

UNIVERSITÉ DE LILLE
FACULTÉ DE MÉDECINE PÔLE RECHERCHE

Année : 2021

THÈSE POUR LE DIPLÔME D'ÉTAT
DE DOCTEUR EN BIOLOGIE

**MicroARN : biomarqueurs et cibles thérapeutiques
en oncogenèse**

Présentée et soutenue publiquement le 25 Janvier 2021 à 14 heures

par Julie LEMAIRE

JURY

Présidente :

Madame le Professeur Delphine ALLORGE

Rapporteurs :

Monsieur le Docteur Georges VASSAUX

Monsieur le Docteur Bruno CARDINAUD

Examineurs :

Monsieur le Professeur Antoine GALMICHE

Madame le Docteur Cynthia VAN DER HAUWAERT

Directeur de thèse :

Monsieur le Docteur Nicolas POTTIER

**UMR 9020 CNRS - UMR-S 1277 CANTHER : "Hétérogénéité, Plasticité et Résistance aux
Thérapies des Cancers" (Dr. Isabelle VAN SEUNINGEN)**

Equipe « Sénescence, fibrose et cancer » (Pr. Corinne ABBADIE)

Préambule

Au cours des vingt dernières années, notre conception du génome a été profondément bouleversée grâce notamment à l'essor de méthodes de séquençage à haut débit et la mise en évidence des ARN non codants. En effet, les travaux réalisés durant la dernière décennie ont permis de montrer que les ARN, autrefois considérés comme de simples intermédiaires de la synthèse des protéines, jouent en fait un rôle majeur dans la régulation de l'expression du génome. Ainsi, les microARN (miARN), des petits ARN non codants d'une vingtaine de nucléotides, sont devenus l'une des classes d'ARN non codants les mieux caractérisées. De par leurs fonctions clés dans de nombreux processus physio-pathologiques, les miARN représentent actuellement de nouveaux outils non seulement à visée diagnostique et pronostique mais également thérapeutique. En particulier, le rôle instrumental des miARN dans le processus de cancérogenèse ainsi que l'identification de profils d'expression de miARN spécifiques de sous-type tumoraux, ouvrent de nouvelles perspectives en cancérologie.

Les travaux réalisés dans le cadre de cette thèse s'inscrivent dans ce contexte. Deux axes ont été développés en parallèle. Le premier concerne l'intérêt des miARN en tant que biomarqueurs d'exposition au cadmium, un composé environnemental cancérogène. Le second porte sur le ciblage thérapeutique des ARN non codants en cancérogenèse pulmonaire. Ces travaux ont été réalisés au sein de l'EA4483 (Impact de l'environnement chimique sur la santé humaine) dirigée par le Docteur Jean Marc Lo Guidice puis au sein de

l'UMR9020 CNRS - UMR1277 Inserm Canther (Hétérogénéité, Plasticité et Résistance aux Thérapies des Cancers) dirigée par le Docteur Isabelle Van Seuning.

Le manuscrit de cette thèse est organisé en deux grandes parties. La première partie présente une revue générale sur l'oncogenèse et le rôle joué par les miARN dans ce processus. La deuxième partie présente les principaux résultats de nos travaux.

Résumé

Les microARN (miARN) représentent une classe de petits ARN non codants régulateurs de l'expression génique. Ils sont impliqués dans de nombreuses fonctions cellulaires et moléculaires essentielles. De plus, leur dérégulation joue un rôle important dans le processus de tumorigenèse. En effet, certains miARN ont été décrits comme des oncogènes ou des gènes suppresseurs de tumeur. Ces travaux de thèse s'inscrivent dans ce contexte. Ainsi, une première étude a consisté à identifier les miARN exprimés de manière différentielle dans les cellules tubulaires rénales proximales en réponse à une exposition au cadmium, un composé environnemental présentant des propriétés carcinogènes. Cette étude permet de suggérer que certains de ces miARN pourraient présenter un intérêt en tant que biomarqueurs d'exposition au cadmium.

Dans une seconde étude, nous avons évalué les propriétés pro-tumorales de miR-92a-3p dans les cancers pulmonaires non à petites cellules. Nos données obtenues *in vitro* suggèrent que le ciblage de miR-92a-3p par des oligonucléotides antisens pourrait représenter une stratégie thérapeutique pertinente. Un modèle murin d'adénocarcinome pulmonaire (modèle CCSP-Cre-LSL-Kras^{G12D}) a été mis en place et permettra de tester l'effet pharmacologique de ce type d'inhibiteurs.

Au total, ces travaux soulignent l'importance des miARN en tant que biomarqueurs et cibles thérapeutiques dans le domaine du cancer.

Mots clés : cancer, microARN, oligonucléotides

Abstract

MicroRNAs (miRNAs) represent a class of small non-coding RNAs that regulate gene expression. They are involved in many essential cellular and molecular processes such as cell death or differentiation. In addition, their deregulation plays an important role in the tumorigenesis. Indeed, many miRNAs have been described as oncogenes or tumor suppressor genes. In this context, this thesis work focused on the potential role played by miRNAs in kidney and lung cancers. Indeed, a first part consisted in identifying miRNAs differentially expressed in proximal renal tubular cells in response to cadmium exposure, an environmental compound with carcinogenic properties. This data suggests that some of these miRNAs could be of interest as biomarkers of cadmium exposure.

In the second part of this thesis, we evaluated the tumorigenic properties of miR-92a-3p in non-small cell lung cancers. Our in vitro data suggests that targeting miR-92a-3p by antisense oligonucleotides could represent a relevant anticancer therapeutic strategy. Furthermore, a mouse model of pulmonary adenocarcinoma (CCSP-Cre-LSL-Kras^{G12D} model) has been developed to test the pharmacological effect of this therapeutic strategy.

Overall, this work highlights the importance of miRNAs as biomarkers and therapeutic targets in the field of cancer.

Keywords : cancer, microRNA, oligonucleotides

Remerciements

Tout d'abord, je remercie les docteurs Jean-Marc Lo Guidice et Isabelle Van Seuning, respectivement directeurs de l'EA4483 IMPECS (Impact de l'environnement chimique sur la santé humaine) et de l'UMR9020 CNRS - UMR1277 INSERM CANTHER (Hétérogénéité, Plasticité et Résistance aux Thérapies des Cancers) pour m'avoir permis d'évoluer au sein de leurs structures.

Je remercie le Professeur Corinne ABBADIE de m'avoir permise de faire partie de son équipe « Sénescence, fibrose et cancer ».

Je remercie les membres du jury d'avoir accepté d'examiner ce travail de thèse. Je remercie les Docteurs Bruno Cardinaud et Georges Vassaux qui ont accepté d'être mes rapporteurs.

Je remercie également les Docteurs Bruno Cardinaud et Bruno Lefebvre, qui ont suivi l'évolution de ce travail par l'intermédiaire du comité de suivi de thèse.

Je remercie mon directeur de thèse le Docteur Nicolas Pottier pour m'avoir permise de réaliser cette thèse.

Je tiens également à remercier l'ensemble des membres de l'EA4483 et de l'UMR9020 CNRS - UMR1277 INSERM CANTHER.

Je remercie ma famille et mes amis pour leur soutien.

Valorisations des travaux de thèse et travaux collaboratifs

Articles Scientifiques

2020

Lemaire, J. ; Larrue R. ; Perrais M. ; Cauffiez C. ; Pottier N. 2020. Aspects fondamentaux du développement tumoral. Bulletin du Cancer.
doi : 10.1016/j.bulcan.2020.08.004.

Lemaire, J. ; Van der Hauwaert, C. ; Savary, G. ; Dewaeles, E. ; Perrais, M. ; Lo Guidice, J.M. ; *et al.* 2020. Cadmium-Induced Renal Cell Toxicity Is Associated With MicroRNA Deregulation. International Journal of Toxicology : 109158181989903.
doi : 10.1177/1091581819899039.

2019

Savary, G. ; Dewaeles, E. ; Diazi, S. ; Buscot, M. ; Nottet, N. ; Fassy, J. ; Courcot E., Henaoui I. S., **Lemaire J.** *et al.* 2019. The Long Non-Coding RNA DNM3OS is a Reservoir of FibromiRs with Major Functions in Lung Fibroblast Response to TGF- β and Pulmonary Fibrose. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine.
doi : 10.1164/rccm.201807-1237OC

Communications affichées

2019

Lemaire, J. ; Van der Hauwaert, C. ; Savary, G. ; Dewaeles, E. ; De Sousa C. ; Cauffiez C. ; Pottier N. Role and Therapeutic Potential of MIR17HG in pulmonary carcinogenesis. JDD, (journée des doctorants) CANTHER, Mars, 2019.

2018

Cauffiez C. ; Savary, G. ; Dewaeles, E. ; **Lemaire, J.** ; Glowacki F. ; Pottier N. DNM3OS non coding RNA as a new therapeutic target in the context of renal fibrose. ASN Kidney Week, San Diego, CA, Octobre, 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, Mai, 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, Février, 2018.

Sommaire

PREAMBULE	1
RESUME	3
ABSTRACT	4
REMERCIEMENTS	5
VALORISATIONS DES TRAVAUX DE THESE ET TRAVAUX COLLABORATIFS	6
SOMMAIRE	8
ABBREVIATIONS	12
INTRODUCTION	16
A. GENERALITES SUR LE PROCESSUS DE CANCEROGENESE	16
B. MICROARN	17
<i>Généralités.....</i>	17
<i>Biogenèse des miARN</i>	17
<i>Mécanisme d'action des miARN</i>	20
<i>Fonctions biologiques</i>	21
C. IMPLICATION DES MIARN DANS LE PROCESSUS DE CANCEROGENESE	23
OBJECTIFS DE LA THESE	37
TRAVAUX	38
A. AXE 1 : DEREGULATION DES MIARN INDUITE PAR L'EXPOSITION AU CADMIUM ET CANCEROGENESE RENALE.....	39
<i>Généralités.....</i>	39
a) Présentation du cadmium.....	39
b) Sources d'exposition au cadmium	39
c) Toxicocinétique du cadmium	40
d) Effets cancérogènes du Cd	40
<i>Objectifs.....</i>	43

<i>Matériel et méthodes</i>	43
a) Culture cellulaire	43
b) Exposition au cadmium	44
c) Extraction des ARN	44
d) Profilage des miARN modulés par le cadmium	44
e) Analyse des voies de signalisation	46
f) RT-PCR	46
g) Western Blot	47
h) Analyses statistiques	48
<i>Résultats</i>	48
a) Cytotoxicité du Cd	48
b) Modulation de l'expression des miARN par le Cd dans les cellules RPTEC/hTERT	50
c) Validation de la modulation des miARN induite par le Cd dans la lignée cellulaire HK-2	52
d) Voies de signalisation modulées par les miARN dérégulés par le Cd	55
<i>Discussion</i>	65
B. AXE 2 : ROLE ET POTENTIEL THERAPEUTIQUE DE L'ARN NON CODANT POLYCISTRONIQUE MIR17HG DANS LES CPNPC ..	69
<i>Cancer du poumon</i>	69
a) Epidémiologie	69
b) Classification anatomo-pathologique	69
c) Altérations moléculaires des CPNPC	70
d) Stades du CPNPC	72
e) Stratégies thérapeutiques	73
<i>Cisplatine</i>	75
a) Historique	75
b) Mode d'action du cisplatine	75
c) Anomalies de réponse au cisplatine	76
<i>MIR17HG et cancer</i>	77
<i>Objectifs</i>	80
<i>Matériel et Méthodes</i>	80
a) Culture cellulaire	80
b) Criblage fonctionnel	80

c)	Transfection	83
d)	Exposition au cisplatine.....	84
e)	Modèle murin d'adénocarcinome pulmonaire CCSP-Cre-LSL-Kras ^{G12D}	84
f)	Extraction des ARN.....	85
g)	Expression des miARN matures	85
h)	Expression des ARNm	86
i)	Extraction protéique et Western Blot	87
j)	Immunofluorescence	88
k)	Test de clonogénicité	89
l)	RNA FISH	89
m)	Test de prolifération	90
n)	Histologie	90
o)	Immunohistochimie	90
p)	Analyses statistiques.....	91
<i>Résultats</i>		91
a)	Identification de microARN associés à la réponse des cellules pulmonaires tumorales au cisplatine	91
b)	Effets pro-tumoraux de miR-92a-3p	92
c)	Expression de miR-92a-3p dans le modèle murin CCSP-Cre-LSL-Kras ^{G12D}	96
d)	Identification d'oligonucléotides antisens permettant l'inhibition de MIR17HG	98
e)	Effet des oligonucléotides de type GapmeR sur BIM et l'apoptose	102
<i>Discussion</i>		102
DISCUSSION GENERALE		106
A.	LES MIARN, DES NOUVEAUX BIOMARQUEURS.	106
B.	LES MIARN, DE NOUVELLES CIBLES THERAPEUTIQUES.....	107
CONCLUSION ET PERSPECTIVES		110
FIGURES		112
TABLEAUX		114
RÉFÉRENCES		115
ANNEXES		155

A.	ANNEXE 1	156
B.	ANNEXE 2	178

Abbreviations

ADNc : acide désoxyribonucléique complémentaire

AGO : argonaute

ALK : anaplastic lymphoma receptor tyrosine kinase

AMM : autorisation de mise sur le marché

ARNm : acide ribonucléique messenger

APAF-1 : apoptotic peptidase activating factor 1

ASO : antisens oligonucleotide

ATCC : american type culture collection

ATP : adénosine triphosphate

ATP7B : ATPase copper transporting beta

BCA : bicinchoninic acid assay

BCL-2 : b-cell lymphoma 2

BER : réparation par excision de base

BSA : bovin serum albumin

CCSP : clara cell specific promoter

Cd : cadmium

CdCl₂ : chlorure de cd

CDDP : cisplatine ou *cis* – diamine – dichloro – platine

CEEA : comité d'éthique en expérimentation animale

CPNPC : cancer du poumon non à petites cellules

CPPC : cancer du poumon à petites cellules

Crt : relative threshold cycle

CTR1 : copper uptake protein 1

DAB : di-amino benzidine

DAPI : 4',6-diamidino-2-phenylindole

DDR2 : discoidin domain-containing receptor 2

DGCR8 : digeorge syndrome critical region gene 8

DIANA : DNA intelligent analysis

DMEM-F12 : dulbecco's modified eagle medium: nutrient mixture f-12

EGFR : epidermal growth factor receptor

FDA : food and drug administration

FDR : false discovery rate

FPG : formamidopyrimidine dna glycosylase

Gp : GapmeR

GRB2 : growth factor receptor-bound protein 2

H₂O₂ : peroxyde d'hydrogène

HER2 : erb-b2 receptor tyrosine kinase 2

HK-2 : human kidney-2

HMDD : human microrna disease database

HO-1 : heme oxygenase-1

HSP-60 : heat shock protein-60

i.p. : intrapéritonéale

IC20 : concentration estimée requise pour inhiber la croissance cellulaire de 20%

IF4F : Initiation factor 4F

IL-6 : interleukine-6

JDD : journée des doctorants

KRAS : Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog

KEGG : Kyoto encyclopedia of genes and genomes

K-SFM : keratinocyte-serum free medium

LLC : leucémie lymphoïde chronique

LNA : locked nucleic acid

MAPK : mitogen-activated protein kinases

miARN : microARN

miRNA : microRNA

MMR : réparation des mésappariements

MRP2 : multidrug resistance-associated protein 2

NER : réparation par excision de nucléotides

NGAL : neutrophil gelatinase-associated lipocalin

NRF2 : nuclear factor erythroid-2-related factor 2

p : valeur- p

PABPC : poly(A) binding protein cytoplasmic

PARP-1 : poly (ADP-ribose) polymerase 1

PBS : solution saline de phosphate tamponnée

PD-1 : programmed cell death 1

PD-L1 : programmed death-ligand 1

PI3K-Akt : phosphoinositide 3-kinase-protein kinase b

PI3KCA : phosphatidylinositol-4, 5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha kinase

PPIA : cyclophilin a, peptidylprolyl isomerase A

PTEN : phosphatase and tensin homolog

Rap1 : ras-proximate-1

RIPA : radioimmunoprecipitation assay

RISC : RNA-induced silencing complex

RPTEC/hTERT : renal proximal tubular epithelial cell / human telomerase reverse transcriptase

SDS-polyacrylamide : sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide

SEM : standard error of the mean

snRNA U6 : small nuclear RNA U6

SOS : son of sevenless

SVF : sérum de veau fœtal

TER : élément de réponse au tamoxifène

TMX : tamoxifène

TRBP : transactivation response element rna-binding protein

UTR : untranslated region

VEGF : vascular endothelial growth factor

XPA : xeroderma pigmentosum group a

Introduction

A. Généralités sur le processus de cancérogenèse

A l'heure actuelle, le développement tumoral apparaît comme un processus bien plus complexe qu'anticipé ces dernières décennies. Par exemple, les études récentes réalisées à grande échelle ont permis de montrer que le nombre des altérations moléculaires du génome tumoral est largement plus élevé qu'attendu. De plus, il est désormais bien établi que les mécanismes à l'origine du développement tumoral ne se limitent pas à ces seules anomalies génomiques et font intervenir de nombreux autres acteurs cellulaires et moléculaires distincts, tels que le microenvironnement tumoral.

L'ensemble des mécanismes participant au processus d'oncogenèse est présenté sous forme d'une revue didactique permettant d'obtenir une vision globale du développement tumoral (**Annexe 1**, page 156).

B. microARN

Généralités

Les microARN (miARN) représentent une classe d'acides ribonucléiques (ARN) non codants simple brin, d'une vingtaine de nucléotides, qui agissent en temps que régulateurs négatifs de l'expression des gènes ¹. Actuellement, plus de 2700 miARN ont été décrits chez l'homme (miRbase version v22.1). Le premier d'entre eux, *lin-4*, identifié en 1993 chez un invertébré, *Caenorhabditis elegans*, un ver de la famille des nématodes, est un miARN impliqué dans son développement ². Les recherches sur le nématode permettront par la suite la découverte d'un deuxième miARN, *let-7*, dont la séquence est conservée dans la plupart des espèces animales, dont l'homme, démontrant ainsi son importance biologique tout au long de l'évolution ^{3,4}. Ces premières études ont permis de suggérer le rôle essentiel des miARN. De plus, plusieurs études de perte de fonction de certains miARN, réalisées dans des modèles murins, ont permis de mettre en évidence leur importance dans le développement de nombreux organes ou dans l'hématopoïèse ⁵. Ils sont également impliqués dans de nombreux autres processus biologiques tels que la différenciation cellulaire ⁵.

Biogenèse des miARN

La localisation génomique des miARN est très variable (**Figure 1, 1**). Certains gènes de miARN se situent dans des régions intergéniques et possèdent leur propre unité transcriptionnelle ^{6,7}. C'est le cas de miR-21, qui possède son propre promoteur ⁸. Les gènes d'autres miARN, nommés « miRtron », sont situés dans les introns de gènes codant pour des protéines. Dans ce cas, leur transcription est soit sous la dépendance de l'activation de la transcription de leur gène hôte, soit sous le contrôle d'un promoteur spécifique ^{6,7}. Certains miARN peuvent aussi

être organisés en cluster et partagent ainsi un même transcrit primaire dit polycistronique ⁹⁻¹¹.

La transcription est généralement réalisée par l'ARN polymérase II chez les animaux ⁵. Cette étape permet d'obtenir un premier type de précurseur de miARN, le pri-miARN (**Figure 1, 2**) qui possède une structure en épingle à cheveux ou tige boucle présentant quelques mésappariements, une coiffe methyl-7-guanine à l'extrémité 5' ainsi qu'une queue polyadénylée en 3'.

Le pri-miARN est ensuite clivé par un complexe enzymatique hétéromérique, appelé microprocesseur et composé de DROSHA, une endonucléase de type III et de son partenaire protéique DiGeorge syndrome critical region gene 8 (DGCR8), une protéine de liaison à l'ARN ^{5,12}. La molécule d'une soixantaine de nucléotides libérée, nommée pré-miARN, possède un groupement phosphate 5' et deux nucléotides flottants en 3' ⁵. Le pré-miARN est alors exporté dans le cytoplasme grâce à l'exportine 5, un transporteur de la famille des Ran GTPase (**Figure 1, 3**) ^{5,13}. L'étape finale de maturation des miARN consiste en un nouveau clivage du pré-miARN réalisé par Dicer, une endonucléase possédant deux domaines RNase II. Avec son partenaire TRBP (Transactivation response element RNA-binding protein), Dicer hydrolyse les deux brins à proximité de la boucle, et libère un duplex d'une vingtaine de nucléotides comprenant le miARN mature (ou brin guide) et le brin antisens (**Figure 1, 4**). Le chargement du miARN mature dans le complexe RISC (RNA induced silencing complex) finalise le processus de maturation (**Figure 1, 5**) ⁵.

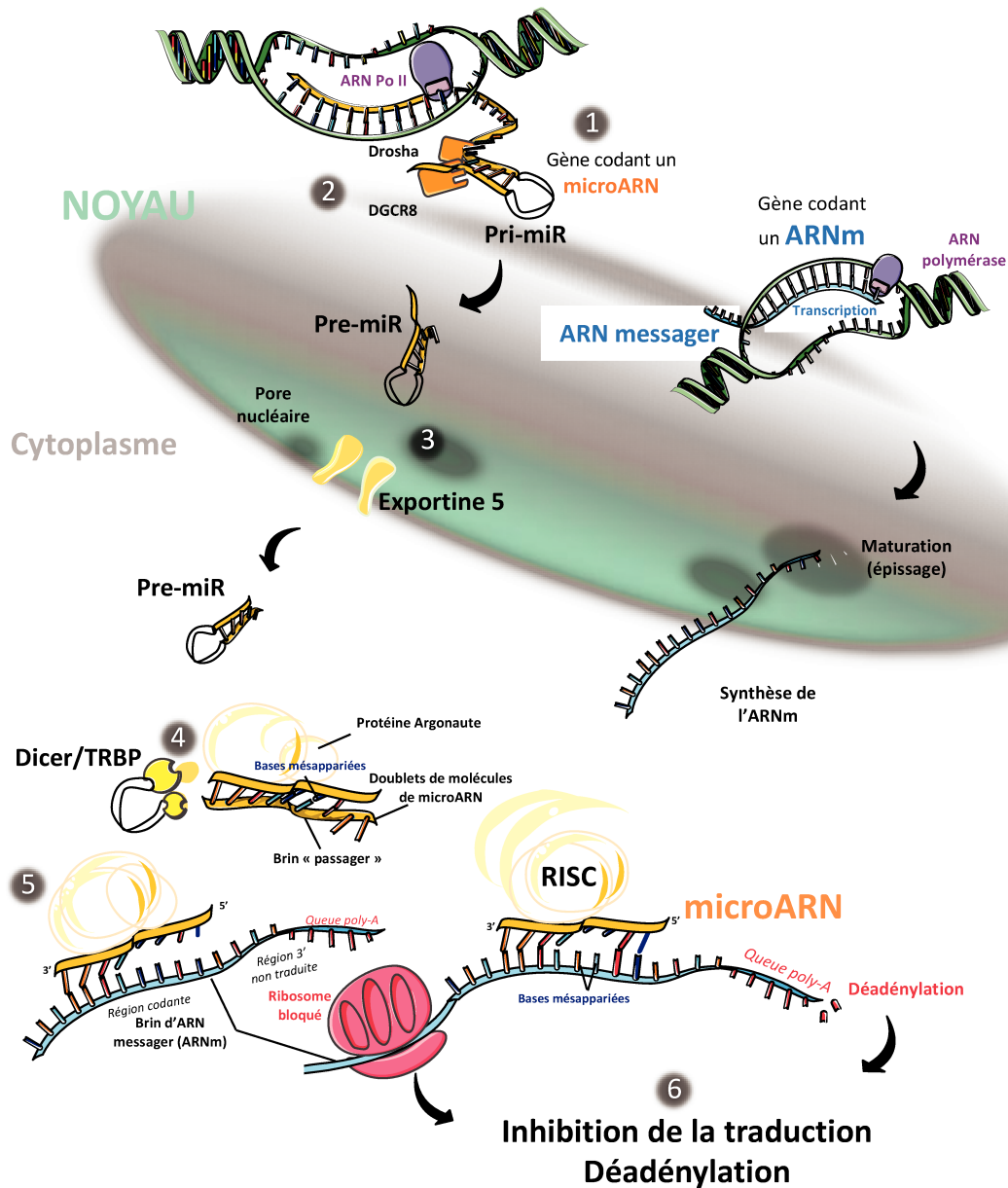


Figure 1 : Biogenèse et fonctions des microARN chez les Métazoaires.

D'après Bartel (2018) ⁵.

Étapes nucléaires de la maturation : **1.** Transcription d'un gène codant pour un microARN. **2.** Synthèse du transcrit primaire (pri-miARN) par l'ARN polymérase II, libération du pré-miARN par le complexe Drosha/DGCR8 à partir du pri-miARN. **3.** Export cytoplasmique du pré-miARN par l'exportine 5.

Étapes cytoplasmiques de la maturation : **4.** Prise en charge du pré-miARN par le complexe Dicer/TRBP. **5.** Libération du miARN mature et intégration dans le complexe protéique RISC (RNA Induced Silencing Complex). **6.** Inhibition de la traduction ou dégradation de l'ARNm cible du microARN.

Cette succession d'étapes décrit la voie canonique de maturation des miARN. D'autres voies « non canoniques », dans lesquelles les nucléases Drosha et Dicer ne sont pas nécessaires, ont également été décrites ⁵.

Mécanisme d'action des miARN

Les miARN possèdent dans leur région 5' une séquence de reconnaissance minimale d'environ 6 pb (nucléotides 2 à 7), appelée séquence « seed », complémentaire de la région 3'UTR (untranslated region) des ARNm qu'ils ciblent ¹⁴. Dans certains cas, la région en 3' du miARN peut participer à la fixation du miARN sur son gène cible, notamment en cas de mésappariements présents dans la séquence « seed » ¹⁵. Chez les végétaux, l'appariement parfait du miARN avec l'ARNm cible induit la dégradation de l'ARNm grâce à l'activité endonucléasique de AGO2 (argonaute) ¹⁶. Chez les animaux, il s'agit plutôt d'un appariement imparfait ¹⁷. Dans ce cas, l'interaction des protéines AGO avec GW182 permet le recrutement de protéines dont celles de la famille EIF4 associé à l'ablation de la coiffe 5' ainsi que le recrutement du complexe PABPC (PolyA binding protein cytoplasmic) associé à la déadénylation ¹⁸. L'ensemble de ces processus participe ainsi à l'inhibition de la traduction de l'ARNm (**Figure 2**) ¹⁸.

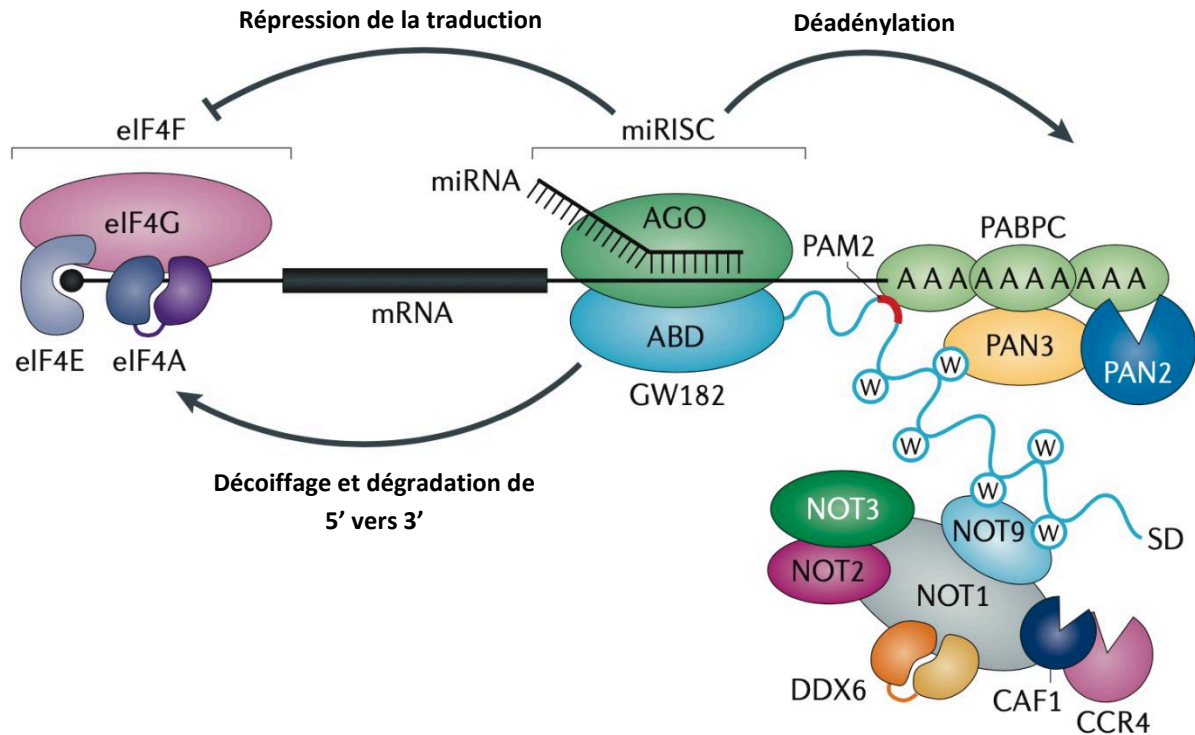


Figure 2 : Mécanismes de répression de la traduction induit par un miARN chez l'animal.

D'après Jonas et Izaurralde, 2015 ¹⁸.

La liaison du microARN à la protéine AGO dans le complexe RISC permet la reconnaissance de l'ARNm cible. La protéine GW182, recrutée par AGO, permet le recrutement de protéines impliquées dans l'inhibition de la traduction (inhibition du complexe IF4F (Initiation Factor 4F), le processus de désadénylation, le décoiffage et la dégradation de l'ARNm dans le sens 5'-3'.

Etant donné qu'un miARN peut cibler un ARNm malgré une complémentarité imparfaite, chaque miARN est capable en théorie de réguler plusieurs centaines de gènes. Des logiciels de prédiction de cibles, tels que TargetScan ou encore MiRanda, montrent par exemple qu'un même miARN peut cibler jusqu'à 400 gènes ^{19,20}.

Fonctions biologiques

De nombreuses études fonctionnelles ont permis d'élucider le rôle des miARN. La délétion d'un miARN entraîne des phénotypes variables à l'échelle d'un organisme ²¹. Cependant, le développement des connaissances actuelles a permis de définir trois modes d'action principaux des miARN en fonction du contexte cellulaire (**Figure 3**) ²² :

- (i) Boucle d'anticipation (**Figure 3, A**), dans laquelle le miARN régule la même cible que son inducteur. Dans ce cas, le miARN renforce l'action de l'inducteur du gène ou stabilise le processus biologique ;
- (ii) Boucle de régulation négative (**Figure 3, B**), dans laquelle le miARN régule négativement son inducteur. Ce système permet de maintenir l'homéostasie cellulaire ;
- (iii) Boucle de rétrocontrôle positive (**Figure 3, C**), dans laquelle, le miARN régule positivement son inducteur.

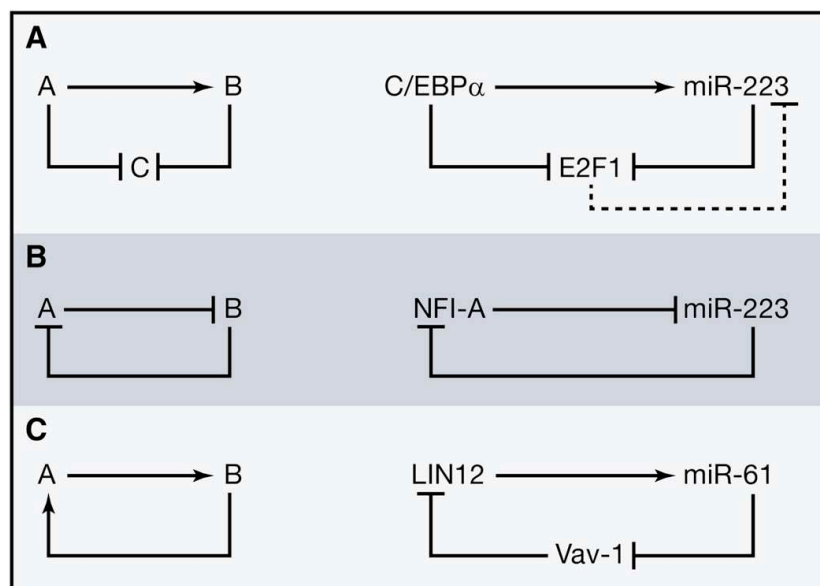


Figure 3 : Modes d'action principaux des microARN.

D'après Ebert (2012) ²².

A. Boucle d'anticipation : cas de miR-223, inhibition directe et indirecte de E2F1 dans la régulation du cycle cellulaire impliqué dans la granulopoïèse. **B.** Boucle de régulation négative : cas de miR-223 dans le contexte du maintien de l'équilibre entre précurseurs myéoïdes et granulocytes par inhibition réciproque avec NFI-A. **C.** Boucle de régulation positive : cas de miR-61 dans la différenciation des cellules vulvaires chez le nématode par ciblage de LIN12.

Au total, les miARN représentent une classe de petits ARN non codants endogènes qui régulent négativement l'expression génique. Ils participent ainsi à la régulation de nombreux

processus cellulaires ¹. De plus, leur dérégulation est associée à de nombreuses pathologies dont certains troubles neurologiques, inflammatoires, cardiovasculaires ou métaboliques, et également dans le cancer ^{23,24}.

Les miARN impliqués dans ces différentes pathologies sont répertoriés dans la base de données Human MicroRNA Disease Database (HMDD, <http://www.cuilab.cn/hmdd>).

C. Implication des miARN dans le processus de cancérogenèse

La découverte des miARN et de leur mode d'action a révolutionné l'étude des mécanismes physiopathologiques de la plupart des maladies complexes, en particulier les pathologies cancéreuses ²³. En effet, jusqu'à récemment, la majorité des études considérait les gènes codant pour les protéines comme étant les seuls acteurs du processus de cancérogenèse ^{25,26}. Depuis, les miARN se sont avérés être des effecteurs majeurs du développement tumoral et de très nombreuses études ont mis en évidence un lien causal entre l'expression aberrante de certains miARN et l'initiation et la progression de plusieurs cancers ²⁷.

Les études de cartographie des tumeurs montrent que de nombreux gènes de miARN sont localisés dans des régions du génome fréquemment délétées ou amplifiées²⁸, bien que leur expression soit le plus souvent globalement réprimée dans les tissus cancéreux²⁹. Les premières études visant à démontrer le rôle pro-tumoral des miARN se sont d'abord focalisées sur les propriétés intrinsèques des cellules tumorales, en particulier leur résistance à l'apoptose (**Figure 4**), leur capacité à proliférer ainsi que leur aptitude à métastaser ³⁰.

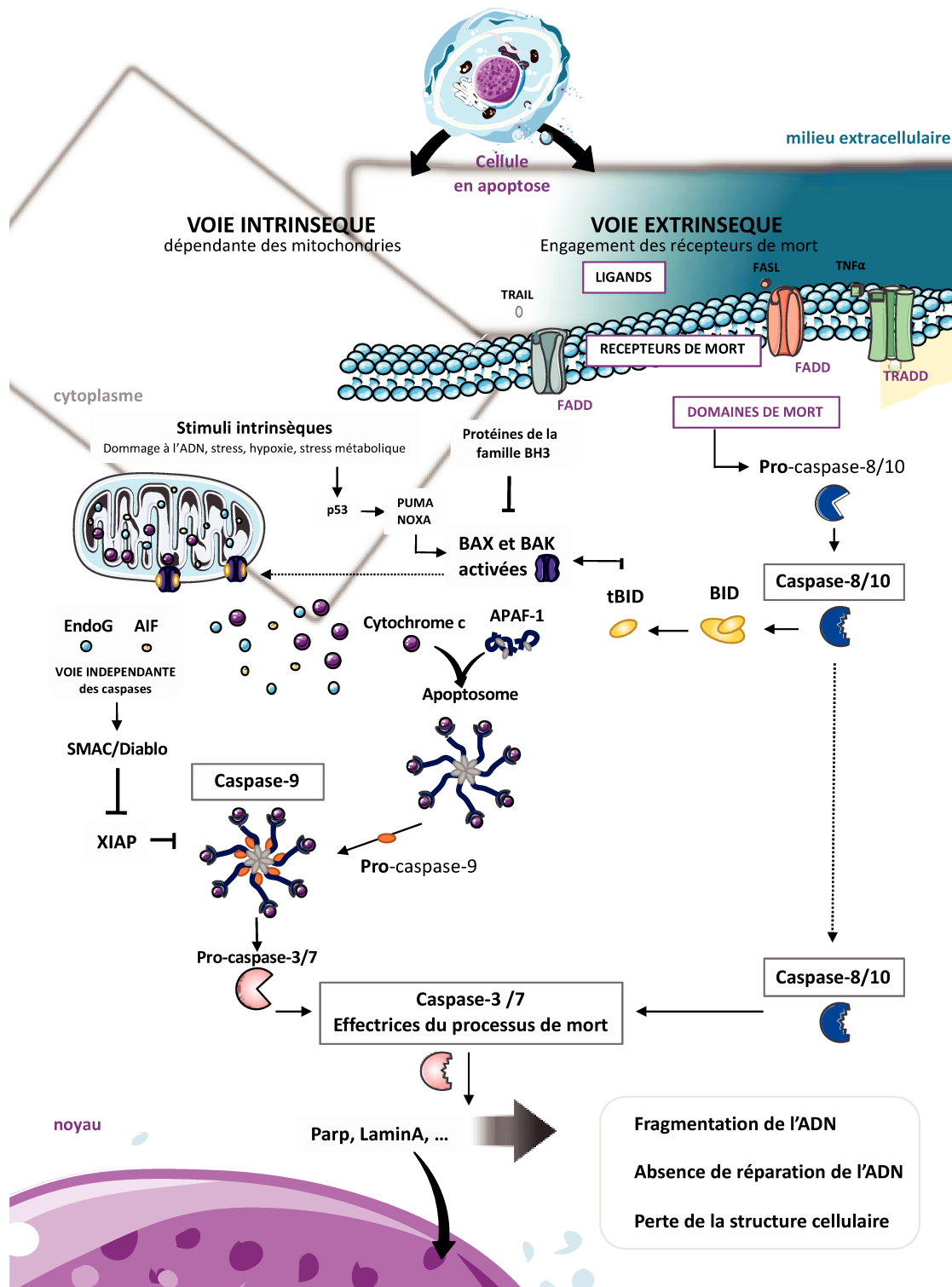


Figure 4 : Apoptose, voies intrinsèque et extrinsèque.

Lorsque la cellule reçoit un signal pro-apoptotique notamment suite à des lésions de la molécule d'ADN, des protéines pro-apoptotiques comme BIM sont activées et déclenchent une cascade d'évènements intracellulaires : les protéines BAX et BAK forment un pore au niveau de la membrane mitochondriale. Cela permet le relargage cytosolique du cytochrome c. Ce dernier forme, avec APAF-1, l'apoptosome, un complexe apoptotique permettant l'activation de la caspase 9 qui, une fois clivée, active à son tour la caspase 3, la caspase

effectrice du processus apoptotique. Cette dernière induit la mort de la cellule par différents mécanismes complémentaires.

En effet, la première démonstration d'un lien causal entre l'expression aberrante d'un miARN et le processus de tumorigenèse chez l'homme porte sur la régulation du gène anti-apoptotique *BCL2* dans les leucémies lymphoïdes chroniques (LLC)^{31,32}. Les auteurs ont notamment mis en évidence que la majorité des LLC présente un défaut d'expression de deux miARN, miR-15a et miR-16-1, qui est responsable de la surexpression de *BCL2*. Ainsi, ces miARN pro-apoptotiques jouent un rôle onco-suppresseur majeur dans cette pathologie *via* le ciblage du transcrit *BCL2*, un inhibiteur majeur du stress apoptotique. Par la suite, de très nombreuses études ont démontré que les miARN régulent l'ensemble des phénomènes biologiques (**Figure 5**)³³ impliqués dans le développement tumoral tels que l'angiogenèse (**Annexe 1**, figure 4, page 175) ou la sénescence (**Figure 6**)³⁴.

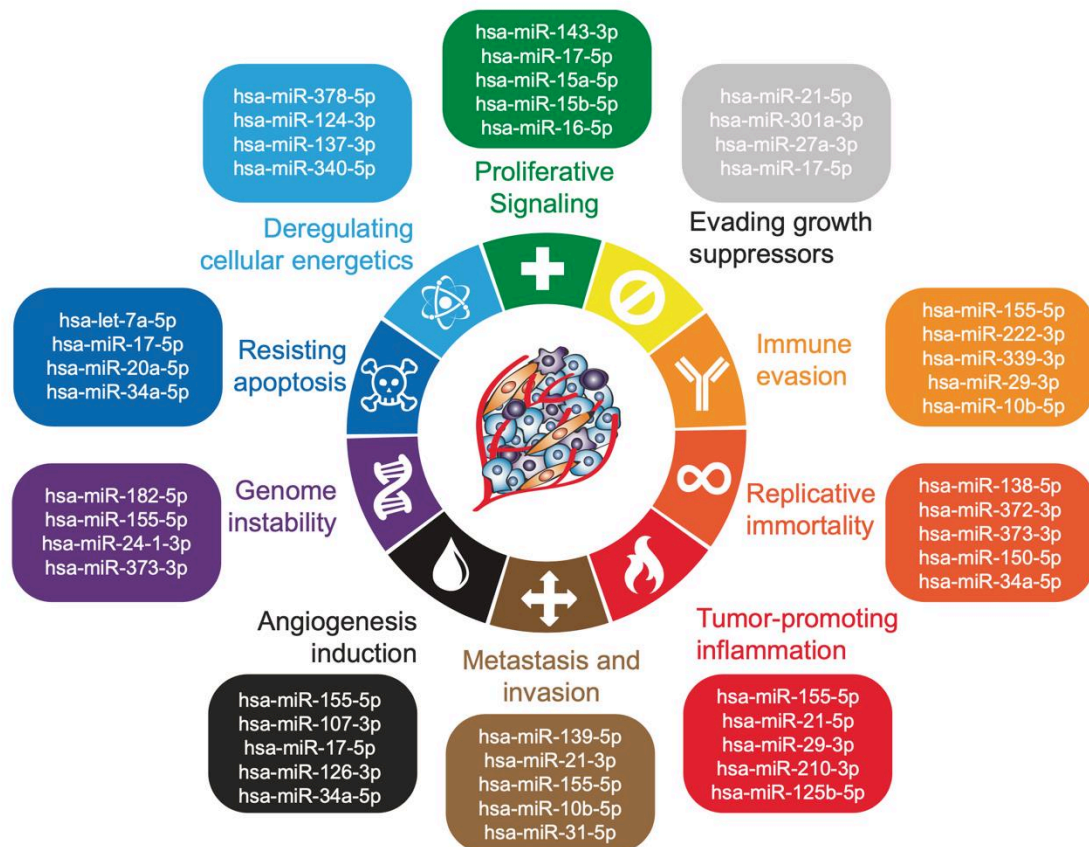


Figure 5 : MicroARN impliqués dans les principales caractéristiques des cellules cancéreuses. D'après Krishnan (2017) ³³.

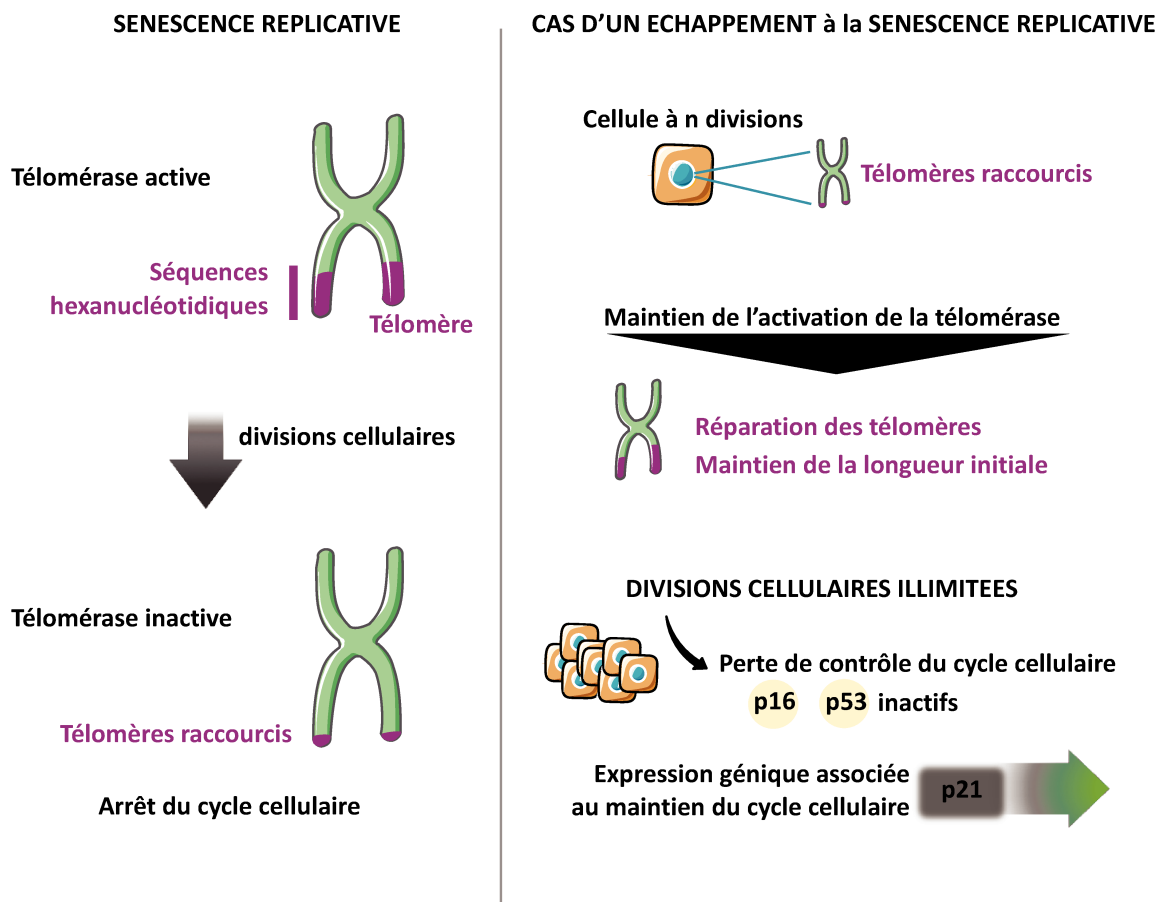


Figure 6 : Immortalité réplivative.

Dans le cas normal, la téломérase permet le maintien de la longueur des téломères. Au fil des divisions cellulaires, la téломérase perd cette capacité. Les cellules ne peuvent plus se diviser, elles deviennent sénescentes. Dans certains cas, la téломérase reste active, les téломères sont renouvelés. Les cellules se divisent de façon illimitée.

Comme l'indique le **Tableau 1**, des propriétés oncogéniques ont pu ainsi être attribuées à plusieurs miARN surexprimés dans les tumeurs tels que miR-21-5p et les miARN du polycistron miR-17~92 à travers par exemple la régulation du gène *PTEN* (Phosphatase and TENSin homolog). A l'inverse, un rôle de suppresseur de tumeur a pu être démontré pour d'autres miARN tels que ceux appartenant à la famille let-7 qui régulent certains oncogènes tels que *RAS* (**Tableau 2**)³⁵.

