi: 10.1039/c0dt00292e.
- Wu, J. *et al.* (2010) 'Induction of anion exchanger-1 translation and its opposite roles in the carcinogenesis of gastric cancer cells and differentiation of K562 cells', *Oncogene*, 29(13), pp. 1987–1996. doi: 10.1038/onc.2009.481.
- Wynder, E. L. and Graham, E. A. (1950) 'Tabacco smoking as a possible etiologic factor in bronchiogenic carcinoma, a study of 684 proved cases', *Journal of American Medical Association*, 143(4), pp. 329–336.
- Xie, Y. *et al.* (2013) 'MicroRNA-24 regulates XIAP to reduces the apoptosis threshold in cancer cells', *Oncogene*, 32(19), pp. 2442–2451. doi: 10.1038/onc.2012.258.
- Xiong, Y., Huang, B. Y. and Yin, J. Y. (2017) 'Pharmacogenomics of platinum-based chemotherapy in non-small cell lung cancer: focusing on DNA repair systems', *Medical Oncology*. Springer US, 34(4), pp. 1–16. doi: 10.1007/s12032-017-0905-6.
- Xu, X. *et al.* (2012) 'Evidence for type II cells as cells of origin of K-Ras-induced distal lung adenocarcinoma', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 109(13), pp. 4910–4915. doi: 10.1073/pnas.1112499109.
- Yi, R. *et al.* (2003) 'Exportin-5 mediates the nuclear export of pre-microRNAs and short hairpin RNAs', *Genes and Development*, 17(24), pp. 3011–3016. doi: 10.1101/gad.1158803.
- Yoo, A. S. and Greenwald, I. (2005) 'LIN-12/Notch Activation leads to lcrRNA-Mediated Down-Regulation of Vav in *C. elegans*', *Science*, 310(5752), pp. 1330–1333. doi: 10.1126/science.1119481.
- Young, A. *et al.* (2016) 'Co-inhibition of CD73 and A2AR Adenosine Signaling Improves Anti-tumor Immune Responses', *Cancer Cell*. Elsevier Inc., 30(3), pp. 391–403. doi: 10.1016/j.ccell.2016.06.025.
- Young, J. D. *et al.* (2008) 'Human equilibrative nucleoside transporter (ENT) family of nucleoside and nucleobase transporter proteins', *Xenobiotica*, 38(7–8), pp. 995–1021. doi: 10.1080/00498250801927427.
- Young, J. D. *et al.* (2013) 'The human concentrative and equilibrative nucleoside transporter families, SLC28 and SLC29', *Molecular Aspects of Medicine*, 34(2–3), pp. 529–547. doi: 10.1016/j.mam.2012.05.007.
- Yu, H. *et al.* (2011) 'P62/SQSTM1 involved in cisplatin resistance in human ovarian cancer cells by clearing ubiquitinated proteins', *European Journal of Cancer*, 47(10), pp. 1585–1594. doi: 10.1016/j.ejca.2011.01.019.
- Yu, J. *et al.* (2006) 'Human microRNA clusters: Genomic organization and expression profile in leukemia cell lines', *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 349(1), pp. 59–68. doi: 10.1016/j.bbrc.2006.07.207.
- Yuan, M. *et al.* (2018) 'MicroRNA (miR) 125b regulates cell growth and invasion in pediatric low grade glioma', *Scientific Reports*, 8(1), pp. 1–14. doi: 10.1038/s41598-018-30942-4.

- Yuwen, D. *et al.* (2017) 'Andrographolide enhances cisplatin-mediated anticancer effects in lung cancer cells through blockade of autophagy', *Anti-Cancer Drugs*, 28(9), pp. 967–976. doi: 10.1097/CAD.0000000000000537.
- Zander, L. and Bemark, M. (2004) 'Immortalized mouse cell lines that lack a functional Rev3 gene are hypersensitive to UV irradiation and cisplatin treatment', *DNA Repair*, 3(7), pp. 743–752. doi: 10.1016/j.dnarep.2004.03.031.
- Zhang, B. *et al.* (2007) 'MicroRNAs as Oncogenes and Tumor Suppressors', *Developmental Biology*, 302(1), pp. 1–12. doi: 10.1016/j.ydbio.2006.08.028.
- Zhang, S. *et al.* (2015) 'MicroRNA-24 upregulation inhibits proliferation, metastasis and induces apoptosis in bladder cancer cells by targeting CARMA3', *International Journal of Oncology*, 47(4), pp. 1351–1360. doi: 10.3892/ijo.2015.3117.
- Zhao, G. *et al.* (2015) 'Upregulation of miR-24 promotes cell proliferation by targeting NAIF1 in non-small cell lung cancer', *Tumor Biology*, 36(5), pp. 3693–3701. doi: 10.1007/s13277-014-3008-4.
- Zheng, M. (2016) 'Classification and Pathology of Lung Cancer', *Surgical Oncology Clinics of North America*. Elsevier Inc, 25(3), pp. 447–468. doi: 10.1016/j.soc.2016.02.003.
- Zhou, B. and Gitschier, J. (1997) 'hCTR1: a human gene for copper uptake identified by complementation in yeast.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(14), pp. 7481–6.
- Zhou, W. *et al.* (2013) 'Expression of DNA translesion synthesis polymerase η in head and neck squamous cell cancer predicts resistance to gemcitabine and cisplatin-based chemotherapy', *PLoS ONE*, 8(12), pp. 1–10. doi: 10.1371/journal.pone.0083978.
- Zhu, Q. *et al.* (2017) 'Knockdown of CFTR enhances sensitivity of prostate cancer cells to cisplatin via inhibition of autophagy', *Neoplasia*, 64(5), pp. 709–717. doi: 10.4149/neo_2017_508.
- Zhu, S. *et al.* (2017) 'A Role for The ATP7A Copper Transporter in Tumorigenesis and Cisplatin Resistance', *Journal of cancer*, 8(11), pp. 1952–1958. doi: 10.7150/jca.19029.
- Zhuang, M. *et al.* (2018) 'MicroRNA-524 promotes cell proliferation by down-regulating PTEN expression in osteosarcoma', *Cancer Cell International*. BioMed Central, 18(1), pp. 1–9. doi: 10.1186/s12935-018-0612-1.
- Zou, A.-P. *et al.* (1999) 'Role of renal medullary adenosine in the control of blood flow and sodium excretion', *American Journal of Physiology*, 276(3), pp. R790–R798. doi: 10.1152/ajpregu.1999.276.3.r790.