Tableau 1 : Liste des microARN présentant des propriétés oncogéniques.

microARN	Chromosome	Tumeur/lignée cellulaire	Cible	Phénotype	Références
miR-17/92	13q23.1	Colon	TSP-1, CTGF	Transformation des colonocytes	36
		Cancer de la prostate, Lymphome de Burkitt	E2F2, E2F3	Régulation de la prolifération cellulaire	37,38
		Lymphome Myc-induit	BIM, PTEN	Régulation de l'apoptose	39
		Cancer du poumon	HIF1 α	Régulation de l'hypoxie	40
		Lignées cellulaires tumorales cervicales	PTPRO	Régulation de la prolifération cellulaire	41
		Cellules myéloïdes	p63	Régulation de la prolifération cellulaire	42
		Leucémie lymphoïde aigue à cellules T	BIM, PTEN, PRKAA1, PPP2R5e	Régulation de l'apoptose	43
		Cellules endothéliales	JAK1	Régulation de l'angiogenèse	44
		Cancer du sein	HBP1	Régulation de l'invasion tumorale	45
		Fibroblaste sénescence Ras-induit	p21WAF1	Régulation de la sénescence	46
		Glioblastome	TGF- β II, SMAD4	Régulation de l'angiogenèse et de la prolifération	47
		Cancer de la prostate	MnSOD, GPX2, TRXR2	Régulation du stress oxydant	48

miR-222/221	Xp11.3	Glioblastome et cancer de la thyroïde et des testicules	p27Kip1	Régulation de la prolifération cellulaire	49–51
		Fibroblastes normaux	p57Kip2	Régulation de la prolifération cellulaire	52
		Cancer du poumon non à petits cellules et cancer hépatocellulaire	PTEN, TIMP3	Régulation de la prolifération et de l'invasion tumorale	53
		Cancer du sein	FOXO3A	Régulation de la prolifération cellulaire	54
		Cellules endothéliales	KIT	Régulation de l'angiogenèse	55
		Cancer du sein	ESR1	Régulation de la signalisation associée à ER α	56
		Glioblastome	PUMA	Régulation de l'apoptose	57
		Cancer du sein	TRSP1	Régulation de la transition épithéliale-mésenchymateuse	58
		Glioblastome	PTP μ	Effets protumoraux	59
		Cancer du sein	DICER	Régulation de l'expression des miARN	56
		Cancer du poumon non à petites cellules	APAF1	Régulation de l'apoptose	60
miR-21	17q23.1	Cholangiocarcinome	PTEN	Régulation de l'apoptose	61
		Cancer du sein	TPM1	Régulation de la croissance tumorale	62
			PDCD4	Régulation de l'apoptose	63
		—	SPRY1	Régulation de la tumorigenèse	64

miR-155	21q21.3	Glioblastome	RECK, TIMP3	Régulation de la tumorigenèse	65
			p63, JMY, TOPORS, TP53BP2, DAXX, HNRPK, TGF-BRII	Régulation de l'apoptose	66
		Cancer de la prostate	MARKS	Régulation de l'apoptose	67
			ANP32A, SMARCA4	—	68
	21q21.3	Cancer du sein	SOCS1	Régulation de l'inflammation	69
		Leucémie myéloïde aigue	CEBPB, PU.1, CUTL1, PICALM	Régulation de l'inflammation	70
		—	BACH1, ZIC3	Régulation de la signalisation médiée par le virus d'Epstein-Barr (EBV)	71
		Cellules CD34+ sanguines et médullaires	ETS1, MEIS1	Régulation de la prolifération et de la différenciation mégacaryocytaires	72
		Lymphocytes	C-MAF	Régulation de la réponse immunitaire	73
		Lymphome diffus à grandes cellules B	HGAL	Régulation de la dissémination cellulaire	74
		Carcinome nasopharyngé	JMJD1A	Régulation de l'inflammation	75
		Cancer du sein	WEE1		76

				Régulation de la réponse aux dommages à l'ADN	
		Cancer pancréatique	TP53INP1	—	77
		—	SMAD1, SMAD5, HIVEP2, CEBPB, RUNX2, MYO10	Régulation de la signalisation médiée par BMP	78
		Cancer du sein	FOXO3A	Régulation de la survie cellulaire	79
		Cancer du côlon	hMSH2, hMSH6, hMLH1	Régulation de la réponse aux dommages à l'ADN	80
		Lymphome à grandes cellules B	SMAD5	—	81

Tableau 2 : Liste des microARN présentant des propriétés de suppresseur de tumeur.

microRNA	Chromosome	Tumeur/lignée cellulaire	Cible	Remarques	Références
miR-15/16	13q14.2, 3q25.33	Leucémie lymphoïde chronique	BCL2	Régulation de l'apoptose	82
		Cancer du colon	COX-2	Régulation des éicosanoïdes	83
		Lymphome folliculaire	CHK1	Régulation de la prolifération	84
		Fibroblaste	CCNE1, CDC-25a	Régulation de la prolifération	85
		Fibroblaste	VEGF, VEGFR2, FGFR1	Régulation de l'angiogenèse	86
		Fibroblastes associés au cancer	FGF2, FGFR1	Régulation de la croissance tumorale	87
		—	CCNE1	Régulation de la prolifération	88
		Myélome multiple	FGFR1, PI3KCA, MDM4, VEGFa	Régulation de la croissance tumorale	89
		Cancer du sein	WIP1	Régulation de la réponse aux dommages à l'ADN	90
		Cancer ovarien	BMI-1	Régulation de la prolifération	91

		Lung cancer	CCND1, CCND2, CCNE1	Régulation de la prolifération	92
miR-34	1p36.22, 11q23.1	Cancer du colon	SIRT1	Régulation de l'apoptose	93
		Cancer gastrique	BCL2, NOTCH, HMGA2	Régulation de l'apoptose	94
		Fibroblaste	MYC	Régulation de la prolifération	95
		Cancer du poumon	AXL	Régulation de la voie de signalisation du récepteur AXL	96
		Cancer ovarien	MET	Régulation de la voie de signalisation induite par MET	97
		Fibroblaste embryonique	NANOG, SOX2, MYCN	Régulation de la différenciation	98
		Colon cancer	SNAIL1	Régulation de la transition épithéliale-mésenchymateuse	99
let-7 (famille)	9q22.32, Xp11.22, 22q13.31, 21q21.1, 19q13.41, 11q24.1,	Cancer du poumon	KRAS	Régulation de la voie de signalisation induite par KRAS	100
		—	HMGA2	Régulation de la prolifération	101
		Lymphome de Burkitt	MYC	Régulation de la lymphomagenèse	102

	3q21.1, 12q14.1	—	IMP-1	Contrôle de protéines oncofœtales	103
		—	DICER	Régulation de l'expression des miARN	104
		Fibroblaste	CDC-34	Régulation de la prolifération	105
		Cancer du sein	IL-6	Régulation de l'inflammation	106
		Cancer de la prostate	E2F2, CCND2	Régulation de la prolifération	107
		Cancer du foie	BCL-XL	Régulation de l'apoptose	108
miR-200 (famille)	1p36.33, 12p13.31	Cancer du sein	ZEB1, ZEB2	Régulation de la transition épithéliale-mésenchymateuse	109
		Cancer des reins	ERRFI-1	Régulation de l'apoptose	110
		Carcinome nasopharyngé	ZEB1, CTNNB1	Régulation de la croissance, la migration et l'invasion	111
		Cancer pancréatique	BMI-1	Régulation de la transition épithéliale-mésenchymateuse	112
		Cancer du sein	PLCy1	Régulation de la prolifération et de l'invasion	113
		—	FAP1	Régulation de l'apoptose	114

		Cancer du sein	SUZ12	Régulation de la croissance tumorale et de l'invasion	115
		Cancer du poumon	FLT1, VEGFR1	Régulation du processus métastatique	116
		—	JAG1, MALM2, MALM3	Régulation de la signalisation NOTCH	117
		Cancer du sein et endométrial	FN1, LEPR, NTRK2, ARHGAP19	Régulation de la motilité cellulaire	118
		Cancer ovarien	p38 α	Régulation de la croissance tumorale	119

Par ailleurs, certains miARN surexprimés tels que miR-10b, miR-373 et miR-21 ou sous-exprimés tels que let-7, miR-335 et miR-126 de manière récurrente dans les tumeurs ont été associés au phénotype métastatique ¹²⁰. Enfin, la dysrégulation des miARN semble être un évènement précoce puisque, par exemple, Varnholt *et al.* ont montré que des altérations de l'expression des miARN dans les carcinomes hépatocellulaires pouvaient déjà être mises en évidence dans les nodules cirrhotiques dysplasiques prénéoplasiques ¹²¹. Ainsi, l'expression aberrante des miARN joue un rôle oncogénique fondamental dans l'initiation tumorale et sa progression (**Figure 5**) ¹²².

Objectifs de la thèse

Cette thèse s'inscrit dans le contexte général du rôle des miARN en oncogénèse et s'articule sur deux projets.

Le premier projet cherche à identifier les miARN exprimés de manière différentielle dans les cellules tubulaires rénales proximales en réponse à une exposition au cadmium, un composé environnemental présentant des propriétés carcinogènes. Pour établir une liste des miARN modulés lors de l'exposition au cadmium, deux modèles cellulaires ont été utilisés : les cellules rénales épithéliales tubulaires proximales RPTEC/hTERT (Renal Proximal Tubular Epithelial Cell / human Telomerase Reverse Transcriptase) et les cellules rénales épithéliales HK-2 (Human Kidney-2).

Le deuxième projet s'intéresse au développement d'un inhibiteur à visée thérapeutique dirigé contre MiR17HG ou l'un de ses miARN associés pour améliorer la prise en charge du cancer du poumon non à petites cellules (CPNPC) en complément du traitement de référence à base de cisplatine. La stratégie se base sur l'utilisation d'oligonucléotides antisens (ASO). Une lignée cellulaire d'adénocarcinome pulmonaire A549 mutée KRAS est utilisée comme modèle d'étude *in vitro*. Un modèle murin d'adénocarcinome pulmonaire a également été mis en place.

Travaux

A. Axe 1 : dérégulation des miARN induite par l'exposition au cadmium et cancérogenèse rénale

Généralités

a) Présentation du cadmium

Le cadmium (Cd) est un métal naturel blanc argent, retrouvé en quantité infime dans la composition de la croûte terrestre (0,15g/tonne) et appartenant à la classe des métaux lourds (Figure 7)¹²³.



Figure 7 : Cristal de Cd et place du Cd dans la classification périodique des éléments. Numéro atomique 48, masse atomique : $112,414 \pm 0,004$ g/mol, configuration électronique : $4d^{10}5s^2$.

Ces éléments chimiques sont présents dans l'environnement généralement à l'état de traces et dépourvus d'activité biologique dans la plupart des cellules vivantes. Le Cd a été isolé pour la première fois en 1817 par le chimiste allemand F. Strohmeyer¹²⁴. Le Cd est généralement trouvé à l'état de minerais¹²⁵.

b) Sources d'exposition au cadmium

Le Cd est un polluant environnemental émanant notamment des activités anthropiques industrielles et agricoles¹²⁶. En dépit de la baisse à la fois de sa production et de son utilisation, le Cd est encore retrouvé en association avec le nickel dans les batteries, les stabilisateurs pour plastiques ou encore dans certains pigments de peinture¹²⁴. Cependant, la source majeure d'exposition résulte de l'inhalation de polluants aériens atmosphériques, de la

consommation de nourriture : poissons, mollusques bivalves et d'eaux contaminées ou encore la consommation de tabac chez les fumeurs ¹²⁷.

c) Toxicocinétique du cadmium

Chez l'Homme, le Cd est principalement absorbé au niveau du tractus gastrointestinal et par voie pulmonaire notamment en milieu industriel ^{126,128}. Le Cd absorbé est transporté par voie sanguine majoritairement sous forme liée à l'hémoglobine ¹²⁹. Le Cd pénètre dans les cellules par l'intermédiaire des canaux calciques et se lie majoritairement à des métallothionéines ¹³⁰. En effet, le Cd présente une forte affinité pour les groupements thiols, et de ce fait se fixe sur des protéines riches en acides aminés soufrés, perturbant ainsi leur fonctionnement ¹³¹. Ainsi, le Cd s'accumule dans le foie et les reins, deux organes riches en métallothionéines ¹³². Lorsque les réserves en métallothionéines sont dépassées, le Cd se retrouve dans l'organisme à l'état libre et peut induire ses effets délétères ¹²⁹. Très faiblement métabolisé, le Cd est principalement éliminé par voie urinaire par filtration glomérulaire ^{126,133}. Outre ses effets néphrotoxiques ¹³⁴, le Cd est également un puissant agent carcinogène.

d) Effets cancérogènes du Cd

L'apparition de cancers de la prostate chez des travailleurs exposés au Cd a permis d'établir les premières corrélations entre l'exposition au Cd et le développement tumoral ¹³⁵. Classé aujourd'hui comme carcinogène de catégorie I par l'Agence Internationale de Recherche sur le Cancer ¹³⁶, des études décrivent notamment son implication dans la carcinogenèse rénale ¹³⁷. D'autres types de cancers, comme le cancer du poumon, peuvent survenir suite à une exposition prolongée d'origine environnementale ou liée au tabac ¹³⁸.

Des études cherchant à identifier les mécanismes mis en jeu dans le processus de carcinogenèse induite par l'exposition au Cd ont permis de mettre en évidence un rôle

génotoxique de ce métal lourd ¹³⁹. En particulier, l'exposition au Cd entraîne une production accrue d'espèces réactives de l'oxygène ¹⁴⁰, l'inhibition des systèmes anti-oxydants cellulaires ¹⁴¹ dont le glutathion et un défaut d'activité des protéines impliquées dans les processus de réparation des dommages à l'ADN (acide désoxyribonucléique) ¹⁴². Ainsi, le Cd interfère avec le processus NER (réparation par excision de nucléotides) en se substituant aux atomes de zinc constitutifs de certaines protéines dont la formamidopyrimidine DNA glycosylase (FPG), et la xeroderma pigmentosum group a (XPA) ¹⁴³. Un mécanisme similaire a été décrit pour le système BER (réparation par excision de base) au niveau de l'enzyme 8-oxoguanine DNA N-glycosylase 1, responsable de la reconnaissance et de la suppression des bases oxydées de type 8-oxo-guanine ¹⁴¹. Enfin, le Cd interfère également dans le système MMR (réparation des mésappariements) en inhibant l'activité ATPasique de l'hétérodimère MSH2-MSH6 ¹⁴⁴.

En plus de ses effets génotoxiques, le Cd peut moduler la prolifération cellulaire en induisant l'expression des protooncogènes *c-jun* ou *c-fos* ou en induisant la phosphorylation et par conséquent l'activation de protéines appartenant aux voies de signalisation regroupées sous le terme générique MAPK (mitogen-activated protein kinases) (**Figure 8**) ¹⁴⁵.

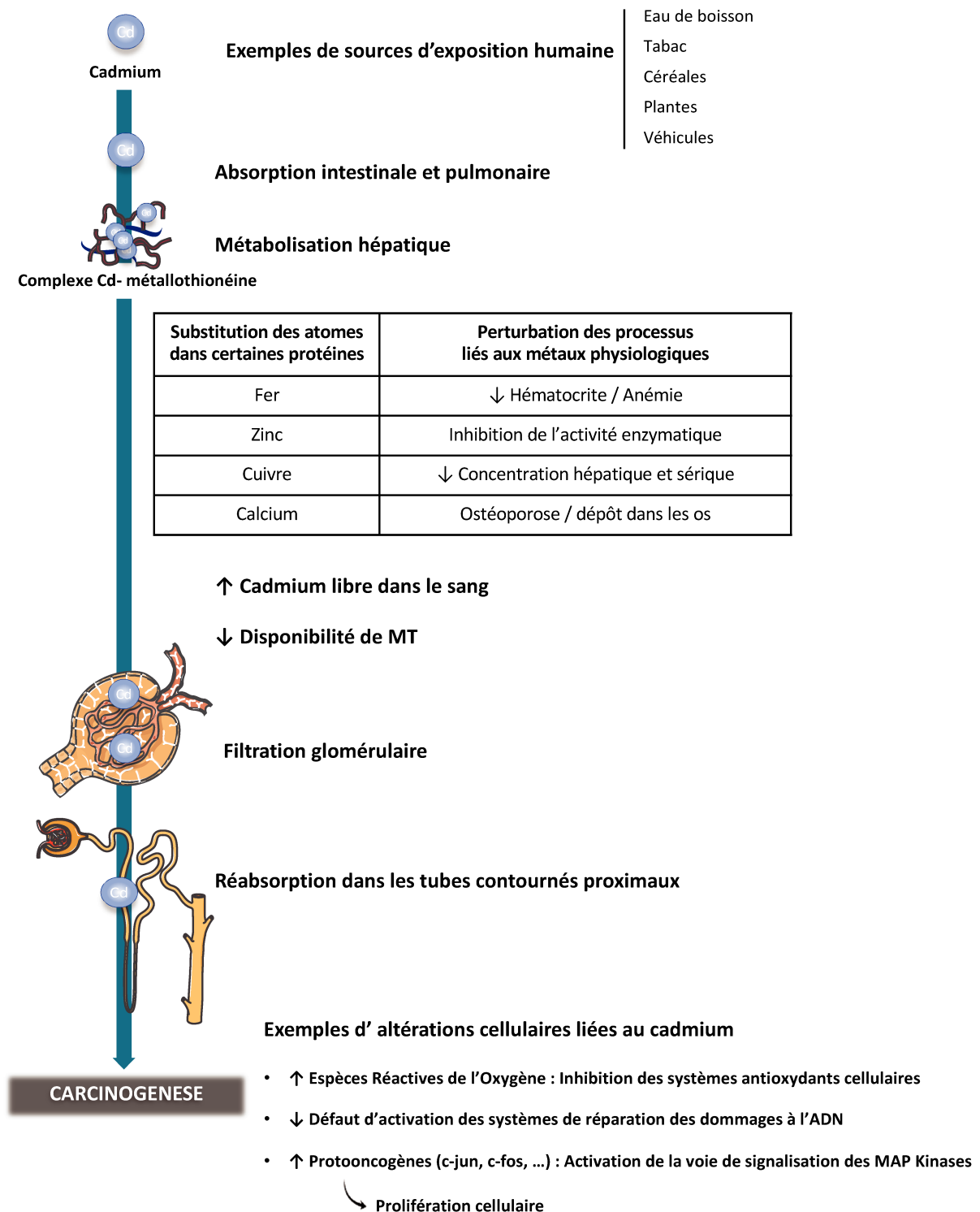


Figure 8 : Etapes d'incorporation du Cd dans l'organisme humain et processus de carcinogénèse.

MT : métallothionéines

Objectifs

La découverte et la compréhension des mécanismes régulateurs impliqués dans la survenue de lésions induites par le Cd restent des priorités non seulement pour mieux appréhender les risques associés à l'exposition à ce contaminant environnemental mais aussi afin de déterminer de nouveaux biomarqueurs d'exposition au Cd. En particulier, la découverte récente de l'importance des miARN pendant le développement rénal ¹⁴⁶ ou dans la physiopathologie des maladies rénales tumorales ¹⁴⁷ ou non tumorales ¹⁴⁸⁻¹⁵² souligne leur rôle clé au cours d'une atteinte rénale et ce, quel qu'en soit l'origine ¹⁴⁹. Ainsi, notre étude a consisté à identifier les miARN différentiellement exprimés dans des cellules tubulaires rénales proximales après exposition au Cd.

Matériel et méthodes

a) Culture cellulaire

Des cellules épithéliales tubulaires proximales immortalisées RPTEC/hTERT (CRL-4031, ATCC American Type Culture Collection, Manassas, VA) ont été cultivées dans du milieu DMEM-F12 (Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture F-12, Thermofisher, Waltham, MA) supplémenté avec 1% de pénicilline/streptomycine, 5 pmol/L de triiodo-L-thyronine, 10 ng/mL de EGF (recombinant human epidermal growth factor), 3,5 mg/mL d'acide ascorbique, 5,0 mg/mL de transferrine humaine, 5,0 mg/mL d'insuline, 25 ng/mL de prostaglandine E1, 25 ng/mL d'hydrocortisone, 8,65 ng/mL de sélénite de sodium, 0,1 mg/mL de G418, et 1,2 g/L de bicarbonate de sodium (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO). La lignée cellulaire rénale HK-2 (Human Kidney-2, ATCC CRL-2190) a été cultivée dans du milieu K-SFM (Keratinocyte-Serum free medium, Thermofisher) supplémenté avec 0,05 mg/mL d'extrait pituitaire bovin

(Thermofisher), 5 ng/mL d'EGF (Thermofisher), et 1% de pénicilline/streptomycine (Sigma-Aldrich). Les cellules ont été cultivées à 37°C dans une atmosphère humidifiée et à 5% de CO₂.

b) Exposition au cadmium

Vingt-quatre heures après ensemencement en plaques 96 puits (20000 cellules par puits), les cellules RPTEC/hTERT et HK-2 ont été exposées à des concentrations comprises entre 0 et 1000 µmol/L de chlorure de Cd (CdCl₂, Sigma-Aldrich) pendant 24 heures. La viabilité cellulaire a été évaluée par quantification de l'adénosine triphosphate (ATP) en utilisant le kit CellTiterGlo (Promega, Madison, WI) afin de déterminer les doses utilisées pour les traitements ultérieurs. En particulier, après ensemencement 200000 cellules par puits, en plaque 6 puits, les cellules ont été exposées à une dose correspondant à l'IC₂₀ (concentration estimée requise pour inhiber la croissance cellulaire de 20%) de CdCl₂ 10 µmol/L pour les RPTEC/hTERT ou 20 µmol/L pour les HK-2 pendant 24 heures.

c) Extraction des ARN

Les ARN totaux ont été extraits à partir de deux puits d'une plaque 6 puits en utilisant le kit miRNeasy Mini (Qiagen, Redwood City, CA) selon les recommandations du fournisseur. La qualité des ARN a été évaluée en utilisant l'automate Experion (BioRad, Hercules, CA).

d) Profilage des miARN modulés par le cadmium

Le profilage des miARN modulés par le Cd (10 µmol/L CdCl₂), trois expositions indépendantes a été réalisé dans la lignée RPTEC/hTERT en utilisant la technologie Open Array (Thermofisher) (**Figure 9**). La réaction de rétro-transcription des ARN est effectuée en utilisant les amorces Megaplex RT Primers Pool A v2.1 et Pool B v3.0. Une étape de préamplification est réalisée

avant la réaction de polymérisation en chaîne en temps réel, selon les recommandations du fournisseur sur l'automate Quant Studio 12K Flex Real-Time PCR System (Thermofisher).

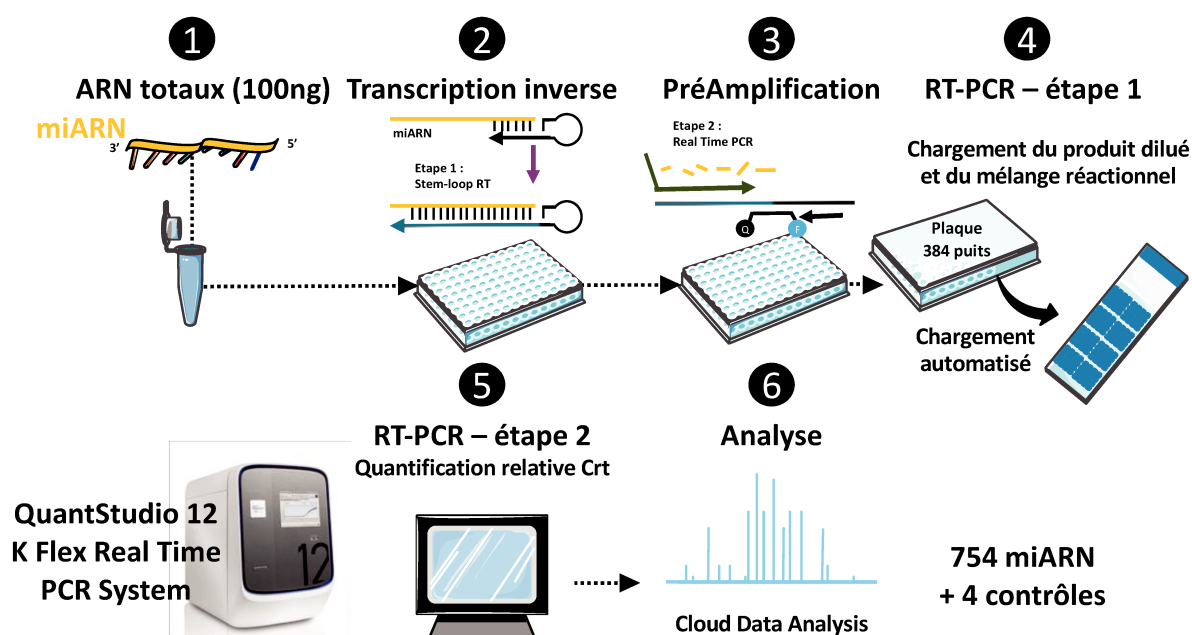


Figure 9 : Analyse par Open array par la technologie QuantStudio™ 12K Flex Real-Time PCR.
1. Les ARN totaux sont extraits, dosés et dilués à 100 ng dans 3 µL finaux. **2.** Une transcription inverse permet d'obtenir les ADN complémentaires (ADNc) des miARN cibles. **3.** Une étape de pré-amplification permet d'augmenter la quantité d'ADNc présents en solution et ainsi de réaliser l'open array sur les ADNc représentatifs. **4.** Chargement des échantillons dilués et du mélange réactionnel en plaques 384 puits permettant à l'automate de distribuer les solutions, automatiquement et en respectant la cartographie de la plaque, sur la microplaque. **5.** Quantification relative des miARN, un par puits, des échantillons. **6.** Analyse des données extraites à l'aide de l'application Cloud Data Analysis.
 Crt (relative threshold cycle).

L'analyse des données a été réalisée par quantification relative méthode de comparaison des cycles seuil (Crt, relative threshold cycle) en utilisant l'application Cloud Data Analysis (Thermofisher). 754 miARN et 4 contrôles internes ont été analysés. Les miARNs exprimés faiblement (Crt >26) et les miARN associés à une faible qualité d'amplification (<1,24) ont été exclus de l'analyse. Le gène de référence snRNA U6 (smallnuclear RNA U6) a permis de normaliser l'expression de chaque miARN.

e) Analyse des voies de signalisation

Les voies de signalisation KEGG (Enriched Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) modulées par le Cd ont été analysées grâce au logiciel DNA Intelligent Analysis (DIANA)-miRPath v3.0, <http://diana.imis.athena-innovation.gr/DianaTools/index.php>) qui s'appuie sur les cibles prédites des miARN par l'algorithme DIANA – microT - CDS¹⁵³. Les cibles des miARN associées à un score de plus de 0,8 ont été sélectionnées. Seules les voies KEGG avec une valeur-*p* (*p*) <0,05 et un FDR (False Discovery Rate) <0,05 ont été retenues.

f) RT-PCR

La transcription inverse des miARN a été réalisée en utilisant le kit Taqman microRNA Reverse Transcription (Thermofisher). La RT - PCR a été réalisée grâce à l'automate Step One Plus Real-Time PCR (Thermofisher). Le milieu réactionnel comprend du tampon Taqman Universal Master Mix II, no UNG (Thermofisher) et les sondes Taqman suivantes : miR-21-5p (ID 000397), miR-29c-3p (ID 000587), miR-193a-5p (ID 002281), miR-27a-3p (ID 000408), miR-30b-5p (ID 000602), et miR-30c-5p (ID 00019) et la sonde U6 snRNA (ID 001973) utilisée comme normalisateur.

La rétro-transcription des ARNm a été réalisée avec le kit high-capacity complementary DNA reverse transcription (Thermofisher) suivant les recommandations du fournisseur. La PCR en temps réel a été réalisée avec l'automate Step One Plus Real-Time PCR (Thermofisher). Le mélange réactionnel contient du tampon Taqman Universal Master Mix II, no UNG Thermofisher et les sondes Taqman suivantes : Bax (ID hs99999001), B-cell lymphoma 2 (Bcl2, ID hs00153350), neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL, ID hs01008571), heme oxygenase-1 (HO-1, ID hs01110250), IL-6 (interleukine-6 ; ID hs00174131). La cyclophiline A (PPIA, Peptidylprolyl isomerase A, ID hs99999904) a été utilisée comme gène de référence.

Les niveaux d'expression relative des ARNm et des miARN ont été déterminés par la méthode d'analyse comparative des cycles seuils $2^{\Delta\Delta CT}$.

g) Western Blot

Les protéines totales ont été obtenues par lyse des cellules 3 puits d'une plaque 6 puits dans du tampon RIPA (radioimmunoprecipitation assay), (Sigma-Aldrich) contenant un mélange d'inhibiteurs de protéases et de phosphatases (Roche, Meylan, France) et après sonication de 20 secondes. La concentration en protéines a été mesurée grâce au kit BCA protein assay (Bicinchonic Acid, Pierce, Waltham, MA). Vingt microgrammes de protéines ont été séparées par électrophorèse dans un gel de polyacrylamide 4% - 12% BisTrisNuPAGE gel (Thermofisher) ou 7% Tris acetate NuPAGE gel (Thermofisher) puis transférées sur une membrane de nitrocellulose en utilisant le système de transfert Trans-Blot Turbo (BioRad). Après blocage des sites aspécifiques, les membranes ont été incubées avec des solutions d'anticorps primaires dirigés contre caspase 3 (sc7148; Santa Cruz, Dallas, TX ; 1/1000^e), caspase 3 clivée (9661 ; Cell Signaling Danvers, MA ; 1/1000^e), polyADP-ribose polymerase 1 (Parp-1), (9542P ; Cell Signaling ; 1/1000^e), HO-1 (5853 S, Cell Signaling; 1/1,000^e) et Heat shock protein 60 (HSP-60, sc-1052; Santa Cruz; 1/4000^e) sur la nuit à 4°C. Les membranes ont ensuite été incubées avec un anticorps secondaire conjugué à une peroxydase (Sigma-Aldrich ; 1/10000^e) 45 minutes à température ambiante.

Les bandes protéiques ont été visualisées grâce au réactif ECL Western blotting (GE Healthcare, Chicago) à l'aide de l'imageur Fusion FX Spectra Vilber (Lourmat, Collégien, France). L'analyse des images a été réalisée grâce au logiciel ImageJ.

h) Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées grâce au logiciel GraphPadPrism version 6.0 pour Windows GraphPad Software. Les résultats sont présentés par la moyenne $\pm$ SEM (standard error of the mean). Le test statistique Two-tailed student t a été utilisé pour les comparaisons simples. Le test One-way analysis of variance a été utilisé pour les comparaisons multiples suivi d'une correction de Bonferroni. Les valeurs $p < 0,05$ ont été considérées significatives.

Résultats

a) Cytotoxicité du Cd

Dans un premier temps, nous avons évalué la toxicité induite par le Cd dans des cellules rénales épithéliales tubulaires proximales RPTEC/hTERT. Comme attendu, l'exposition au Cd induit une toxicité dose-dépendante ($IC_{50} = 26.01 \pm 6.38 \mu\text{mol/L}$) (**Figure 10, A**).

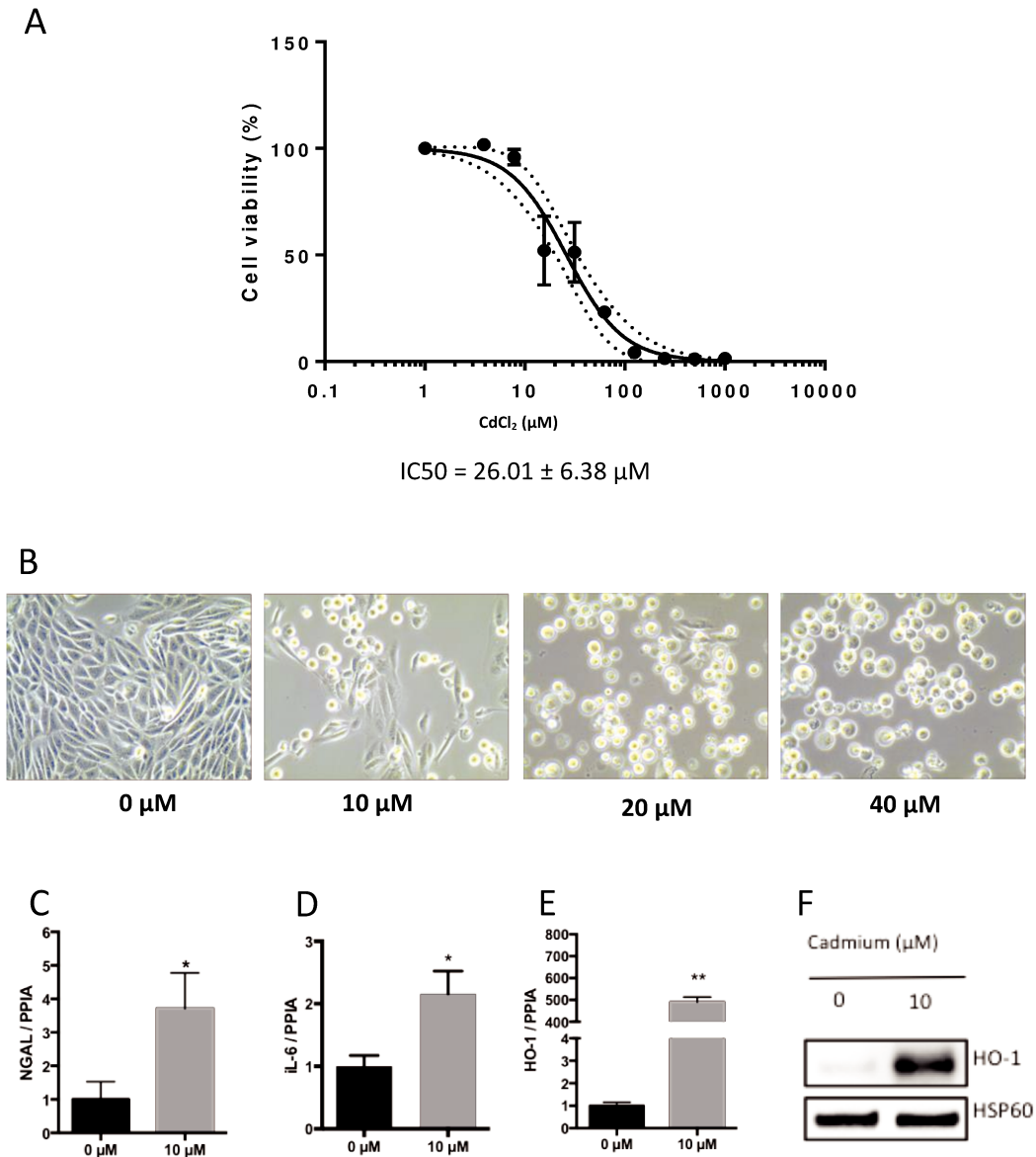


Figure 10 : Mort cellulaire et cytotoxicité induite par le Cd dans les cellules RPTEC/hTERT.

A. La viabilité cellulaire a été mesurée après traitement avec du CdCl₂ 0 à 1000 μmol/L pendant 24 heures en utilisant le kit CellTiterGlo (Promega). Les valeurs indiquées (moyennes ± SEM) dérivent de 4 expériences indépendantes. $p < 0,0001$.

B. Microscopie représentative à grossissement x 400. Les cellules ont été traitées pendant 24 heures avec 0 à 40 μmol/L de CdCl₂. **C – E.** Expression relative de NGAL, de l'IL-6 et de HO-1. Les valeurs indiquées (moyennes ± SEM) dérivent de 5 expériences indépendantes. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. PPIA a été utilisé comme référence. **F.** Analyse de l'apoptose par Western blot. Les valeurs sont issues de 3 expériences indépendantes. Cellules exposées à 10 μmol/L de CdCl₂ par rapport aux cellules non traitées. Les protéines ont été incubées avec un anticorps dirigé contre HO-1.

De plus, le Cd induit une individualisation des cellules ainsi qu'une modification de leur morphologie, les cellules passant d'une forme épithélioïde à une forme arrondie (**Figure 10**,

B). Les expositions suivantes ont ensuite été réalisées avec une concentration modérée de CdCl₂ de 10 µmol/L, correspondant à l'IC20.

De plus, nous avons confirmé que l'expression relative de NGAL, un marqueur de lésions rénales ¹⁵⁴, est augmentée après exposition au CdCl₂ (**Figure 10, C**). De plus, l'exposition au Cd induit également l'expression de gènes pro-inflammatoires tels qu'IL-6 (**Figure 10, D**). Finalement, nous observons une induction significative de HO-1, un marqueur du stress oxydant ¹⁵⁵, tant au niveau transcriptomique (**Figure 10, E**) qu'au niveau protéomique (**Figure 10, F**).

b) Modulation de l'expression des miARN par le Cd dans les cellules RPTEC/hTERT.

Afin d'identifier les miARN potentiellement impliqués dans les effets délétères du Cd dans les cellules RPTEC/hTERT, une stratégie à haut débit, permettant de mesurer simultanément l'expression de 754 miARN, a été choisie.

Un miARN est considéré comme non exprimé lorsque la valeur ajustée Crt est supérieure à 26, selon les recommandations du fournisseur. En utilisant ce critère, parmi les 754 miARN étudiés, 150 ont été retenus. Parmi eux, les miARN les plus exprimés sont miR-222-3p, miR-21-5p, miR-146a-5p, miR-30c-5p et miR-30b-5p. De plus, le cadmium induit la surexpression significative de 38 miARN (**Figure 11**).

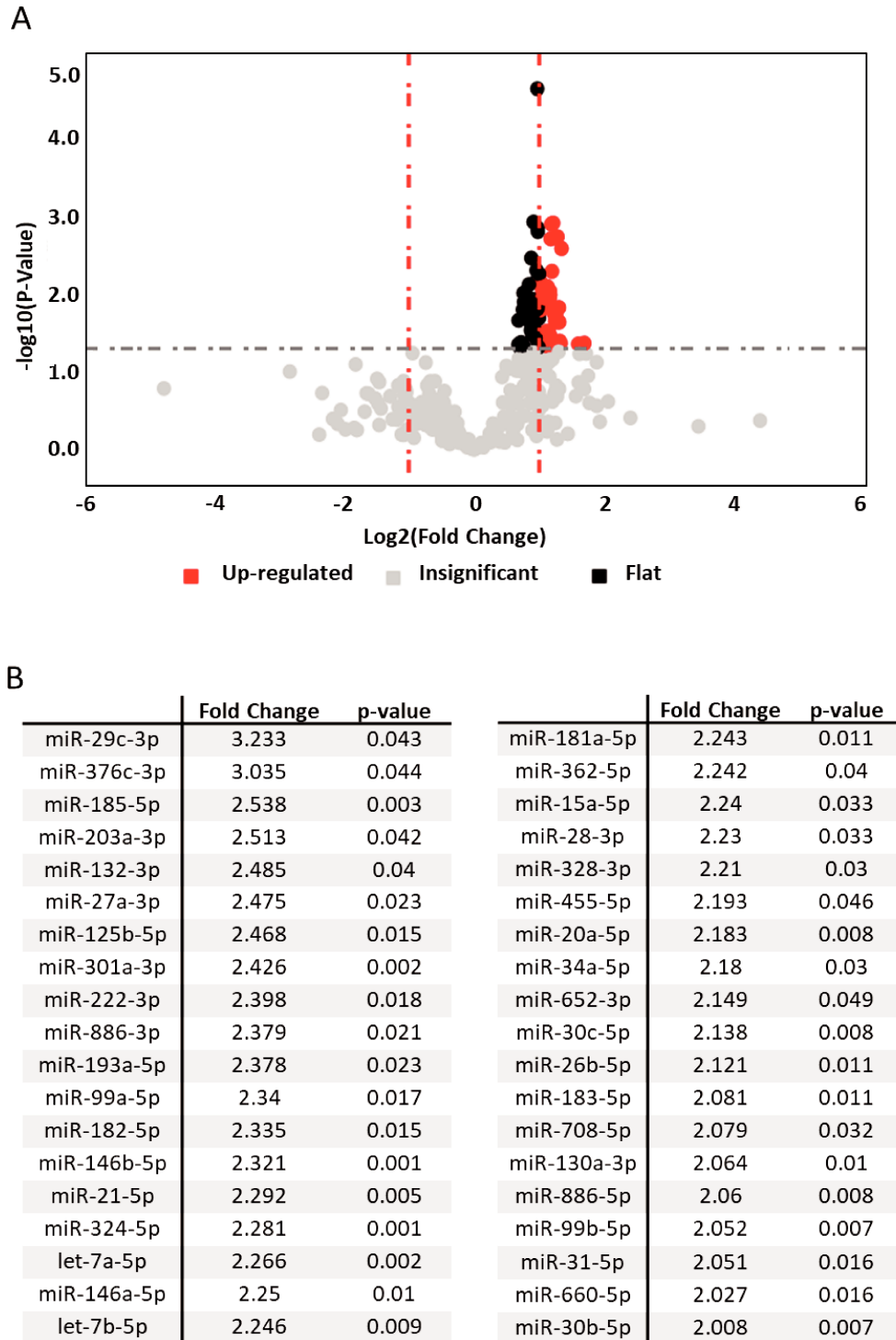


Figure 11 : miARN significativement dérégulés dans les cellules RPTEC/hTERT exposées au Cd. **A.** Volcano Plot montrant les 38 miARN exprimés significativement de manière différentielle dans les cellules RPTEC/hTERT exposées à 10 $\mu\text{mol/L}$ de CdCl_2 par rapport aux cellules non traitées $n = 3$ expériences indépendantes. **B.** Liste des miARN modulés significativement suite à une exposition au Cd.

Il est important de noter qu'aucun des miARN étudiés n'est significativement sous-exprimé dans ces cellules exposées au Cd.

Afin de valider ces données de manière indépendante par RT-qPCR, nous avons sélectionné six miARN en fonction de leur expression basale, leur niveau de surexpression et leurs significativités. Des résultats similaires ont été obtenus pour cinq d'entre eux miR-21-5p, miR-27a-3p, miR-29c-3p, miR-30b-5p, et miR-30c-5p (**Figure 12**).

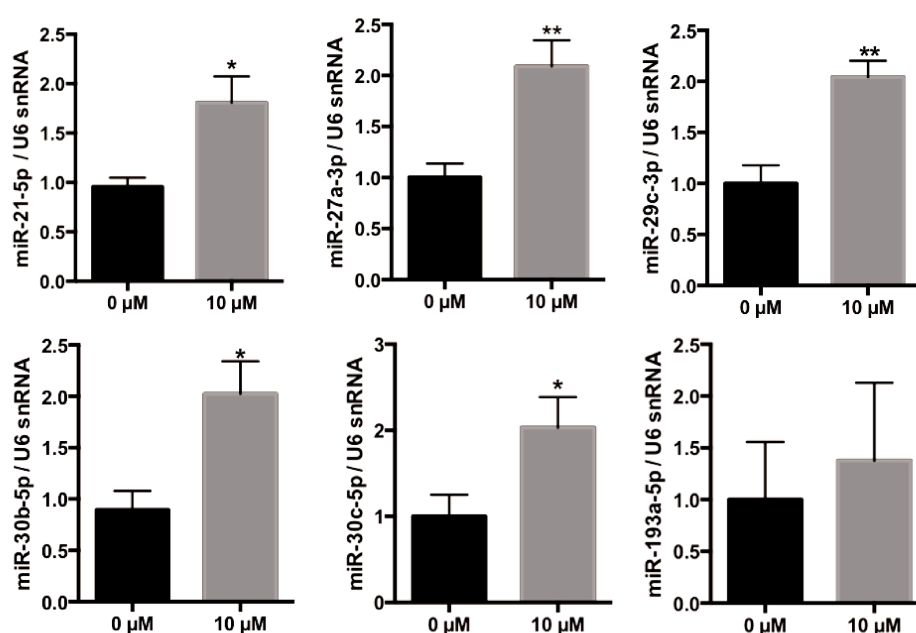


Figure 12 : Validation de la surexpression induite par le Cd de miR-21-5p, miR-27a-3p, miR-29c-3p, miR-30b-5p, miR-30c-5p et miR-193a-5p dans les cellules RPTEC/hTERT. Expression relative des miARN mesurée par PCR quantitative. Les valeurs indiquées (moyennes $\pm$ SEM) dérivent de 5 expériences indépendantes. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. L'ARNsn U6 a été utilisé comme référence.

c) Validation de la modulation des miARN induite par le Cd dans la lignée cellulaire HK-2

Nous avons également cherché à évaluer la pertinence des résultats obtenus dans les cellules RPTEC/hTERT dans une autre lignée cellulaire, la lignée HK-2, couramment utilisée dans la littérature^{156–160}. Les cellules HK-2 présentent également des caractéristiques typiques de la toxicité du Cd, notamment une diminution de la viabilité cellulaire et une modification

morphologique. Cependant, les cellules HK-2 semblent moins sensibles au Cd que les cellules RPTEC/hTERT, comme le suggère une IC50 plus élevée : $IC_{50} = 36.42 \pm 7.10 \mu\text{mol/L}$ contre $IC_{50} = 26.01 \pm 6.38 \mu\text{mol/L}$ (**Figure 13**, A et B).

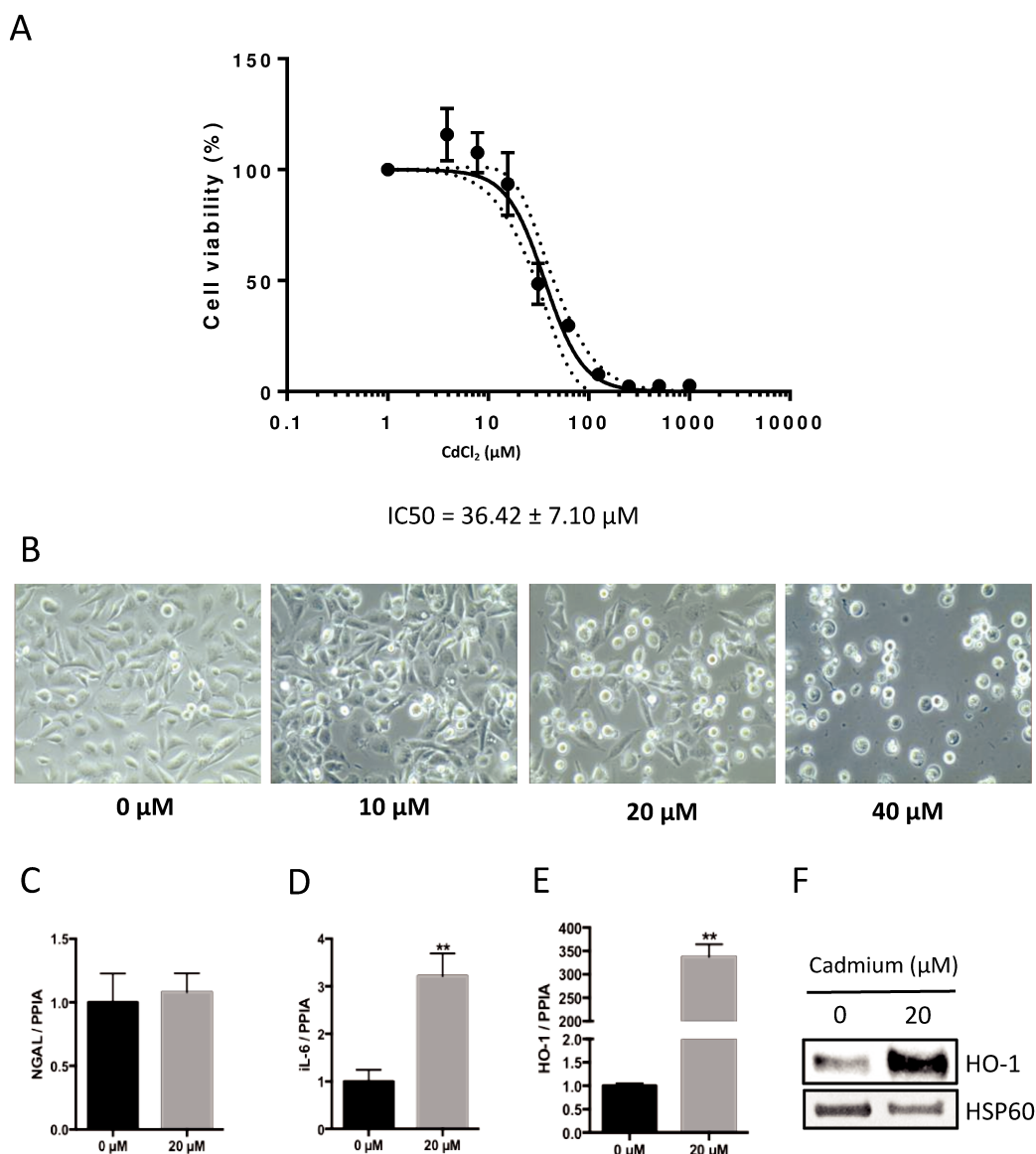


Figure 13 : Mort cellulaire et cytotoxicité induite par le Cd dans les cellules HK-2.

A. Viabilité cellulaire mesurée après traitement avec du $CdCl_2$ 0 à 1000 $\mu\text{mol/L}$ pendant 24 heures en utilisant le kit CellTiterGlo (Promega). Les valeurs indiquées (moyennes $\pm$ SEM) dérivent de 4 expériences indépendantes. $p < 0,0001$. **B.** Microscopie représentative à grossissement $\times 400$. Les cellules ont été traitées pendant 24 heures avec 0 à 40 $\mu\text{mol/L}$ de $CdCl_2$. **C–E.** Expression relative de NGAL, de l'IL-6 et de HO-1. Les valeurs indiquées (moyennes $\pm$ SEM) dérivent de 5 expériences indépendantes. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. PPIA a été utilisé comme référence. **F.** Analyse de l'apoptose par Western blot de 3 expériences indépendantes. Cellules exposées à 20 $\mu\text{mol/L}$ de $CdCl_2$ par rapport aux cellules non traitées. Les protéines ont

été incubées avec un anticorps dirigé contre HO-1. La protéine HSP-60 a été utilisée comme contrôle interne.

De plus, nous avons confirmé dans la lignée cellulaire HK-2, une tendance à l'augmentation de NGAL après exposition au CdCl_2 (**Figure 13**, C). De même, l'exposition au Cd induit l'expression significative de gènes pro-inflammatoires tels qu'IL-6 (**Figure 13**, D). Finalement, nous observons également une induction significative de HO-1, tant au niveau transcriptomique (**Figure 13**, E) qu'au niveau protéomique (**Figure 13**, F).

L'expression des miARN précédemment sélectionnés miR-21-5p, miR-27a-3p, miR-29c-3p, miR-30b-5p, miR-30c-5p, et miR-193a-5p a ensuite été évaluée après exposition au Cd ($\text{IC}_{20} = 20 \mu\text{mol/L}$). Nous avons observé que l'exposition des cellules au Cd induit la surexpression significative de 5 miARN parmi les 6 miARN testés (**Figure 14**).

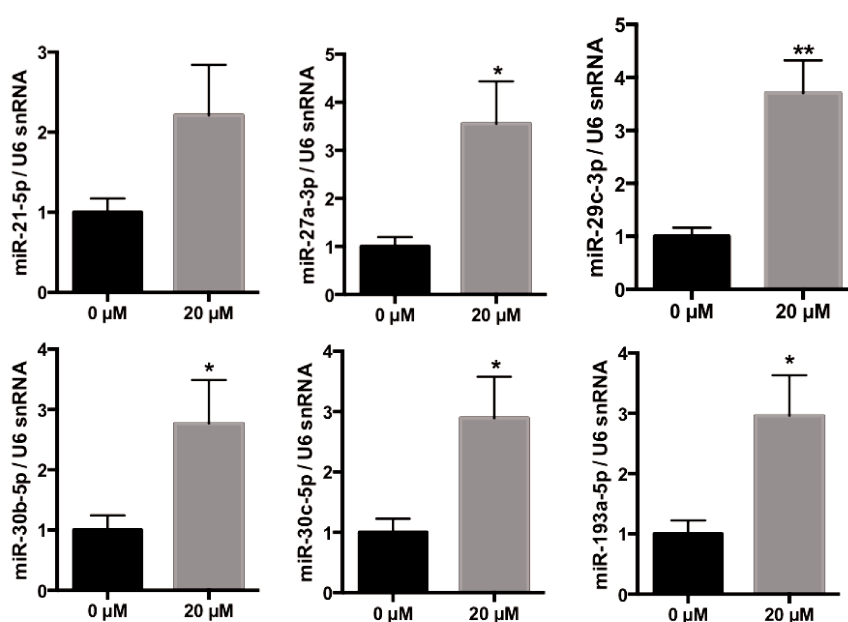


Figure 14 : Validation de la surexpression induite par le Cd de miR-21-5p, miR-27a-3p, miR-29c-3p, miR-30b-5p, miR-30c-5p et miR-193a-5p dans les cellules HK-2. Expression relative des miARN après exposition au CdCl_2 . Les valeurs indiquées (moyennes $\pm$ SEM) dérivent de 4 expériences indépendantes. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. L'ARNsn U6 a été utilisé comme référence.

d) Voies de signalisation modulées par les miARN dérégulés par le Cd

De manière intéressante, une recherche bibliographique indique que l'ensemble des miARN surexprimés après stimulation des cellules RPTEC/hTERT par le Cd sont impliqués dans les processus de cancérogenèse (**Tableau 3**).

Tableau 3 : Liste des microARN significativement dérégulés par l'exposition des cellules RPTEC/hTERT au Cd et de leurs cibles.

miRNA	Cibles validées/<i>non validées</i>	Processus associés	Références
miR-29c-3p	CDK6, TGFB, DNMT3, NFKB, TNFAIP3, ZFP36, COL2A1, TPM1	cancer, apoptose, inflammation, fibrose	161–165
miR-376c-3p	HOXB7	cancer, apoptose, inflammation	166
miR-185-5p	DDIT3, CCND2, PDIA3P1, RICTOR, ABCC1, BCL2, BCL2L1, RHEB	cancer, inflammation, apoptose, fibrose	167–172
miR-203a-3p	<i>E2, MTOR, FOXO1, MAPK, HOXD3</i>	cancer, stress cellulaire	173,174
miR-132-3p	ADAMTS5, YAP1, FOXO1, SOX4	cancer, stress cellulaire, apoptose	159,175,176
miR-27a-3p	DUSP16, RXRA, SMAD2, SMAD4, BTG2, TLR4, ACTA2, <i>NFE2L2</i>	cancer, inflammation, fibrose, stress oxydant	177–183
miR-125b-5p	KEAP1, BCL2, VTCN1, STARD13	cancer, apoptose, inflammation, fibrose	184–187
miR-301a-3p	SMAD4, DLC1, RUNX3	cancer, apoptose	188–190
miR-222-3p	GAS5, HIPK2, KIT, CDKN1B	cancer, fibrose, sénescence, apoptose	191–194
miR-886-3p	AKT2, MAPK3, PITX1	cancer, apoptose	195,196
miR-193a-5p	KRAS, KIT, E2F6, JNK1, BACH2	cancer, apoptose	197–200
miR-99a-5p	MTOR, NOX4	cancer, apoptose	201,202
miR-182-5p	BCL2L12, MET, EPAS1, PPP1R1C, TLR4, FOXO3	cancer, apoptose, inflammation, stress oxydant	203–206

miR-146b-5p	RARB, ZNRF3, TRAF6, TIMP4	cancer, apoptose, inflammation, fibrose	207–209
miR-21-5p	MSH2, DRP1, MSLN, SESN1, CAB39L, RASA1, SMAD7, PTEN, PDCD4, BCL2, PPARA, RECK, TPM1, TSP1, PHD2, MKK3, RAB11A, TIMP3, FASL, IL12A, NOTCH2	cancer, sénescence, apoptose, inflammation, fibrose	210–225
miR-324-5p	ELAVL1, GLI1, TSPAN8, CUEDC2	cancer, apoptose, inflammation	226–228
let-7a-5p	CASP3, IL13	cancer, apoptose, inflammation	229,230
miR-146a-5p	ZNRF3, IRAK-1, NOTCH2, SMAD4, CCND1, CCND2, ROCK1, WNT1, WNT5A	cancer, EMT, inflammation, apoptose, fibrose	208,231–236
let-7b-5p	IGF1R	cancer, apoptose	237
miR-181a-5p	TNF, PTPN9, SMAD7, TCF7L2, MMP14, RASSF6, WIF1	cancer, stress immunitaire	238–244
miR-362-5p	GADD45A, CASC2	cancer	245,246
miR-15a-5p	WNT3A, CXCL10, BDNF, VEGFA	cancer, apoptose, inflammation, fibrose	247–250
miR-28-3p	NME1, IL34	cancer, infection au HTLV-1, apoptose	251–253
miR-328-3p	H2AFX, CD44	cancer	254,255
miR-455-5p	UBE2B, RAB18	cancer	256,257

miR-20a-5p	ATG7, TP63, E2F1, ATG16L1, KIF26B, SMAD4, <i>RAB27B</i> , MAPK9, MAPK9, JNK2, SIRPA	cancer, développement musculaire, autophagie, chemoresistance, apoptose, inflammation	258–265
miR-34a-5p	MDM4, XIST, KIT, AGTR1, DLL1, BCL2, NEAT1, SIRT1	cancer, apoptose, fibrose	266–271
miR-652-3p	LLGL1	cancer	272
miR-30c-5p	EIF2A, CASP3, MTA1, SNAIL, DNMT1, SERPINE1	cancer, apoptose	273–276
miR-26b-5p	PLOD2, S100A7, EZH2, <i>CCND2</i> , <i>TRPS1</i>	cancer	277–280
miR-183-5p	SRSF2, PDCD4, <i>MTUS1</i> , <i>SOCS6</i>	cancer	281–284
miR-708-5p	FOXO3, CDKN2B, AKT2	cancer, apoptose	285–287
miR-130a-3p	SMAD4, BACH2, RAB5A, TNF, TBL1XR1	cancer, apoptose	288–292
miR-886-5p	<i>BAX</i>	cancer, sénescence, apoptose	293,294
miR-99b-5p	TGFB1, MTOR, FGFR3, CLDN11	cancer, EMT	295–298
miR-31-5p	SP1, MLH1, ACOX1	cancer	299–301
miR-660-5p	TFCP2, EPAS1	cancer	302,303

miR-30b-5p	DNMT3A, USP37, <i>SERPINE1</i> , <i>SIX1</i> , KRAS, PIK3CD, BCL2, ATG12, GNA13, EIF2A	cancer, apoptose, EMT	304–309
------------	--	-----------------------	---------

Note : Les cibles non validées sont inscrites en italique.

De plus, l'analyse bioinformatique réalisée grâce au logiciel DIANA-miRPath v3.0 a permis de montrer que près de 80% de ces miARN ont été expérimentalement associés à des gènes impliqués dans le processus apoptotique (**Tableau 4**).

Tableau 4 : Liste des gènes associés à l'apoptose, validés expérimentalement et ciblés par les miARN modulés par l'exposition au Cd.

miARN	Gènes cibles validés expérimentalement
hsa-let-7a-5p	APAF1 ; BID ; BIRC2 ; BIRC3 ; CASP3 ; CASP6 ; CHUK ; FADD ; FAS ; IRAK2 ; PRKAR1B ; PRKAR2A ; TNFRSF10B ; TNFSF10 ; TP53
hsa-miR-30b-5p	BIRC2 ; BIRC3 ; CASP3 ; PIK3CA ; PIK3R1 ; PPP3CA ; PPP3CB ; PPP3R1 ; TNFRSF10B ; TNFRSF10D ; XIAP
hsa-miR-30c-5p	BIRC2 ; BIRC3 ; CASP3 ; FAS ; PIK3CA ; PIK3R1 ; PPP3CA ; PPP3CB ; PPP3R1 ; TNFRSF10B ; TNFRSF10D ; XIAP
hsa-miR-185-5p	TNFRSF10D
hsa-miR-34a-5p	AKT2 ; ATM ; BAD ; BCL2 ; BID ; CAPN1 ; CAPN2 ; CASP6 ; CASP7 ; CASP9 ; IRAK4 ; MAP3K14 ; NFKB1 ; NFKBIA ; PIK3CA ; PIK3R2 ; PPP3CA ; PPP3CC ; PPP3R1 ; PRKACA ; CFLAR ; PRKACB ; CYCS ; DFFA ; IRAK1 ; IRAK2 ; PRKAR1A ; PRKAR2B ; PRKX ; TNFRSF1A ; TP53
hsa-miR-130a-3p	APAF1 ; ATM ; CAPN1 ; CHUK ; MAP3K14 ; NFKB1 ; NFKBIA ; PIK3CB ; PIK3R2 ; PPP3R1 ; PRKAR1A ; RELA ; TNF
hsa-miR-652-3p	CHUK
hsa-miR-15a-5p	AKT3 ; BCL2 ; CFLAR ; CHUK ; IKBKB ; MYD88 ; PIK3CA ; PPP3R1 ; PRKACA ; PRKAR1A ; PRKAR2A ; TNFRSF10B ; TP53 ; XIAP
hsa-miR-181a-5p	AKT3 ; APAF1 ; BCL2 ; CHUK ; IL1A ; PIK3CB ; PIK3R1 ; PIK3R3 ; PPP3R1 ; TP53 ; XIAP
hsa-let-7b-5p	AKT1 ; APAF1 ; BAX ; BIRC2 ; BIRC3 ; CASP3 ; CHUK ; FAS ; PIK3CA ; PRKAR2A ; TNFSF10 ; TP53
hsa-miR-301a-3p	CASP8 ; CHUK ; IL1RAP ; MAP3K14 ; NFKB1 ; PIK3CB ; PIK3R2 ; PPP3R1
hsa-miR-182-5p	AKT1 ; AKT3 ; BAX ; BCL2 ; BCL2L1 ; DFFA ; IRAK1 ; NFKB1 ; PIK3CB ; PIK3R1 ; PPP3CB ; PPP3R1 ; PRKACB ; PRKAR1A ; RELA ; TP53
hsa-miR-26b-5p	AIFM1 ; AKT1 ; BID ; CAPN2 ; CASP3 ; CASP7 ; CASP8 ; CASP9 ; DFFB ; ENDOG ; PRKACA ; TNFRSF10B ; FASLG ; IL3 ; NFKB1 ; PIK3CG ; PIK3R3 ; PPP3R1

hsa-miR-21-5p	APAF1 ; BID ; CAPN2 ; FAS ; FASLG ; IL1B ; IRAK4 ; PIK3R1 ; TNFRSF10B
hsa-miR-31-5p	IL1R1 ; IL1RAP ; MAP3K14 ; NFKB1 ; PPP3R1 ; RIPK1 ; TNFRSF10B
hsa-miR-146a-5p	AKT2 ; CAPN2 ; IRAK1 ; IRAK2
hsa-miR-146b-5p	AKT2 ; CAPN2 ; IRAK1
hsa-miR-20a-5p	AKT1 ; APAF1 ; BCL2 ; CASP8 ; PIK3R1 ; PPP3CA ; PPP3CC ; PPP3R1 ; PRKACB ; PRKAR1A ; PRKAR2B ; TNFRSF10B ; XIAP
hsa-miR-27a-3p	BAX ; BID ; CAPN1 ; CASP8 ; FADD ; IL1RAP ; IRAK1 ; NFKB1 ; NFKBIA ; PIK3CB ; PIK3R1 ; PIK3R3 ; PRKAR1A ; PRKAR2A ; PRKX ; TP53
hsa-miR-455-5p	IL1RAP ; PIK3R1 ; PPP3R1
hsa-miR-193a-5p	CASP9 ; PPP3R1
hsa-miR-222-3p	BIRC3 ; CASP3
hsa-miR-125b-5p	CFLAR ; IRAK1 ; PRKAR1A ; TNFRSF10B
hsa-miR-99a-5p	CASP3 ; CFLAR ; PIK3CB ; XIAP
hsa-miR-132-3p	ATM ; CAPN2 ; CASP7 ; CFLAR ; IKBKB ; IL1R1 ; PIK3R1 ; PIK3R3 ; PRKAR1A ; PRKX ; XIAP
hsa-miR-29c-3p	ATM ; BAX ; CASP7 ; CASP8 ; CYCS ; PIK3R1 ; PIK3R3 ; RELA ; TNFRSF10B ; TNFRSF1A ; TP53
hsa-miR-28-3p	XIAP
hsa-miR-362-5p	CAPN2 ; TP53 ; XIAP
hsa-miR-324-5p	AKT1 ; PPP3CA

hsa-miR-99b-5p	CFLAR ; PPP3R1
hsa-miR-183-5p	PRKAR1A ; TNFRSF10B ; TP53

Ces données *in silico* apparaissent pertinentes. En effet, comme attendu, le Cd induit le processus apoptotique dans les cellules RPTEC/hTERT, comme le montre le clivage de la caspase 3 et de Parp-1, deux protéines clés de ce processus (**Figure 15, A**).

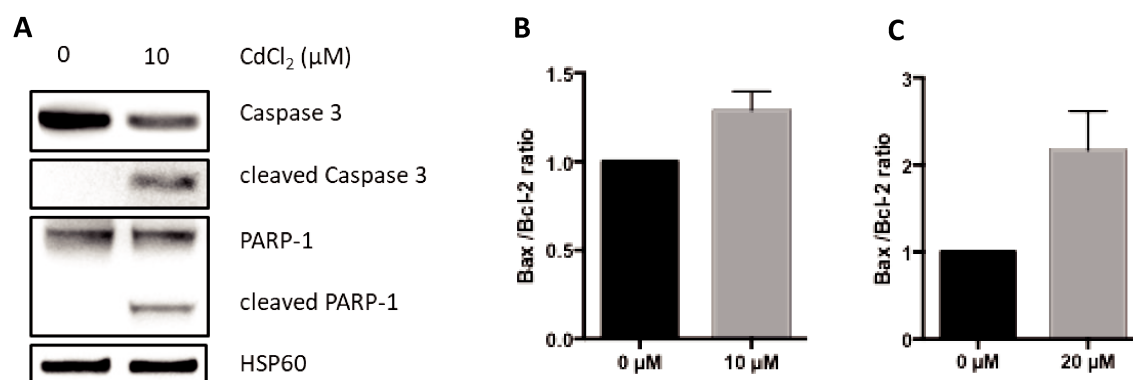


Figure 15 : Apoptose induite par le Cd dans le modèle cellulaire RPTEC/hTERT et HK-2.

A. Analyse de l'apoptose par Western blot de 3 expériences indépendantes pour les cellules exposées à 10 μmol/L de CdCl₂ par rapport aux cellules non traitées. Les membranes ont été incubées avec des solutions d'anticorps dirigés contre la caspase 3 clivée et Parp-1. La protéine HSP-60 a été utilisée comme contrôle interne. **B - C.** Effet de l'exposition des cellules RPTEC/hTERT (**B**) et des cellules HK-2 (**C**) au CdCl₂ sur le ratio entre la protéine pro-apoptotique Bax et la protéine anti-apoptotique Bcl-2. Les valeurs indiquées (moyennes ± SEM) dérivent de trois expériences indépendantes. La protéine HSP-60 a été utilisée comme contrôle interne.

De plus, comme les protéines de la famille BCL-2 sont des régulateurs du potentiel de membrane mitochondrial et de l'apoptose, le niveau d'expression de BCL-2 et BAX a été évalué en présence ou en absence de Cd dans les deux lignées cellulaires. L'exposition au Cd induit la surexpression de la protéine pro-apoptotique BAX et la sous-expression de la protéine anti-apoptotique BCL-2, ce qui entraîne une augmentation du rapport BAX/BCL-2 et souligne ainsi l'activation de la voie pro-apoptotique (**Figure 15, B et C**).

Enfin, l'outil d'analyse miR-Path a montré un enrichissement des cibles directes des miARN surexprimés après exposition au Cd dans les processus biologiques impliqués dans le remodelage cellulaire incluant la fibrogenèse et la carcinogenèse. En particulier, les voies de signalisation significativement modulées par le Cd comprennent les voies de la

Phosphoinositide 3-kinase-protein kinase B (PI3K - Akt), des MAPK, de RAS, de RAP1 (Ras-proximate-1), et HIPPO (**Figure 16**).

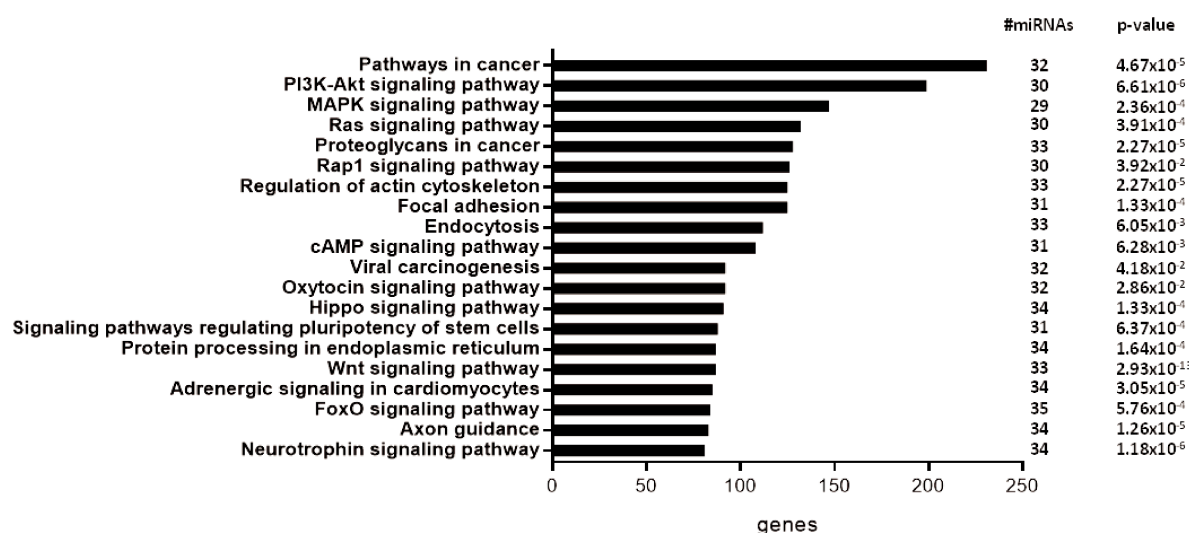


Figure 16 : Prédiction des voies de signalisation des miARN surexprimés dans les cellules RPTEC/hTERT traitées avec du Cd par rapport aux cellules non traitées selon mirPath v.3 Diana Tools.

Le nombre de miARN associés à chaque voie et le nombre de gènes impliqués dans chaque voie sont indiqués. Les 20 principales voies sont répertoriées. $p < 0,05$.

Discussion

Les miARN sont désormais reconnus comme des répresseurs majeurs de l'expression de gènes et sont impliqués dans la plupart des processus cellulaires et biologiques ³¹⁰. Bien que cette classe d'ARN ait fait l'objet de très nombreuses études ces vingt dernières années en biologie fondamentale et dans de nombreuses pathologies ²⁴, l'impact des miARN en toxicologie environnementale reste lacunaire ³¹¹. En particulier, les métaux lourds comme le Cd sont des toxiques environnementaux majeurs responsables de nombreux effets délétères pour la santé tels que la néphrotoxicité ou l'émergence de cancers ^{134,141}. A ce jour, seules quelques études se sont intéressées à la dérégulation des miARN induite par l'exposition à des métaux lourds autres que le Cd tels que l'arsenic, l'un des polluants cancérigènes environnementaux les plus courants ³¹². Plus précisément, l'expression aberrante de certains miARN est notamment

associée à la transformation maligne des cellules épithéliales bronchiques humaines ³¹³. En ce qui concerne le Cd, du fait de son accumulation dans les sols et les milieux aquatiques, les études publiées se sont principalement focalisées sur les organismes dulcicoles et marins ainsi que les plantes ³¹⁴, telles que le riz, le soja et le blé ^{315–317}.

A notre connaissance, notre étude a permis pour la première fois une analyse exhaustive de la modulation des miARN après exposition au Cd dans les cellules rénales épithéliales tubulaires proximales RPTEC/hTERT humaines. Notre choix s'est porté sur ce modèle cellulaire qui s'est avéré fiable dans plusieurs études ayant trait à la néphrotoxicité ^{152,160,318,319}. En effet, le recours à la sous-unité catalytique de l'enzyme hTERT endogène pour l'immortalisation permet de s'affranchir du phénomène de sénescence répllicative ³²⁰, une limite bien connue des cultures primaires de cellules. De plus, la lignée cellulaire RPTEC/hTERT présente un taux de métallothionéines et une réponse au stress cellulaire proche des cellules rénales humaines natives ^{316,318}.

Notre étude montre que l'exposition des cellules RPTEC/hTERT à une dose modérément toxique de cadmium (IC20) pendant 24 heures induit la surexpression de 38 miARN. Ces données suggèrent que la modulation des miARN en réponse au Cd pourrait représenter un événement précoce dans la physiopathologie des lésions rénales induites par cet élément métallique. Un effet précoce similaire a récemment été observé dans un modèle subchronique d'exposition au Cd chez le rat, les animaux ayant été traités par des injections sous-cutanées de CdCl₂ 0,6 mg/kg, 5 jours par semaine pendant 12 semaines ³²¹. Le profil d'expression rénale des miARN a ainsi permis d'identifier 44 miARN induits en réponse au Cd, dont 5 miARN : miR-222-3p, miR-146b-5p, miR-20a-5p, miR146a-5p, miR-21-5p et miR-132-3p, sont communs avec notre étude. De plus, pour évaluer la robustesse des données observées dans les cellules RPTEC/hTERT et pour étayer davantage la validité de notre

approche expérimentale, la dérégulation de 6 miARN a été évaluée dans la lignée rénale HK-2, une lignée fréquemment utilisée dans la littérature ¹⁶⁰.

Globalement, et malgré les limites intrinsèques des études *in vitro*, ces résultats démontrent que le Cd impacte significativement le profil d'expression des miARN dans les cellules tubulaires proximales rénales et suggèrent leur implication dans la pathogenèse des lésions rénales induites par le Cd. De plus, au vu de l'abondante littérature concernant la fonction des 38 miARN et des gènes qu'ils ciblent, notre étude suggère leur rôle majeur dans la régulation de processus cellulaires clés tels que, le stress oxydant, l'inflammation et la mort cellulaire par apoptose (**Tableau 3**).

Par exemple, miR-182-5p et miR-27a-3p sont connus pour être impliqués dans les processus moléculaires relatifs au stress oxydant. En effet, il a été démontré que miR-182-5p réprime le stress oxydant dans les cellules RAW264.7, un modèle cellulaire d'athérosclérose, exposées à des lipoprotéines de basse densité oxydées ²⁰⁶. miR-27a-3p, quant à lui, a récemment été décrit comme étant impliqué dans la régulation du facteur de transcription Nuclear factor erythroid-2-related factor 2 (NRF2), une protéine clé du stress oxydant ¹⁸³. Par ailleurs, notre étude suggère qu'une grande proportion des gènes cibles des miARN modulés en réponse au Cd sont liés à l'apoptose dont miR-21-5p et les membres de la famille miR-30 ³²²⁻³²⁴.

Au total, l'ensemble de ces processus cellulaires joue un rôle dans le remodelage tissulaire, notamment la fibrose et le cancer (**Tableau 3**). En effet, certains miARN peuvent agir soit comme oncogènes soit comme gènes suppresseurs de tumeurs et leur modulation contribue ainsi aux processus associés à la cancérogenèse tels que la prolifération, l'invasion, la reprogrammation métabolique ou la survie cellulaire ³²⁵. En particulier, miR-27a-3p, l'un des miARN les plus dérégulés dans cette étude, est impliqué dans la transformation maligne des cellules épithéliales pulmonaires ¹⁷⁹ et hépatiques ³²⁶ après exposition au Cd. De plus, ces

résultats sont concordants avec l'analyse des voies de signalisation référencées dans la base de données KEGG. De même, en ce qui concerne la fibrose tissulaire, notre étude met en évidence la surexpression de plusieurs miARN impliqués dans la fibrose rénale ^{149,151,327} et dénommés « fibromiR ».

Enfin, les miARN dérégulés en réponse au Cd pourraient également présenter un intérêt en tant que biomarqueurs d'exposition à cet élément. En particulier, miR-21-5p a déjà été proposé dans plusieurs études comme biomarqueur pronostique et/ou diagnostique dans le contexte de plusieurs pathologies tumorales dont le cancer du rein ³²⁸.

En conclusion, nos résultats démontrent que le Cd altère profondément l'expression des miARN des cellules épithéliales tubulaires proximales et suggèrent que l'expression aberrante des miARN pourrait jouer un rôle dans les événements moléculaires délétères se produisant lors d'une lésion rénale induite par le Cd. La caractérisation des interactions entre les miARN et leurs ARNm cibles permettra à terme de mieux comprendre les mécanismes toxiques induits par le Cd et pourrait conduire à l'identification de nouveaux marqueurs de stress environnemental.

Ces travaux ont fait l'objet d'une publication présentée en **Annexe 2** (page 178).

Lemaire, J. ; Van der Hauwaert, C. ; Savary, G. ; Dewaeles, E. ; Perrais, M. ; Lo Guidice, J.M. ; *et al.* 2020. Cadmium-Induced Renal Cell Toxicity Is Associated With MicroRNA Deregulation. International Journal of Toxicology : 109158181989903. doi : 10.1177/1091581819899039.

B. Axe 2 : rôle et potentiel thérapeutique de l'ARN non codant polycistronique MIR17HG dans les CPNPC

Cancer du poumon

a) Epidémiologie

Le cancer du poumon est la première cause de mortalité par cancer en France et dans le monde. En effet, le taux de survie à cinq ans est inférieur à 15% ³²⁹. En 2018, il comptait plus de deux millions de nouveaux cas et environ 1,8 millions de cas de décès dans le monde ³³⁰.

Chez l'homme, il s'agit du cancer le plus fréquemment diagnostiqué, en particulier en Europe de l'Est, en Asie occidentale et en Afrique du Nord ³³¹ alors que chez la femme, il représente le troisième cancer le plus communément retrouvé en Amérique du Nord, en Europe du Nord et en Europe de l'Est. La répartition géographique du cancer du poumon est souvent corrélée à l'exposition à certains facteurs de risque notamment le tabac, l'industrialisation et la pollution environnementale ³³².

b) Classification anatomo-pathologique

Les carcinomes pulmonaires se déclinent en deux grands groupes, le CPNPC et le CPPC (cancer du poumon à petites cellules). Le CPNPC est la forme histologique la plus courante, regroupant plus de 85% des cancers pulmonaires ³²⁹. Le CPNPC peut se présenter sous différents sous-types histologiques, notamment les adénocarcinomes (50%), les carcinomes épidermoïdes (35%) et les carcinomes à cellules larges (15%). Les CPPC, quant à eux, sont les plus agressifs et sont souvent diagnostiqués à un stade avancé ³³³.

c) Altérations moléculaires des CPNPC

Les progrès dans la compréhension des mécanismes moléculaires à l'origine des CPNPC ont permis l'identification de plusieurs altérations moléculaires spécifiques (**Tableau 5**) ^{334–339}.

Tableau 5 : Altérations moléculaires dans les CPNPC.

Gène	Chromosome	Fréquence (%)	Principales altérations moléculaires
EGFR	7p12	10-15	délétion exon 19 (45%), exon 21 L858R (40%), exon 20 T790M
			amplification
KRAS	12p12.1	20-25	G12C (forme majoritaire), G12D, G12V, G12R, G13D
MEK1	15q22.1	1	E56P, K57N, D67N
HER2	17q12	2	p.A775 G776insYVMA dans exon 20
			amplification
ALK (fusion)	2p23	4-7	EML4-ALK, TGF-ALK ou KIF5B-ALK
ROS1 (fusion)	6q22	1-2	CD74-ROS1, EZR-ROS1, SLC34A2-ROS1, SDC4-ROS1
RET (fusion)	10q11.2	1-2	KIF5B-RET, CCDC6-RET ou NCOA4-RET
FGFR1	8p12	1	amplification
NRF2	2q31	1-2	mutation Exon 2
DDR2	1q23.3	1	mutation R105S et N456S
PIK3CA	3q26.3	1-3	E542K, E545K, H1047R
		6	amplification
BRAF (mutation)	7q34	2	V600E, G465V et L596R
PTEN	10q23.3	8-20	délétion

		2	mutation exon 9, 20
MET	7q31	3-21	amplification
		<5	saut de l'exon 14

Parmi les principales altérations moléculaires décrites dans les CPNPC, on retrouve des altérations structurales des gènes *DDR2* (Discoidin domain-containing receptor 2), *EGFR* (Epidermal Growth Factor Receptor), *HER2* (Erb-B2 receptor tyrosine kinase 2), *MET*, *PI3KCA* (Phosphatidylinositol-4, 5-bisphosphate 3-Kinase Catalytic subunit Alpha), *KRAS*, *BRAF*, *ALK* (Anaplastic Lymphoma receptor tyrosine Kinase) et *ROS1*.

Parmi les plus représentées, on trouve les mutations du récepteur à l'EGF ou encore celles affectant le gène *KRAS* (**Figure 17** et **Figure 18**)³⁴⁰.

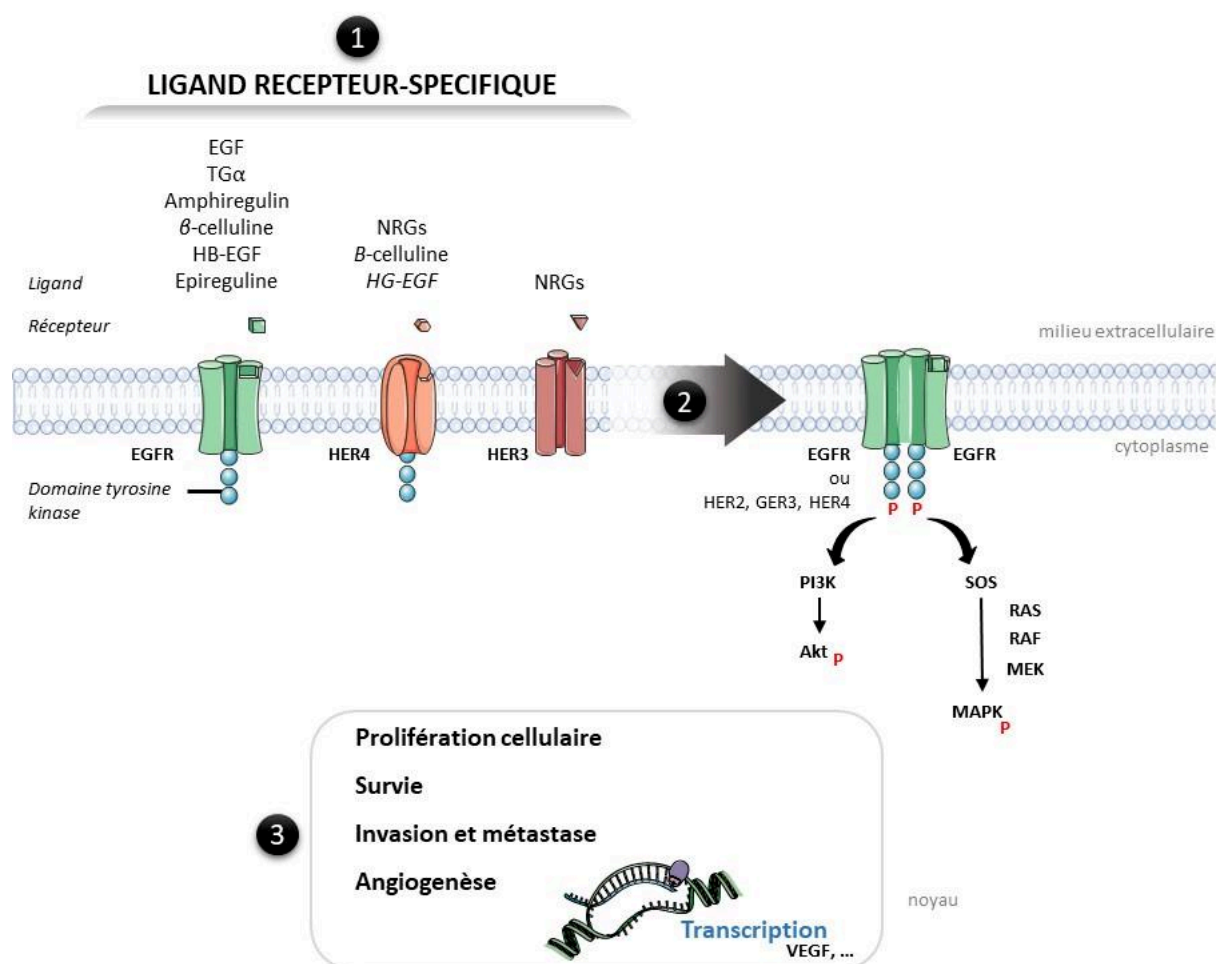


Figure 17 : Voies de signalisation cellulaire du récepteur à l'EGF.

1. Liaison du ligand sur le récepteur. **2.** Dimérisation du récepteur. **3.** Modulation des voies de signalisations associées à la prolifération cellulaire, la survie cellulaire, l'invasion, les capacités métastatiques ou encore l'angiogenèse.

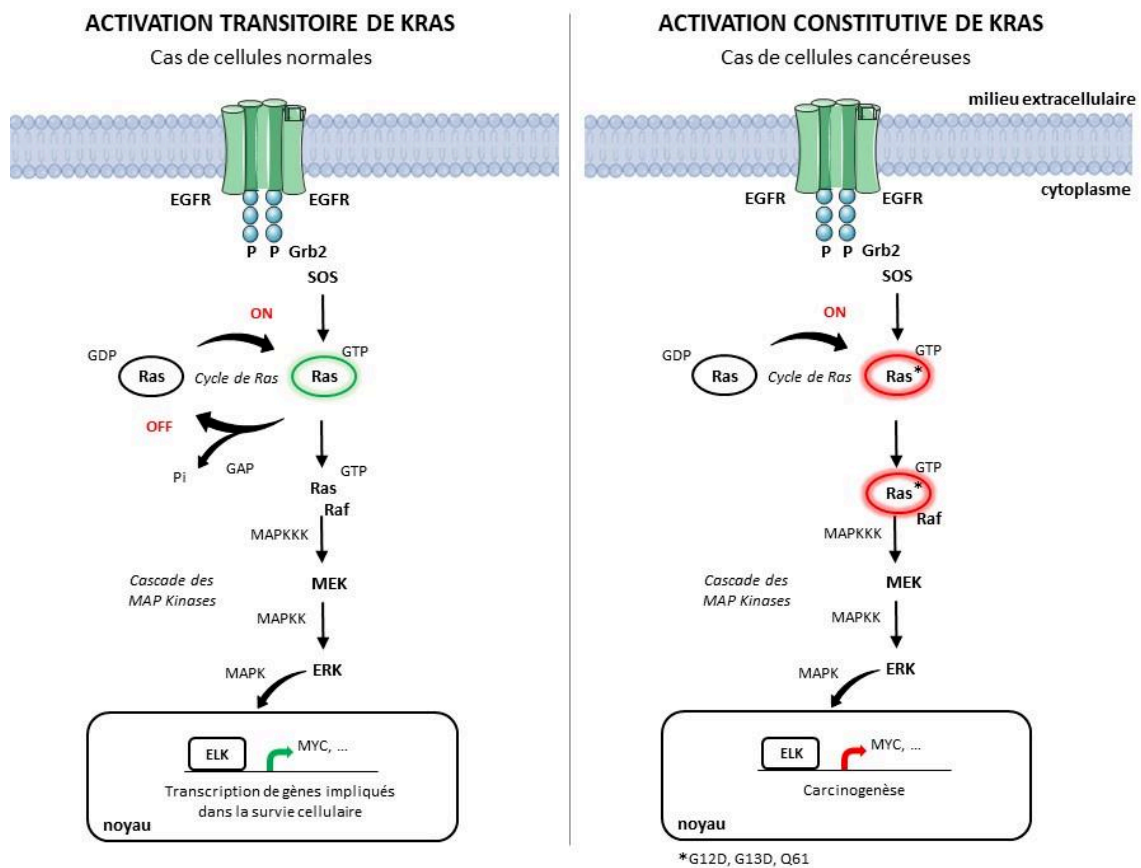


Figure 18 : Altération du gène *KRAS* et impact sur le devenir de la cellule.

Dans le cas normal, Ras peut revenir à un état inactif en perdant un phosphate P_i . Dans le cas pathologique, Ras a perdu cette fonction et est activé constitutivement. La cellule reçoit des signaux aberrants des voies de signalisation impliquées dans des processus physiologiques tels que la prolifération et la survie, cela menant à un phénotype oncogénique.

GRB2 : Growth factor receptor-bound protein 2 ; SOS : son of sevenless.

d) Stades du CPNPC

Les CPNPC sont classés au diagnostic en quatre principaux stades en fonction de la taille en centimètre de la tumeur et du degré d'invasion dans d'autres organes. Des données

supplémentaires liées à la présence d'embolies dans les ganglions lymphatiques et la présence de tumeurs secondaires ou métastases complètent le diagnostic. Chaque stade est associé à des lignes thérapeutiques bien définies ³⁴¹.

e) Stratégies thérapeutiques

Dans les premiers stades de CPNPC, I à II, le traitement proposé est la résection chirurgicale, une lobectomie ou une pneumonectomie, ainsi qu'un curage ganglionnaire. Dans les cas d'une exérèse incomplète ou d'une atteinte tissulaire plus profonde, le traitement de référence est complété par une radiothérapie. Pour ces stades précoces, l'utilisation de molécules chimiothérapeutiques est nécessaire dans le cas où la tumeur a une taille supérieure à 3 cm ou lorsque des ganglions sont atteints. La chirurgie reste le meilleur traitement curatif en termes de survie du patient ³⁴².

Parfois, quand la tumeur n'est pas accessible à la chirurgie ou que la maladie s'est diffusée localement (stade III), une chimiothérapie à base de sels de platine, notamment le cisplatine, est mise en route. Au stade IV, la stratégie thérapeutique dépend de la présence d'altérations moléculaires au niveau tumoral et repose sur l'utilisation de thérapies ciblées ou de chimiothérapies conventionnelles le plus souvent à base de cisplatine (**Figure 19**) ³⁴³.

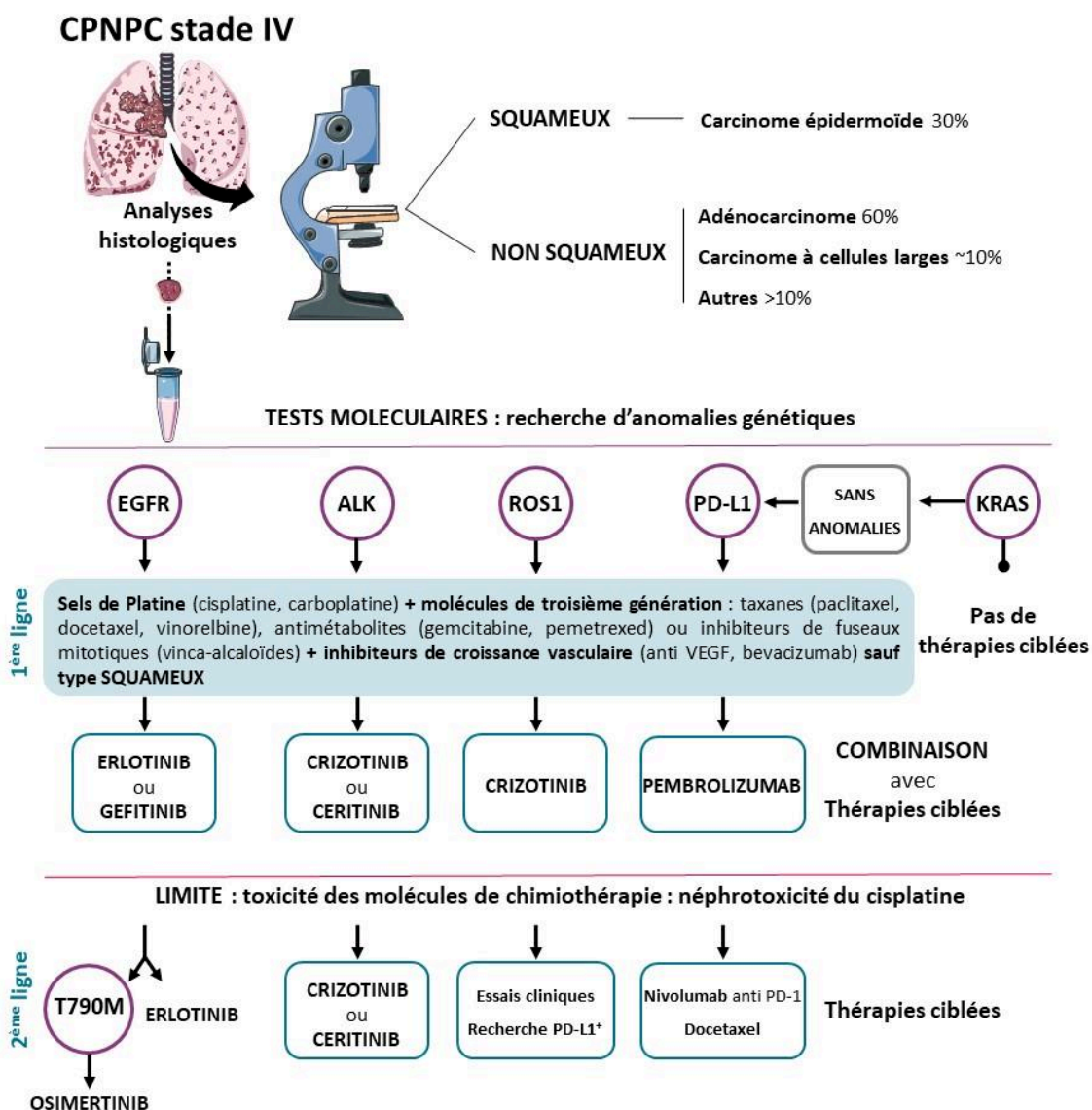


Figure 19 : Introduction des thérapies dans les traitements du CPNPC, stade IV.

Adapté de Lemjabbar-Alaoui (2015), Ettinger (2017) et Griffin et Ramirez (2017) ^{343–345}.

Une analyse histologique permet de déterminer le sous-type de cancer pulmonaire. Les tests moléculaires quant à eux, permettent d'identifier la présence d'anomalies génétiques permettant l'utilisation de thérapies ciblées.

PD-L1 (Programmed death-ligand 1), VEGF (Vascular endothelial growth factor) et PD-1 (Programmed cell death 1).

Ainsi, la prise en charge thérapeutique fait intervenir plusieurs molécules dont les différentes propriétés sont combinées pour maximiser l'effet antitumoral. Le cisplatine reste le traitement de première ligne souvent proposé ³⁴⁶.

Cisplatine

a) Historique

En 1884, Michele Peyrone découvre un composé chloré qu'il nomme le chlorure de Peyrone mieux connu actuellement sous l'appellation cisplatine (*cis*-diamine-dichloro-platine, CDDP)³⁴⁷. Son potentiel cytotoxique a été mis en évidence, de façon fortuite, en 1965 par Barnett Rosenberg lors d'une étude sur la bactérie *Escherichia coli* et les effets des champs magnétiques sur sa croissance³⁴⁸. Plus précisément, l'étude utilisait des électrodes de platine immergées dans une solution de chlorure d'ammonium. La corrosion des électrodes libère dans le milieu de montage du platine. L'ensemble platine – chlorure d'ammonium forme un complexe : le dichlorodiamineplatine, toxique pour les bactéries. L'effet antitumoral du cisplatine a été démontré en 1969 lors d'une étude sur la leucémie lymphocytaire dans un modèle murin³⁴⁸. Le cisplatine reçoit une autorisation de mise sur le marché (AMM) aux Etats-Unis par la Food and Drug Administration (FDA) en 1978.

Désormais utilisé dans de nombreuses stratégies thérapeutiques pour son efficacité, il est employé dans différents types de cancers, en particulier les cancers pulmonaires³⁴⁹.

b) Mode d'action du cisplatine

Le cisplatine est l'un des sels de platine les plus couramment utilisés en oncologie pulmonaire. La structure plane de la molécule est basée sur un atome central de platine portant deux groupements amine en *cis* et deux groupements chlorure. Le cisplatine alors inerte devient hautement actif au contact de l'eau et dévoile son action cytotoxique principalement par la formation d'adduits au niveau de la molécule d'ADN (**Figure 20**).

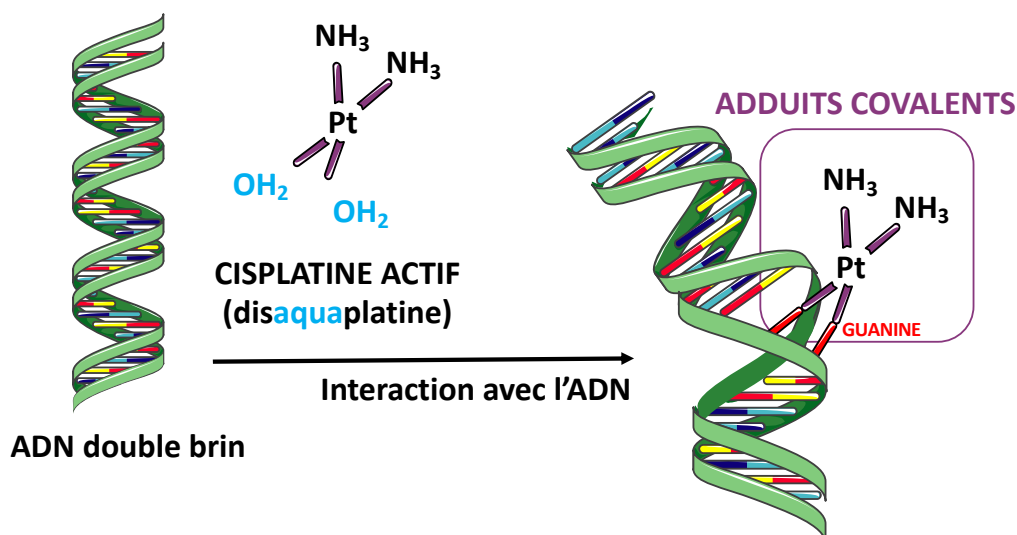


Figure 20 : Structure, activation du cisplatine et mécanisme d'action sur l'ADN.

Dans le milieu aqueux intracellulaire, les atomes de chlorure sont libérés de l'atome central de platine. Des molécules d'eau substituent les groupements chlore. Les ions chlorure sont éliminés dans l'eau. Le cisplatine est alors chargé positivement. La structure dicationique interagit avec les sites nucléophiles de l'ADN. Très rigide, la géométrie du cisplatine explique la déformation imposée à la double hélice.

Le cisplatine est un agent alkylant, formant des liaisons covalentes avec la chaîne d'ADN à l'origine d'adduits qui déforment la double hélice d'ADN et bloquent les processus de transcription et de réplication, conduisant à la mort de la cellule ³⁴⁷. Malgré ce potentiel thérapeutique, l'utilisation de cette molécule présente certaines limites dont des effets toxiques et une chimiorésistance.

c) Anomalies de réponse au cisplatine

Les thérapies à base de cisplatine sont souvent associées à des effets toxiques pouvant interférer avec la poursuite du traitement. Les organes les plus fréquemment atteints et associés à un effet dose sont les reins, l'appareil digestif, les cellules sanguines et certaines structures de l'oreille interne ^{350,351}. De plus, un phénomène de chimiorésistance apparaît fréquemment dans le traitement des CPNPC. Les cellules cancéreuses montrent alors une capacité accrue à survivre en présence de cisplatine et le traitement devient inefficace. Parmi

les mécanismes à l'origine de ce phénomène, on retrouve en particulier la réparation des adduits formés, la diminution de l'accumulation intracellulaire de cisplatine, ou encore l'inactivation de sa forme réactive (**Figure 21**)^{352,353}.

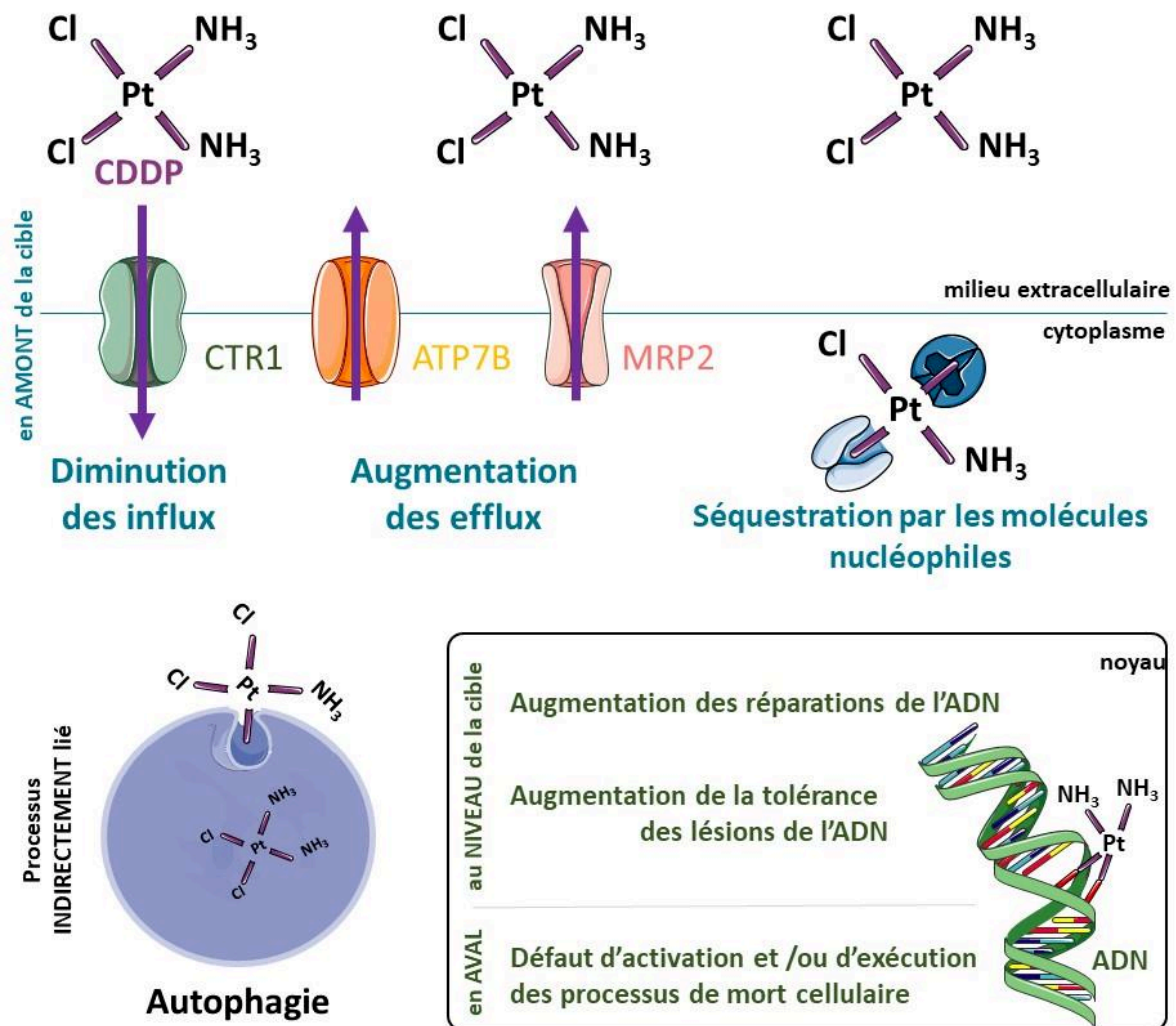


Figure 21 : Mécanismes moléculaires à l'origine de la résistance au cisplatine.

ATP7B : copper-transporting P-type adenosine triphosphate 7B , CTR1 : copper transporter receptor 1, MRP2 : multidrug resistance associated transporter protein 2.

MIR17HG et cancer

Comme décrit dans la partie introductive de ce manuscrit, les miARN, en particulier ceux codés par l'ARN polycistronique MIR17HG, présentent un intérêt majeur en cancérologie. Le polycistron MIR17HG, également appelé miR-17-92, code pour six miARN *miR-17*, *miR-18a*, *miR-19a*, *miR-20a*, *miR-19b*, et *miR-92* exprimés à partir d'une même unité

transcriptionnelle située dans le troisième intron d'une phase ouverte de lecture C13orf25 (Figure 22)³⁵⁴.

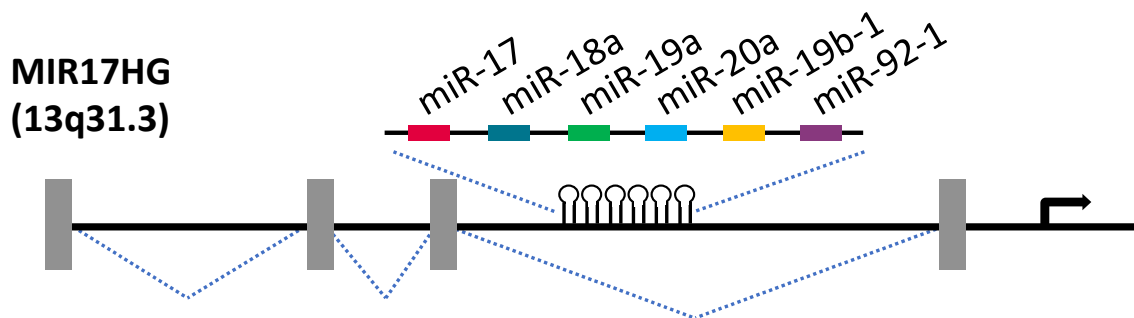


Figure 22 : Organisation en cluster de l'ARN non codant MIR17HG.

Ces miARN jouent un rôle majeur dans le développement au moins chez la souris car la délétion du locus MIR17HG chez cette espèce est responsable en particulier d'une hypoplasie pulmonaire et d'anomalies cardiaques³⁵⁵. De plus, l'ARN polycistronique MIR17HG joue un rôle important dans la lymphopoïèse car son inactivation dans les cellules B progénitrices conduit à une diminution de la demi-vie des lymphocytes B alors que sa surexpression induit leur prolifération³⁵⁶. L'ARN polycistronique miR-17-92 est également retrouvé sous l'appellation oncomiR-1 car les miARN qui lui sont associés sont les premiers à avoir été décrits comme ayant une activité oncogénique³⁵⁷. En effet, le locus MIR17HG est localisé la région 13q31-32 qui est fréquemment amplifiée dans plusieurs types de lymphomes¹⁰ et de cancers du poumon³⁵⁸ et les miARN qu'il produit sont surexprimés dans de nombreux cancers³⁵⁹. De plus, le potentiel oncogénique du polycistron miR-17-92 a été démontré dans différents modèles murins tels que la souris Eμ-Myc qui développe un lymphome³⁶⁰.

Sur le plan mécanistique, plusieurs cibles régulées par les miARN issus de l'ARN polycistronique MIR17HG ont été identifiées et validées expérimentalement. Le facteur de transcription E2F1, une protéine impliquée dans le contrôle de la transition G1/S du cycle

cellulaire, est une des premières cibles ayant été caractérisée ³⁸. De plus, comme E2F1 induit la transcription de miR-17-92, il existe ainsi une boucle d'autorégulation entre ce facteur de transcription et le polycistron MIR17HG ³⁷. Le facteur de transcription c-Myc, lui aussi engagé dans le contrôle de la transition G1/S, est également capable de stimuler de manière directe l'expression du polycistron miR-17-92 ³⁵⁹. Par la suite, d'autres cibles codant pour des inhibiteurs du cycle cellulaire telles que CDKN1A/p21 ou Rbl2/p130 ont également été identifiées ainsi que l'inhibiteur de la voie PI3 kinase et d'Akt/PKB, PTEN, qui module la croissance cellulaire. Plusieurs études ont aussi montré que l'ARN polycistronique MIR17HG module le processus apoptotique notamment en ciblant le facteur pro-apoptotique BIM ³⁵⁷. Ces études suggèrent en particulier que l'inhibition de BIM par les miARN du polycistron miR-17-92 participerait au processus de lymphomagenèse dans le modèle murin Eμ-Myc ³⁶⁰. Enfin, certaines études ont proposé un rôle plus accessoire de ce cluster de miARN dans d'autres processus importants du développement tumoral tels que l'angiogenèse et la formation de métastases. Ainsi, le polycistron miR-17-92 occupe une place centrale dans le processus oncogénique en favorisant principalement la prolifération cellulaire et l'échappement à l'apoptose (**Figure 23**).

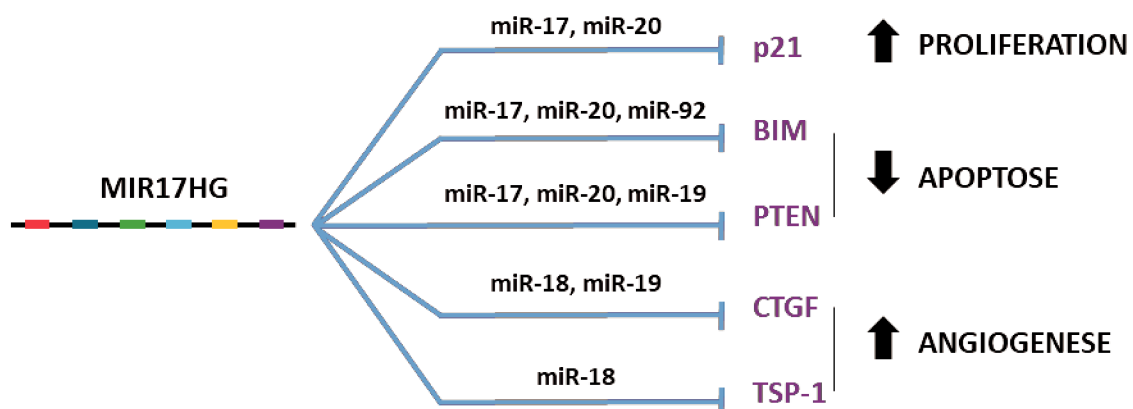


Figure 23 : Rôle du cluster MIR17HG dans le développement tumoral.
D'après Olive (2010) ³⁵⁷.

Objectifs

La découverte de nouvelles cibles thérapeutiques dans les CPNPC est un enjeu majeur des projets de recherche actuels. En particulier, le rôle clé exercé par les miARN, en particulier ceux produits par l'ARN polycistronique MIR17HG, au cours du développement tumoral démontre leur intérêt en tant que nouvelles cibles thérapeutiques à visée anti-cancéreuse ²⁴. Ainsi, notre étude a consisté à démontrer l'intérêt thérapeutique de molécules oligonucléotidiques permettant d'interférer avec la fonction de MIR17HG dans les CPNPC.

Matériel et Méthodes

a) Culture cellulaire

Les cellules d'adénocarcinome pulmonaire A549 (ATCC (American Type Culture Collection)) ont été cultivées dans du milieu DMEM-Glutamax (Thermofisher) supplémenté avec 10% de SVF (sérum de veau fœtal) et 1% de pénicilline/streptomycine. Les cellules d'adénocarcinome pulmonaire PC-9 (Sigma-Aldrich) et H1975 (ATCC) ont été cultivées dans du milieu RPMI-1640 (Thermofisher) supplémenté avec 10% de SVF, 1% de pénicilline/streptomycine et 1% de glutamine. Les cellules ont été cultivées à 37°C dans une atmosphère humidifiée et à 5% de CO₂.

b) Criblage fonctionnel

Une banque de 138 inhibiteurs de type LNA (Locked Nucleic Acid) (Exiqon, miRbase version 10) dirigés contre les miARN les plus exprimés dans la lignée d'adénocarcinome pulmonaire A549³⁶¹ a été transfectée dans ces cellules à une concentration finale de 10 nM, en plaques 96 puits (**Tableau 6**). 48 heures après transfection, les cellules ont été exposées au cisplatine

à 60 μ M, correspondant à deux fois la dose DL50 (dose létale de 50% des cellules) pendant 3 jours. La viabilité cellulaire a été évaluée par quantification de l'ATP en utilisant le kit CellTiterGlo (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. Le test statistique Two-tailed student t a été utilisé pour les comparaisons simples. Les valeurs $p < 0,05$ ont été considérées significatives.

Les miARN candidats ont été sélectionnés sur des critères statistiques ($p < 0,01$) et en fonction du niveau de sensibilité induite.

Tableau 6 : Liste des 138 microARN les plus exprimés dans la lignée d'adénocarcinome pulmonaire A549.

	miARN		miARN
1	hsa-miR-151-3p	73	hsa-miR-22
2	hsa-miR-16-2	74	hsa-miR-19a
3	hsa-miR-193b	75	hsa-miR-18a
4	hsa-miR-21	76	hsa-miR-29a
5	hsa-miR-24-2	77	hsa-miR-27b
6	hsa-miR-28-3p	78	hsa-miR-19b
7	hsa-miR-345	79	hsa-miR-200b
8	hsa-miR-34a	80	hsa-miR-196a
9	hsa-miR-34b	81	hsa-miR-23b
10	hsa-miR-374a	82	hsa-miR-424
11	hsa-miR-424	83	hsa-miR-34a
12	hsa-miR-452	84	hsa-miR-374b
13	hsa-miR-452	85	hsa-miR-30e
14	hsa-miR-454	86	hsa-miR-532-5p
15	hsa-miR-455-3p	87	hsa-miR-484
16	hsa-miR-500a	88	hsa-miR-340
17	hsa-miR-550a	89	hsa-miR-31
18	hsa-miR-597	90	hsa-miR-331-3p
19	hsa-miR-660	91	hsa-miR-423-3p
20	hsa-miR-935	92	hsa-miR-30c
21	hsa-miR-1180	93	hsa-miR-30d
22	hsa-let-7i	94	hsa-miR-324-5p
23	hsa-let-7c	95	hsa-miR-423-5p
24	hsa-let-7b	96	hsa-miR-361-5p
25	hsa-miR-151-5p	97	hsa-miR-450a

26	hsa-let-7a
27	hsa-miR-10a
28	hsa-miR-148b
29	hsa-miR-143
30	hsa-miR-15a
31	hsa-miR-181b
32	hsa-let-7a
33	hsa-let-7d
34	hsa-let-7f
35	hsa-let-7i
36	hsa-miR-125a-5p
37	hsa-miR-15b
38	hsa-miR-181a
39	hsa-miR-128
40	hsa-miR-125b
41	hsa-miR-126
42	hsa-miR-100
43	hsa-miR-101
44	hsa-miR-140-3p
45	hsa-miR-106b
46	hsa-miR-15b
47	hsa-miR-138
48	hsa-miR-16
49	hsa-miR-146b-5p
50	hsa-let-7g
51	hsa-miR-106b
52	hsa-miR-25
53	hsa-miR-27a
54	hsa-miR-185
55	hsa-miR-224
56	hsa-miR-27b
57	hsa-miR-28-5p
58	hsa-miR-26b
59	hsa-miR-194
60	hsa-miR-210
61	hsa-miR-26a
62	hsa-miR-191
63	hsa-miR-200a
64	hsa-miR-30a
65	hsa-miR-29b
66	hsa-miR-22
67	hsa-miR-182
68	hsa-miR-20a
69	hsa-miR-222
70	hsa-miR-221

98	hsa-miR-30e
99	hsa-miR-335
100	hsa-miR-425
101	hsa-miR-339-5p
102	hsa-miR-320a
103	hsa-miR-320a
104	hsa-miR-378
105	hsa-miR-7
106	hsa-miR-96
107	hsa-miR-9
108	hsa-miR-582-5p
109	hsa-miR-99a
110	hsa-miR-93
111	hsa-miR-99b
112	hsa-miR-671-5p
113	hsa-miR-103-2
114	hsa-miR-7-1
115	hsa-miR-92a-3p
116	hsa-miR-652
117	hsa-miR-23c
118	hsa-miR-98
119	hsa-miR-17
120	hsa-miR-1260
121	hsa-miR-103
122	hsa-miR-320b
123	hsa-miR-224
124	hsa-miR-449c
125	hsa-miR-500b
126	hsa-miR-3182
127	hsa-miR-29c
128	hsa-miR-365
129	hsa-miR-92b
130	hsa-miR-339-3p
131	hsa-let-7e
132	hsa-miR-342-3p
133	hsa-miR-140-5p
134	hsa-miR-24
135	hsa-miR-590-3p
136	hsa-miR-192
137	hsa-miR-31
138	hsa-miR-30b

71	hsa-miR-21
72	hsa-miR-183

c) Transfection

Les cellules A549, PC-9 et H1975 ont été cultivées en plaques 6 puits (150000 cellules/puits). Après 24h de culture, un inhibiteur de miR-92a-3p, le LNA-miR-92a-3p (Qiagen) ainsi qu'un LNA contrôle, ou un précurseur du miR-92a-3p, (pré-miR-92a-3p, Thermofisher) ainsi qu'un pré-miR contrôle ont été transfectés. Les molécules ont été transfectées à une concentration de 10 nM pour les inhibiteurs et 1,5 nM pour les pré-miR à l'aide de la lipofectamine RNAimax (Life Technologies) dans du milieu DMEM non supplémenté ou du RPMI-1640 supplémenté avec 10% de SVF.

Les GapmeR ciblant MIR17HG ou un GapmeR contrôle (Qiagen) (**Tableau 7**), ont été transfectés comme décrit ci-dessus, à une concentration finale de 25 nM.

Tableau 7 : ID et séquence des GapmeR.

ID des GapmeR	Séquence des GapmeR
LG00197374-DDA (GapmeR 1)	3'-AGATACACAGTTAGGT-5'
LG00197375-DDA (GapmeR 2)	3'-TGTGATCCAATCTGGT-5'
LG00197376-DDA (GapmeR 3)	3'-GTCAAAGTGCTTACAG-5'
LG00197377-DDA (GapmeR 4)	3'-AGGACAGTATGTGCAC-5'
G00197378-DDA (GapmeR 5)	3'-TTATTGTGTCGATGTA-5'
LG00197379-DDA (GapmeR 6)	3'-ATGACTTCTAAAGCTG-5'
LG00197380-DDA (GapmeR 7)	3'-GTGTGACTGAGGACTG-5'
LG00197381-DDA (GapmeR 8)	3'-CTTAAAAAGTTCCGGC-5'
LG00197382-DDA (GapmeR 9)	3'-GACTAAATTGCCTTTA-5'

LG00197383-DDA (Gp 10)	3'-GTTTTTGTCTCTAGCC-5'
------------------------	------------------------

d) Exposition au cisplatine

48 heures après transfection, les cellules ont été exposées 24h au cisplatine à une concentration finale de 60 μ M de cisplatine pour les cellules A549 et 20 μ M pour les cellules PC-9 et H1975.

e) Modèle murin d'adénocarcinome pulmonaire CCSP-Cre-LSL-Kras^{G12D}

L'établissement des tumeurs pulmonaires a été réalisé par injection intrapéritonéale (i.p.) de 0,25 mg de tamoxifène (T5648, Sigma-Aldrich) par gramme pendant 5 jours à intervalle de 24 heures chez des souris mâles ou femelles âgées de 8 à 12 semaines. Le tamoxifène (50 mg) a été dissous dans 250 μ L d'éthanol absolu puis agité vigoureusement. Après ajout de 4750 μ L d'huile de maïs (C8267, Sigma-Aldrich), la solution a été incubée 5 minutes au bain marie à 37°C puis soumise à une sonication de 5 minutes. Après établissement des tumeurs (15 semaines), les souris ont soit été sacrifiées par dislocation cervicale ou ont reçu une cure de cisplatine correspondant à l'administration i.p. d'une dose unique de cisplatine (7 mg/kg) ou de PBS. Les souris ont été sacrifiées par dislocation cervicale sept jours après injection. Pour les analyses histologiques, les poumons ont été perfusés au formol puis inclus en paraffine. Pour les analyses en biologie moléculaire, les poumons prélevés ont été congelés à sec.

Tous les protocoles de soins et d'expérimentation ont été approuvés par le comité d'éthique en expérimentation animale (CEEA) de l'Université de Lille (numéro de protocole : CEEA17098-2018101215473925).

f) Extraction des ARN

Pour les expérimentations *in vitro*, les ARN totaux ont été extraits à l'aide du kit miRNeasy Mini (Qiagen) selon les recommandations du fournisseur.

Pour les expérimentations *in vivo*, les ARN totaux tissulaires ont été extraits par broyage des tissus dans du Trizol (Thermofisher) à l'aide du dissociateur Gentle MACS (Miltenyi Biotec). Après ajout de chloroforme, les solutions ont été mélangées grâce à un agitateur à vortex pendant au moins 15 secondes, puis incubées 3 minutes à température ambiante. Après centrifugation à 4000 g à 4°C pendant 45 minutes, la phase aqueuse contenant les ARN a été récupérée. Après ajout d'isopropanol (volume/volume), les échantillons sont à nouveau centrifugés pendant 45 minutes à 4000 g à 4°C. Le surnageant a été éliminé et le culot a été lavé deux fois à l'éthanol 75% et centrifugé 15 minutes à 4000 g à 4°C. Les culots sont séchés à l'air libre puis élués dans 300 µL d'eau RNase-free. Le dosage des ARN totaux est réalisé par spectrophotométrie Spark (260 nm, Tecan).

g) Expression des miARN matures

Pour les ARN totaux extraits à partir des cellules, la transcription inverse des miARN a été réalisée en utilisant le kit RT LNA miRCURY (Qiagen). La qPCR a été réalisée en utilisant le kit miRCURY LNA Probe PCR (Qiagen). Les amorces suivantes (miRCURY LNA miRNA PCR Assays, Qiagen) ont été utilisées : miR-17-5p (YP02119304), miR-18a-5p (YP00204207), miR-19a-3p

(YP00205862), miR-19b-3p (YP00204450), miR-20a-5p (YP00204292), miR-92a-3p (YP00204258) et la sonde RNU44 (YP00203902) a été utilisée comme normalisateur.

Pour les ARN totaux tissulaires, la rétro-transcription a été réalisée à l'aide du kit microARN Reverse Transcription (Thermofisher). La PCR en temps réel a été réalisée avec le tampon TaqMan Universal MasterMixII, no UNG (Thermofisher) et la sonde Taqman spécifique miR-92a-3p (431, Thermofisher). La sonde sno-251 (1236, Thermofisher) a été utilisée comme référence.

Les réactions d'amplification ont été réalisées sur l'appareil Step One Plus Real-Time PCR (Thermofisher). L'analyse des données est effectuée par la méthode comparative des $\Delta\Delta Ct$. 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 microARN de référence par la formule suivante : $\Delta Ct = Ct \text{ miARN d'intérêt} - Ct \text{ référence}$. La relation mathématique $2^{-\Delta\Delta Ct}$ dans laquelle $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct \text{ échantillon cible} - \Delta Ct \text{ échantillon contrôle}$, permet d'exprimer les niveaux d'expression relative (RQ) d'un échantillon ³⁶².

h) Expression des ARNm

La rétro-transcription des ARNm a été réalisée avec le kit high-capacity complementary DNA reverse transcription (Thermofisher) suivant les recommandations du fournisseur.

La PCR en temps réel a été réalisée avec du tampon Master Mix Fast SYBR™ Green (Thermofisher) et les amorces de MIR17HG (IDT). Le gène PPIA (IDT) a été utilisé comme gène de référence (**Tableau 8**).

Tableau 8 : séquences des amorces utilisées en PCR en temps réel pour l'expression des ARNm.

Nom de l'amorce	Séquences de l'amorce
<u>Séquences de l'amorce hsa - MIR17HG</u>	sens : CTGCTTGCAAAGTGTTGGTG antisens : AGGCTGCATTTTGTTCAGGAG
<u>Séquences de l'amorce hsa - PPIA</u>	sens : GACCCAACACAAATGGTTCC antisens : GGCCTCCACAATATTCATGC
<u>Séquences de l'amorce mmu - MIR17HG</u>	sens : AACAGCTCAGTTGGGCAAG antisens : GTGCACAGAGCAAAGCAATC
<u>Séquences de l'amorce mmu - PPIA</u>	sens : GACCAAACACAAACGGTTCC antisens : TTCACCTTCCCAAAGACCAC

La réaction d'amplification a été réalisée grâce au StepOne PlusReal Time PCR System (Thermofisher). L'analyse des données est effectuée par la méthode comparative des $\Delta\Delta C_t$ décrite ci-dessus pour les miARN.

i) Extraction protéique et Western Blot

Les protéines totales ont été obtenues par lyse des cellules de 2 puits d'une plaque 6 puits dans du tampon RIPA (radioimmunoprecipitation assay buffer, Sigma-Aldrich) contenant un mélange d'inhibiteurs de protéases et de phosphatases (Roche) et après sonication pendant 20 secondes. La concentration en protéines a été mesurée grâce au kit BCA protein assay (Pierce). Vingt microgrammes de protéines ont été séparées par électrophorèse dans un gel

de SDS-polyacrylamide (Sodium dodecyl sulfate - polyacrylamide) 4% - 12% BisTris NuPAGE gel (Thermofisher) ou 7% Tris acetate NuPAGE gel (Thermofisher) puis transférées sur une membrane de nitrocellulose en utilisant le système de transfert Trans-Blot Turbo (BioRad). Après blocage des sites aspécifiques, les membranes ont été incubées, sur la nuit à 4°C, avec des solutions d'anticorps primaires dirigés contre Akt (9272 ; Cell Signaling ; 1/1000^e) ; Akt phosphorylée (Ser473) (9271 ; Cell Signaling ; 1/1000^e), Bim (2933 ; Cell Signaling ; 1/1000^e), caspase 3 clivée (Asp175) (9661 ; Cell Signaling ; 1/500^e), Parp-1 clivée, (5625 ; Cell Signaling ; 1/1000^e) et PTEN (9188 ; Cell Signaling ; 1/1000^e). Afin de s'assurer qu'une quantité égale de protéines a été utilisée, les membranes ont été incubées avec une solution d'anticorps primaires dirigés contre HSP-60 (sc-1052 ; Santa Cruz ; 1/4000^e). Les membranes ont ensuite été incubées avec une solution d'anticorps secondaires conjugués à une peroxydase (Sigma-Aldrich, 1/10000^e) 45 minutes à température ambiante.

Les bandes protéiques ont été visualisées grâce au réactif ECL Western blotting Select (GE Healthcare) à l'aide de l'imageur LAS4000. L'analyse des images a été réalisée grâce au logiciel ImageJ.

j) Immunofluorescence

Les cellules A549 ont été cultivées sur des lamelles de verre de 16 mm de diamètre placées au fond de plaques 24 puits (10000 cellules/puits). Les lamelles ont été rincées dans une solution saline de phosphate tamponnée (PBS). Les cellules ont été fixées par du paraformaldéhyde 4% pendant 15 minutes, perméabilisées grâce à une solution de Triton à 0,1% pendant 10 minutes puis bloquées pendant 30 minutes avec une solution de PBS contenant 3% BSA (Bovine Serum Albumin). L'incubation avec la solution d'anticorps primaires dirigés contre Ki-67 (AB-20.0029 ; 1/400^e) a été réalisée dans une solution de blocage contenant 1% de BSA

pendant une heure à 37°C (9129 ; Cell signaling ; 1/400^e). Après 3 lavages dans du PBS, les cellules sont incubées avec un anticorps secondaire Alexa Fluor 568 (Thermofisher) dans une solution de blocage contenant 1% de BSA pendant 45 minutes à 37°C. Enfin, les lamelles sont montées sur lame à l'aide du milieu de montage Prolong Diamond Antiface avec DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole, Thermofisher). La fluorescence est visualisée avec un microscope confocal Zeiss Spinning Disk.

k) Test de clonogénicité

Des cellules transfectées ont été transférées en plaques 6 puits (4000 cellules/puits). Quatre et sept jours après transfection, une coloration au cristal violet a été réalisée. La procédure de coloration comprend deux rinçages dans une solution de PBS suivie d'une fixation au méthanol froid pendant 10 minutes. Les cellules sont ensuite colorées 10 minutes avec la solution de cristal violet. Enfin, au moins quatre lavages successifs à l'eau pure sont réalisés.

l) RNA FISH

Les sondes Stellaris® FISH ont été conçues pour s'hybrider au transcrit primaire MIR17HG en utilisant l'outil Stellaris® RNA FISH Probe Designer (Biosearch Technologies), disponible en ligne (<https://www.biosearchtech.com/stellarisdesigner>).

Les cellules A549 sont cultivées sur µDish 35mm avec fond en verre (Ibidi) puis hybridées avec les sondes MIR17HG Stellaris® FISH probe set conjuguées CAL Fluor® Red 590 (Biosearch Technologies) selon les recommandations du fournisseur à une concentration finale de 500 nM. L'acquisition a été réalisée sur un microscope confocal inversé LSM 710 (Zeiss) couplé au module haute résolution AiryScan (Zeiss). Le logiciel Zen lite (Zeiss) a servi dans le traitement d'images.

m) Test de prolifération

Les cellules A549 sont cultivées en plaques 96 puits (2000 cellules/puits). Après trois et cinq jours de transfection, la viabilité cellulaire a été mesurée à l'aide du kit CellTiterGlo (Promega) selon les recommandations du fournisseur. La luminescence a été mesurée sur un luminomètre Varioskan (Thermofisher).

n) Histologie

La coloration à l'hématoxyline – éosine a été réalisée sur des coupes de 4 µm d'épaisseur par la plateforme d'histologie de l'Université de Lille.

o) Immunohistochimie

Après déparaffinage au xylène et réhydratation par un gradient décroissant d'éthanol, les lames ont été rincées au PBS et les sites antigéniques ont été démasqués à l'aide d'une solution de Target Retrieval (S2031, Dako), pendant 20 minutes, aux micro-ondes (700 watts). L'activité endogène des peroxydases a ensuite été bloquée grâce à une solution de peroxyde d'hydrogène (H₂O₂, référence 31642, Sigma-Aldrich) à 3% pendant 10 minutes. Les sites aspécifiques restants ont été bloqués par incubation pendant une heure dans une solution de sérum d'âne (D9663, Sigma-Aldrich). Une solution d'anticorps primaires, au 1/200^e, dirigé contre BIM (C34C5, référence 2933, Cell Signaling) est appliquée sur la nuit à 4°C. Après rinçage au PBS, l'anticorps secondaire biotinylé (anti rabbit, BA-1000, Vector) est appliqué durant une heure à température ambiante, à une dilution au 1/200^e. La localisation du complexe anticorps primaire BIM - anticorps secondaire biotinylé est révélée par l'action enzymatique des peroxydases (Vectastain, PK6100, Vector) et du chromogène, la DiAminoBenzidine (DAB, D4168, Sigma-Aldrich). Une contre coloration des noyaux est réalisée par immersion de la section en solution d'hématoxyline (H35502, Vector).

p) Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées grâce au logiciel GraphPadPrism version 6.0 pour Windows GraphPad Software. Les résultats sont présentés par la moyenne $\pm$ SEM. Le test statistique Two-tailed student t a été utilisé pour les comparaisons simples. Les valeurs $p < 0,05$ ont été considérées significatives.

Résultats

a) Identification de microARN associés à la réponse des cellules pulmonaires tumorales au cisplatine

Un criblage fonctionnel a été réalisé à l'aide d'une banque de 138 inhibiteurs de miARN ciblant les miARN les plus exprimés dans la lignée d'adénocarcinome pulmonaire A549.

Parmi l'ensemble des inhibiteurs testés, seule l'inhibition de deux miARN diminue de manière importante la viabilité cellulaire notamment en présence de cisplatine : miR-92a-3p et miR-1260 (Figure 24).

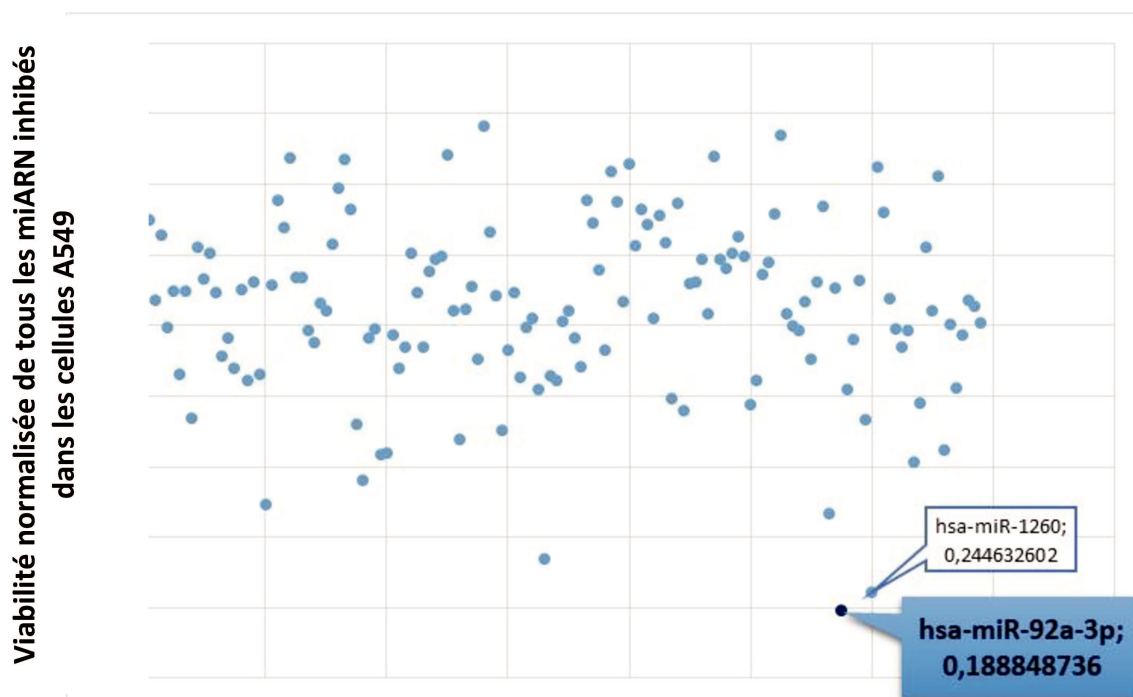


Figure 24 : miARN associés à la sensibilité au cisplatine.

Les valeurs présentées sont les moyennes des quatre valeurs issues de deux expériences indépendantes réalisées en duplicat.

Parmi, ces deux miARN candidats, nous avons choisi de nous focaliser sur miR-92a-3p dont les effets oncogéniques ont été précédemment caractérisés ³⁶³.

b) Effets pro-tumoraux de miR-92a-3p

Nous avons validé dans des lignées de CPNPC certains effets pro-tumoraux connus de miR-92a-3p, de manière indépendante, dont le processus apoptotique et la prolifération cellulaire ³⁶⁴. Les résultats montrent que l'inhibition de miR-92a-3p à l'aide d'un oligonucléotide ciblant ce miARN induit l'expression de BIM, une cible directe précédemment identifiée ³⁶⁵, et sensibilise les cellules à l'apoptose induite par le cisplatine (**Figure 25, A**). De plus, l'inhibition de miR-92a-3p dans les cellules A549 induit de façon significative une baisse de la viabilité cellulaire trois et cinq jours après transfection (**Figure 25, B**). Enfin, nos résultats montrent une baisse significative de la prolifération des cellules A549 transfectées avec un oligonucléotide dirigé contre miR-92a-3p comparé aux cellules transfectées avec un anti-miR contrôle (**Figure 25, C-D**).

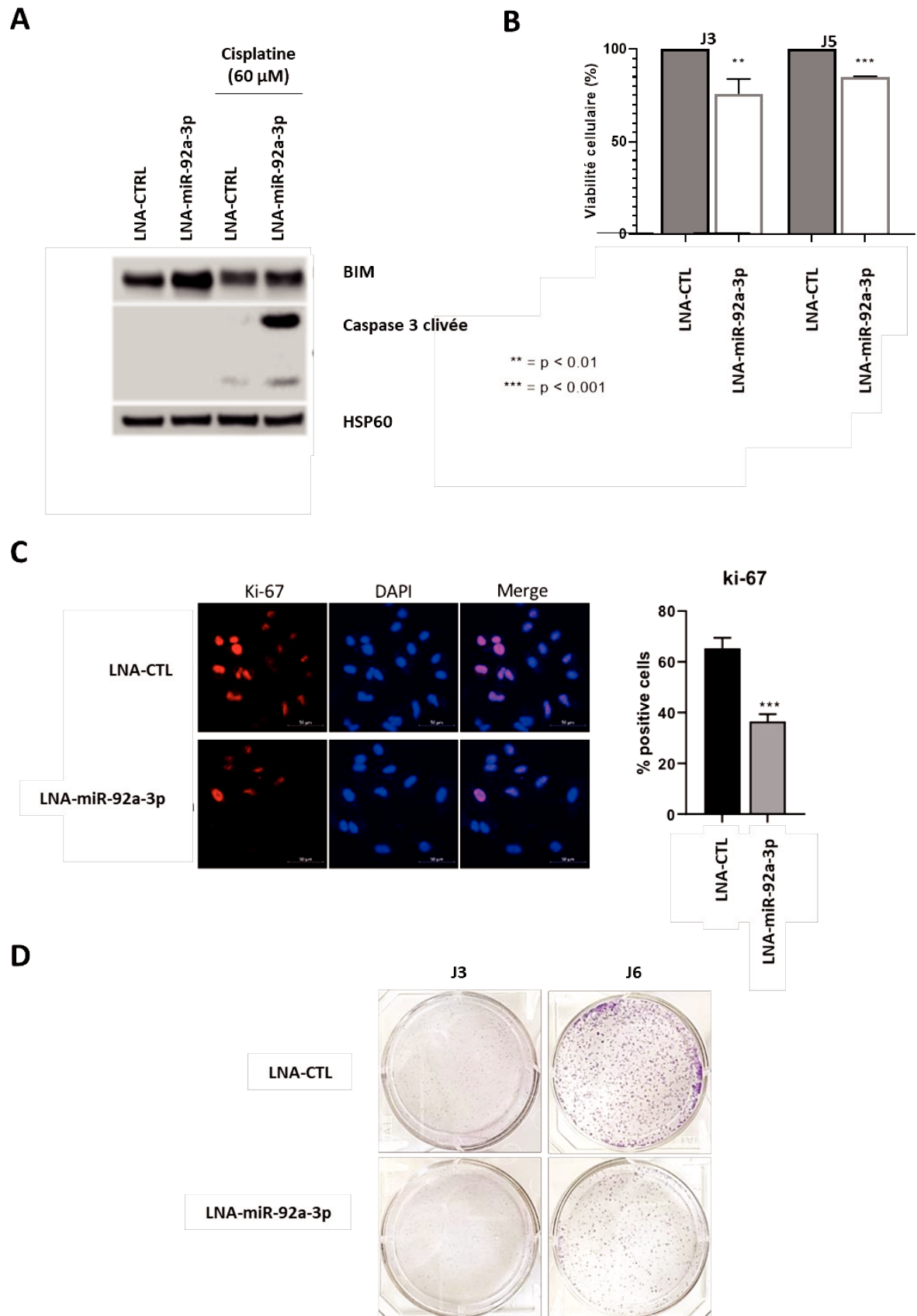


Figure 25 : Effets de l'inhibition de miR-92a-3p dans les cellules A549 sur la sensibilité au cisplatine, la viabilité cellulaire et la prolifération.

A. Analyse de l'apoptose par Western blot chez des cellules A549 transfectées 24 h avec un anti-miR-92a-3p ou un inhibiteur contrôle, exposées ou non au cisplatine (60 μ M). Les anticorps sont dirigés contre la protéine BIM et la forme clivée de la protéine caspase 3. La protéine HSP-60 a été utilisée comme contrôle interne. Les données présentées sont représentatives de 3 expériences indépendantes. **B.** Analyse de la viabilité cellulaire de cellules A549 mesurée 3 et 5 jours après transfection avec un anti-miR-92a-3p ou un inhibiteur contrôle. Les valeurs indiquées (moyennes $\pm$ SEM) dérivent de 3 expériences indépendantes. $**p < 0,01$; $***p < 0,001$. **C.** Indice de prolifération cellulaire évaluée par la détection par immunofluorescence de Ki-67 sur des cellules A549 après transfection avec un anti-miR-92a-3p ou un inhibiteur contrôle. Les données présentées sont représentatives de 3 expériences indépendantes. **D.** Test de clonogénicité évaluée par coloration au cristal violet sur des cellules A549 après transfection avec un anti-miR-92a-3p ou un inhibiteur contrôle. Les données présentées sont représentatives de 3 expériences indépendantes.

De façon réciproque, nous avons analysé l'effet d'une surexpression de miR-92a-3p dans la même lignée cellulaire A549. En accord avec les résultats précédents, la surexpression de miR-92a-3p à l'aide d'un pré-miR induit d'une part la diminution de l'expression de BIM (**Figure 26, A**) et d'autre part, une prolifération cellulaire accrue, suggérée par la phosphorylation d'Akt (**Figure 26, B**).

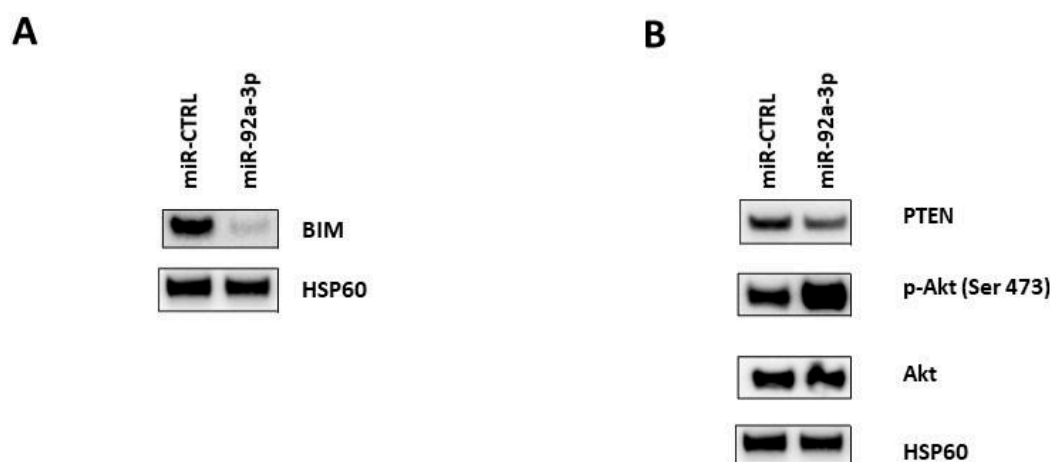


Figure 26 : Effets de la surexpression de miR-92a-3p sur l'expression de BIM et la phosphorylation d'Akt.

A. Analyse de l'expression de BIM par Western blot dans les cellules A549 transfectées pendant 24 heures avec un pré-miR-92a-3p ou un pré-miR contrôle. La protéine HSP-60 a été utilisée comme contrôle interne. Les données présentées sont représentatives de 3 expériences indépendantes. **B.** Analyse de la phosphorylation d'Akt par Western blot dans les cellules A549 transfectées pendant 24 heures avec un pré-miR-92a-3p ou un pré-miR contrôle. Les anticorps sont dirigés contre les protéines PTEN, p-Akt (sérine 473) et Akt totale. La

protéine HSP-60 a été utilisée comme contrôle interne. Les données présentées sont représentatives de 3 expériences indépendantes.

Ces données ont été complétées par l'analyse d'autres lignées d'adénocarcinomes pulmonaires, les lignées PC-9 et H1975 (**Figure 27**). Dans la lignée PC-9, nous avons validé l'effet pro-tumoral de miR-92a-3p sur le processus apoptotique. Les résultats montrent que l'inhibition de miR-92a-3p à l'aide d'un oligonucléotide ciblant ce miARN induit l'expression de BIM et sensibilise les cellules à l'apoptose induite par le cisplatine (**Figure 27**, PC-9). Dans la lignée H1975, l'inhibition de miR-92a-3p induit non seulement l'expression de BIM ainsi qu'une augmentation de la sensibilité des cellules à l'apoptose induite par le cisplatine, mais également le clivage de PARP (**Figure 27**, H1975).

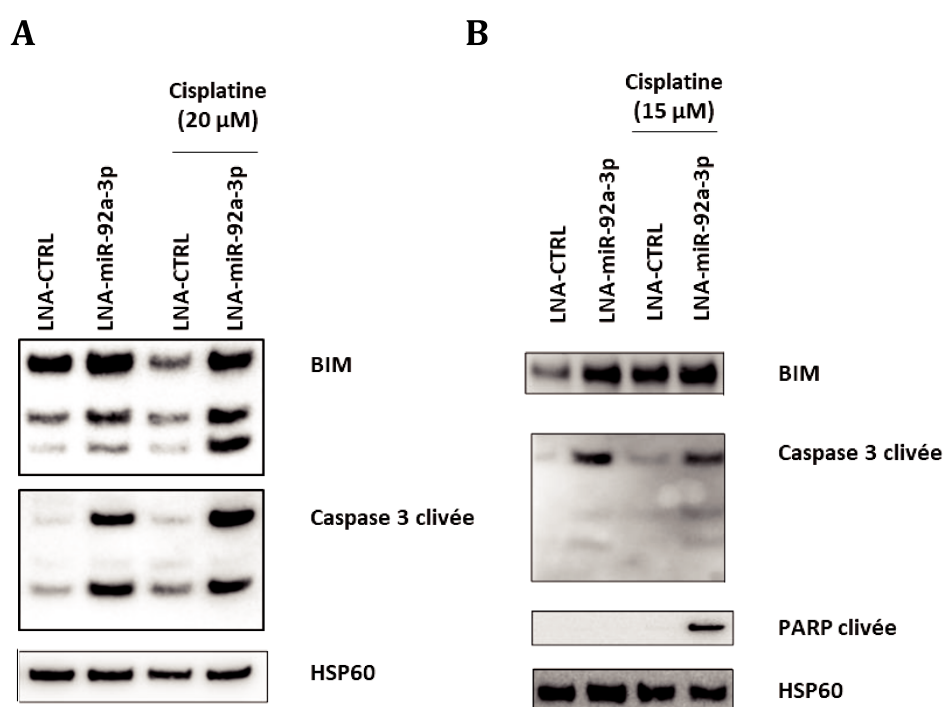


Figure 27 : Effet de l'inhibition de miR-92a-3p sur l'apoptose dans les lignées cellulaires PC-9 et H1975.

A. Analyse de l'apoptose par Western blot dans les cellules PC-9 transfectées 24 heures avec un LNA-miR-92a-3p ou un LNA-CTRL, exposées ou non au cisplatine (20 μM). Les anticorps sont dirigés contre les protéines BIM et la forme clivée de la caspase 3. La protéine HSP-60 a été utilisée comme contrôle interne. Les données présentées sont représentatives de 3 expériences indépendantes. **B.** Analyse de l'apoptose par Western blot dans les cellules H1975 transfectées 24 heures avec un LNA-miR-92a-3p ou un LNA-CTRL, exposées ou non au cisplatine

(15 μ M). Les anticorps sont dirigés contre les protéines BIM, la forme clivée de la caspase 3 et PARP. La protéine HSP-60 a été utilisée comme contrôle interne. Les données présentées sont représentatives de 3 expériences indépendantes.

c) Expression de miR-92a-3p dans le modèle murin CCSP-Cre-LSL-Kras^{G12D}

Le modèle d'adénocarcinome pulmonaire choisi est un modèle murin C57BL/6, portant une construction génétique permettant l'expression conditionnelle d'un variant muté du gène KRAS^{G12D} notamment dans les cellules alvéolaires de type II de manière inducible (CCSP-Cre-LSL-Kras^{G12D}) par administration de tamoxifène (TMX) (**Figure 28**).

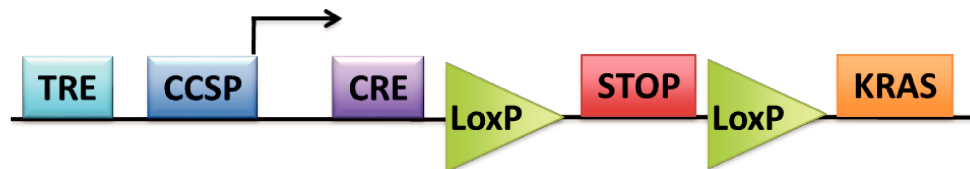


Figure 28 : Représentation schématique de la construction génétique permettant l'expression de la forme mutée du gène KRAS.

Le promoteur CCSP (Clara Cell Specific Promoter) est activé par le tamoxifène *via* son élément de réponse au tamoxifène (TRE), et induit l'expression de la recombinaise Cre. A son tour, l'enzyme recombinaise Cre excise les régions Lox de la construction permettant l'excision de la cassette STOP et l'induction de la forme mutée du proto-oncogène KRAS dans les cellules alvéolaires de type II et les cellules de Clara.

Chez les souris portant la construction génétique CCSP-Cre-LSL-Kras^{G12D}, nous avons pu observer, chez quelques animaux, l'apparition spontanée de tumeurs pulmonaires au bout de 15 semaines. Chez les souris ayant subi un protocole d'administration de tamoxifène, des tumeurs pulmonaires plus importantes se sont également développées sur la même durée (**Figure 29**).

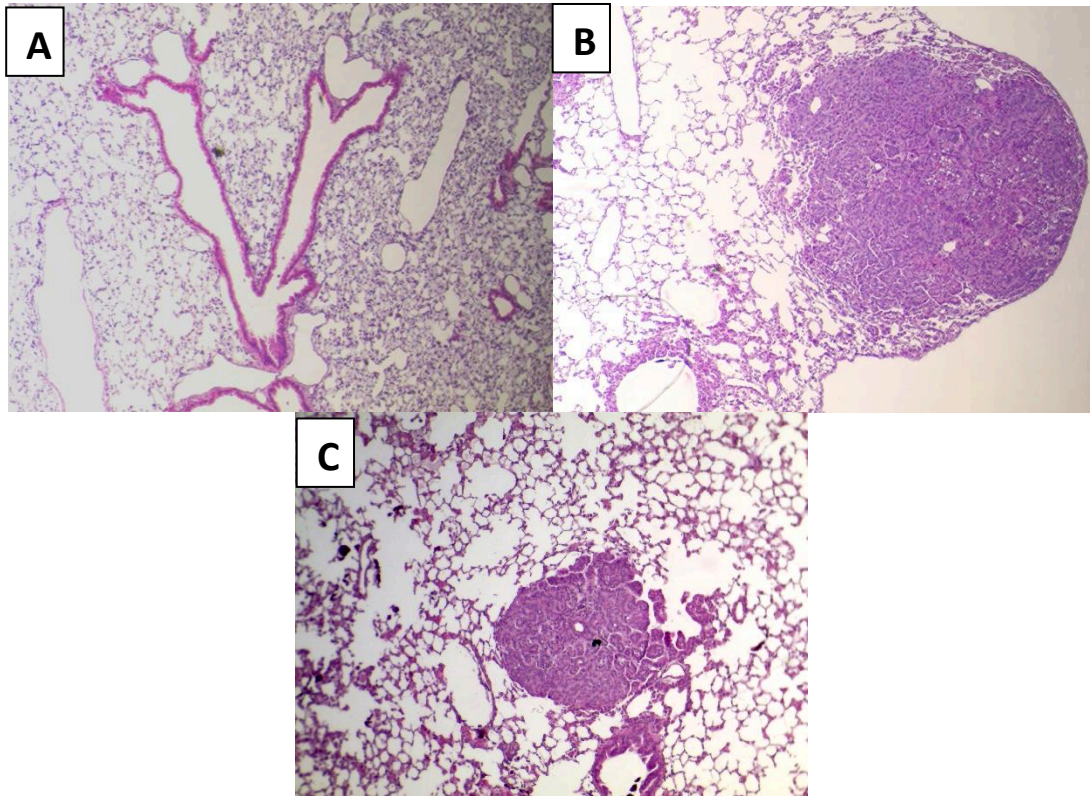


Figure 29 : Etude histologique du tissu pulmonaire des souris CCSP-Cre-LSL-Kras^{G12D}.

A. Image représentative de tissu pulmonaire de souris non exposée au tamoxifène, ne présentant pas de tumeurs (hématoxyline – éosine, x 100). **B.** Image représentative d'une coupe histologique de tissu pulmonaire de souris CCSP-Cre-LSL-Kras^{G12D} exposée au TMX, présentant une tumeur (hématoxyline – éosine, x 100). **C.** Image représentative d'une coupe histologique de tissu pulmonaire de souris CCSP-Cre-LSL-Kras^{G12D} non exposée au TMX, présentant une tumeur (hématoxyline – éosine, x 100).

Nous avons poursuivi notre étude en comparant des souris CCSP-Cre-LSL-Kras^{G12D} exposées au TMX à des souris sauvages de même fond génétique et exposées au PBS.

Les résultats indiquent une surexpression significative de miR-92a-3p et du transcrit MIR17HG dans les poumons de souris CCSP-Cre-LSL-Kras^{G12D} exposées au TMX comparé aux poumons de souris sauvages exposées au PBS ainsi qu'une diminution d'expression tumorale de BIM (Figure 30).

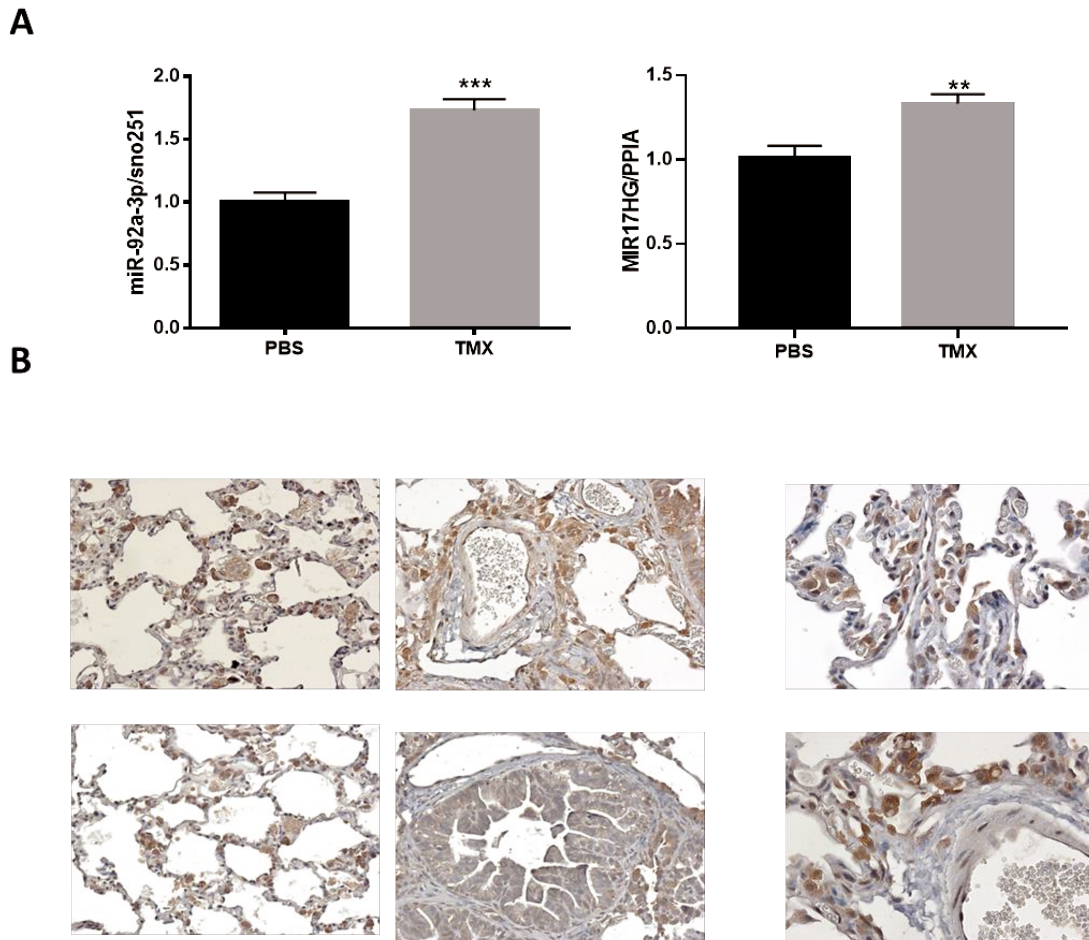


Figure 30 : Expression relative de miR-92a-3p, MIR17HG et de BIM dans les poumons de souris CCSP-Cre-LSL-Kras^{G12D} ayant reçu du tamoxifène comparé aux poumons de souris sauvages exposées au PBS.

A. Les valeurs indiquées (moyennes $\pm$ SEM) dérivent de 6 souris sauvages exposées au PBS (**PBS**) et de 10 souris CCSP-Cre-LSL-Kras^{G12D} exposées au TMX (**TMX**). ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

B. Images représentatives d'une analyse immunohistochimique de l'expression de la protéine BIM, réalisée sur tissu pulmonaire de souris CCSP-Cre-LSL-Kras^{G12D}, exposée au TMX. Grossissement x 200 et x 1000 au microscope photonique.

d) Identification d'oligonucléotides antisens permettant l'inhibition de MIR17HG

Le ciblage du transcrit primaire MIR17HG dont l'expression est majoritairement nucléaire (**Figure 31**) a été réalisé à l'aide d'oligonucléotides antisens de type GapmeR (**Figure 32**).

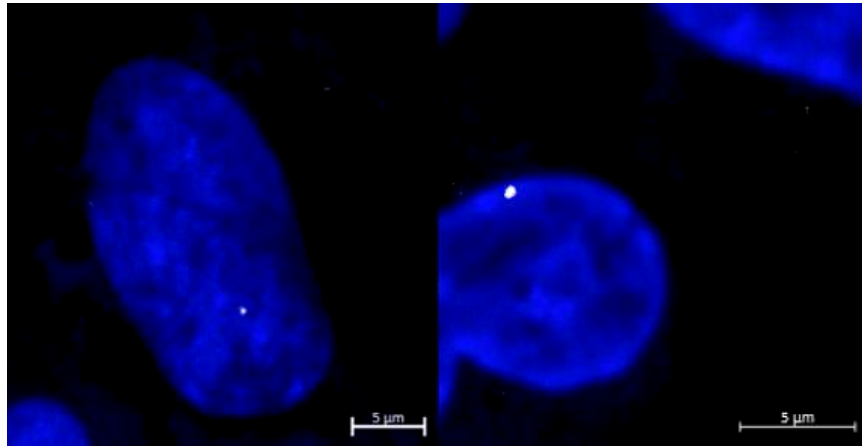


Figure 31 : Visualisation de la localisation nucléaire de MIR17HG par la technique de RNA FISH dans la lignée cellulaire A549.

Des cellules A549 ont été exposées à un ensemble de sondes FISH Stellaris RNA comprenant une cinquantaine d'oligonucléotides marqués individuellement et conçus pour se lier sélectivement à une zone du transcrit MIR17HG. Une fois toutes les sondes liées à MIR17HG, elles émettent un signal fluorescent global détectable par microscopie.

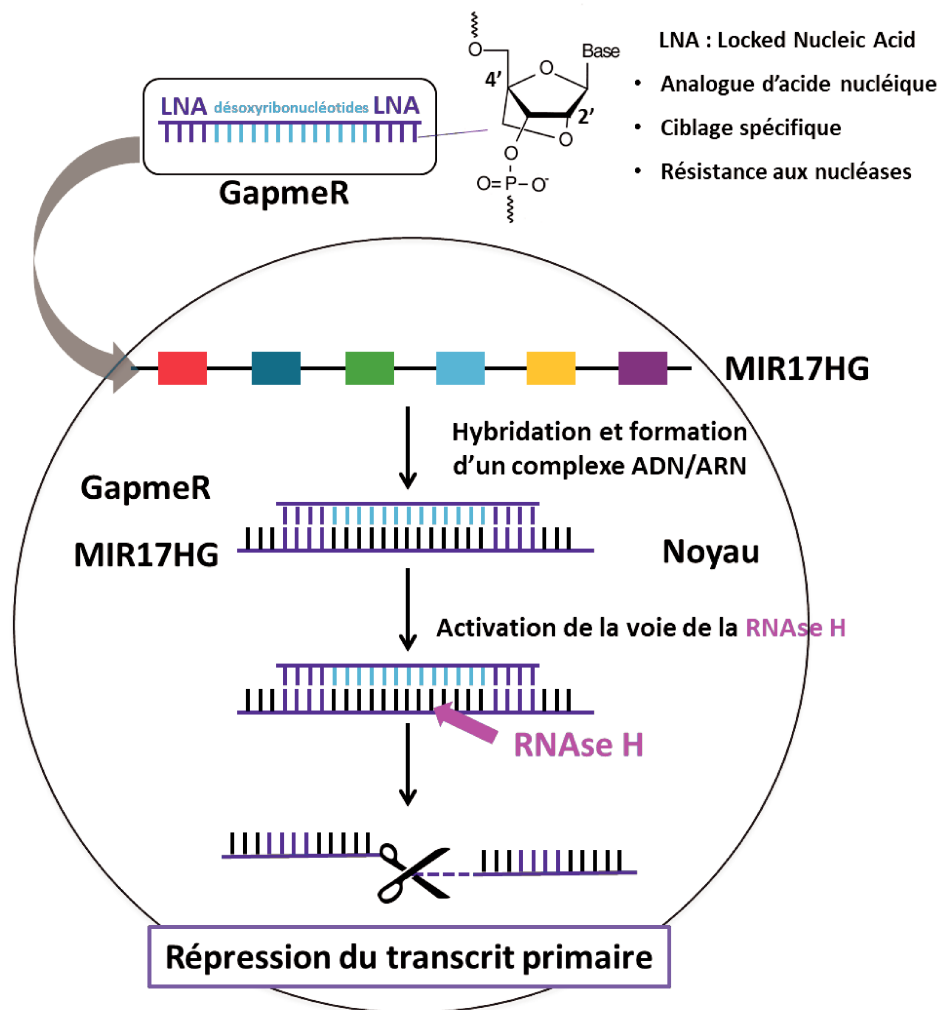


Figure 32 : Inhibition de MIR17HG par les oligonucléotides antisens de type GapmeR. Un GapmeR est une molécule simple brin constituée de deux régions flanquantes de type LNA. Les LNA sont des acides nucléiques modifiés par un pont entre un hydroxyle en position deux et un carbone en position quatre à l'origine d'une interaction plus forte entre les bases complémentaires et d'une résistance aux nucléases. La partie centrale du GapmeR est composée de désoxynucléotides permettant de créer un duplex ADN/ARN repéré par la RNase H nucléaire et induisant la dégradation du transcrit. La RNase H reconnaît les duplex ADN – ARN et hydrolyse la partie ribonucléique.

Dix GapmeR ont été synthétisés à façon afin de cibler spécifiquement le transcrit non codant MIR17HG (Qiagen). Les lignées cellulaires A549 et PC-9 ont été transfectées avec des GapmeR contrôles ou des GapmeR dirigés contre MIR17HG afin de tester leur efficacité. Parmi les dix GapmeR testés, six induisent, de manière reproductible et dans les deux lignées testées, la dégradation de MIR17HG (**Figure 33, A**). De manière intéressante, la transfection par ces

GapmeR permet également l'inhibition de l'expression des six microARN du cluster (**Figure 33**, B).

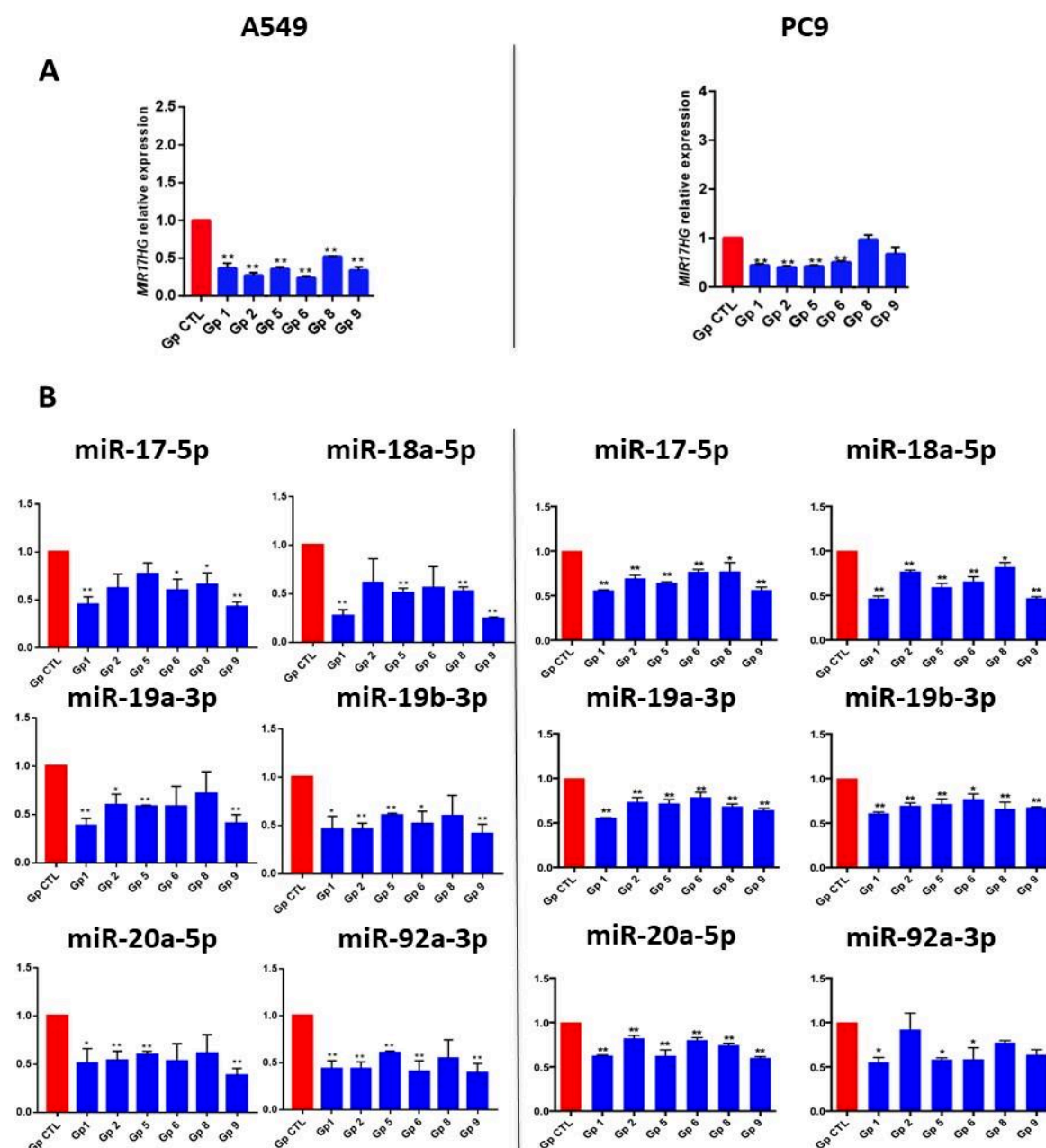


Figure 33 : Effet des GapmeR dirigés contre MIR17HG sur l'expression de MIR17HG et des six miARN du cluster dans les lignées d'adénocarcinome pulmonaire A549 et PC-9.

A. Expression relative de MIR17HG par PCR quantitative après transfection par les GapmeR dans les lignées A549 et PC-9. Les valeurs indiquées (moyenne $\pm$ SEM) dérivent de trois expériences indépendantes. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. U6 snRNA a été utilisé comme contrôle interne. **B.** Expression relative des six miARN du cluster par PCR quantitative après transfection par les GapmeR dans les lignées A549 et PC-9. Les valeurs indiquées (moyenne $\pm$ SEM) dérivent de trois expériences indépendantes. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$. U6 snRNA a été utilisé comme contrôle interne.

e) Effet des oligonucléotides de type GapmeR sur BIM et l'apoptose

L'effet fonctionnel de trois GapmeR précédemment identifiés (GapmeR (Gp) 2, 6 et 9) a été étudié sur le processus apoptotique trois jours après transfection de la lignée A549 (**Figure 34**).

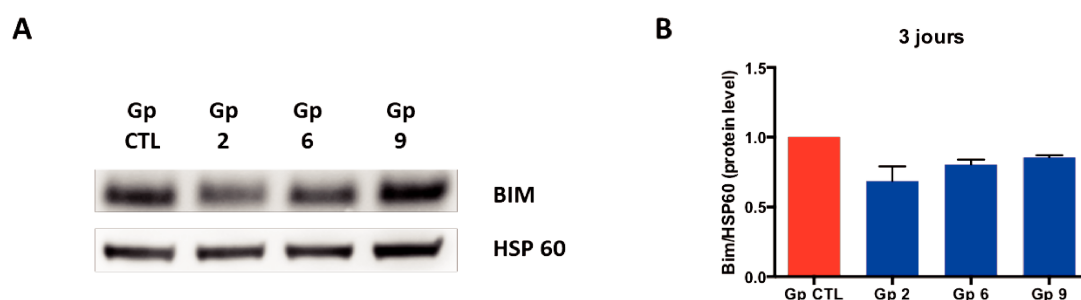


Figure 34 : Effet des GapmeR 2, 6 et 9 sur l'expression de BIM dans la lignée A549.

A. Analyse de l'apoptose par Western blot dans les cellules A549 transfectées pendant 72 heures avec les GapmeR 2, 6 et 9. Les anticorps sont dirigés contre la protéine BIM. La protéine HSP-60 a été utilisée comme contrôle interne. Les données présentées sont représentatives de 2 expériences indépendantes. **B.** Quantification des Western blot.

Contrairement aux résultats obtenus par Morelli *et al.*, les GapmeR testés n'ont pas permis de moduler de manière reproductible l'expression de la protéine pro-apoptotique BIM. Afin de compléter ces résultats, nous avons réalisé cette même expérience sur une durée de transfection prolongée à une semaine. Dans ces conditions, nos résultats sont comparables à ceux obtenus avec 3 jours de transfection (données non présentées).

Discussion

La prise en charge thérapeutique des cancers repose le plus souvent sur l'administration simultanée ou séquentielle d'agents chimiothérapeutiques dont les mécanismes d'action sont distincts afin de maximiser l'efficacité du traitement tout en évitant la sélection de clones résistants et le risque de récurrence ³⁶⁶. Néanmoins, bien que cette stratégie ait permis la

guérison de certaines formes de lymphomes, de cancers du sein et de cancers des testicules, la plupart des patients recevant une polychimiothérapie rechutent ³⁶⁷. Par conséquent, de nouvelles connaissances sur les mécanismes moléculaires à l'origine de l'absence de sensibilité des tumeurs aux chimiothérapies est nécessaire afin d'optimiser les schémas thérapeutiques actuels et permettre la mise au point de nouvelles combinaisons thérapeutiques efficaces ³⁶⁸. Ceci est particulièrement vrai pour les cancers bronchopulmonaires présentant une altération du gène KRAS qui sont généralement réfractaires aux sels de platine, des médicaments utilisés en chimiothérapies de première ligne ³⁶⁹.

Dans cette étude, nous avons émis l'hypothèse que le ciblage pharmacologique de miARN représente une nouvelle stratégie thérapeutique potentiellement intéressante pour augmenter les taux de réponse des tumeurs pulmonaires présentant des altérations du gène KRAS au cisplatine. En effet, la capacité des miARN à moduler de multiples transcrits provenant de voies oncogéniques identiques ou interconnectées représente un avantage par rapport aux approches pharmacologiques traditionnelles ³⁷⁰. L'identification des miARN d'intérêt a été effectuée à l'aide d'un criblage fonctionnel basé sur la transfection d'inhibiteurs de miARN permettant d'établir un lien de causalité directe entre l'expression d'un miARN et le phénotype étudié ³⁷¹. En particulier, nos données montrent que miR-92a-3p est un régulateur puissant de la réponse des cellules dérivées de CPNPC au cisplatine incluant celles présentant une altération du gène KRAS.

miR-92a-3p est localisé au niveau du chromosome 13 et est transcrit sous forme d'un long ARN non codant polycistronique, MIR17HG, en association avec miR-17, miR-18a, miR-19a, miR-20a et miR-19b ³⁷¹. Les données de la littérature convergent vers un rôle oncogénique notamment pro-prolifératif et anti-apoptotique de cet ARN polycistronique dans de

nombreux types de cancers ³⁵⁹. En effet, la surexpression du polycistron miR-17-92 dans un modèle expérimental de souris développant des lymphomes (souris Eμ-Myc) accélère de façon dramatique l'apparition de tumeurs ³⁶⁰. De même, la surexpression de ce polycistron dans les cellules progénitrices épithéliales du poumon favorise leur prolifération ³⁷². De plus, le polycistron miR-17-92 est localisé dans une région fréquemment amplifiée dans plusieurs types de lymphomes et de cancers du poumon, la région 13q31-32 du chromosome 13. Enfin, la plupart des miARN matures du cluster est également surexprimée dans la majorité des pathologies tumorales ³⁵⁷.

Sur le plan moléculaire, il est maintenant établi que l'activité oncogénique de cet ARN polycistronique résulte de l'inhibition des gènes suppresseurs de tumeurs comme *BIM* par les miARN matures formés à partir de ce transcrit, qui régulent de manière synergique différentes voies biologiques impliquées dans la prolifération cellulaire et l'apoptose ³⁵⁹. Dans notre étude, à l'aide de plusieurs lignées cellulaires de CPNPC dont la lignée A549 qui présente une altération du gène *KRAS*, nous avons montré que miR-92a-3p exerce, d'une part, un effet anti-apoptotique important en association avec le cisplatine à travers l'inhibition de *BIM*, et, d'autre part, que miR-92a-3p impacte la prolifération des cellules tumorales pulmonaires. Néanmoins, *BIM* n'ayant pas d'influence démontrée sur le cycle cellulaire, il est très probable que miR-92a-3p cible d'autres gènes impliqués dans la régulation de la prolifération cellulaire tels que par exemple le gène suppresseur de tumeur *PTEN* ³⁷³. En effet, le ciblage de *PTEN* par miR-92a-3p a déjà été décrit dans plusieurs lignées cellulaires issues de différents types de tumeurs ³⁷³.

Enfin, bien que le ciblage direct de l'ARN polycistronique MIR17HG à l'aide de molécules oligonucléotidiques de type GapmeR ait récemment été proposé comme une nouvelle stratégie thérapeutique anticancéreuse prometteuse par Morelli *et al.* ³⁷⁴, nos données n'ont

pas permis de confirmer ces résultats. En effet, les différents GapmeR testés, bien qu'inhibant significativement l'expression du lncRNA MIR17HG, n'ont pas permis d'induire l'expression de *BIM* dans les cellules tumorales pulmonaires et se sont révélés inefficaces dans la régulation du processus apoptotique. Ainsi, ces données suggèrent que les résultats obtenus par Morelli *et al.* ³⁷⁴, résulteraient du ciblage non spécifique de MIR17HG (effets « off-target ») dont les effets seraient susceptibles de perturber l'homéostasie des cellules et d'induire leur mort cellulaire par apoptose, d'autant plus que les résultats présentés dans cette étude se limitent à l'utilisation d'un seul GapmeR.

En conclusion, cette étude confirme le rôle central des miARN dans la régulation des mécanismes oncogéniques impliqués dans la survenue des tumeurs pulmonaires, en particulier les CPNPC. Nous avons identifié miR-92a-3p comme un déterminant important de la réponse des CPNPC au cisplatine en régulant notamment les voies biologiques associées au processus apoptotique et à la prolifération cellulaire. Ainsi, le développement d'approche thérapeutique visant à cibler miR-92a-3p pourrait s'avérer utile dans la prise en charge des CPNPC, en particulier ceux présentant une altération du gène *KRAS*.

Discussion générale

Des progrès dans la connaissance des mécanismes physiopathologiques de maladies dont le pronostic est souvent défavorable telles que les pathologies cancéreuses sont indispensables pour permettre l'identification de nouvelles cibles pharmacologiques ou de nouveaux biomarqueurs d'intérêt ^{375,376}. Ainsi, les miARN, de par leur rôle majeur dans les processus d'initiation et de progression des cancers ^{325,377}, constituent non seulement des cibles thérapeutiques prometteuses pour le développement de nouveaux traitements anticancéreux mais également des biomarqueurs pronostiques/diagnostiques ou d'exposition à des contaminants environnementaux cancérigènes ^{378–380}.

A. Les miARN, des nouveaux biomarqueurs.

La découverte de biomarqueurs spécifiques, sensibles et peu invasifs est un des enjeux majeurs de la recherche en cancérologie. En effet, ces marqueurs biologiques ont le potentiel de révolutionner la prise en charge médicale des pathologies cancéreuses en améliorant leur diagnostic et leur pronostic, ainsi qu'en permettant de prédire la réponse des patients aux traitements anti-tumoraux ^{375,381}. De même, le développement de biomarqueurs d'exposition présente un grand intérêt pour appréhender l'exposition, présente ou passée, d'un individu à des contaminants environnementaux cancérigènes et donc potentiellement pour prédire le risque de survenue d'un cancer ³⁸². Les fluides biologiques tels que le plasma sanguin ou l'urine sont facilement accessibles et représentent un matériel biologique particulièrement intéressant pour le développement de tels biomarqueurs. Ainsi, les miARN, du fait de leur stabilité et de leur présence dans ces fluides biologiques, représentent une nouvelle classe de biomarqueurs à très fort potentiel. En effet, depuis leur détection dans la circulation sanguine

par Gilad *et al.* en 2008 ³⁸³, la caractérisation des miARN circulants est un domaine de recherche en plein essor notamment en cancérologie ^{24,384}. Les modifications quantitatives des miARN dans la circulation sanguine résultent souvent d'un relargage passif suite à une atteinte tissulaire et sont donc le reflet indirect de l'évolution de la pathologie sous-jacente ^{384,385}. Dans d'autres cas, les miARN pourraient exercer un rôle délétère direct et contribuer ainsi à l'évolution de la maladie ^{386–388}. Par exemple, certaines études ont montré qu'une altération des quantités sériques de plusieurs miARN, tels que miR-15a ou miR-223, était détectable avant le développement d'un diabète de type 2, suggérant ainsi l'implication directe de ces miARN au cours de la physiopathologie de cette maladie ³⁸⁹. Enfin, les biomarqueurs d'exposition à des polluants environnementaux cancérigènes présentent un intérêt majeur en toxicologie en particulier ceux associés de manière précoce au risque de développement d'une tumeur. Ainsi, certaines études ont par exemple montré une relation de dose à effet entre l'expression de certains miARN urinaires et l'exposition à certains pesticides organophosphorés ^{390,391}.

B. Les miARN, de nouvelles cibles thérapeutiques

De nombreuses études ayant clairement mis en évidence le rôle majeur exercé par les miARN au cours du processus tumoral, ces molécules constituent de nouvelles cibles thérapeutiques prometteuses d'autant plus que leur ciblage pharmacologique a la capacité d'impacter de nombreuses voies de signalisation oncogéniques ^{392–395}. En effet, les premiers travaux réalisés dans le cadre de la modulation pharmacologique des miARN ayant rapidement donné des résultats encourageants à l'aide de modèles *in vitro*, le ciblage thérapeutique des miARN est devenu un axe de recherche important suscitant de nombreuses études *in vivo* dont des essais cliniques chez l'homme. Ainsi, l'oligonucléotide antisens dirigé contre miR-122 Miravirsen,

basé sur la technologie des acides nucléiques de type LNA (Locked Nucleic Acid), a été le premier agent pharmacologique ciblant un miARN à entrer en phase clinique chez des patients infectés par le virus de l'hépatite C ³⁹⁶. La technologie LNA, une modification chimique d'acide nucléique couramment utilisée dans le développement d'oligonucléotides antisens à visée pharmacologique, consiste à ajouter un pont méthylène au niveau du ribose d'un acide nucléique, permettant ainsi d'augmenter significativement la stabilité (résistance aux nucléases) ainsi que l'affinité de l'oligonucléotide antisens pour sa cible ^{397,398}.

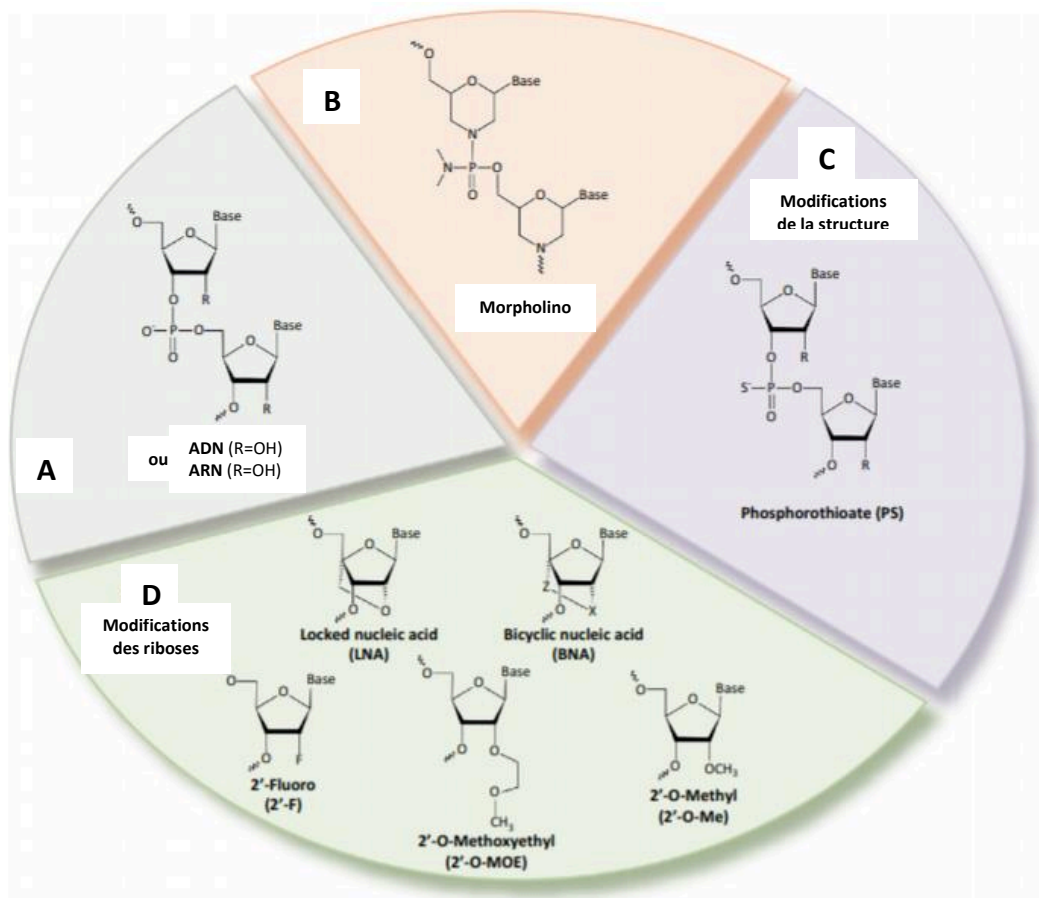


Figure 35 : Modifications chimiques courantes utilisées dans les thérapies à base de miARN. D'après Pottier *et al.* (2014) ³⁹⁹.

A. Modifications des acides nucléiques. **B.** Utilisation de morpholinos. **C.** Modification de la structure : ajout de groupements phosphorothiorates. **D.** Modification des riboses.

Une autre stratégie, également en plein essor, consiste à réexprimer un miARN à l'aide d'une molécule d'ARN double brin dénommée « mimic » car mimant l'activité du miARN endogène

⁴⁰⁰. L'entreprise de biotechnologies *miRNA Therapeutics*, spécialisée dans le développement de ce type de molécules, a ainsi développé miRX34, un mimic de miR-34a encapsulé dans des liposomes et actuellement en phase clinique dans les tumeurs solides ⁴⁰¹.

Malgré des résultats prometteurs, les thérapies basées sur les miARN présentent un certain nombre d'inconvénients limitant leur développement tels que des problèmes de spécificité (ciblage d'autres ARN) ou encore ceux liés à leur distribution aux différents tissus. En particulier, les effets indésirables potentiels, résultant de la fixation non spécifique des oligonucléotides, ainsi que les effets à long terme du ciblage des miARN restent à évaluer.

Conclusion et perspectives

Le séquençage du génome humain et son annotation ont permis de mettre en évidence que la majorité du génome est biologiquement fonctionnelle bien que sa fraction codante soit largement minoritaire ⁴⁰². Ainsi, une grande partie du génome est transcrite sous forme d'ARN non codant dont l'importance dans la régulation de l'expression génique est désormais clairement établie ⁴⁰³. Parmi eux, les miARN constituent la classe d'ARN non codants la mieux caractérisée à l'heure actuelle ¹. En effet, l'engouement suscité par ces petits ARN ces vingt dernières années a donné lieu à de très nombreuses études aussi bien fondamentales, expérimentales que cliniques et toutes soulignent leur rôle majeur dans la régulation de l'expression des gènes au cours de la plupart des processus physiopathologiques ainsi que leur importance biomédicale à travers le développement de nouveaux types de biomarqueurs et la mise au point de nouveaux traitements innovants ²⁴. Ainsi, les travaux réalisés au cours de cette thèse ont permis d'aborder ces deux aspects. D'une part, nos travaux ont permis d'identifier un panel de miARN dont l'expression, modulée par l'exposition au cadmium, est susceptible de constituer des nouveaux biomarqueurs d'exposition à ce composé carcinogène. D'autre part, nos données ont également permis de proposer miR-92a-3p en tant que nouvelle cible thérapeutique potentielle en cancérologie pulmonaire.

Néanmoins, même si les miARN représentent désormais des acteurs incontournables de la biologie fondamentale et appliquée, de nombreux défis restent encore à relever avant leur utilisation en clinique. En effet, l'extrapolation à l'homme des résultats obtenus à l'aide de modèles *in vitro* est pour l'instant mal maîtrisée et les effets à long terme du ciblage de miARN sont pour l'instant méconnus. Ainsi, le recours à un modèle animal représentatif des cancers pulmonaires est une étape indispensable avant d'envisager le ciblage de miR-92a-3p chez

l'homme. De même, la validation du panel de miARN identifiés lors de notre étude portant sur le cadmium doit être poursuivie dans des populations bien caractérisées quant à leur exposition au cadmium (population générale ou en milieu professionnel).

Figures

FIGURE 1 : BIOGENESE ET FONCTIONS DES MICROARN CHEZ LES METAZOAIRES.	19
FIGURE 2 : MECANISMES DE REPRESSION DE LA TRADUCTION INDUIT PAR UN MIARN CHEZ L'ANIMAL.	21
FIGURE 3 : MODES D'ACTION PRINCIPAUX DES MICROARN.....	22
FIGURE 4 : APOPTOSE, VOIES INTRINSEQUE ET EXTRINSEQUE.	24
FIGURE 5 : MICROARN IMPLIQUES DANS LES PRINCIPALES CARACTERISTIQUES DES CELLULES CANCEREUSES.....	26
FIGURE 6 : IMMORTALITE REPLICATIVE.	27
FIGURE 7 : CRISTAL DE Cd ET PLACE DU Cd DANS LA CLASSIFICATION PERIODIQUE DES ELEMENTS.	39
FIGURE 8 : ETAPES D'INCORPORATION DU Cd DANS L'ORGANISME HUMAIN ET PROCESSUS DE CARCINOGENESE.....	42
FIGURE 9 : ANALYSE PAR OPEN ARRAY PAR LA TECHNOLOGIE QUANTSTUDIO™ 12K FLEX REAL-TIME PCR.	45
FIGURE 10 : MORT CELLULAIRE ET CYTOTOXICITE INDUITE PAR LE Cd DANS LES CELLULES RPTEC/hTERT.....	49
FIGURE 11 : MIARN SIGNIFICATIVEMENT DEREGULES DANS LES CELLULES RPTEC/hTERT EXPOSEES AU Cd.....	51
FIGURE 12 : VALIDATION DE LA SUREXPRESSION INDUITE PAR LE Cd DE miR-21-5p, miR-27a-3p, miR-29c-3p, miR-30b-5p, miR-30c-5p ET miR-193a-5p DANS LES CELLULES RPTEC/hTERT.....	52
FIGURE 13 : MORT CELLULAIRE ET CYTOTOXICITE INDUITE PAR LE Cd DANS LES CELLULES HK-2.....	53
FIGURE 14 : VALIDATION DE LA SUREXPRESSION INDUITE PAR LE Cd DE miR-21-5p, miR-27a-3p, miR-29c-3p, miR-30b-5p, miR-30c-5p ET miR-193a-5p DANS LES CELLULES HK-2.....	54
FIGURE 15 : APOPTOSE INDUITE PAR LE Cd DANS LE MODELE CELLULAIRE RPTEC/hTERT ET HK-2.....	64
FIGURE 16 : PREDICTION DES VOIES DE SIGNALISATION DES MIARN SUREXPRIMES DANS LES CELLULES RPTEC/hTERT TRAITEES AVEC DU Cd PAR RAPPORT AUX CELLULES NON TRAITEES SELON MIRPATH V.3 DIANA TOOLS.	65
FIGURE 17 : VOIES DE SIGNALISATION CELLULAIRE DU RECEPTEUR A L'EGF.....	71
FIGURE 18 : ALTERATION DU GENE <i>KRAS</i> ET IMPACT SUR LE DEVENIR DE LA CELLULE.	72
FIGURE 19 : INTRODUCTION DES THERAPIES DANS LES TRAITEMENTS DU CPNPC, STADE IV.....	74
FIGURE 20 : STRUCTURE, ACTIVATION DU CISPLATINE ET MECANISME D'ACTION SUR L'ADN.....	76
FIGURE 21 : MECANISMES MOLECULAIRES A L'ORIGINE DE LA RESISTANCE AU CISPLATINE.	77
FIGURE 22 : ORGANISATION EN CLUSTER DE L'ARN NON CODANT MIR17HG.	78
FIGURE 23 : ROLE DU CLUSTER MIR17HG DANS LE DEVELOPPEMENT TUMORAL.	79

FIGURE 24 : MIARN ASSOCIES A LA SENSIBILITE AU CISPLATINE.	92
FIGURE 25 : EFFETS DE L'INHIBITION DE MIR-92A-3P DANS LES CELLULES A549 SUR LA SENSIBILITE AU CISPLATINE, LA VIABILITE CELLULAIRE ET LA PROLIFERATION.....	93
FIGURE 26 : EFFETS DE LA SUREXPRESSION DE MIR-92A-3P SUR L'EXPRESSION DE BIM ET LA PHOSPHORYLATION D'AKT.	94
FIGURE 27 : EFFET DE L'INHIBITION DE MIR-92A-3P SUR L'APOPTOSE DANS LES LIGNEES CELLULAIRES PC-9 ET H1975.....	95
FIGURE 28 : REPRESENTATION SCHEMATIQUE DE LA CONSTRUCTION GENETIQUE PERMETTANT L'EXPRESSION DE LA FORME MUTE DU GENE KRAS.....	96
FIGURE 29 : ETUDE HISTOLOGIQUE DU TISSU PULMONAIRE DES SOURIS CCSP-CRE-LSL-KRAS ^{G12D}	97
FIGURE 30 : EXPRESSION RELATIVE DE MIR-92A-3P, MIR17HG ET DE BIM DANS LES POUMONS DE SOURIS CCSP-CRE-LSL-KRAS ^{G12D} AYANT REÇU DU TAMOXIFENE COMPAREE AUX POUMONS DE SOURIS SAUVAGES EXPOSEES AU PBS.	98
FIGURE 31 : VISUALISATION DE LA LOCALISATION NUCLEAIRE DE MIR17HG PAR LA TECHNIQUE DE RNA FISH DANS LA LIGNEE CELLULAIRE A549.....	99
FIGURE 32 : INHIBITION DE MIR17HG PAR LES OLIGONUCLEOTIDES ANTISENS DE TYPE GAPMER.....	100
FIGURE 33 : EFFET DES GAPMER DIRIGES CONTRE MIR17HG SUR L'EXPRESSION DE MIR17HG ET DES SIX MIARN DU CLUSTER DANS LES LIGNEES D'ADENOCARCINOME PULMONAIRE A549 ET PC-9.	101
FIGURE 34 : EFFET DES GAPMER 2, 6 ET 9 SUR L'EXPRESSION DE BIM DANS LA LIGNEE A549.	102
FIGURE 35 : MODIFICATIONS CHIMIQUES COURANTES UTILISEES DANS LES THERAPIES A BASE DE MIARN.	108

Tableaux

TABLEAU 1 : LISTE DES MICROARN PRESENTANT DES PROPRIETES ONCOGENIQUES.	28
TABLEAU 2 : LISTE DES MICROARN PRESENTANT DES PROPRIETES DE SUPPRESSEUR DE TUMEUR.	32
TABLEAU 3 : LISTE DES MICROARN SIGNIFICATIVEMENT DEREGLUES PAR L'EXPOSITION DES CELLULES RPTEC/HTERT AU Cd ET DE LEURS CIBLES.....	56
TABLEAU 4 : LISTE DES GÈNES ASSOCIÉS À L'APOPTOSE, VALIDÉS EXPÉRIMENTALEMENT ET CIBLÉS PAR LES MIARN MODULÉS PAR L'EXPOSITION AU Cd.....	61
TABLEAU 5 : ALTERATIONS MOLECULAIRES DANS LES CPNPC.....	70
TABLEAU 6 : LISTE DES 138 MICROARN LES PLUS EXPRIMES DANS LA LIGNEE D'ADENOCARCINOME PULMONAIRE A549.....	81
TABLEAU 7 : ID ET SEQUENCE DES GAPMER.....	83
TABLEAU 8 : SEQUENCES DES AMORCES UTILISEES EN PCR EN TEMPS REEL POUR L'EXPRESSION DES ARNm.....	86

Références

1. Bartel, D. P. MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. *Cell* vol. 116 281–297 (2004).
2. Lee, R. C., Feinbaum, R. L. & Ambros, V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* **75**, 843–854 (1993).
3. Pasquinelli, A. E. *et al.* Conservation of the sequence and temporal expression of *let-7* heterochronic regulatory RNA. *Nature* **408**, 86–89 (2000).
4. Reinhart, B. J. *et al.* The 21-nucleotide *let-7* RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **403**, 901–906 (2000).
5. Bartel, D. P. Metazoan MicroRNAs. *Cell* **173**, 20–51 (2018).
6. C, H., F, C.-M., A, B., M, J. & C, L.-B. [MicroRNAs: A New Class of Gene Expression Regulators]. *Med. Sci. (Paris)*. **20**, (2004).
7. Zendjabil, M., Favard, S., Tse, C., Abbou, O. & Hainque, B. The microRNAs as biomarkers: What prospects? *Comptes Rendus - Biologies* vol. 340 114–131 (2017).
8. Baskerville, S. & Bartel, D. P. Microarray profiling of microRNAs reveals frequent coexpression with neighboring miRNAs and host genes. *RNA* **11**, 241–247 (2005).
9. Kabekkodu, S. P. *et al.* Clustered miRNAs and their role in biological functions and diseases. *Biol. Rev.* **93**, 1955–1986 (2018).
10. Kuo, G., Wu, C. Y. & Yang, H. Y. MiR-17-92 cluster and immunity. *Journal of the Formosan Medical Association* vol. 118 2–6 (2019).
11. Ichiyama, K. & Dong, C. The role of miR-183 cluster in immunity. *Cancer Letters* vol. 443 108–114 (2019).
12. Faller, M. *et al.* DGCR8 recognizes primary transcripts of microRNAs through highly

- cooperative binding and formation of higher-order structures. *RNA* **16**, 1570–1583 (2010).
13. Bohnsack, M. T., Czaplinski, K. & Görlich, D. Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. *RNA* **10**, 185–191 (2004).
 14. Bartel, D. P. MicroRNAs: Target Recognition and Regulatory Functions. *Cell* vol. 136 215–233 (2009).
 15. Friedman, R. C., Farh, K. K. H., Burge, C. B. & Bartel, D. P. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Res.* **19**, 92–105 (2009).
 16. Gebert, L. F. R. & MacRae, I. J. Regulation of microRNA function in animals. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* vol. 20 21–37 (2019).
 17. Brennecke, J., Stark, A., Russell, R. B. & Cohen, S. M. Principles of microRNA-target recognition. in *PLoS Biology* vol. 3 0404–0418 (Public Library of Science, 2005).
 18. Jonas, S. & Izaurralde, E. Towards a molecular understanding of microRNA-mediated gene silencing. *Nature Reviews Genetics* vol. 16 421–433 (2015).
 19. Mazière, P. & Enright, A. J. Prediction of microRNA targets. *Drug Discovery Today* vol. 12 452–458 (2007).
 20. Agarwal, V., Bell, G. W., Nam, J. W. & Bartel, D. P. Predicting effective microRNA target sites in mammalian mRNAs. *Elife* **4**, (2015).
 21. AL, F. & P, C. [Oncogenic and Tumour Suppressor microRNAs]. *Med. Sci. (Paris)*. **24**, (2008).
 22. Ebert, M. S. & Sharp, P. A. Roles for MicroRNAs in conferring robustness to biological processes. *Cell* vol. 149 515–524 (2012).
 23. Calin, G. A. & Croce, C. M. MicroRNA signatures in human cancers. *Nature Reviews Cancer* vol. 6 857–866 (2006).

24. Rupaimoole, R. & Slack, F. J. MicroRNA therapeutics: Towards a new era for the management of cancer and other diseases. *Nature Reviews Drug Discovery* vol. 16 203–221 (2017).
25. Ling, H., Zhang, W. & Calin, G. A. Principles of microRNA involvement in human cancers. *Chinese Journal of Cancer* vol. 30 739–748 (2011).
26. Peng, Y. & Croce, C. M. The role of microRNAs in human cancer. *Signal Transduction and Targeted Therapy* vol. 1 1–9 (2016).
27. Bartels, C. L. & Tsongalis, G. J. Mini-reviews micrnas: novel biomarkers for human cancer. *Clinical Chemistry* vol. 55 623–631 (2009).
28. Calin, G. A. *et al.* Human microRNA genes are frequently located at fragile sites and genomic regions involved in cancers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**, 2999–3004 (2004).
29. Williams, M., Cheng, Y. Y., Blenkiron, C. & Reid, G. Exploring Mechanisms of MicroRNA Downregulation in Cancer. *MicroRNA* **6**, 2–16 (2017).
30. Ma, L. MicroRNA and Metastasis. in *Advances in Cancer Research* vol. 132 165–207 (Academic Press Inc., 2016).
31. Calin, G. A. *et al.* Frequent deletions and down-regulation of micro-RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **99**, 15524–15529 (2002).
32. Cimmino, A. *et al.* miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 13944–13949 (2005).
33. Krishnan, K. & Cloonan, N. Applications of non-coding RNA in the molecular pathology of cancer. in *Molecular Pathology in Cancer Research* 177–217 (Springer New York, 2017). doi:10.1007/978-1-4939-6643-1_9.

34. Lopez, M. F. *et al.* Opposing activities of oncogenic MIR17HG and tumor suppressive MIR100HG clusters and their gene targets regulate replicative senescence in human adult stem cells. *npj Aging Mech. Dis.* **3**, (2017).
35. Di Leva, G., Garofalo, M. & Croce, C. M. MicroRNAs in Cancer. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* **9**, 287–314 (2014).
36. Dews, M. *et al.* Augmentation of tumor angiogenesis by a Myc-activated microRNA cluster. *Nat. Genet.* **38**, 1060–1065 (2006).
37. Sylvestre, Y. *et al.* An E2F/miR-20a autoregulatory feedback loop. *J. Biol. Chem.* **282**, 2135–2143 (2007).
38. Woods, K., Thomson, J. M. & Hammond, S. M. Direct regulation of an oncogenic micro-RNA cluster by E2F transcription factors. *J. Biol. Chem.* **282**, 2130–2134 (2007).
39. Xiao, C. *et al.* Lymphoproliferative disease and autoimmunity in mice with increased miR-17-92 expression in lymphocytes. *Nat. Immunol.* **9**, 405–414 (2008).
40. Taguchi, A. *et al.* Identification of hypoxia-inducible factor-1 α as a novel target for miR-17-92 microRNA cluster. *Cancer Res.* **68**, 5540–5545 (2008).
41. Xu, X. *et al.* Protein tyrosine phosphatase receptor-type O (PTPRO) is co-regulated by E2F1 and miR-17-92. *FEBS Lett.* **582**, 2850–2856 (2008).
42. Manni, I. *et al.* The microRNA miR-92 increases proliferation of myeloid cells and by targeting p63 modulates the abundance of its isoforms. *FASEB J.* **23**, 3957–3966 (2009).
43. Mavrakis, K. J. *et al.* Genome-wide RNA-mediated interference screen identifies miR-19 targets in Notch-induced T-cell acute lymphoblastic leukaemia. *Nat. Cell Biol.* **12**, 372–379 (2010).
44. Maimaiti, A., Maimaiti, A., Yang, Y. & Ma, Y. MiR-106b exhibits an anti-angiogenic function by inhibiting STAT3 expression in endothelial cells. *Lipids Health Dis.* **15**,

- (2016).
45. Li, H., Bian, C., Liao, L., Li, J. & Zhao, R. C. miR-17-5p promotes human breast cancer cell migration and invasion through suppression of HBP1. *Breast Cancer Res. Treat.* **126**, 565–575 (2011).
 46. Hong, L. *et al.* The miR-17-92 cluster of microRNAs confers tumorigenicity by inhibiting oncogene-induced senescence. *Cancer Res.* **70**, 8547–8557 (2010).
 47. Dews, M. *et al.* The Myc-miR-17~92 axis blunts TGF β signaling and production of multiple TGF β -dependent antiangiogenic factors. *Cancer Res.* **70**, 8233–8246 (2010).
 48. Xu, Y. *et al.* Mir-17* suppresses tumorigenicity of prostate cancer by inhibiting mitochondrial antioxidant enzymes. *PLoS One* **5**, (2010).
 49. Zhang, C. *et al.* Co-suppression of miR-221/222 cluster suppresses human glioma cell growth by targeting p27kip1 in vitro and in vivo. *Int. J. Oncol.* **34**, 1653–1660 (2009).
 50. Galardi, S. *et al.* miR-221 and miR-222 expression affects the proliferation potential of human prostate carcinoma cell lines by targeting p27Kip1. *J. Biol. Chem.* **282**, 23716–23724 (2007).
 51. Visone, R. *et al.* MicroRNAs (miR)-221 and miR-222, both overexpressed in human thyroid papillary carcinomas, regulate p27Kip1 protein levels and cell cycle. *Endocr. Relat. Cancer* **14**, 791–798 (2007).
 52. Medina, R. *et al.* MicroRNAs 221 and 222 bypass quiescence and compromise cell survival. *Cancer Res.* **68**, 2773–2780 (2008).
 53. Garofalo, M. *et al.* miR-221&222 Regulate TRAIL Resistance and Enhance Tumorigenicity through PTEN and TIMP3 Downregulation. *Cancer Cell* **16**, 498–509 (2009).
 54. Di Leva, G. *et al.* MicroRNA cluster 221-222 and estrogen receptor α interactions in

- breast cancer. *J. Natl. Cancer Inst.* **102**, 706–721 (2010).
55. Poliseno, L. *et al.* MicroRNAs modulate the angiogenic properties of HUVECs. *Blood* **108**, 3068–3071 (2006).
 56. Cochrane, D. R. *et al.* MicroRNAs Link Estrogen Receptor Alpha Status and Dicer Levels in Breast Cancer. *Horm. Cancer* **1**, 306–319 (2010).
 57. Zhang, C. Z. *et al.* MiR-221 and miR-222 target PUMA to induce cell survival in glioblastoma. *Mol. Cancer* **9**, (2010).
 58. Stinson, S. *et al.* TRPS1 targeting by miR-221/222 promotes the epithelial-to-mesenchymal transition in breast cancer. *Sci. Signal.* **4**, (2011).
 59. Quintavalle, C. *et al.* MiR-221/222 overexpression in human glioblastoma increases invasiveness by targeting the protein phosphate PTP. *Oncogene* **31**, 858–868 (2012).
 60. Garofalo, M. *et al.* EGFR and MET receptor tyrosine kinase-altered microRNA expression induces tumorigenesis and gefitinib resistance in lung cancers. *Nat. Med.* **18**, 74–82 (2012).
 61. Meng, F. *et al.* Involvement of Human Micro-RNA in Growth and Response to Chemotherapy in Human Cholangiocarcinoma Cell Lines. *Gastroenterology* **130**, 2113–2129 (2006).
 62. Zhu, S., Si, M. L., Wu, H. & Mo, Y. Y. MicroRNA-21 targets the tumor suppressor gene tropomyosin 1 (TPM1). *J. Biol. Chem.* **282**, 14328–14336 (2007).
 63. Tao, L., Wu, Y. Q. & Zhang, S. P. MiR-21-5p enhances the progression and paclitaxel resistance in drug-resistant breast cancer cell lines by targeting PDCD4. *Neoplasma* **66**, 746–755 (2019).
 64. Ma, X. *et al.* Loss of the miR-21 allele elevates the expression of its target genes and reduces tumorigenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 10144–10149 (2011).

65. Gabriely, G. *et al.* MicroRNA 21 Promotes Glioma Invasion by Targeting Matrix Metalloproteinase Regulators. *Mol. Cell. Biol.* **28**, 5369–5380 (2008).
66. Papagiannakopoulos, T., Shapiro, A. & Kosik, K. S. MicroRNA-21 targets a network of key tumor-suppressive pathways in glioblastoma cells. *Cancer Res.* **68**, 8164–8172 (2008).
67. Li, T., Li, D., Sha, J., Sun, P. & Huang, Y. MicroRNA-21 directly targets MARCKS and promotes apoptosis resistance and invasion in prostate cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **383**, 280–285 (2009).
68. Schramedei, K. *et al.* MicroRNA-21 targets tumor suppressor genes ANP32A and SMARCA4. *Oncogene* **30**, 2975–2985 (2011).
69. Jiang, S. *et al.* MicroRNA-155 functions as an oncomiR in breast cancer by targeting the suppressor of cytokine signaling 1 gene. *Cancer Res.* **70**, 3119–3127 (2010).
70. O’Connell, R. M. *et al.* Sustained expression of microRNA-155 in hematopoietic stem cells causes a myeloproliferative disorder. *J. Exp. Med.* **205**, 585–594 (2008).
71. Yin, Q. *et al.* MicroRNA-155 Is an Epstein-Barr Virus-Induced Gene That Modulates Epstein-Barr Virus-Regulated Gene Expression Pathways. *J. Virol.* **82**, 5295–5306 (2008).
72. Romania, P. *et al.* MicroRNA 155 modulates megakaryopoiesis at progenitor and precursor level by targeting Ets-1 and Meis1 transcription factors. *Br. J. Haematol.* **143**, 570–580 (2008).
73. Rodriguez, A. *et al.* Requirement of bic/microRNA-155 for normal immune function. *Science (80-.).* **316**, 608–611 (2007).
74. Dagan, L. N. *et al.* miR-155 regulates HGAL expression and increases lymphoma cell motility. *Blood* **119**, 513–520 (2012).
75. Du, Z. M. *et al.* Upregulation of miR-155 in nasopharyngeal carcinoma is partly driven

- by LMP1 and LMP2A and downregulates a negative prognostic marker JMJD1A. *PLoS One* **6**, (2011).
76. Tili, E. *et al.* Mutator activity induced by microRNA-155 (miR-155) links inflammation and cancer. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 4908–4913 (2011).
 77. Seux, M. *et al.* TP53INP1 decreases pancreatic cancer cell migration by regulating SPARC expression. *Oncogene* **30**, 3049–3061 (2011).
 78. Yin, Q. *et al.* MicroRNA miR-155 Inhibits Bone Morphogenetic Protein (BMP) Signaling and BMP-Mediated Epstein-Barr Virus Reactivation. *J. Virol.* **84**, 6318–6327 (2010).
 79. Kong, W. *et al.* MicroRNA-155 regulates cell survival, growth, and chemosensitivity by targeting FOXO3a in breast cancer. *J. Biol. Chem.* **285**, 17869–17879 (2010).
 80. Valeri, N. *et al.* Modulation of mismatch repair and genomic stability by miR-155. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 6982–6987 (2010).
 81. Rai, D., Kim, S. W., McKeller, M. R., Dahia, P. L. M. & Aguiar, R. C. T. Targeting of SMAD5 links microRNA-155 to the TGF- β pathway and lymphomagenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 3111–3116 (2010).
 82. Cimmino, A. *et al.* miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 13944–13949 (2005).
 83. Young, L. E., Moore, A. E., Sokol, L., Meisner-Kober, N. & Dixon, D. A. The mRNA stability factor HuR inhibits MicroRNA-16 targeting of COX-2. *Mol. Cancer Res.* **10**, 167–180 (2012).
 84. Leich, E. *et al.* MicroRNA profiles of t(14;18)-negative follicular lymphoma support a late germinal center B-cell phenotype. *Blood* **118**, 5550–5558 (2011).
 85. Rissland, O. S., Hong, S. J. & Bartel, D. P. MicroRNA Destabilization Enables Dynamic Regulation of the miR-16 Family in Response to Cell-Cycle Changes. *Mol. Cell* **43**, 993–

- 1004 (2011).
86. Chamorro-Jorganes, A. *et al.* MicroRNA-16 and MicroRNA-424 regulate cell-autonomous angiogenic functions in endothelial cells via targeting vascular endothelial growth factor receptor-2 and fibroblast growth factor receptor-1. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **31**, 2595–2606 (2011).
 87. Musumeci, M. *et al.* Control of tumor and microenvironment cross-talk by miR-15a and miR-16 in prostate cancer. *Oncogene* **30**, 4231–4242 (2011).
 88. Ofir, M., Hacohen, D. & Ginsberg, D. miR-15 and miR-16 are direct transcriptional targets of E2F1 that limit E2F-induced proliferation by targeting cyclin E. *Mol. Cancer Res.* **9**, 440–447 (2011).
 89. Gatt, M. E. *et al.* MicroRNAs 15a/16-1 function as tumor suppressor genes in multiple myeloma. *Blood* **117**, 7188 (2010).
 90. Zhang, X. *et al.* Oncogenic Wip1 phosphatase is inhibited by miR-16 in the DNA damage signaling pathway. *Cancer Res.* **70**, 7176–7186 (2010).
 91. Bhattacharya, R. *et al.* MiR-15a and MiR-16 control Bmi-1 expression in ovarian cancer. *Cancer Res.* **69**, 9090–9095 (2009).
 92. Liu, Q. *et al.* miR-16 family induces cell cycle arrest by regulating multiple cell cycle genes. *Nucleic Acids Res.* **36**, 5391–5404 (2008).
 93. Yamakuchi, M., Ferlito, M. & Lowenstein, C. J. miR-34a repression of SIRT1 regulates apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **105**, 13421–13426 (2008).
 94. Ji, Q. *et al.* Restoration of tumor suppressor miR-34 inhibits human p53-mutant gastric cancer tumorspheres. *BMC Cancer* **8**, (2008).
 95. Christoffersen, N. R. *et al.* P53-independent upregulation of miR-34a during oncogene-induced senescence represses MYC. *Cell Death Differ.* **17**, 236–245 (2010).

96. Mudduluru, G. *et al.* Regulation of Axl receptor tyrosine kinase expression by miR-34a and miR-199a/b in solid cancer. *Oncogene* **30**, 2888–2899 (2011).
97. Corney, D. C. *et al.* Frequent downregulation of miR-34 family in human ovarian cancers. *Clin. Cancer Res.* **16**, 1119–1128 (2010).
98. Choi, Y. J. *et al.* MiR-34 miRNAs provide a barrier for somatic cell reprogramming. *Nat. Cell Biol.* **13**, 1353–1360 (2011).
99. Kim, N. H. *et al.* A p53/miRNA-34 axis regulates Snail1-dependent cancer cell epithelial-mesenchymal transition. *J. Cell Biol.* **195**, 417–433 (2011).
100. Johnson, S. M. *et al.* RAS is regulated by the let-7 microRNA family. *Cell* **120**, 635–647 (2005).
101. Mayr, C., Hemann, M. T. & Bartel, D. P. Disrupting the pairing between let-7 and Hmga2 enhances oncogenic transformation. *Science* (80-.). **315**, 1576–1579 (2007).
102. Sampson, V. B. *et al.* MicroRNA let-7a down-regulates MYC and reverts MYC-induced growth in Burkitt lymphoma cells. *Cancer Res.* **67**, 9762–9770 (2007).
103. Boyerinas, B. *et al.* Identification of let-7-regulated oncofetal genes. *Cancer Res.* **68**, 2587–2591 (2008).
104. Tokumaru, S., Suzuki, M., Yamada, H., Nagino, M. & Takahashi, T. let-7 regulates Dicer expression and constitutes a negative feedback loop. *Carcinogenesis* **29**, 2073–2077 (2008).
105. Legesse-Miller, A. *et al.* Let-7 overexpression leads to an increased fraction of cells in G2/M, direct down-regulation of Cdc34, and stabilization of wee1 kinase in primary fibroblasts. *J. Biol. Chem.* **284**, 6605–6609 (2009).
106. Hendrayani, S. F., Al-Harbi, B., Al-Ansari, M. M., Silva, G. & Aboussekhra, A. The inflammatory/cancer-related IL-6/STAT3/NF-κB positive feedback loop includes AUF1

- and maintains the active state of breast myofibroblasts. *Oncotarget* **7**, 41974–41985 (2016).
107. Dong, Q. *et al.* MicroRNA let-7a inhibits proliferation of human prostate cancer cells In Vitro and In Vivo by targeting E2F2 and CCND2. *PLoS One* **5**, (2010).
 108. Shimizu, S. *et al.* The let-7 family of microRNAs inhibits Bcl-xL expression and potentiates sorafenib-induced apoptosis in human hepatocellular carcinoma. *J. Hepatol.* **52**, 698–704 (2010).
 109. Gregory, P. A. *et al.* The miR-200 family and miR-205 regulate epithelial to mesenchymal transition by targeting ZEB1 and SIP1. *Nat. Cell Biol.* **10**, 593–601 (2008).
 110. Adam, L. *et al.* miR-200 expression regulates epithelial-to-mesenchymal transition in bladder cancer cells and reverses resistance to epidermal growth factor receptor therapy. *Clin. Cancer Res.* **15**, 5060–5072 (2009).
 111. Xia, H. *et al.* miR-200a-mediated downregulation of ZEB2 and CTNNB1 differentially inhibits nasopharyngeal carcinoma cell growth, migration and invasion. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **391**, 535–541 (2010).
 112. Wellner, U. *et al.* The EMT-activator ZEB1 promotes tumorigenicity by repressing stemness-inhibiting microRNAs. *Nat. Cell Biol.* **11**, 1487–1495 (2009).
 113. Uhlmann, S. *et al.* MiR-200bc/429 cluster targets PLCy1 and differentially regulates proliferation and EGF-driven invasion than miR-200a/141 in breast cancer. *Oncogene* **29**, 4297–4306 (2010).
 114. Schickel, R., Park, S. M., Murmann, A. E. & Peter, M. E. miR-200c regulates induction of apoptosis through CD95 by targeting FAP-1. *Mol. Cell* **38**, 908–915 (2010).
 115. Iliopoulos, D. *et al.* Loss of miR-200 Inhibition of Suz12 Leads to Polycomb-Mediated Repression Required for the Formation and Maintenance of Cancer Stem Cells. *Mol.*

- Cell* **39**, 761–772 (2010).
116. Roybal, J. D. *et al.* miR-200 inhibits lung adenocarcinoma cell invasion and metastasis by targeting Flt1/VEGFR1. *Mol. Cancer Res.* **9**, 25–35 (2011).
 117. Brabletz, S. *et al.* The ZEB1/miR-200 feedback loop controls Notch signalling in cancer cells. *EMBO J.* **30**, 770–782 (2011).
 118. Howe, E. N., Cochrane, D. R. & Richer, J. K. Targets of miR-200c mediate suppression of cell motility and anoikis resistance. *Breast Cancer Res.* **13**, (2011).
 119. Mateescu, B. *et al.* MiR-141 and miR-200a act on ovarian tumorigenesis by controlling oxidative stress response. *Nature Medicine* vol. 17 1627–1635 (2011).
 120. Ma, L. & Weinberg, R. A. Micromanagers of malignancy: role of microRNAs in regulating metastasis. *Trends in Genetics* vol. 24 448–456 (2008).
 121. Varnholt, H. *et al.* MicroRNA gene expression profile of hepatitis C virus-associated hepatocellular carcinoma. *Hepatology* **47**, 1223–1232 (2008).
 122. C, M.-L. *et al.* [Cancer Cell Plasticity and Metastatic Dissemination]. *Med. Sci. (Paris)*. **32**, (2016).
 123. Fleischer, M. *et al.* Environmental impact of cadmium: a review by the Panel on Hazardous Trace Substances. *Environ. Health Perspect.* **7**, 253–323 (1974).
 124. Nordberg, G. F., Nogawa, K. & Nordberg, M. Cadmium. in *Handbook on the Toxicology of Metals: Fourth Edition* vol. 1 667–716 (Elsevier Inc., 2015).
 125. Vangronsveld, J., Colpaert, J. V. & Van Tichelen, K. K. Reclamation of a bare industrial area contaminated by non-ferrous metals: Physico-chemical and biological evaluation of the durability of soil treatment and revegetation. *Environ. Pollut.* **94**, 131–140 (1996).
 126. Satarug, S. *et al.* A global perspective on cadmium pollution and toxicity in non-occupationally exposed population. in *Toxicology Letters* vol. 137 65–83 (Toxicol Lett,

- 2003).
127. Honda, R. *et al.* Cadmium induced renal dysfunction among residents of rice farming area downstream from a zinc-mineralized belt in Thailand. *Toxicol. Lett.* **198**, 26–32 (2010).
 128. Järup, L., Berglund, M., Elinder, C. G., Nordberg, G. & Vanter, M. Health effects of cadmium exposure – a review of the literature and a risk estimate. *Scandinavian Journal of Work, Environment & Health* vol. 24 1–51 (1998).
 129. Andujar, P., Bensefa-Colas, L. & Descatha, A. Intoxication aiguë et chronique au cadmium. *Revue de Medecine Interne* vol. 31 107–115 (2010).
 130. Bernhoft, R. A. Cadmium toxicity and treatment. *The Scientific World Journal* vol. 2013 (2013).
 131. Klaassen, C. D., Liu, J. & Choudhuri, S. METALLOTHIONEIN: An Intracellular Protein to Protect Against Cadmium Toxicity. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* **39**, 267–294 (1999).
 132. Kim, H. T., Loftus, J. P., Mann, S. & Wakshlag, J. J. Evaluation of arsenic, cadmium, lead and mercury contamination in over-the-counter available dry dog foods with different animal ingredients (Red Meat, Poultry, and Fish). *Front. Vet. Sci.* **5**, 264–264 (2018).
 133. Wallin, M. *et al.* Kidney cadmium levels and associations with urinary calcium and bone mineral density: A cross-sectional study in Sweden. *Environ. Heal. A Glob. Access Sci. Source* **12**, (2013).
 134. Yang, H. & Shu, Y. Cadmium transporters in the kidney and cadmium-induced nephrotoxicity. *International Journal of Molecular Sciences* vol. 16 1484–1494 (2015).
 135. Lemen, R. A., Lee, J. S., Wagoner, J. K. & Blejer, H. P. CANCER MORTALITY AMONG CADMIUM PRODUCTION WORKERS. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **271**, 273–279 (1976).
 136. Straif, K. *et al.* A review of human carcinogens--part C: metals, arsenic, dusts, and fibres.

- in *The lancet oncology* vol. 10 453–454 (Lancet Oncol, 2009).
137. Waalkes, M. P. Cadmium carcinogenesis. *Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* vol. 533 107–120 (2003).
 138. Nawrot, T. *et al.* Environmental exposure to cadmium and risk of cancer: A prospective population-based study. *Lancet Oncol.* **7**, 119–126 (2006).
 139. Demir, E. *et al.* Cytotoxicity and genotoxicity of cadmium oxide nanoparticles evaluated using in vitro assays. *Mutat. Res. - Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* **850–851**, (2020).
 140. Liu, J., Qu, W. & Kadiiska, M. B. Role of oxidative stress in cadmium toxicity and carcinogenesis. *Toxicology and Applied Pharmacology* vol. 238 209–214 (2009).
 141. Hartwig, A. Cadmium and cancer. *Met. Ions Life Sci.* **11**, 491–507 (2013).
 142. Zhang, H. & Reynolds, M. Cadmium exposure in living organisms: A short review. *Science of the Total Environment* vol. 678 761–767 (2019).
 143. Schwerdtle, T. *et al.* Genotoxicity of soluble and particulate cadmium compounds: Impact on oxidative dna damage and nucleotide excision repair. *Chem. Res. Toxicol.* **23**, 432–442 (2010).
 144. Wieland, M., Levin, M. K., Hingorani, K. S., Noah Biro, F. & Hingorani, M. M. Mechanism of cadmium-mediated inhibition of Msh2-Msh6 function in DNA mismatch repair. *Biochemistry* **48**, 9492–9502 (2009).
 145. Wei, Z., Song, X. & Shaikh, Z. A. Cadmium promotes the proliferation of triple-negative breast cancer cells through EGFR-mediated cell cycle regulation. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **289**, 98–108 (2015).
 146. Ma, L. & Qu, L. The function of MicroRNAs in renal development and pathophysiology. *Journal of Genetics and Genomics* vol. 40 143–152 (2013).
 147. Pichler, M. & Calin, G. A. MicroRNAs in cancer: from developmental genes in worms to

- their clinical application in patients. *Br. J. Cancer* **113**, 569–573 (2015).
148. Glowacki, F. *et al.* Increased Circulating miR-21 Levels Are Associated with Kidney Fibrosis. *PLoS One* **8**, (2013).
 149. Gomez, I. G., Grafals, M., Portilla, D. & Duffield, J. S. MicroRNAs as potential therapeutic targets in kidney disease. *Journal of the Formosan Medical Association* vol. 112 237–243 (2013).
 150. Khella, H. W. Z. *et al.* MicroRNAs in kidney disease: An emerging understanding. *Am. J. Kidney Dis.* **61**, 798–808 (2013).
 151. Hennino, M. F. *et al.* MiR-21-5p renal expression is associated with fibrosis and renal survival in patients with IgA nephropathy. *Sci. Rep.* **6**, (2016).
 152. Vandenbussche, C. *et al.* Tacrolimus-induced nephrotoxicity in mice is associated with microRNA deregulation. *Arch. Toxicol.* **92**, 1539–1550 (2018).
 153. Vlachos, I. S. *et al.* DIANA-miRPath v3.0: Deciphering microRNA function with experimental support. *Nucleic Acids Res.* **43**, W460–W466 (2015).
 154. Devarajan, P. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL): A new marker of kidney disease. in *Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation* vol. 68 89–94 (Scand J Clin Lab Invest Suppl, 2008).
 155. Jun, S. Y. *et al.* Clinicopathological and prognostic significance of heme oxygenase-1 expression in small intestinal adenocarcinomas. *Pathol. Int.* **68**, 294–300 (2018).
 156. Komoike, Y., Inamura, H. & Matsuoka, M. Effects of salubrinal on cadmium-induced apoptosis in HK-2 human renal proximal tubular cells. *Arch. Toxicol.* **86**, 37–44 (2012).
 157. Kondo, M., Inamura, H., Matsumura, K. I. & Matsuoka, M. Cadmium activates extracellular signal-regulated kinase 5 in HK-2 human renal proximal tubular cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **421**, 490–493 (2012).

158. Fujiki, K., Inamura, H. & Matsuoka, M. Phosphorylation of FOXO3a by PI3K/Akt pathway in HK-2 renal proximal tubular epithelial cells exposed to cadmium. *Arch. Toxicol.* **87**, 2119–2127 (2013).
159. Kim, H. R. *et al.* SRSF3-regulated miR-132/212 controls cell migration and invasion by targeting YAP1. *Exp. Cell Res.* **358**, 161–170 (2017).
160. Handl, J. *et al.* Transient increase in cellular dehydrogenase activity after cadmium treatment precedes enhanced production of reactive oxygen species in human proximal tubular kidney cells. *Physiol. Res.* **68**, 481–490 (2019).
161. Wang, C. M. *et al.* MiR-29c targets TNFAIP3, inhibits cell proliferation and induces apoptosis in hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **411**, 586–592 (2011).
162. Fang, Y. *et al.* miR-29C is downregulated in renal interstitial fibrosis in humans and rats and restored by HIF- α activation. *Am. J. Physiol. - Ren. Physiol.* **304**, 1274–1282 (2013).
163. Wang, Y., Zhang, X., Li, H., Yu, J. & Ren, X. The role of miRNA-29 family in cancer. *European Journal of Cell Biology* vol. 92 123–128 (2013).
164. Yan, B. *et al.* The role of miR-29b in cancer: Regulation, function, and signaling. *OncoTargets and Therapy* vol. 8 539–548 (2015).
165. Guo, J. *et al.* MiRNA-29c regulates the expression of inflammatory cytokines in diabetic nephropathy by targeting tristetraprolin. *Sci. Rep.* **7**, (2017).
166. Wang, K., Jin, J., Ma, T. & Zhai, H. MiR-376c-3p regulates the proliferation, invasion, migration, cell cycle and apoptosis of human oral squamous cancer cells by suppressing HOXB7. *Biomed. Pharmacother.* **91**, 517–525 (2017).
167. Pei, K., Zhu, J. J., Wang, C. E., Xie, Q. L. & Guo, J. Y. MicroRNA-185-5p modulates chemosensitivity of human non-small cell lung cancer to cisplatin via targeting ABCC1.

- Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* **20**, 4697–4704 (2016).
168. Chen, P. *et al.* MicroRNA-185-5p restores glucocorticoid sensitivity by suppressing the mammalian target of rapamycin complex (mTORC) signaling pathway to enhance glucocorticoid receptor autoregulation. *Leuk. Lymphoma* **58**, 2657–2667 (2017).
 169. Shang, W. *et al.* LncRNA RNCR3 promotes Chop expression by sponging miR- 185-5p during MDSC differentiation. *Oncotarget* **8**, 111754–111769 (2017).
 170. Sun, C. C. *et al.* The lncRNA PDIA3P Interacts with miR-185-5p to Modulate Oral Squamous Cell Carcinoma Progression by Targeting Cyclin D2. *Mol. Ther. - Nucleic Acids* **9**, 100–110 (2017).
 171. Ostadrahimi, S. *et al.* miR-1266-5p and miR-185-5p promote cell apoptosis in human prostate cancer cell lines. *Asian Pacific J. Cancer Prev.* **19**, 2305–2311 (2018).
 172. Zhou, L. *et al.* miR-185 Inhibits Fibrogenic Activation of Hepatic Stellate Cells and Prevents Liver Fibrosis. *Mol. Ther. - Nucleic Acids* **10**, 91–102 (2018).
 173. Wang, L. *et al.* EGR1 mediates miR-203a suppress the hepatocellular carcinoma cells progression by targeting HOXD3 through EGFR signaling pathway. *Oncotarget* **7**, 45302–45316 (2016).
 174. Zierau, O. *et al.* Role of miR-203 in estrogen receptor-mediated signaling in the rat uterus and endometrial carcinoma. *J. Cell. Biochem.* **119**, 5359–5372 (2018).
 175. Kim, H. Y. *et al.* MicroRNA-132 and microRNA-223 control positive feedback circuit by regulating FOXO3a in inflammatory bowel disease. *J. Gastroenterol. Hepatol.* **31**, 1727–1735 (2016).
 176. Zhou, X. *et al.* MiR-132-3p regulates ADAMTS-5 expression and promotes chondrogenic differentiation of rat mesenchymal stem cells. *J. Cell. Biochem.* **119**, 2579–2587 (2018).
 177. Cui, H. *et al.* MicroRNA-27a-3p is a negative regulator of lung fibrosis by targeting

- myofibroblast differentiation. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* **54**, 843–852 (2016).
178. Zhou, L. *et al.* MiR-27a-3p functions as an oncogene in gastric cancer by targeting BTG2. *Oncotarget* **7**, 51943–51954 (2016).
 179. Chae, D. K. *et al.* MIR-27a regulates the TGF- β signaling pathway by targeting SMAD2 and SMAD4 in lung cancer. *Mol. Carcinog.* **56**, 1992–1998 (2017).
 180. Liang, J. *et al.* miR-27a-3p targeting RXRa promotes colorectal cancer progression by activating Wnt/ β -catenin pathway. *Oncotarget* **8**, 82991–83008 (2017).
 181. Li, J. M. *et al.* MicroRNA-27a-3p inhibits cell viability and migration through down-regulating DUSP16 in hepatocellular carcinoma. *J. Cell. Biochem.* **119**, 5143–5152 (2018).
 182. Zhang, P., Li, L. Q., Zhang, D. & Shen, Y. Over-expressed miR-27a-3p inhibits inflammatory response to spinal cord injury by decreasing TLR4. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* **22**, 5416–5423 (2018).
 183. Zhao, Y., Dong, D., Reece, E. A., Wang, A. R. & Yang, P. Oxidative stress-induced miR-27a targets the redox gene nuclear factor erythroid 2-related factor 2 in diabetic embryopathy. *Am. J. Obstet. Gynecol.* **218**, 136.e1-136.e10 (2018).
 184. Yang, D. *et al.* MicroRNA-125b-5p mimic inhibits acute liver failure. *Nat. Commun.* **7**, (2016).
 185. Diao, W. *et al.* MicroRNA-125b-5p modulates the inflammatory state of macrophages via targeting B7-H4. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **491**, 912–918 (2017).
 186. Yang, D. *et al.* MIR-125b-5p enhances chemotherapy sensitivity to cisplatin by down-regulating Bcl2 in gallbladder cancer. *Sci. Rep.* **7**, (2017).
 187. You, K. *et al.* MicroRNA-125b Promotes Hepatic Stellate Cell Activation and Liver Fibrosis by Activating RhoA Signaling. *Mol. Ther. - Nucleic Acids* **12**, 57–66 (2018).

188. Lu, Y. *et al.* Hsa-miR-301a-3p acts as an oncogene in laryngeal squamous cell carcinoma via target regulation of Smad4. *J. Cancer* **6**, 1260–1275 (2015).
189. Xia, X. *et al.* MicroRNA-301a-3p promotes pancreatic cancer progression via negative regulation of SMAD4. *Oncotarget* **6**, 21046–21063 (2015).
190. Zhang, L. *et al.* Overexpression of miR-301a-3p promotes colorectal cancer cell proliferation and metastasis by targeting deleted in liver cancer-1 and runt-related transcription factor 3. *J. Cell. Biochem.* **120**, 6078–6089 (2019).
191. Gits, C. M. M. *et al.* MiR-17-92 and miR-221/222 cluster members target KIT and ETV1 in human gastrointestinal stromal tumours. *Br. J. Cancer* **109**, 1625–1635 (2013).
192. Markopoulos, G. S. *et al.* Senescence-associated microRNAs target cell cycle regulatory genes in normal human lung fibroblasts. *Exp. Gerontol.* **96**, 110–122 (2017).
193. Tan, X., Tang, H., Bi, J., Li, N. & Jia, Y. MicroRNA-222-3p associated with Helicobacter pylori targets HIPK2 to promote cell proliferation, invasion, and inhibits apoptosis in gastric cancer. *J. Cell. Biochem.* **119**, 5153–5162 (2018).
194. Zhang, X. F., Ye, Y. & Zhao, S. J. LncRNA Gas5 acts as a ceRNA to regulate PTEN expression by sponging miR-222-3p in papillary thyroid carcinoma. *Oncotarget* **9**, 3519–3530 (2018).
195. Xiong, Y. *et al.* MiR-886-3p regulates cell proliferation and migration, and is dysregulated in familial non-medullary thyroid cancer. *PLoS One* **6**, (2011).
196. Yu, Z. *et al.* MiR-886-3p upregulation in clear cell renal cell carcinoma regulates cell migration, proliferation and apoptosis by targeting PITX1. *Int. J. Mol. Med.* **34**, 1409–1416 (2014).
197. Gao, X. N. *et al.* MicroRNA-193a represses c-kit expression and functions as a methylation-silenced tumor suppressor in acute myeloid leukemia. *Oncogene* **30**,

- 3416–3428 (2011).
198. Iliopoulos, D., Rotem, A. & Struhl, K. Inhibition of miR-193a expression by max and RXR α activates K-ras and PLA1 to mediate distinct aspects of cellular transformation. *Cancer Res.* **71**, 5144–5153 (2011).
 199. Uhlmann, S. *et al.* Global microRNA level regulation of EGFR-driven cell-cycle protein network in breast cancer. *Mol. Syst. Biol.* **8**, (2012).
 200. Yang, Z. *et al.* Silencing of miR-193a-5p increases the chemosensitivity of prostate cancer cells to docetaxel. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **36**, 178 (2017).
 201. Shi, Y. *et al.* MiR-99a-5p regulates proliferation, migration and invasion abilities of human oral carcinoma cells by targeting NOX4. *Neoplasma* **64**, 666–673 (2017).
 202. Tsai, T. F. *et al.* miR-99a-5p acts as tumor suppressor via targeting to mTOR and enhances RARAD001-induced apoptosis in human urinary bladder urothelial carcinoma cells. *Onco. Targets. Ther.* **11**, 239–252 (2018).
 203. Kouri, F. M. *et al.* MiR-182 integrates apoptosis, growth, and differentiation programs in glioblastoma. *Genes Dev.* **29**, 732–745 (2015).
 204. Liu, L. *et al.* MicroRNA-182 targets protein phosphatase 1 regulatory inhibitor subunit 1C in glioblastoma. *Oncotarget* **8**, 114677–114684 (2017).
 205. Cao, M. Q. *et al.* MIR-182-5p promotes hepatocellular carcinoma progression by repressing FOXO3a. *J. Hematol. Oncol.* **11**, (2018).
 206. Qin, S. B., Peng, D. Y., Lu, J. M. & Ke, Z. P. MiR-182-5p inhibited oxidative stress and apoptosis triggered by oxidized low-density lipoprotein via targeting toll-like receptor 4. *J. Cell. Physiol.* **233**, 6630–6637 (2018).
 207. Wang, C. *et al.* MIR-146a-5p mediates epithelial-mesenchymal transition of oesophageal squamous cell carcinoma via targeting Notch2. *Br. J. Cancer* **115**, 1548–

- 1554 (2016).
208. Xu, B. *et al.* Hsa-miR-146a-5p modulates androgen-independent prostate cancer cells apoptosis by targeting ROCK1. *Prostate* **75**, 1896–1903 (2015).
 209. Czajka, A. A. *et al.* Family of microRNA-146 regulates RAR β in papillary thyroid carcinoma. *PLoS One* **11**, (2016).
 210. Lu, J. *et al.* MicroRNA expression profiles classify human cancers. *Nature* **435**, 834–838 (2005).
 211. Wickramasinghe, N., Manavalan, T., Riggs, K., Li, Y. & Klinge, C. Estradiol downregulates miR-21 expression and miR-21 gene targets in MCF-7 breast cancer cells. in 3051 (American Association for Cancer Research (AACR), 2009). doi:10.1158/0008-5472.sabcs-3051.
 212. Schauerte, C. *et al.* Antagonism of profibrotic microRNA-21 improves outcome of murine chronic renal allograft dysfunction. *Kidney Int.* **92**, 646–656 (2017).
 213. Song, Y. *et al.* Inhibition of MicroRNA-21-5p Promotes the Radiation Sensitivity of Non-Small Cell Lung Cancer Through HMSH2. *Cell. Physiol. Biochem.* **43**, 1258–1272 (2017).
 214. Xu, L., Xu, Q., Li, X. & Zhang, X. MicroRNA-21 regulates the proliferation and apoptosis of cervical cancer cells via tumor necrosis factor- α . *Mol. Med. Rep.* **16**, 4659–4663 (2017).
 215. Lu, T. X., Munitz, A. & Rothenberg, M. E. MicroRNA-21 Is Up-Regulated in Allergic Airway Inflammation and Regulates IL-12p35 Expression. *J. Immunol.* **182**, 4994–5002 (2009).
 216. Zhang, J. J. *et al.* miR-21-5p/203a-3p promote ox-LDL-induced endothelial cell senescence through down-regulation of mitochondrial fission protein Drp1. *Mech. Ageing Dev.* **164**, 8–19 (2017).
 217. Bica-Pop, C. *et al.* Overview upon miR-21 in lung cancer: focus on NSCLC. *Cellular and*

218. Sarkar, J. *et al.* MicroRNA-21 plays a role in hypoxia-mediated pulmonary artery smooth muscle cell proliferation and migration. *Am. J. Physiol. - Lung Cell. Mol. Physiol.* **299**, (2010).
219. Zhang, J. *et al.* MicroRNA-21 (miR-21) represses tumor suppressor PTEN and promotes growth and invasion in non-small cell lung cancer (NSCLC). *Clin. Chim. Acta* **411**, 846–852 (2010).
220. Zhong, X. *et al.* MiR-21 is a key therapeutic target for renal injury in a mouse model of type 2 diabetes. *Diabetologia* **56**, 663–674 (2013).
221. Liu, X. *et al.* MiR-21 inhibits autophagy by targeting Rab11a in renal ischemia/reperfusion. *Exp. Cell Res.* **338**, 64–69 (2015).
222. Li, Z. *et al.* Elevation of miR-21, through targeting MKK3, may be involved in ischemia pretreatment protection from ischemia–reperfusion induced kidney injury. *J. Nephrol.* **29**, 27–36 (2016).
223. Markou, A., Zavridou, M. & Lianidou, E. S. MiRNA-21 as a novel therapeutic target in lung cancer. *Lung Cancer: Targets and Therapy* vol. 7 19–27 (2016).
224. Jiao, X. *et al.* miR-21 contributes to renal protection by targeting prolyl hydroxylase domain protein 2 in delayed ischaemic preconditioning. *Nephrology* **22**, 366–373 (2017).
225. De Santi, C. *et al.* Identification of MiR-21-5p as a functional regulator of mesothelin expression using microRNA capture affinity coupled with next generation sequencing. *PLoS One* **12**, (2017).
226. Chen, Y. *et al.* Dysregulation of the MiR-324-5p-CUEDC2 Axis Leads to Macrophage Dysfunction and Is Associated with Colon Cancer. *Cell Rep.* **7**, 1982–1993 (2014).

227. Gu, C., Zhang, M., Sun, W. & Dong, C. Upregulation of miR-324-5p inhibits proliferation and invasion of colorectal cancer cells by targeting ELAVL1. *Oncol. Res.* **27**, 515–524 (2019).
228. Lin, H., Zhou, A. J., Zhang, J. Y., Liu, S. F. & Gu, J. X. MiR-324-5p reduces viability and induces apoptosis in gastric cancer cells through modulating TSPAN8. *J. Pharm. Pharmacol.* **70**, 1513–1520 (2018).
229. Polikepahad, S. *et al.* Proinflammatory role for let-7 microRNAs in experimental asthma. *J. Biol. Chem.* **285**, 30139–30149 (2010).
230. Fasihi-Ramandi, M., Moridnia, A., Najafi, A. & Sharifi, M. Inducing Apoptosis and Decreasing Cell Proliferation in Human Acute Promyelocytic Leukemia Through Regulation Expression of CASP3 by Let-7a-5p Blockage. *Indian J. Hematol. Blood Transfus.* **34**, 70–77 (2018).
231. Du, J. *et al.* MiR-146a-5p suppresses activation and proliferation of hepatic stellate cells in nonalcoholic fibrosing steatohepatitis through directly targeting Wnt1 and Wnt5a. *Sci. Rep.* **5**, (2015).
232. Li, Y. L. *et al.* MiR-146a-5p inhibits cell proliferation and cell cycle progression in NSCLC cell lines by targeting CCND1 and CCND2. *Oncotarget* **7**, 59287–59298 (2016).
233. Wang, J. *et al.* Integrated analysis of microRNA and mRNA expression profiles in the left atrium of patients with nonvalvular paroxysmal atrial fibrillation: Role of miR-146b-5p in atrial fibrosis. *Hear. Rhythm* **12**, 1018–1026 (2015).
234. Lo, W. Y., Peng, C. T. & Wang, H. J. MicroRNA-146a-5p mediates high glucose-induced endothelial inflammation via targeting interleukin-1 receptor-associated kinase 1 expression. *Front. Physiol.* **8**, (2017).
235. Y, S. *et al.* miR-146a-5p Acts as a Negative Regulator of TGF- β Signaling in Skeletal

- Muscle After Acute Contusion. *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)*. **49**, (2017).
236. Zhou, C., Jiang, C. Q., Zong, Z., Lin, J. C. & Lao, L. F. miR-146a promotes growth of osteosarcoma cells by targeting ZNRF3/GSK-3 β / β -catenin signaling pathway. *Oncotarget* **8**, 74276–74286 (2017).
 237. Xu, H. *et al.* Let-7b-5p Regulates Proliferation and Apoptosis in Multiple Myeloma by Targeting IGF1R. *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)*. **46**, (2014).
 238. Parikh, A. *et al.* MicroRNA-181a has a critical role in ovarian cancer progression through the regulation of the epithelial-mesenchymal transition. *Nat. Commun.* **5**, (2014).
 239. Li, Y. *et al.* miR-181a-5p inhibits cancer cell migration and angiogenesis via downregulation of matrix metalloproteinase-14. *Cancer Res.* **75**, 2674–2685 (2015).
 240. D, O. *et al.* MiR-181a-5p Regulates 3T3-L1 Cell Adipogenesis by Targeting Smad7 and Tcf7l2. *Acta Biochim. Biophys. Sin. (Shanghai)*. **48**, (2016).
 241. Liu, Z. *et al.* MEG2 is regulated by miR-181a-5p and functions as a tumour suppressor gene to suppress the proliferation and migration of gastric cancer cells. *Mol. Cancer* **16**, (2017).
 242. Lyu, X. *et al.* MiR-181a-5p, an inducer of Wnt-signaling, facilitates cell proliferation in acute lymphoblastic leukemia. *Oncol. Rep.* **37**, 1469–1476 (2017).
 243. Mi, Y. *et al.* miR-181a-5p promotes the progression of gastric cancer via RASSF6-mediated MAPK signalling activation. *Cancer Lett.* **389**, 11–22 (2017).
 244. Zhu, J. *et al.* TNF- α mRNA is negatively regulated by microRNA-181a-5p in maturation of dendritic cells induced by high mobility group box-1 protein. *Sci. Rep.* **7**, (2017).
 245. Yang, P. *et al.* MiR-362-5p promotes the malignancy of chronic myelocytic leukaemia via down-regulation of GADD45a α . *Mol. Cancer* **14**, (2015).
 246. Zhao, L., Zhang, Y. & Zhang, Y. Long noncoding RNA CASC2 regulates hepatocellular

- carcinoma cell oncogenesis through miR-362-5p/Nf- κ B axis. *J. Cell. Physiol.* **233**, 6661–6670 (2018).
247. Long, J., Jiang, C., Liu, B., Fang, S. & Kuang, M. MicroRNA-15a-5p suppresses cancer proliferation and division in human hepatocellular carcinoma by targeting BDNF. *Tumor Biol.* **37**, 5821–5828 (2016).
 248. Chen, D. *et al.* MiR-15a-5p negatively regulates cell survival and metastasis by targeting CXCL10 in chronic myeloid leukemia. *Am J Transl Res* vol. 9 www.ajtr.org (2017).
 249. Wang, Z. M. *et al.* miR-15a-5p suppresses endometrial cancer cell growth via Wnt/ β -catenin signaling pathway by inhibiting WNT3A. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* **21**, 4810–4818 (2017).
 250. Shang, J. *et al.* miR-15a-5p suppresses inflammation and fibrosis of peritoneal mesothelial cells induced by peritoneal dialysis via targeting VEGFA. *J. Cell. Physiol.* **234**, 9746–9755 (2019).
 251. Almeida, M. I. *et al.* Strand-specific miR-28-5p and miR-28-3p have distinct effects in colorectal cancer cells. *Gastroenterology* **142**, (2012).
 252. Bai, X. T. & Nicot, C. MiR-28-3p is a cellular restriction factor that inhibits human T cell leukemia virus, type 1 (HTLV-1) replication and virus infection. *J. Biol. Chem.* **290**, 5381–5390 (2015).
 253. Zhou, X. *et al.* MiR-28-3p as a potential plasma marker in diagnosis of pulmonary embolism. *Thromb. Res.* **138**, 91–95 (2015).
 254. Ma, W., Ma, C. N., Zhou, N. N., Li, X. D. & Zhang, Y. J. Up- regulation of miR-328-3p sensitizes non-small cell lung cancer to radiotherapy. *Sci. Rep.* **6**, (2016).
 255. Al-Othman, N., Hammad, H. & Ahram, M. Dihydrotestosterone regulates expression of CD44 via miR-328-3p in triple-negative breast cancer cells. *Gene* **675**, 128–135 (2018).

256. Cheng, C. M., Shiah, S. G., Huang, C. C., Hsiao, J. R. & Chang, J. Y. Up-regulation of miR-455-5p by the TGF- β –SMAD signalling axis promotes the proliferation of oral squamous cancer cells by targeting UBE2B. *J. Pathol.* **240**, 38–49 (2016).
257. Liu, J. *et al.* MiR-455-5p acts as a novel tumor suppressor in gastric cancer by down-regulating RAB18. *Gene* **591**, 308–315 (2016).
258. Cheng, D. *et al.* MicroRNA-20a-5p promotes colorectal cancer invasion and metastasis by downregulating Smad4. *Oncotarget* **7**, 45199–45213 (2016).
259. Fang, W. *et al.* MicroRNA-20a-5p contributes to hepatic glycogen synthesis through targeting p63 to regulate p53 and PTEN expression. *J. Cell. Mol. Med.* **20**, 1467–1480 (2016).
260. Luo, W., Li, G., Yi, Z., Nie, Q. & Zhang, X. E2F1-miR-20a-5p/20b-5p auto-regulatory feedback loop involved in myoblast proliferation and differentiation. *Sci. Rep.* **6**, (2016).
261. Pu, Y. *et al.* MiR-20a-5p represses multi-drug resistance in osteosarcoma by targeting the KIF26B gene. *Cancer Cell Int.* **16**, (2016).
262. Zhang, G. *et al.* Down-regulation of miR-20a-5p triggers cell apoptosis to facilitate mycobacterial clearance through targeting JNK2 in human macrophages. *Cell Cycle* **15**, 2527–2538 (2016).
263. Huang, D. *et al.* MiR-20a-5p promotes radio-resistance by targeting Rab27B in nasopharyngeal cancer cells. *Cancer Cell Int.* **17**, (2017).
264. Yu, Y. *et al.* MiR-20a-5p suppresses tumor proliferation by targeting autophagy-related gene 7 in neuroblastoma. *Cancer Cell Int.* **18**, (2018).
265. Zhu, D. *et al.* MicroRNA-17/20a/106a modulate macrophage inflammatory responses through targeting signal-regulatory protein α . *J. Allergy Clin. Immunol.* **132**, (2013).
266. Pu, Y. *et al.* The miR-34a-5p promotes the multi-chemoresistance of osteosarcoma via

- repression of the AGTR1 gene. *BMC Cancer* **17**, (2017).
267. Ding, N., Wu, H., Tao, T. & Peng, E. NEAT1 regulates cell proliferation and apoptosis of ovarian cancer by miR-34a-5p/BCL2. *Onco. Targets. Ther.* **10**, 4905–4915 (2017).
 268. Pu, Y. *et al.* MiR-34a-5p promotes the multi-drug resistance of osteosarcoma by targeting the CD117 gene. *Oncotarget* **7**, 28420–28434 (2016).
 269. Jiang, Z. Q. *et al.* Luteolin inhibits tumorigenesis and induces apoptosis of non-small cell lung cancer cells via regulation of microRNA-34a-5p. *Int. J. Mol. Sci.* **19**, (2018).
 270. Sun, Z., Zhang, B. & Cui, T. Long non-coding RNA XIST exerts oncogenic functions in pancreatic cancer via miR-34a-5p. *Oncol. Rep.* **39**, 1591–1600 (2018).
 271. Xue, M. *et al.* High glucose up-regulates microRNA-34a-5p to aggravate fibrosis by targeting SIRT1 in HK-2 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **498**, 38–44 (2018).
 272. Yang, W. *et al.* MiR-652-3p is upregulated in non-small cell lung cancer and promotes proliferation and metastasis by directly targeting Lgl1. *Oncotarget* **7**, 16703–16715 (2016).
 273. Jiang, L. *et al.* A microRNA-mediated decrease in eukaryotic initiation factor 2 α promotes cell survival during PS-341 treatment. *Sci. Rep.* **6**, (2016).
 274. Luo, M. *et al.* Hyperglycaemia-induced reciprocal changes in miR-30c and PAI-1 expression in platelets. *Sci. Rep.* **6**, (2016).
 275. Cao, J. mei, Li, G. zhong, Han, M., Xu, H. ling & Huang, K. ming. MiR-30c-5p suppresses migration, invasion and epithelial to mesenchymal transition of gastric cancer via targeting MTA1. *Biomed. Pharmacother.* **93**, 554–560 (2017).
 276. Ceolotto, G. *et al.* MiR-30c-5p regulates macrophage-mediated inflammation and pro-atherosclerosis pathways. *Cardiovasc. Res.* **113**, 1627–1638 (2017).
 277. Liu, Y. *et al.* Overexpression of miR-26b-5p regulates the cell cycle by targeting CCND2

- in GC-2 cells under exposure to extremely low frequency electromagnetic fields. *Cell Cycle* **15**, 357–367 (2016).
278. Fan, F. *et al.* MicroRNA-26b-5p regulates cell proliferation, invasion and metastasis in human intrahepatic cholangiocarcinoma by targeting S100A7. *Oncol. Lett.* **15**, 386–392 (2018).
 279. Wilke, C. M. *et al.* Expression of miRNA-26b-5p and its target TRPS1 is associated with radiation exposure in post-Chernobyl breast cancer. *Int. J. Cancer* **142**, 573–583 (2018).
 280. Miyamoto, K. *et al.* Tumour-suppressive miRNA-26a-5p and miR-26b-5p inhibit cell aggressiveness by regulating PLOD2 in bladder cancer. *Br. J. Cancer* **115**, 354–363 (2016).
 281. Cheng, Y., Xiang, G., Meng, Y. & Dong, R. MiRNA-183-5p promotes cell proliferation and inhibits apoptosis in human breast cancer by targeting the PDCD4. *Reprod. Biol.* **16**, 225–233 (2016).
 282. Kara, M. *et al.* MTUS1 tumor suppressor and its miRNA regulators in fibroadenoma and breast cancer. *Gene* **587**, 173–177 (2016).
 283. Miao, F. *et al.* MicroRNA-183-5p promotes the proliferation, invasion and metastasis of human pancreatic adenocarcinoma cells. *Oncol. Lett.* **11**, 134–140 (2016).
 284. Sokół, E. *et al.* microRNA-mediated regulation of splicing factors SRSF1, SRSF2 and hnRNP A1 in context of their alternatively spliced 3'UTRs. *Exp. Cell Res.* **363**, 208–217 (2018).
 285. Han, B. W. *et al.* A set of miRNAs that involve in the pathways of drug resistance and leukemic stem-cell differentiation is associated with the risk of relapse and glucocorticoid response in childhood ALL. *Hum. Mol. Genet.* **20**, 4903–4915 (2011).
 286. Saini, S. *et al.* MiRNA-708 control of CD44+ prostate cancer-initiating cells. *Cancer Res.*

- 72**, 3618–3630 (2012).
287. Lei, S. L. *et al.* Regulatory roles of microRNA-708 and microRNA-31 in proliferation, apoptosis and invasion of colorectal cancer cells. *Oncol. Lett.* **8**, 1768–1774 (2014).
 288. Pan, Y. *et al.* MicroRNA-130a inhibits cell proliferation, invasion and migration in human breast cancer by targeting the RAB5A. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **8**, 384–393 (2015).
 289. Liu, Y. *et al.* MIR-130a-3p regulates cell migration and invasion via inhibition of Smad4 in gemcitabine resistant hepatoma cells. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* **35**, (2016).
 290. Chen, X. *et al.* MiR-130a-3p inhibits the viability, proliferation, invasion, and cell cycle, and promotes apoptosis of nasopharyngeal carcinoma cells by suppressing BACH2 expression. *Biosci. Rep.* **37**, (2017).
 291. Jiang, Y. *et al.* Overexpression of miR-130a-3p/301a-3p attenuates high glucose-induced MPC5 podocyte dysfunction through suppression of TNF- α signaling. *Exp. Ther. Med.* **15**, 1021–1028 (2018).
 292. Wang, S. *et al.* MicroRNA-130a-3p suppresses cell migration and invasion by inhibition of TBL1XR1-mediated EMT in human gastric carcinoma. *Mol. Carcinog.* **57**, 383–392 (2018).
 293. Li, J. H. *et al.* MicroRNA miR-886-5p inhibits apoptosis by down-regulating Bax expression in human cervical carcinoma cells. *Gynecol. Oncol.* **120**, 145–151 (2011).
 294. Yentrapalli, R. *et al.* Quantitative and integrated proteome and microRNA analysis of endothelial replicative senescence. *J. Proteomics* **126**, 12–23 (2015).
 295. Kang, J. *et al.* MicroRNA-99b acts as a tumor suppressor in non-small cell lung cancer by directly targeting fibroblast growth factor receptor 3. *Exp. Ther. Med.* **3**, 149–153 (2012).
 296. Turcatel, G., Rubin, N., El-Hashash, A. & Warburton, D. Mir-99a and mir-99b modulate

- TGF- β induced epithelial to mesenchymal plasticity in normal murine mammary gland cells. *PLoS One* **7**, (2012).
297. Yang, J., Liu, X., Yuan, X. & Wang, Z. MiR-99b promotes metastasis of hepatocellular carcinoma through inhibition of claudin 11 expression and may serve as a prognostic marker. *Oncol. Rep.* **34**, 1415–1423 (2015).
 298. Cao, F., Liu, T., Sun, S. & Feng, S. The role of the miR-99b-5p/mTOR signaling pathway in neuroregeneration in mice following spinal cord injury. *Mol. Med. Rep.* **16**, 9355–9360 (2017).
 299. Zhong, Z., Dong, Z., Yang, L., Chen, X. & Gong, Z. MicroRNA-31-5p modulates cell cycle by targeting human mutL homolog 1 in human cancer cells. *Tumor Biol.* **34**, 1959–1965 (2013).
 300. Zhao, G., Han, C., Zhang, Z., Wang, L. & Xu, J. Increased expression of microRNA-31-5p inhibits cell proliferation, migration, and invasion via regulating Sp1 transcription factor in HepG2 hepatocellular carcinoma cell line. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **490**, 371–377 (2017).
 301. Lai, Y. H. *et al.* MiR-31-5p-ACOX1 axis enhances tumorigenic fitness in oral squamous cell carcinoma via the promigratory prostaglandin E2. *Theranostics* **8**, 486–504 (2018).
 302. Salati, S. *et al.* Deregulated expression of miR-29a-3p, miR-494-3p and miR-660-5p affects sensitivity to tyrosine kinase inhibitors in CML leukemic stem cells. *Oncotarget* **8**, 49451–49469 (2017).
 303. Shen, Y. *et al.* Inhibition of miR-660-5p expression suppresses tumor development and metastasis in human breast cancer. *Genet. Mol. Res.* **16**, (2017).
 304. Liao, W. T. *et al.* MicroRNA-30b functions as a tumour suppressor in human colorectal cancer by targeting KRAS, PIK3CD and BCL2. *J. Pathol.* **232**, 415–427 (2014).

305. Zhao, H., Xu, Z., Qin, H., Gao, Z. & Gao, L. MiR-30b regulates migration and invasion of human colorectal cancer via SIX1. *Biochem. J.* **460**, 117–125 (2014).
306. Zhu, E. D. *et al.* miR-30b, down-regulated in gastric cancer, promotes apoptosis and suppresses tumor growth by targeting plasminogen activator inhibitor-1. *PLoS One* **9**, (2014).
307. Li, S. P. *et al.* MiR-30b inhibits autophagy to alleviate hepatic ischemiareperfusion injury via decreasing the Atg12-Atg5 conjugate. *World J. Gastroenterol.* **22**, 4501–4514 (2016).
308. Liu, W. *et al.* MiR-30b-5p functions as a tumor suppressor in cell proliferation, metastasis and epithelial-to-mesenchymal transition by targeting G-protein subunit α -13 in renal cell carcinoma. *Gene* **626**, 275–281 (2017).
309. Qin, X., Chen, J., Wu, L. & Liu, Z. MiR-30b-5p acts as a tumor suppressor, repressing cell proliferation and cell cycle in human hepatocellular carcinoma. *Biomed. Pharmacother.* **89**, 742–750 (2017).
310. Stahlhut, C. & Slack, F. J. MicroRNAs and the cancer phenotype: profiling, signatures and clinical implications. *Genome Med.* **5**, 111 (2013).
311. Huang, Q., Liu, Y. & Dong, S. Emerging roles of long non-coding RNAs in the toxicology of environmental chemicals. *Journal of Applied Toxicology* vol. 38 934–943 (2018).
312. Humphries, B., Wang, Z. & Yang, C. The role of microRNAs in metal carcinogen-induced cell malignant transformation and tumorigenesis. *Food Chem. Toxicol.* **98**, 58–65 (2016).
313. He, J. *et al.* Chronic arsenic exposure and angiogenesis in human bronchial epithelial Cells via the ROS/miR-199a-5p/HIF-1 α /COX-2 pathway. *Environ. Health Perspect.* **122**, 255–261 (2014).
314. Li, J., Yu, H. & Luan, Y. Meta-analysis of the copper, zinc, and cadmium absorption

- capacities of aquatic plants in heavy metal-polluted water. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **12**, 14958–14973 (2015).
315. Ding, Y., Chen, Z. & Zhu, C. Microarray-based analysis of cadmium-responsive microRNAs in rice (*Oryza sativa*). *J. Exp. Bot.* **62**, 3563–3573 (2011).
 316. Cucu, D., D’Haese, P. C., De Beuf, A. & Verhulst, A. Low Doses of Cadmium Chloride and Methallothionein-1-Bound Cadmium Display Different Accumulation Kinetics and Induce Different Genes in Cells of the Human Nephron. *Nephron Extra* **1**, 24–37 (2011).
 317. Tang, M. *et al.* Integrated analysis of miRNA and mRNA expression profiles in response to Cd exposure in rice seedlings. *BMC Genomics* **15**, (2014).
 318. Simon-Friedt, B. R. *et al.* The RPTEC/TERT1 Cell Line as an Improved Tool for In Vitro Nephrotoxicity Assessments. *Biol. Trace Elem. Res.* **166**, 66–71 (2015).
 319. Secker, P. F., Luks, L., Schlichenmaier, N. & Dietrich, D. R. RPTEC/TERT1 cells form highly differentiated tubules when cultured in a 3D matrix. *ALTEX* **35**, 223–234 (2018).
 320. Wieser, M. *et al.* hTERT alone immortalizes epithelial cells of renal proximal tubules without changing their functional characteristics. *Am. J. Physiol. - Ren. Physiol.* **295**, (2008).
 321. Fay, M. J. *et al.* Cadmium nephrotoxicity is associated with altered microRNA expression in the rat renal cortex. *Toxics* **6**, (2018).
 322. Wei, C., Li, L. & Gupta, S. NF- κ B-mediated miR-30b regulation in cardiomyocytes cell death by targeting Bcl-2. *Mol. Cell. Biochem.* **387**, 135–141 (2014).
 323. Liu, X. *et al.* miR-30c regulates proliferation, apoptosis and differentiation via the Shh signaling pathway in P19 cells. *Exp. Mol. Med.* **48**, e248 (2016).
 324. Du, B. *et al.* MiR-30c regulates cisplatin-induced apoptosis of renal tubular epithelial cells by targeting Bnip3L and Hspa5. *Cell Death Dis.* **8**, e2987 (2017).

325. Peng, Y. & Croce, C. M. The role of microRNAs in human cancer. *Signal Transduction and Targeted Therapy* vol. 1 (2016).
326. Fabbri, M., Urani, C., Sacco, M. G., Procaccianti, C. & Gribaldo, L. Whole genome analysis and micrnas regulation in HepG2 cells exposed to cadmium. *ALTEX* **29**, 173–182 (2012).
327. Wang, G. *et al.* Urinary miR-21, miR-29, and miR-93: Novel biomarkers of fibrosis. *Am. J. Nephrol.* **36**, 412–418 (2012).
328. Zhao, W. *et al.* Serum miR-21 level: a potential diagnostic and prognostic biomarker for non-small cell lung cancer. *Int. J. Clin. Exp. Med.* **8**, 14759–63 (2015).
329. Testa, U., Castelli, G. & Pelosi, E. Lung Cancers: Molecular Characterization, Clonal Heterogeneity and Evolution, and Cancer Stem Cells. *Cancers (Basel)*. **10**, 248 (2018).
330. Bray, F. *et al.* Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA. Cancer J. Clin.* **68**, 394–424 (2018).
331. Bray, F. *et al.* Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA. Cancer J. Clin.* **68**, 394–424 (2018).
332. Barta, J. A., Powell, C. A. & Wisnivesky, J. P. Global Epidemiology of Lung Cancer. *Ann. Glob. Heal.* **85**, (2019).
333. Schulze, A. B. *et al.* Future options of molecular-targeted therapy in small cell lung cancer. *Cancers* vol. 11 (2019).
334. Pikor, L. A., Ramnarine, V. R., Lam, S. & Lam, W. L. Genetic alterations defining NSCLC subtypes and their therapeutic implications. *Lung Cancer* vol. 82 179–189 (2013).
335. Herbst, R. S., Morgensztern, D. & Boshoff, C. The biology and management of non-small

- cell lung cancer. *Nature* vol. 553 446–454 (2018).
336. Mignard, X. *et al.* Altérations moléculaires anciennes et émergentes: quand les rechercher ? *Rev. des Mal. Respir. Actual.* **9**, 202–212 (2017).
 337. Shim, H. S. *et al.* Molecular testing of lung cancers. *Journal of Pathology and Translational Medicine* vol. 51 242–254 (2017).
 338. Samanta, D. *et al.* Smoking attenuates transforming growth factor- β -mediated tumor suppression function through downregulation of Smad3 in lung cancer. *Cancer Prev. Res. (Phila)*. **5**, 453–463 (2012).
 339. Westcott, P. M. K. & To, M. D. The genetics and biology of KRAS in lung cancer. *Chinese Journal of Cancer* vol. 32 63–70 (2013).
 340. Skoulidis, F. & Heymach, J. V. Co-occurring genomic alterations in non-small-cell lung cancer biology and therapy. *Nature Reviews Cancer* vol. 19 495–509 (2019).
 341. Duma, N., Santana-Davila, R. & Molina, J. R. Non–Small Cell Lung Cancer: Epidemiology, Screening, Diagnosis, and Treatment. *Mayo Clinic Proceedings* vol. 94 1623–1640 (2019).
 342. De Leyn, P. & Decker, G. Le traitement chirurgical du cancer bronchique non à petites cellules. *Rev. Mal. Respir.* **21**, 971–982 (2004).
 343. Lemjabbar-Alaoui, H., Hassan, O. U. I., Yang, Y. W. & Buchanan, P. Lung cancer: Biology and treatment options. *Biochimica et Biophysica Acta - Reviews on Cancer* vol. 1856 189–210 (2015).
 344. Ettinger, D. S. *et al.* Non-small cell lung cancer, version 5.2017: Clinical practice guidelines in oncology. *JNCCN Journal of the National Comprehensive Cancer Network* vol. 15 504–535 (2017).
 345. Griffin, R. & Ramirez, R. A. *Molecular Targets in Non-Small Cell Lung Cancer*.

346. Rossi, A. & Di Maio, M. Platinum-based chemotherapy in advanced non-small-cell lung cancer: optimal number of treatment cycles. *Expert Review of Anticancer Therapy* vol. 16 653–660 (2016).
347. Dasari, S. & Bernard Tchounwou, P. Cisplatin in cancer therapy: Molecular mechanisms of action. *European Journal of Pharmacology* vol. 740 364–378 (2014).
348. Rosenberg, B., VanCamp, L., Trosko, J. E. & Mansour, V. H. Platinum compounds: A new class of potent antitumour agents [24]. *Nature* vol. 222 385–386 (1969).
349. Ghosh, S. Cisplatin: The first metal based anticancer drug. *Bioorganic Chemistry* vol. 88 (2019).
350. Crona, D. J. *et al.* A Systematic Review of Strategies to Prevent Cisplatin-Induced Nephrotoxicity. *Oncologist* **22**, 609–619 (2017).
351. Oun, R., Moussa, Y. E. & Wheate, N. J. The side effects of platinum-based chemotherapy drugs: A review for chemists. *Dalton Transactions* vol. 47 6645–6653 (2018).
352. Amable, L. Cisplatin resistance and opportunities for precision medicine. *Pharmacological Research* vol. 106 27–36 (2016).
353. Galluzzi, L. *et al.* Systems biology of cisplatin resistance: Past, present and future. *Cell Death and Disease* vol. 5 e1257 (2014).
354. Yuan, J. *et al.* MIR17HG-miR-18a/19a axis, regulated by interferon regulatory factor-1, promotes gastric cancer metastasis via Wnt/ β -catenin signalling. *Cell Death Dis.* **10**, 1–16 (2019).
355. Gu, H., Liu, Z. & Zhou, L. Roles of miR-17-92 Cluster in Cardiovascular Development and Common Diseases. (2017) doi:10.1155/2017/9102909.
356. Ventura, A. *et al.* Targeted Deletion Reveals Essential and Overlapping Functions of the miR-17~92 Family of miRNA Clusters. *Cell* **132**, 875–886 (2008).

357. Olive, V., Jiang, I. & He, L. Mir-17-92, a cluster of miRNAs in the midst of the cancer network. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **42**, 1348–1354 (2010).
358. Zhang, X., Li, Y., Qi, P. & Ma, Z. Biology of MiR-17-92 cluster and its progress in lung cancer. *Int. J. Med. Sci.* **15**, 1443–1448 (2018).
359. Mogilyansky, E. & Rigoutsos, I. The miR-17/92 cluster: A comprehensive update on its genomics, genetics, functions and increasingly important and numerous roles in health and disease. *Cell Death and Differentiation* vol. 20 1603–1614 (2013).
360. Sandhu, S. K. *et al.* B-cell malignancies in microRNA Eμ-miR-17~92 transgenic mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, 18208–18213 (2013).
361. Sheng, Y. *et al.* Effect of Nm23-H1 nuclear localization on proliferation of human lung adenocarcinoma cell line A549. *Chinese J. Lung Cancer* **20**, 226–232 (2017).
362. Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods* **25**, 402–408 (2001).
363. Zhu, Q., Zang, Q. & Jiang, Z. M. Enhanced expression of non coding miR 92a expression is implicated in the development of lung cancer. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* **22**, 1028–1034 (2018).
364. Alcantara, K. M. M. & Garcia, R. L. MicroRNA-92a promotes cell proliferation, migration and survival by directly targeting the tumor suppressor gene NF2 in colorectal and lung cancer cells. *Oncol. Rep.* **41**, 2103–2116 (2019).
365. Tsuchida, A. *et al.* miR-92 is a key oncogenic component of the miR-17-92 cluster in colon cancer. *Cancer Sci.* **102**, 2264–2271 (2011).
366. Pritchard, J. R., Lauffenburger, D. A. & Hemann, M. T. Understanding resistance to combination chemotherapy. *Drug Resistance Updates* vol. 15 249–257 (2012).
367. Goldstein, L. J., Pastan, I. & Gottesman, M. M. Multidrug resistance in human cancer.

- Critical Reviews in Oncology and Hematology* vol. 12 243–253 (1992).
368. Mokhtari, R. B. *et al.* Combination therapy in combating cancer. *Oncotarget* vol. 8 38022–38043 (2017).
 369. Langsch, S. *et al.* miR-29b mediates NF- κ B signaling in KRAS-Induced non-small cell lung cancers. *Cancer Res.* **76**, 4160–4169 (2016).
 370. Garzon, R., Marcucci, G. & Croce, C. M. Targeting microRNAs in cancer: Rationale, strategies and challenges. *Nature Reviews Drug Discovery* vol. 9 775–789 (2010).
 371. Kuhn, D. E. *et al.* Experimental validation of miRNA targets. *Methods* **44**, 47–54 (2008).
 372. Hayashita, Y. *et al.* A polycistronic MicroRNA cluster, miR-17-92, is overexpressed in human lung cancers and enhances cell proliferation. *Cancer Res.* **65**, 9628–9632 (2005).
 373. Li, X., Guo, S., Min, L., Guo, Q. & Zhang, S. MiR-92a-3p promotes the proliferation, migration and invasion of esophageal squamous cell cancer by regulating PTEN. *Int. J. Mol. Med.* **44**, 973–981 (2019).
 374. Morelli, E. *et al.* Therapeutic vulnerability of multiple myeloma to MIR17PTi, a first-in-class inhibitor of pri-miR-17-92. *Blood* **132**, 1050–1063 (2018).
 375. Wu, L. & Qu, X. Cancer biomarker detection: Recent achievements and challenges. *Chem. Soc. Rev.* **44**, 2963–2997 (2015).
 376. Lockhart, B. P. & Walther, B. Les biomarqueurs: Found in translation. *Medecine/Sciences* vol. 25 423–430 (2009).
 377. Bertoli, G., Cava, C. & Castiglioni, I. Micrnas: New biomarkers for diagnosis, prognosis, therapy prediction and therapeutic tools for breast cancer. *Theranostics* **5**, 1122–1143 (2015).
 378. Liu, Q., Zheng, C., Shen, H., Zhou, Z. & Lei, Y. MicroRNAs-mRNAs Expression Profile and Their Potential Role in Malignant Transformation of Human Bronchial Epithelial Cells

- Induced by Cadmium. *Biomed Res. Int.* **2015**, (2015).
379. Krauskopf, J. *et al.* MicroRNA profile for health risk assessment: Environmental exposure to persistent organic pollutants strongly affects the human blood microRNA machinery. *Sci. Rep.* **7**, (2017).
 380. Zendjabil, M., Favard, S., Tse, C., Abbou, O. & Hainque, B. The microRNAs as biomarkers: What prospects? *Comptes Rendus - Biologies* vol. 340 114–131 (2017).
 381. Sharma, S. Tumor markers in clinical practice: General principles and guidelines. *Indian J. Med. Paediatr. Oncol.* **30**, 1 (2009).
 382. VoPham, T. *et al.* Pesticide exposure and liver cancer: a review. *Cancer Causes and Control* vol. 28 177–190 (2017).
 383. Gilad, S. *et al.* Serum microRNAs are promising novel biomarkers. *PLoS One* **3**, (2008).
 384. Baulande, S., Criqui, A. & Duthieu, M. Les microARN circulants, une nouvelle classe de biomarqueurs pour la médecine. *Medecine/Sciences* **30**, 289–296 (2014).
 385. Cui, M. *et al.* Circulating MicroRNAs in Cancer: Potential and Challenge. *Front. Genet.* **10**, (2019).
 386. Tüfekci, K. U., Öner, M. G., Meuwissen, R. L. J. & Genç, Ş. The role of microRNAs in human diseases. *Methods Mol. Biol.* **1107**, 33–50 (2014).
 387. Nelson Hayes, C. & Chayama, K. Micrnas as biomarkers for liver disease and hepatocellular carcinoma. *International Journal of Molecular Sciences* vol. 17 (2016).
 388. Jones Buie, J. N., Goodwin, A. J., Cook, J. A., Halushka, P. V. & Fan, H. The role of miRNAs in cardiovascular disease risk factors. *Atherosclerosis* vol. 254 271–281 (2016).
 389. Zampetaki, A. *et al.* Plasma MicroRNA profiling reveals loss of endothelial MiR-126 and other MicroRNAs in type 2 diabetes. *Circ. Res.* **107**, 810–817 (2010).
 390. Weldon, B. A. *et al.* Urinary microRNAs as potential biomarkers of pesticide exposure.

- Toxicol. Appl. Pharmacol.* **312**, 19–25 (2016).
391. Yuan, H., Yuan, M., Tang, Y., Wang, B. & Zhan, X. MicroRNA expression profiling in human acute organophosphorus poisoning and functional analysis of dysregulated miRNAs. *Afr. Health Sci.* **18**, 333–342 (2018).
 392. Dragomir, M., Mafra, A. C. P., Dias, S. M. G., Vasilescu, C. & Calin, G. A. Using microRNA networks to understand cancer. *International Journal of Molecular Sciences* vol. 19 (2018).
 393. Schmeier, S., Schaefer, U., Essack, M. & Bajic, V. B. Network analysis of microRNAs and their regulation in human ovarian cancer. *BMC Syst. Biol.* **5**, (2011).
 394. Li, M., Li, J., Ding, X., He, M. & Cheng, S. Y. MicroRNA and cancer. *AAPS Journal* vol. 12 309–317 (2010).
 395. Pedroza-Torres, A. *et al.* MicroRNAs in Tumor Cell Metabolism: Roles and Therapeutic Opportunities. *Frontiers in Oncology* vol. 9 (2019).
 396. Janssen, H. L. A. *et al.* Treatment of HCV infection by targeting microRNA. *N. Engl. J. Med.* **368**, 1685–1694 (2013).
 397. Grünweller, A. & Hartmann, R. K. Locked nucleic acid oligonucleotides: The next generation of antisense agents? *BioDrugs* vol. 21 235–243 (2007).
 398. Hagedorn, P. H. *et al.* Locked nucleic acid: modality, diversity, and drug discovery. *Drug Discovery Today* vol. 23 101–114 (2018).
 399. Pottier, N., Cauffiez, C., Perrais, M., Barbry, P. & Mari, B. FibromiRs: Translating molecular discoveries into new anti-fibrotic drugs. *Trends in Pharmacological Sciences* vol. 35 119–126 (2014).
 400. Lu, T. X. & Rothenberg, M. E. MicroRNA. *J. Allergy Clin. Immunol.* **141**, 1202–1207 (2018).

401. Beg, M. S. *et al.* Phase I study of MRX34, a liposomal miR-34a mimic, administered twice weekly in patients with advanced solid tumors. *Invest. New Drugs* **35**, 180–188 (2017).
402. Makułowski, W. The human genome structure and organization. *Acta Biochimica Polonica* vol. 48 587–598 (2001).
403. Wei, J. W., Huang, K., Yang, C. & Kang, C. S. Non-coding RNAs as regulators in epigenetics (Review). *Oncol. Rep.* **37**, 3–9 (2017).

Annexes

Les annexes présentées correspondent aux versions révisées et soumises des articles mentionnés.

A. Annexe 1

Lemaire, J. ; Larrue R. ; Perrais M. ; Cauffiez C. ; Pottier N. Aspects fondamentaux du développement tumoral. Bulletin du Cancer (2020).

Doi : 10.1016/j.bulcan.2020.08.004.

Aspects fondamentaux du développement tumoral

Fundamental aspects of oncogenesis

Julie Lemaire¹, Romain Larrue², Michael Perrais¹, Christelle Cauffiez¹, Nicolas Pottier^{1,2*}

¹ Univ. Lille, CNRS, Inserm, CHU Lille, UMR9020-UMR-S 1277, F-59000 Lille, France

² Service de Toxicologie et Génopathies, CHU Lille, F-59000 Lille, France

*** Correspondance** : Nicolas Pottier

UMR9020-UMR-S 1277 Canther 1, place de Verdun 59 045 Lille Cedex

e-mail : nicolas.pottier@univ-lille.fr

Résumé

Le processus de cancérogenèse est traditionnellement considéré comme un processus multiétapes ayant pour origine l'activation d'oncogènes et l'inactivation de gènes suppresseurs de tumeur. Néanmoins, les mécanismes qui sous-tendent la tumorigenèse ne se résument pas aux seules altérations moléculaires et nécessitent d'être appréhendés dans leur globalité en intégrant notamment l'influence de l'environnement tumoral. Cette revue à but didactique présente les grands principes fondamentaux nécessaires à une vision globale et intégrée des mécanismes cellulaires et moléculaires régissant le développement tumoral.

Mots clés : cancérogenèse, oncogénèse moléculaire, tumorigenèse

Abstract

Tumorigenesis has traditionally been considered as a multi-step process involving the activation of oncogenes as well as the inactivation of tumor suppressor genes. However, the mechanisms driving cancer initiation and progression are not restricted to molecular alterations and instead should be viewed as a complex process that interfaces with the entire organism. This didactic review provides an integrated and global view of the key fundamental principles of cancer development.

Key words: cancerogenesis, molecular oncogenesis, tumorigenesis

Le cancer, une maladie du génome

De manière générale, le processus de cancérogenèse fait intervenir plusieurs étapes au cours desquelles les cellules tumorales acquièrent progressivement de nouvelles propriétés biologiques telles qu'une capacité accrue à proliférer et envahir les tissus avoisinants et à se propager dans tout l'organisme, un échappement aux processus associés au vieillissement cellulaire et à l'apoptose, ou encore une capacité à induire la formation de nouveaux vaisseaux sanguins [1]. Ces nouvelles caractéristiques biologiques résultent le plus souvent de l'accumulation de multiples altérations génétiques au niveau de l'ADN nucléaire et incluent principalement des amplifications, des délétions, des insertions, des mutations ponctuelles ainsi que des remaniements chromosomiques ou géniques [1–4]. Ces derniers peuvent notamment conduire à la formation de gènes chimériques codant des protéines de fusion à activité oncogénique [1–4]. Les protéines de fusion impliquent le plus souvent des facteurs de transcription ou des protéines à activité tyrosine/kinase [5]. Ainsi, des lésions moléculaires spécifiques affectant des gènes impliqués dans le contrôle de la prolifération et de la différenciation cellulaire (notamment « oncogènes » ou « gènes suppresseurs de tumeurs ») ont été associées à la transformation néoplasique et/ou à la progression tumorale [1–4]. Selon les types tumoraux, le nombre et la nature des altérations moléculaires sont variables et dépendent des conditions sélectives ayant lieu au cours du développement tumoral [1–4]. On distingue ainsi les mutations dites « *driver* » jouant un rôle moteur dans le développement de la maladie des mutations dites « *passenger* » qui n'ont pas de conséquence en termes d'avantage de croissance [1–4].

En plus des altérations génétiques, d'autres anomalies telles que les modifications épigénétiques de la chromatine jouent un rôle majeur dans le développement tumoral en modulant l'activité transcriptionnelle de certains gènes [6]. En effet, la plupart des cancers se caractérisent par des

méthylations aberrantes de l'ADN au niveau de dinucléotides CpG et des modifications post-traductionnelles des extrémités amino-terminales des histones [6]. Plusieurs études ont ainsi montré par exemple que l'hyperméthylation des îlots CpG au niveau du promoteur de certains gènes suppresseurs de tumeurs tels que p53 et PTEN peut conduire à leur inactivation par défaut d'expression [7,8]. D'autres facteurs, tels que le complexe SWI/SNF, impliqué dans le remodelage de la chromatine, participent également au processus d'oncogénèse [9]. En particulier, parmi les membres de ce complexe, des mutations affectant les gènes *SMARCB1* et *SMARCA4* sont fréquemment décrites dans un nombre croissant de tumeurs [9]. Enfin, bien que la théorie des mutations somatiques soit privilégiée à l'heure actuelle pour expliquer le processus de tumorigenèse, certaines études, bien que controversées, suggèrent au contraire que la rupture de l'équilibre tissulaire serait l'événement initiateur et les altérations génétiques et épigénétiques des épiphénomènes plutôt impliqués dans la progression tumorale [10,11]. Ainsi, selon cette théorie, le cancer serait considéré comme une anomalie du développement et de la différenciation tissulaire ayant pour origine une altération au niveau des membranes cellulaires et/ou des molécules impliquées de manière directe ou indirecte dans l'adhésion et les jonctions cellulaires [10,11]. Cette théorie alternative tire notamment partie du fait que certaines tumeurs telles que l'épendymome des fosses supérieures de l'enfant se caractérisent par une absence de mutations somatiques [10,11].

Étapes de la tumorigenèse : exemple de la carcinogenèse

Les nombreux progrès dans la compréhension des tumeurs ont montré que le processus de tumorigenèse est le résultat d'un long processus constitué d'une succession d'étapes où coexistent un ensemble d'événements moléculaires nécessaires à la transformation d'une cellule normale en cellule cancéreuse (**Figure 1**) [12]. Dans le cas du processus de carcinogenèse, où la tumeur a pour origine une cellule épithéliale, on distingue deux étapes majeures : l'initiation et la progression tumorale [12].

Initiation. La phase d'initiation tumorale est causée par une ou plusieurs altérations irréversibles de l'ADN en réponse par exemple à un agent mutagène conférant à la cellule la capacité de proliférer de manière autonome. La cellule initiée, bien que morphologiquement identique aux cellules normales, possède les altérations génotypiques nécessaires à sa transformation [12]. **Progression.** La progression tumorale, contrairement à l'étape d'initiation, est une phase relativement longue pouvant durer plusieurs années chez l'homme et caractérisée dans un premier temps par l'expansion clonale de la cellule initiée. La multiplication cellulaire étant exponentielle, un nombre limité de mitoses est suffisant pour donner naissance à un nombre considérable de cellules tumorales. Les agents influençant la progression tumorale ne sont habituellement pas mutagènes et favorisent la croissance cellulaire *via* différentes actions : effets pro-inflammatoires, induction de signaux mitotiques, effet de perturbation endocrinienne... Les déterminants de l'expansion clonale des cellules initiées sont très nombreux et incluent divers facteurs endogènes (facteurs de croissance, hormones...) ou exogènes (polluants chimiques, facteurs alimentaires...) [12]. Puis, les cellules acquièrent de manière irréversible le phénotype néoplasique se caractérisant notamment par une croissance cellulaire rapide, le développement d'un système vasculaire tumoral, une capacité à envahir les tissus environnants et à former des métastases ainsi que des modifications biochimiques, métaboliques et morphologiques [12]. Ainsi, la phase de progression est une étape marquant notamment la transformation de lésions précancéreuses en une tumeur maligne [12].

Modèles théoriques de la croissance tumorale

Initialement, le premier modèle de tumorigenèse proposé dit stochastique était basé sur une vision Darwinienne du développement tumoral et supposait que chaque cellule néoplasique avait la capacité de former un clone tumorigène [13]. Ainsi l'initiation et la progression tumorale résulteraient, d'une part, de l'acquisition séquentielle et aléatoire de mutations à l'origine de la formation de clones tumoraux et, d'autre part, de la sélection des clones se multipliant le plus rapidement dans un environnement donné [13] (**Figure 2**). À la fin des années 1990, un nouveau modèle dit hiérarchique a été proposé [13]. Ce dernier, à la différence du modèle précédent, suppose que seule la cellule souche cancéreuse (CSC), de par sa capacité à s'auto-renouveler et à se différencier en cellules néoplasiques peu ou pas tumorigènes, aurait la possibilité d'initier et propager la tumeur [13] (**Figure 2**). Ainsi, la CSC se situerait au sommet de la pyramide du processus tumoral, d'où le terme hiérarchique [13]. Enfin, ces deux modèles ont été revisités ces dernières années pour aboutir à un troisième modèle intégrant la notion de plasticité des CSC [13] (**Figure 2**). Ici, la conception classique selon laquelle la différenciation des cellules souches vers les cellules matures serait irréversible est remise en question et les cellules néoplasiques non tumorigènes auraient de ce fait la capacité à se dédifférencier en CSC [13]. De plus, au cours de la progression tumorale, les CSC pourraient acquérir de nouvelles altérations génétiques conférant à certaines sous-populations un avantage prolifératif [13]. Ainsi, les CSC constitueraient une population cellulaire hétérogène dont la diversité génétique serait responsable de l'organisation clonale de la tumeur [13].

Rôle du micro-environnement tumoral

Le cancer ne doit pas être considéré comme une pathologie purement génétique et cellulaire, mais comme une maladie de système dont l'évolution dépend en grande partie des interactions de la tumeur avec son environnement immédiat [14]. Ce dernier, désigné sous le terme de micro-environnement ou stroma tumoral, regroupe à la fois les constituants de la matrice extra-cellulaire et certains types cellulaires qui forment, d'une part, le compartiment mésenchymateux (fibroblastes, myofibroblastes, péricytes, cellules endothéliales et adipocytaires) et, d'autre part, le compartiment immunitaire (macrophages, cellules dendritiques, lymphocytes, plasmocytes, polynucléaires et mastocytes) [14]. Étant donné que le stroma normal régule négativement le processus néoplasique, le développement d'un carcinome invasif implique le remodelage de son micro-environnement, encore appelé réaction stromale ou desmoplasie, afin de le rendre permissif et propice au développement tumoral [15]. De plus, la nature du micro-environnement tumoral ainsi que l'intensité de la réaction stromale varient en fonction de l'organe dans lequel se développe la tumeur [16]. Par exemple, les tumeurs du pancréas, du sein et du côlon se caractérisent par l'intensité de leur réaction stromale [15,16]. D'un point de vue fondamental, la réaction desmoplasique se traduit, d'une part, par une augmentation de la production de MEC (Matrice Extra-Cellulaire) riche en collagène fibrillaire, et, d'autre part, par une activation de chacune des composantes cellulaires du stroma à l'origine d'une déstructuration majeure du tissu avec formation d'un système vasculaire anarchique et recrutement de cellules inflammatoires, le tout formant un micro-environnement favorable au développement tumoral [15]. Les cellules stromales activées correspondent majoritairement à des cellules fibroblastiques appelées FAC (Fibroblastes Associés au Cancer) [15,16]. Ces dernières, *via* des signaux autocrines ou paracrines, jouent un rôle clé notamment dans la réorganisation de la MEC, la croissance et la dissémination tumorales ainsi que dans les mécanismes d'échappement au système immunitaire en sécrétant notamment des facteurs pro-angiogéniques, pro-métastatiques, anti-apoptotiques ou encore immuno-modulateurs [16]. Enfin, de manière à se constituer l'environnement le plus favorable à son développement, la tumeur cancéreuse est capable d'établir non seulement des interactions réciproques avec ses cellules

environnantes, mais également avec des tissus distants. Par exemple, dans certains cancers de la prostate, le réseau intra-tumoral neuronal provient en partie de la migration de progéniteurs neuronaux [17].

Caractéristiques communes des cellules cancéreuses

Les cellules cancéreuses répondent à un nombre restreint de principes fondamentaux dont la liste a été établie par Douglas Hanahan et Robert A. Weinberg en 2000 puis en 2011 et que nous allons brièvement décrire ci-dessous (**Figure 3**).

Croissance tumorale et insensibilité aux signaux antiprolifératifs

La capacité accrue des cellules tumorales à proliférer est une des principales caractéristiques retrouvée au cours de la transformation tumorale [18,19]. En effet, au cours de la cancérogenèse, le contrôle de la division cellulaire est altéré et la prolifération des cellules tumorales devient autonome et anarchique [18,19]. L'inactivation des gènes impliqués dans le contrôle négatif de la progression du cycle cellulaire joue un rôle fondamental dans ce processus [18,19]. Par exemple, il est maintenant établi que l'inactivation du gène codant la protéine p16, impliquée dans le contrôle de la transition G1-S du cycle cellulaire, est un événement fréquemment retrouvé dans les tumeurs humaines, en particulier dans le mélanome [20]. Outre l'inactivation des régulateurs négatifs du cycle cellulaire, certains gènes peuvent être à l'inverse anormalement activés, entraînant ainsi, une accélération de la prolifération cellulaire [18,19]. À ce titre, un des meilleurs exemples connus à l'heure actuelle est le rôle joué par l'activation constitutive du récepteur du facteur de croissance EGF (EGFR) dans la survenue des cancers broncho-pulmonaires [21]. En effet, l'acquisition d'une mutation activatrice au niveau du gène codant *EGFR* induit l'activation constitutive de la prolifération cellulaire et cela en l'absence de ligand [21].

Résistance à l'apoptose

Dans un organisme vivant, les cellules normales, outre leur capacité à proliférer, ont également la possibilité d'induire leur propre « mort » selon un processus biologique complexe dénommé mort cellulaire programmée ou apoptose [18,19]. En effet, ce mécanisme essentiel, mis en jeu dès les premiers stades de développement de l'organisme, permet le renouvellement des cellules en évitant leur accumulation [18,19]. L'apoptose est un processus complexe impliquant de nombreux acteurs moléculaires, en particulier des métalloprotéases à cystéine spécifiques, les caspases, responsables notamment de la fragmentation de l'ADN lors de la phase effectrice du processus apoptotique [22]. Parmi les différents mécanismes liés au développement tumoral, la résistance à l'apoptose est une caractéristique majeure des cellules cancéreuses [18,19]. En effet, un défaut d'apoptose participe au processus d'oncogénèse en augmentant la survie cellulaire, favorisant ainsi l'accumulation des lésions génétiques impliquées dans la transformation tumorale [18,19]. De plus, la résistance des cellules néoplasiques à l'apoptose contribue également au processus métastatique ainsi qu'à la résistance aux différents agents cytotoxiques utilisés dans la prise en charge des pathologies cancéreuses [18,19]. Sur le plan moléculaire, l'absence de réponse des cellules tumorales à un stress apoptotique résulte fréquemment du déficit d'une ou plusieurs protéines jouant un rôle clé dans l'initiation, le contrôle ou l'exécution du processus apoptotique et relève le plus souvent d'anomalies au niveau de la séquence nucléotidique des gènes codant ces protéines (mutations, réarrangements chromosomiques...), de modifications épigénétiques (méthylation de certains promoteurs...) ou post-traductionnelles [18,19]. Par exemple, de nombreuses études ont pu démontrer que des altérations de la protéine p53 ou de ses régulateurs jouaient un rôle fondamental dans la résistance des cellules cancéreuses à l'apoptose

[18,19]. En effet, p53 est un facteur de transcription jouant un rôle central dans l'initiation du processus apoptotique notamment en réponse à un stress génotoxique et des mutations délétères de p53 sont retrouvées dans plus de 50 % des tumeurs humaines [18,19].

Potentiel réplcatif illimité

Il est désormais bien établi que les cellules somatiques normales ont un potentiel de réplication limité [18,19]. En effet, chaque division cellulaire se caractérise par un raccourcissement progressif des télomères, des séquences hexanucléotidiques répétées en tandem aux extrémités des chromosomes, qui lorsqu'ils atteignent une taille critique sont à l'origine d'un arrêt irréversible du cycle cellulaire par un processus dénommé sénescence réplcative [18,19]. Ainsi, lors du processus de cancérogenèse les cellules sont donc contraintes d'échapper à la sénescence pour leur permettre de proliférer de manière continue. En particulier, la télomérase joue un rôle majeur dans ce processus d'échappement en conférant « l'immortalité » aux cellules précancéreuses [23]. En effet, cette enzyme est active dans plus de 80 % des tumeurs, quelle qu'en soit l'origine, alors qu'elle est indétectable dans les tissus sains correspondants [24]. De plus, *in vitro*, certaines études ont pu montrer un rôle direct de la télomérase dans l'échappement à la sénescence en stabilisant la longueur des télomères [23]. D'autres études ont également décrit l'implication d'altérations notamment au niveau des gènes suppresseurs de tumeurs codant les protéines p16 et p53, deux acteurs majeurs du processus de sénescence [25].

Instabilité génomique

Il est désormais admis que le maintien de l'intégrité du génome n'est possible que grâce à l'existence de plusieurs systèmes enzymatiques impliqués dans les processus de réplication, de réparation et de recombinaison de la molécule d'ADN [26]. Ainsi, la fréquence accrue des anomalies génétiques et chromosomiques retrouvées dans les cellules tumorales par rapport à leur équivalent normal, également appelée instabilité génomique, a d'abord conduit à postuler à l'existence d'altérations au niveau des systèmes de préservation de l'intégrité du génome [19,26]. Cette hypothèse a par la suite été confirmée dans la plupart des cancers héréditaires tels que le syndrome de Lynch, ou cancer colorectal héréditaire sans polypose, qui se caractérise par une variabilité anormale du nombre de séquences répétées dans l'ADN tumoral, en particulier au niveau des microsatellites [26]. En effet, les patients atteints de ce syndrome sont porteurs d'une mutation constitutionnelle au niveau d'un gène du système MMR (Mismatch Repair) qui est impliqué dans la réparation des mésappariements de l'ADN [26]. Ainsi, l'étude des cancers héréditaires a permis de formuler l'hypothèse dite du « mutateur » qui postule que l'instabilité génomique serait présente dès les lésions précancéreuses à la suite d'une altération des gènes impliqués dans le maintien de l'intégrité du génome et favoriserait ainsi le développement tumoral en augmentant la mutabilité de l'ADN [26]. Néanmoins, dans le cas des cancers sporadiques, cette hypothèse n'est généralement pas vérifiée [26]. En effet, la majorité des tumeurs sporadiques ne présente pas d'anomalies au niveau des gènes impliqués dans la réparation de l'ADN et les variations dans la séquence nucléotidique des gènes de surveillance de l'intégrité du génome n'expliquent pas à elles seules l'instabilité génomique de ces cancers [26]. Ainsi, de nouvelles études ont proposé le rôle du stress réplcatif induit par l'activation d'oncogènes pour expliquer ce phénomène [26]. Ce stress correspond au ralentissement ou au blocage des fourches de réplication, la structure formée lorsque l'ADN se réplique et sur laquelle l'ADN polymérase vient se positionner, en réponse à une multitude d'événements exogènes ou endogènes à la cellule [26]. Ce stress a notamment la capacité d'induire de manière simultanée et localisée de multiples altérations génétiques soit par le phénomène de kataegis, un processus mutationnel à l'origine de foyers localisés d'hypermutations [26], soit par le mécanisme de chromoanagenèse au cours duquel de multiples réarrangements complexes (jusqu'à plusieurs centaines) se produisent au cours d'un seul événement cellulaire pour aboutir à la formation

d'un ou de plusieurs chromosomes fortement remaniés [27]. Parmi les différents types de chromoanagenèse, on distingue les phénomènes de chromothripsie (impliquant de multiples cassures double brin se produisant dans une région chromosomique et le réassemblage aléatoire d'une partie des fragments générés), de chromoplexie (un processus lésionnel analogue à la chromothripsie mais impliquant plus de régions chromosomiques et un nombre plus limité de réarrangements) et de chromoanasyntèse (également apparentée à la chromothripsie mais se caractérisant par des anomalies du nombre de copies des zones réarrangées, en particulier des duplications ou triplications) [27]. Ainsi, dans les lésions précancéreuses, la dérégulation d'oncogènes tels que Ras et Myc jouerait un rôle fondamental dans l'instabilité du génome en induisant un stress réplicatif qui, en conférant un avantage sélectif de survie ou de prolifération, favoriserait le développement des tumeurs [28].

Angiogenèse

Outre leur propension à proliférer, migrer et disséminer dans l'organisme, les cellules tumorales acquièrent également la capacité de développer un réseau vasculaire dédié leur permettant non seulement de satisfaire leur besoin en oxygène et en nutriments pour leur croissance, mais également de former un micro-environnement spécifique dans lequel cellules endothéliales de la paroi vasculaire et cellules tumorales peuvent interagir [18,19]. En effet, alors que l'implantation au niveau de la thyroïde de chien de cellules de mélanome de souris n'aboutit qu'à la formation de tumeurs d'une taille maximale de 2 mm de diamètre dépourvues de vaisseaux sanguins, leur greffe syngénique montre une croissance rapide des tissus cancéreux ainsi que leur irrigation par un réseau vasculaire [29]. Ainsi, la formation d'une tumeur est dépendante du processus d'angiogenèse qui correspond au développement d'un nouveau réseau vasculaire dédié à la croissance tumorale à partir d'un ensemble de vaisseaux sanguins préexistants [30]. De plus, la croissance tumorale est marquée par un switch angiogénique, défini par un déséquilibre entre facteurs pro-et anti-angiogéniques en faveur des signaux favorisant l'angiogenèse, permettant la prolifération et la migration des cellules vasculaires ainsi que leur organisation en vaisseaux tumoraux [30]. Sur le plan moléculaire, les cellules cancéreuses participent à la formation du réseau vasculaire tumoral en sécrétant notamment du VEGF (*Vascular Endothelial Growth Factor*), un facteur de croissance pro-angiogénique majeur selon les différents mécanismes décrits dans la **Figure 4**. Enfin, les cellules stromales du micro-environnement tumoral exercent également un rôle important lors du *switch* angiogénique en sécrétant différents facteurs pro-angiogéniques tels que des protéases, des cytokines ainsi que des chimiokines [31].

Invasion et métastase

La formation de métastases est un événement majeur dans l'histoire naturelle d'un cancer et a des conséquences particulièrement péjoratives sur le pronostic des patients [18,19]. Le processus métastatique comporte plusieurs étapes distinctes relativement bien caractérisées et fait intervenir de très nombreux effecteurs moléculaires [32] (**Figure 5**). En particulier, les cellules tumorales doivent, dans un premier temps, se détacher de la tumeur primitive et pénétrer dans la circulation sanguine ou lymphatique afin de se disséminer dans l'organisme, puis coloniser un nouvel organe et se multiplier pour donner à terme une tumeur secondaire ou métastase. Chacune de ces étapes requiert l'acquisition de nouvelles propriétés biologiques: motilité cellulaire et aptitude à dégrader la matrice extra-cellulaire, résistance aux forces de cisaillement imposées par la circulation dans les fluides biologiques, échappement au système immunitaire, et surtout, capacité à survivre et à proliférer au sein d'un nouvel environnement [32]. Les mécanismes moléculaires et cellulaires à l'origine de la maladie métastatique bien que faisant l'objet d'intensives recherches sont toujours relativement mal connus à l'heure actuelle. Un premier modèle, basé sur la sélection clonale, a été proposé à la suite notamment des travaux fondateurs de Fidler en 1977 qui a montré que l'on pouvait enrichir, par

sélections successives, une population cellulaire initialement faiblement métastatique en cellules douées d'un potentiel métastatique élevé [33] (**Figure 6**). Ce modèle considère ainsi que l'acquisition par une cellule tumorale du phénotype métastatique est un phénomène tardif qui dépend de l'accumulation progressive de plusieurs altérations génétiques [33]. Néanmoins, plusieurs observations ont montré que la théorie de la sélection clonale n'est pas généralisable à tous les types de cancers, en particulier dans le cas des tumeurs mammaires, où la dissémination des cellules néoplasiques s'est avérée être un phénomène précoce [34] (**Figure 6**) en partie lié non pas à l'accumulation d'un nombre important de mutations, mais à la réactivation transitoire d'un processus biologique clé du développement embryonnaire, la transition épithélio-mésenchymateuse ou TEM [35]. En effet, ce processus cellulaire, sous l'effet d'un nombre restreint de facteurs de transcription tels que TWIST1, a la capacité de reprogrammer les cellules épithéliales tumorales en cellules fibroblastiques invasives et pourrait en outre leur conférer des propriétés souches supplémentaires [36]. Enfin, les cellules tumorales disséminées seraient maintenues plus ou moins longtemps dans un état dormant peu ou pas répliatif dont l'issue dépendrait à la fois de facteurs pro-métastatiques circulants relargués par la tumeur primitive et de la pression exercée par le système immunitaire [19].

Dérégulation du métabolisme énergétique

Le métabolisme correspond à l'ensemble des réactions biochimiques se produisant au sein d'une cellule et comprend deux grandes entités : l'anabolisme qui constitue l'ensemble des processus de synthèse de macromolécules et le catabolisme qui correspond à leur dégradation. Les réactions métaboliques sont généralement interconnectées et permettent de fournir les constituants biochimiques ainsi que l'énergie nécessaire au maintien de l'homéostasie cellulaire. La glycolyse et le métabolisme mitochondrial, qui regroupe le cycle de Krebs et la phosphorylation oxydative, sont les deux voies principales du métabolisme énergétique. L'altération du métabolisme est une caractéristique majeure de la transformation tumorale [19]. En effet, les cellules cancéreuses, pour assurer leurs besoins accrus en nutriments et en énergie, modifient ou détournent certaines voies métaboliques physiologiques tout en maintenant un état d'oxydoréduction ainsi qu'un statut énergétique compatible avec leur survie et leur croissance [37]. Cette réorientation du métabolisme cellulaire est sous le contrôle direct de protéines à activité suppresseur de tumeurs ou oncogénique telles que le facteur de transcription pro-tumoral Myc [38]. Les altérations métaboliques associées aux tumeurs peuvent se résumer en six caractéristiques principales [37]: (i) l'altération de l'influx de glucose et d'acides aminés, (ii) l'utilisation de moyens opportunistes pour l'acquisition de nutriments, (iii) l'utilisation de certains intermédiaires de la glycolyse et du cycle de Krebs pour les biosynthèses et la production de NADPH, (iv) une demande accrue en azote, (v) des altérations des gènes régulant le métabolisme, (vi) des interactions métaboliques avec le micro-environnement et (vii) la production anormale d'« oncométabolites » tels que le 2-hydroxyglutarate. Par exemple, la plupart des cellules tumorales présentent une activité glycolytique accrue et une forte production de lactate, et ce, même en présence d'oxygène [37]. Ce phénomène métabolique correspond à l'effet Warburg [37]. Bien que beaucoup moins rentable sur le plan énergétique que la phosphorylation oxydative, la glycolyse confère un avantage aux cellules malignes en leur fournissant des précurseurs métaboliques pour la biosynthèse des différents constituants cellulaires (protéines, lipides et acides nucléiques) [37]. Ainsi, la forte activité glycolytique de la plupart des cellules tumorales permet la production des nombreuses macromolécules nécessaires à la croissance tumorale [39]. La réorientation des intermédiaires de la glycolyse vers les voies anaboliques permet aussi la génération de molécules dotées de propriétés anti-oxydantes, comme le NADPH *via* la voie des pentoses phosphates, contribuant ainsi au maintien de l'homéostasie redox [39]. Enfin la production accrue de lactate jouerait un rôle dans l'activation de

plusieurs processus tumoraux tels que l'angiogenèse, la formation des métastases ainsi que l'échappement des cellules tumorales au système immunitaire [37].

h) Échappement immunitaire

Le développement d'une tumeur résulte de l'équilibre entre une réponse immunitaire anti-tumorale ayant la capacité d'éliminer les cellules néoplasiques dès leur formation et les mécanismes d'échappement au système immunitaire [19]. Les cellules tumorales ont ainsi la capacité de se soustraire à la surveillance du système immunitaire par deux mécanismes distincts, d'une part l'immunosélection, correspondant à la sélection de clones tumoraux non immunogènes, et d'autre part, l'immunosubversion, définie par l'ensemble des mécanismes visant à réprimer la réponse immunitaire et/ou induire une tolérance du système immunitaire vis-à-vis de la tumeur [40]. L'immunosélection est un mécanisme précoce d'échappement tumoral qui regroupe l'ensemble des processus visant à sélectionner les variants antigéniques les moins propices à une reconnaissance par le système immunitaire. La stratégie la plus fréquente correspond à un défaut dans les voies de présentation des antigènes tumoraux ayant pour conséquence une diminution voire une absence d'expression des molécules du CMH de classe I ou des gènes TAP1 (*Transporter associated with Antigen Processing 1*) et LMP2 (*Latent Membrane Protein 2*), empêchant ainsi la reconnaissance des cellules transformées par les cellules du système adaptatif [41]. De même, une diminution d'expression des ligands activateurs des cellules NK au profit des ligands inhibiteurs favorise la tolérance des cellules tumorales par les cellules de la réponse immunitaire innée [42]. Enfin, l'instabilité génomique des cellules néoplasiques peut induire, d'une part, la perte de certains antigènes tumoraux normalement reconnus par les cellules de l'immunité spécifique et, d'autre part, un défaut d'expression de ligands activateurs des cellules NK et de ce fait un échappement vis-à-vis des cellules de l'immunité innée [41]. Le phénomène d'immunosubversion, quant à lui, est un ensemble de mécanismes visant à promouvoir un environnement immunosuppresseur autour des cellules tumorales [43]. Plusieurs stratégies sont ainsi mises en jeu par la tumeur et son environnement afin d'éliminer les cellules immunitaires, les inhiber ou induire leur différenciation dans un sous-type pro-tumoral [43]. Par exemple, les cellules cancéreuses peuvent induire le recrutement de cellules immunosuppressives telles que les lymphocytes T régulateurs ou encore consommer de l'IL-2, une cytokine essentielle à la fonction des lymphocytes T cytotoxiques [44]. Enfin, les cellules tumorales peuvent détourner à leur avantage le système des « points de contrôle de l'immunité », un ensemble de récepteurs co-activateurs et co-inhibiteurs jouant un rôle essentiel dans la modulation de l'activation des cellules immunitaires afin d'en limiter la durée et l'intensité [45]. Ainsi, les cellules tumorales sont capables de surexprimer à leur surface les ligands des récepteurs co-inhibiteurs pour échapper au système immunitaire soit de manière constitutive, soit en réponse à la libération de cytokines pro-inflammatoires par un lymphocyte T activé [45].

Inflammation

Alors que la réaction inflammatoire aiguë, le principal mécanisme de défense de l'organisme contre les agressions, favorise le renouvellement cellulaire et la restauration de l'intégrité tissulaire, sa persistance devient néfaste et dans de nombreux cas pro-tumorigène [19]. En effet, les cellules inflammatoires produisent de nombreuses molécules pro-tumorales jouant un rôle majeur dans l'initiation et la progression tumorale en particulier des radicaux libres issus du stress oxydant secondaire à la réaction inflammatoire, des facteurs proangiogéniques pro-métastatiques, immuno-modulateurs ou encore des cytokines inflammatoires favorisant la croissance et la survie tumorale [46]. En particulier, l'activation des facteurs de transcription STAT3 et NF- κ B *via* différentes cytokines inflammatoires telles que l'IL6 ou le TNF α jouent un rôle majeur dans le processus de tumorigenèse

[46]. L'inflammation chronique, quelle qu'en soit la cause, est notamment considérée comme un facteur de risque majeur de survenue d'un cancer. Un des meilleurs exemples à l'heure actuelle est celui de la bactérie *Helicobacter pylori*, capable d'induire un cancer gastrique en partie par la production gastroduodénale de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-6 et le TNF α et l'induction d'une réaction inflammatoire chronique [46]. De même l'obésité, caractérisée par une inflammation chronique du tissu adipeux, est une autre condition pathologique bien connue pour être associée non seulement à une incidence accrue de cancers mais aussi à des tumeurs agressives. En effet, les cellules adipocytaires, en sécrètent des molécules pro-inflammatoires, favorisent le développement tumoral [47]. Enfin, certaines études suggèrent également l'implication du microbiote intestinal dans l'étiologie des cancers du tube digestif, notamment les cancers du colon [46]. En effet, un déséquilibre important du microbiote intestinal serait responsable de la production de toxines inflammatoires par certaines bactéries et favoriserait ainsi le développement d'un cancer colorectal [46].

Rôle des facteurs environnementaux

Ces dernières décennies, de nombreux progrès ont été réalisés dans la compréhension des facteurs à l'origine des cancers. Il est en effet admis que les facteurs environnementaux jouent un rôle primordial dans la survenue des pathologies tumorales en influençant toutes les étapes de la cancérogenèse [48]. Ainsi, de nombreux exemples montrant l'importance de la part de l'environnement dans l'apparition de cancers spécifiques ont été établis : tabac et cancer broncho-pulmonaire, rayonnement UV et mélanome, cadmium et cancer du rein ou encore certains facteurs alimentaires tels que les boissons alcoolisées ou les nitrites. De plus, les facteurs génétiques pourraient expliquer au moins en partie la susceptibilité individuelle aux effets pro-carcinogènes de certains polluants [49]. Néanmoins, des lacunes importantes persistent actuellement dans la connaissance des effets cancérogènes pour de nombreuses substances pourtant largement utilisées. En effet, seule la moitié des agents chimiques classés par l'agence américaine de protection environnementale (EPA) comme à haut volume de production ont fait l'objet de tests de cancérogénicité (<https://www.epa.gov>). De plus, la possibilité d'effets à faible dose est le plus souvent négligée dans les études réglementaires [50]. Les différents polluants cancérogènes peuvent être classés en fonction, d'une part, de leurs propriétés physiques ou chimiques (métaux lourds, rayonnements ionisants, hydrocarbures aromatiques polycycliques...) et, d'autre part, selon leur mode d'action en distinguant notamment les composés génotoxiques tels que l'aflatoxine ou le benzo(a)pyrène et les agents non génotoxiques comme les dioxines [49]. Les composés environnementaux génotoxiques sont des substances ayant la capacité d'altérer le matériel génétique d'une cellule de manière permanente et transmissible à ses cellules filles par mitoses successives. Ces lésions incluent des modifications dans le nombre et/ou la structure des chromosomes ainsi que des mutations ponctuelles le plus souvent au niveau de proto-oncogènes, des gènes suppresseurs de tumeur et/ou des gènes de réparation de l'ADN [49]. Les composés cancérogènes non génotoxiques sont, quant à eux, des substances capables d'induire un stress oncogénique sans altération directe de l'ADN ou de la structure et du nombre de chromosomes [49]. Ces composés, désignés sous le terme d'agents promoteurs tumoraux, regroupent un nombre considérable et hétérogène de polluants qui se caractérisent par une multitude de mécanismes cancérogènes pouvant influencer de nombreux processus moléculaires (méthylation de l'ADN, remodelage chromatinien, stress oxydant...) ou cellulaires (prolifération et mort cellulaire, modification hormonale, réponse immunitaire...) [49]. Parmi ces substances figurent notamment les perturbateurs endocriniens à activité cancérogène (pesticides organochlorés...) qui modifient l'action du système endocrinien soit en interagissant directement avec les récepteurs hormonaux, soit en modifiant le métabolisme de certaines hormones [51]. Enfin, bien que de nombreux composés environnementaux puissent présenter une activité cancérogène directe, pour certains, dénommés pro-cancérogènes, une étape d'activation métabolique préalable est nécessaire pour exercer leurs effets délétères [52]. Celle-ci fait notamment intervenir les enzymes de phase

l'appartenant à la superfamille des cytochromes P450. En effet, ces enzymes, en catalysant l'introduction d'un groupe polaire réactif, convertissent la substance initiale en un produit électrophile ayant la capacité par exemple de former des adduits à l'ADN [52]. Ainsi, les réactions de biotransformation nécessaires à l'élimination des xénobiotiques de l'organisme peuvent avoir dans certains cas des effets néfastes comme l'activation de certaines molécules pro-cancérogènes.

Conclusion

Alors que le cancer est encore actuellement majoritairement perçu par certains comme une maladie génétique et moléculaire de la cellule, cette vision réductionniste ne peut à elle seule expliquer tous les événements biologiques complexes contribuant au développement tumoral. Ainsi, une vision large du processus de tumorigenèse intégrant également l'ensemble des interactions réciproques entre les cellules cancéreuses et leur environnement est un enjeu majeur de la cancérologie.

Références

- [1] Fouad YA, Aanei C. Revisiting the hallmarks of cancer. *Am J Cancer Res* 2017;7(5):1016–36.
- [2] Hoadley KA, Yau C, Wolf DM, Cherniack AD, Tamborero D, Ng S, et al. Multiplatform analysis of 12 cancer types reveals molecular classification within and across tissues of origin. *Cell* 2014;158(4):929–44.
- [3] Ding L, Bailey MH, Porta-Pardo E, Thorsson V, Colaprico A, Bertrand D, et al. Perspective on Oncogenic Processes at the End of the Beginning of Cancer Genomics. *Cell* 2018;173(2):305–20.
- [4] Kim H, Kim YM. Pan-cancer analysis of somatic mutations and transcriptomes reveals common functional gene clusters shared by multiple cancer types. *Sci Rep* 2018;8(1):6041.
- [5] Mertens F, Johansson B, Fioretos T, Mitelman F. The emerging complexity of gene fusions in cancer. *Nat Rev Cancer* 2015;15(6):371–81.
- [6] Nebbioso A, Tambaro FP, Dell'Aversana C, Altucci L. Cancer epigenetics: Moving forward. *PLoS Genet* 2018;14(6):e1007362.
- [7] Chmelarova M, Krepinska E, Spacek J, Laco J, Beranek M, Palicka V. Methylation in the p53 promoter in epithelial ovarian cancer. *Clin Transl Oncol* 2013;15(2):160–3.
- [8] Roh MR, Gupta S, Park KH, Chung KY, Lauss M, Flaherty KT, et al. Promoter Methylation of PTEN Is a Significant Prognostic Factor in Melanoma Survival. *J Invest Dermatol* 2016;136(5):1002–11.
- [9] Mittal P, Roberts CWM. The SWI/SNF complex in cancer — biology, biomarkers and therapy. *Nat Rev Clin Oncol* 2020;17(7):435–48.
- [10] Brucher BLD, Jamall IS. Somatic mutation theory -Why it's wrong for most cancers. *Cell Physiol Biochem* 2016;38(5):1663–80.
- [11] Sonnenschein C, Soto AM. The aging of the 2000 and 2011 Hallmarks of Cancer reviews: A critique. *J Biosci* 2013;38(3):651–63.
- [12] Basu AK. DNA damage, mutagenesis and cancer. *Int J Mol Sci* 2018;19(4):970.
- [13] Khan IN, Al-Karim S, Bora RS, Chaudhary AG, Saini KS. Cancer stem cells: a challenging paradigm for designing targeted drug therapies. *Drug Discov Today* 2015;20(10):1205–16.
- [14] Wang M, Zhao J, Zhang L, Wei F, Lian Y, Wu Y, et al. Role of tumor microenvironment in tumorigenesis. *J Cancer* 2017;8(5):761–73.

- [15] DeClerck YA. Desmoplasia: A response or a niche? *Cancer Discov* 2012;2(9):772–4.
- [16] Nissen NI, Karsdal M, Willumsen N. Collagens and Cancer associated fibroblasts in the reactive stroma and its relation to Cancer biology. *J Exp Clin Cancer Res* 2019;38(1):115.
- [17] Mauffrey P, Tchitchek N, Barroca V, Bemelmans A, Firlej V, Allory Y, et al. Progenitors from the central nervous system drive neurogenesis in cancer. *Nature* 2019;569(7758):672–78.
- [18] Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000;100(1):57–70.
- [19] Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: The next generation. *Cell* 2011;144(5):646–74.
- [20] Bogenrieder T, Herlyn M. The molecular pathology of cutaneous melanoma. *Cancer Biomarkers* 2011;9(1–6):267–86.
- [21] da Cunha Santos G, Shepherd FA, Tsao MS. EGFR Mutations and Lung Cancer. *Annu Rev Pathol Mech Dis* 2011;6(1):49–69.
- [22] Fan TJ, Han LH, Cong RS, Liang J. Caspase family proteases and apoptosis. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 2005;37(11):719–27.
- [23] Bodnar AG, Ouellette M, Frolkis M, Holt SE, Chiu CP, Morin GB, et al. Extension of life-span by introduction of telomerase into normal human cells. *Science* 1998;279(5349):349–52.
- [24] Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, Harley CB, West MD, Ho PLC, et al. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. *Science* 1994;266(5193):2011–5.
- [25] Lin AW, Barradas M, Stone JC, Van Aelst L, Serrano M, Lowe SW. Premature senescence involving p53 and p16 is activated in response to constitutive MEK/MAPK mitogenic signaling. *Genes Dev* 1998;12(19):3008–19.
- [26] Macheret M, Halazonetis TD. DNA Replication Stress as a Hallmark of Cancer. *Annu Rev Pathol Mech Dis* 2015;10(1):425–48.
- [27] Pellestor F. Chromoanagenesis: Cataclysms behind complex chromosomal rearrangements. *Mol Cytogenet* 2019;12:6.
- [28] Gaillard H, García-Muse T, Aguilera A. Replication stress and cancer. *Nat Rev Cancer* 2015;15(5):276–80.
- [29] Folkman J, Long DM, Becker FF. Growth and metastasis of tumor in organ culture. *Cancer* 1963;16(4):453–67.
- [30] Baeriswyl V, Christofori G. The angiogenic switch in carcinogenesis. *Semin Cancer Biol* 2009;19(5):329–37.
- [31] Guo S, Deng CX. Effect of stromal cells in tumor microenvironment on metastasis initiation. *Int J Biol Sci* 2018;14(14):2083–93.
- [32] Feng Z, Yu Q, Zhang T, Tie W, Li J, Zhou X. Updates on mechanistic insights and targeting of tumour metastasis. *J Cell Mol Med* 2020;24(3):2076–86.
- [33] Fidler IJ, Kripke ML. Metastasis results from preexisting variant cells within a malignant tumor. *Science* (80-) 1977;197(4306):893–5.
- [34] Hüsemann Y, Geigl JB, Schubert F, Musiani P, Meyer M, Burghart E, et al. Systemic Spread Is an Early Step in Breast Cancer. *Cancer Cell* 2008;13(1):58–68.
- [35] Craene B De, Berx G. Regulatory networks defining EMT during cancer initiation and progression. *Nat Rev Cancer* 2013;13(2):97–110.

- [36] Sasaki K, Natsugoe S, Ishigami S, Matsumoto M, Okumura H, Setoyama T, et al. Significance of Twist expression and its association with E-cadherin in esophageal squamous cell carcinoma. *J Exp Clin Cancer Res* 2009;28(1):158.
- [37] Pavlova NN, Thompson CB. The Emerging Hallmarks of Cancer Metabolism. *Cell Metab* 2016;23(1):27–47.
- [38] Miller DM, Thomas SD, Islam A, Muench D, Sedoris K. c-Myc and cancer metabolism. *Clin Cancer Res* 2012;18(20):5546–53.
- [39] Counihan JL, Grossman EA, Nomura DK. Cancer Metabolism: Current Understanding and Therapies. *Chem Rev* 2018;118(14):6893–923.
- [40] Kim R, Emi M, Tanabe K. Cancer immunoediting from immune surveillance to immune escape. *Immunology* 2007;121(1):1–14.
- [41] Sharma P, Hu-Lieskovan S, Wargo JA, Ribas A. Primary, Adaptive, and Acquired Resistance to Cancer Immunotherapy. *Cell* 2017;168(4):707–23.
- [42] Groh V, Wu J, Yee C, Spies T. Tumour-derived soluble MIC ligands impair expression of NKG2D and T-cell activation. *Nature* 2002;419(6908):734–8.
- [43] Rescigno M, Avogadri F, Curigliano G. Challenges and prospects of immunotherapy as cancer treatment. *Biochim Biophys Acta -Rev Cancer* 2007;1776(1):108–23.
- [44] Takeuchi Y, Nishikawa H. Roles of regulatory T cells in cancer immunity. *Int Immunol* 2016;28(8):401–9.
- [45] Pardoll DM. The blockade of immune checkpoints in cancer immunotherapy. *Nat Rev Cancer* 2012;12(4):252–64.
- [46] Elinav E, Nowarski R, Thaïss CA, Hu B, Jin C, Flavell RA. Inflammation-induced cancer: Crosstalk between tumours, immune cells and microorganisms. *Nat Rev Cancer* 2013;13(11):759–71.
- [47] Kolb R, Sutterwala FS, Zhang W. Obesity and cancer: inflammation bridges the two. *Curr Opin Pharmacol* 2016;29:77–89.
- [48] Mazerska Z. Metabolism of chemical carcinogens. *Carcinog. Anticarcinog. Food Components*, 2005, p. 37–67.
- [49] Luch A. Nature and nurture -Lessons from chemical carcinogenesis. *Nat Rev Cancer* 2005;5(2):113–25.
- [50] Goodson WH, Lowe L, Carpenter DO, Gilbertson M, Ali AM, de Cerain Salsamendi AL, et al. Assessing the carcinogenic potential of low-dose exposures to chemical mixtures in the environment: The challenge ahead. *Carcinogenesis* 2015;36:S254–96.
- [51] De Coster S, Van Larebeke N. Endocrine-disrupting chemicals: Associated disorders and mechanisms of action. *J Environ Public Health* 2012;2012.
- [52] Peter Guengerich F. Metabolic activation of carcinogens. *Pharmacol Ther* 1992;54(1):17–61.

Conflits d'intérêts
aucun

Légendes des figures

Figure 1. Les différentes étapes du développement tumoral : exemple du carcinome. La formation d'une tumeur épithéliale bénigne (adénome) en une tumeur maligne (carcinome) résulte de l'accumulation progressive d'altérations moléculaires qui confèrent notamment aux cellules une capacité accrue à proliférer et à échapper aux signaux apoptotiques. L'acquisition du phénotype métastatique, quant à lui, débute par une phase d'invasion tissulaire conduisant à un carcinome invasif, suivie d'une phase de dissémination des cellules cancéreuses par voie sanguine ou lymphatique et, après une période de latence, à la colonisation d'un site distant de la tumeur primitive pour former à terme des métastases.

Figure 2. Représentation schématique des modèles théoriques de croissance tumorale. (A) Le modèle stochastique considère que chaque cellule cancéreuse possède un potentiel tumorigène équivalent. Ainsi l'initiation et la progression tumorale résultent, d'une part, de l'acquisition séquentielle et aléatoire de mutations à l'origine de la formation de clones tumoraux distincts et, d'autre part, de la sélection des clones se multipliant le plus rapidement dans un environnement donné (B) Le modèle hiérarchique suppose que les cellules souches cancéreuses (CSC), de par leur capacité à s'auto-renouveler et à se différencier en cellules néoplasiques peu ou pas tumorigènes, sont les éléments moteurs de la croissance tumorale. Ainsi, les cellules non CSC constituent la majorité de la masse tumorale mais n'ont pas ou peu de capacités tumorigéniques. (C) Le modèle de plasticité des CSC remet en cause le caractère unidirectionnel de la différenciation des CSC et propose que les cellules à l'origine de la croissance tumorale puissent être aussi bien des cellules souches que des cellules différenciées. Ainsi, les cellules non-CSC ont la capacité de réalimenter la population de CSC *via* une reprogrammation cellulaire. CSC : Cellule Souche Cancéreuse.

Figure 3. Représentation schématique des principales caractéristiques des cellules cancéreuses.

Figure 4. Mécanismes de la vascularisation tumorale. Les cellules tumorales mettent en jeu plusieurs mécanismes distincts pour former leur propre réseau vasculaire. (A) L'angiogenèse par bourgeonnement ou « sprouting » (mécanisme principal) correspond à l'activation des cellules endothéliales et à la sélection d'une ou plusieurs cellules de front (« tip cell ») qui bourgeonnent à partir d'un vaisseau préexistant et guident la formation du néo-vaisseau. (B) L'angiogenèse par mimétisme vasculaire correspond à la capacité des cellules tumorales à intégrer les vaisseaux sanguins en mimant les cellules endothéliales. (C) L'angiogenèse par intussusception est un mécanisme permettant l'accroissement de la ramification des vaisseaux tumoraux. (D) L'angiogenèse par transdifférenciation est un processus dans lequel les cellules tumorales douées de propriétés souches acquièrent un phénotype pseudo-endothélial et tapissent la paroi interne des vaisseaux. (E) La cooptation est un mécanisme dans lequel la tumeur détourne à son profit les vaisseaux irriguant le tissu sain avoisinant. (F) La vasculogenèse correspond à la formation d'un réseau vasculaire *de novo* à partir du recrutement de cellules endothéliales progénitrices de la moelle osseuse ou des parois vasculaires.

Figure 5. Les différentes étapes du processus métastatique. Dans un premier temps, quelques clones issus de la tumeur primitive se détachent (délamination) et envahissent la matrice extra-cellulaire pour ensuite gagner la circulation sanguine ou lymphatique (intravasation). Dans un second temps, ces cellules métastatiques quittent la circulation (extravasation) pour survivre et proliférer dans leur nouvel environnement.

Figure 6. Modèle linéaire de sélection clonale et modèle de dissémination précoce. (A) Dans le modèle linéaire de sélection clonale, toutes les métastases se forment à partir d'un même clone tumoral qui apparaît tardivement au sein de la tumeur primitive. Ainsi, les anomalies génétiques des cellules de la tumeur primitive sont également présentes dans les cellules métastatiques. (B) A l'inverse, dans le modèle de dissémination précoce, les métastases dérivent de clones présents au début du processus de

cancérogenèse. De ce fait, les altérations moléculaires formées après dissémination des cellules tumorales dans la tumeur primitive sont absentes des cellules métastatiques.

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60
61
62
63
64
65

Figure 1

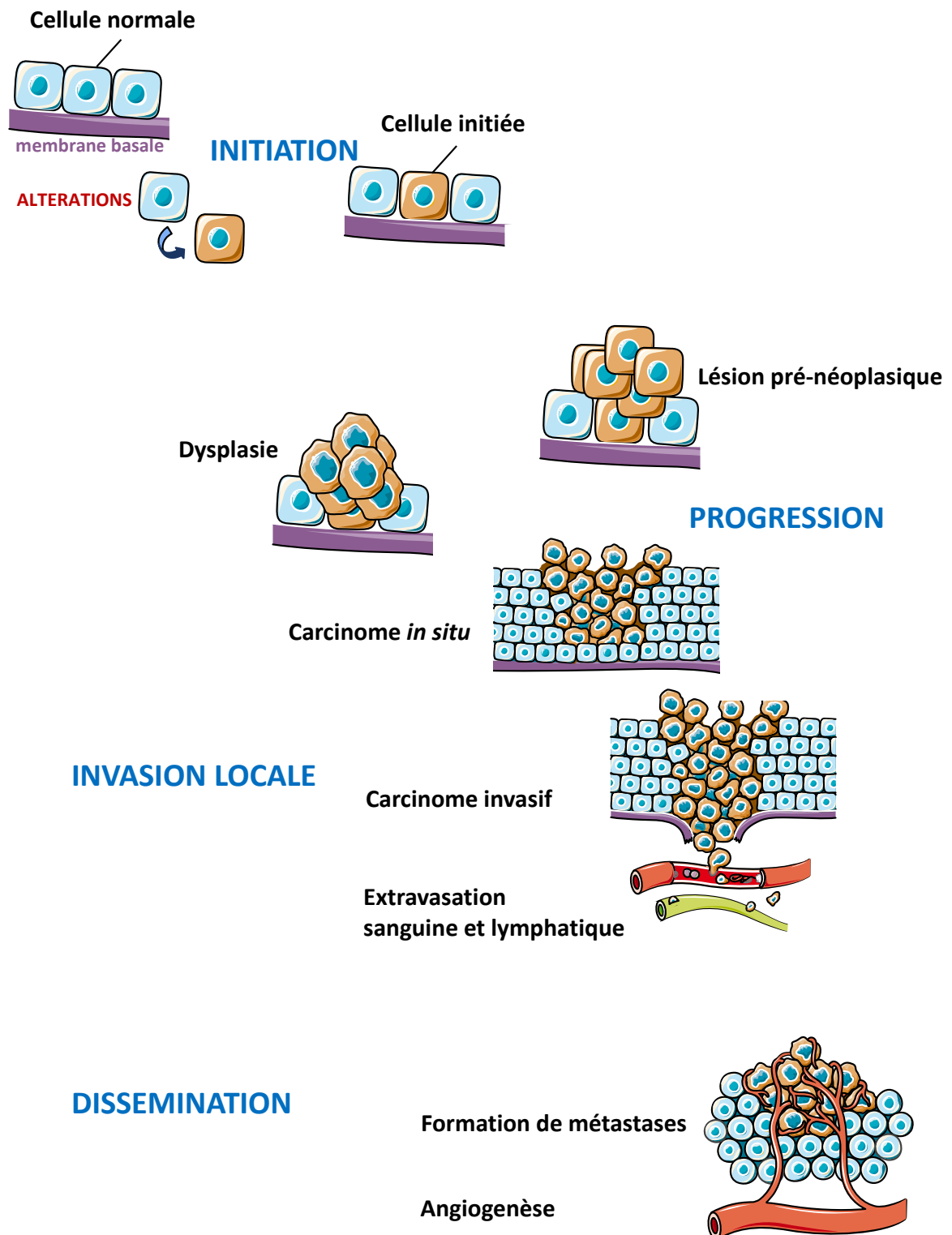


Figure 2

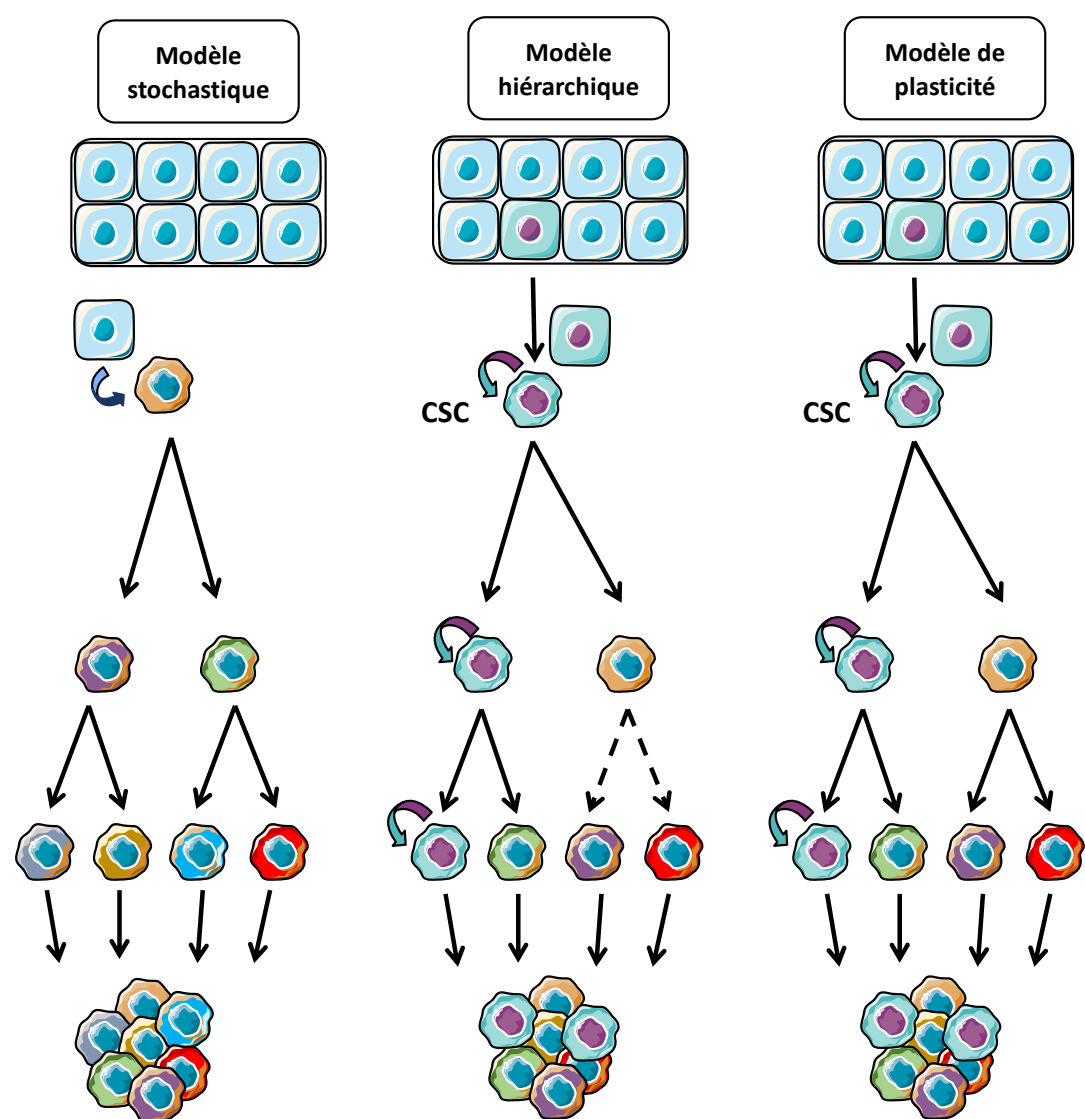


Figure 3

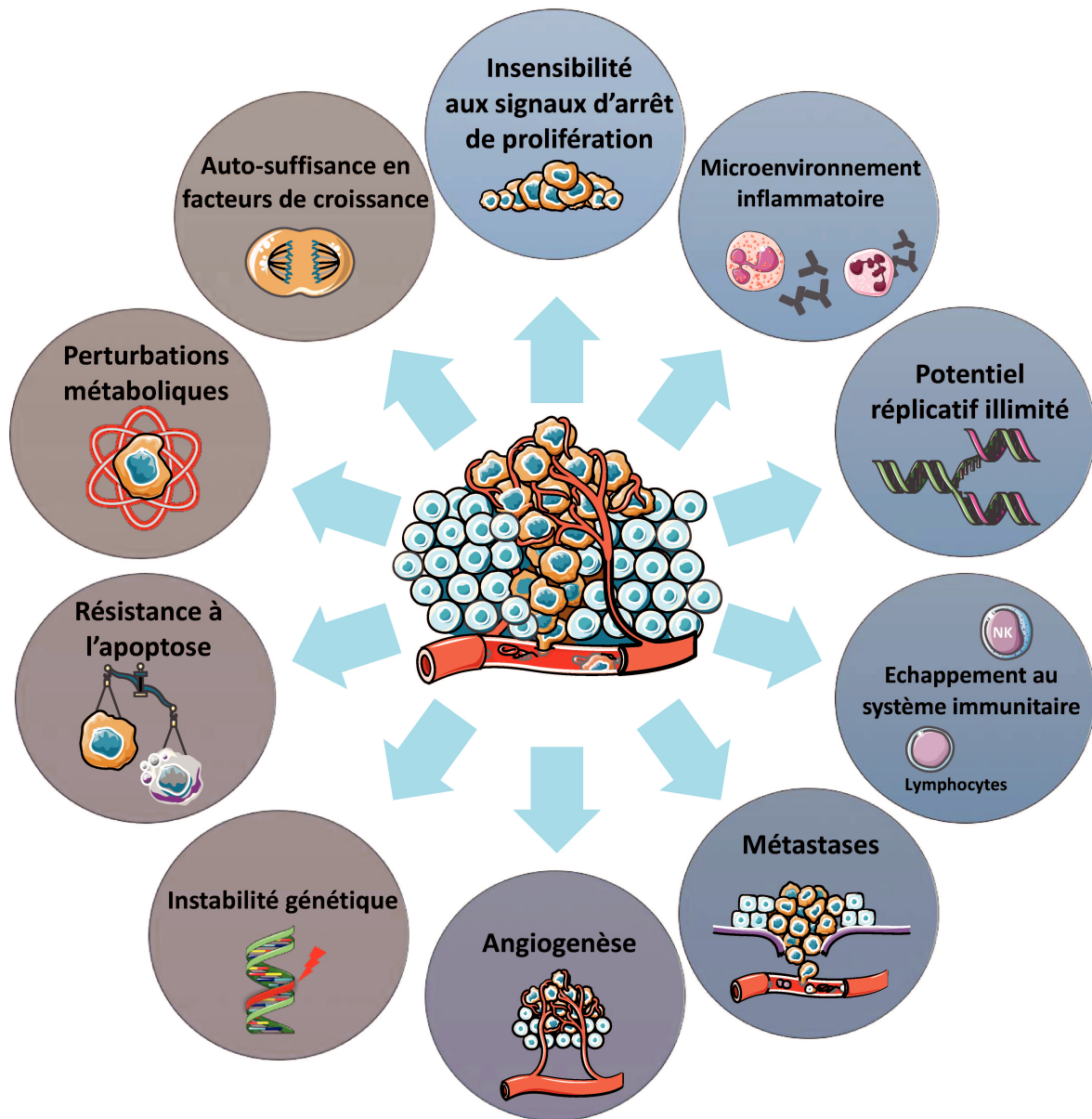


Figure 4

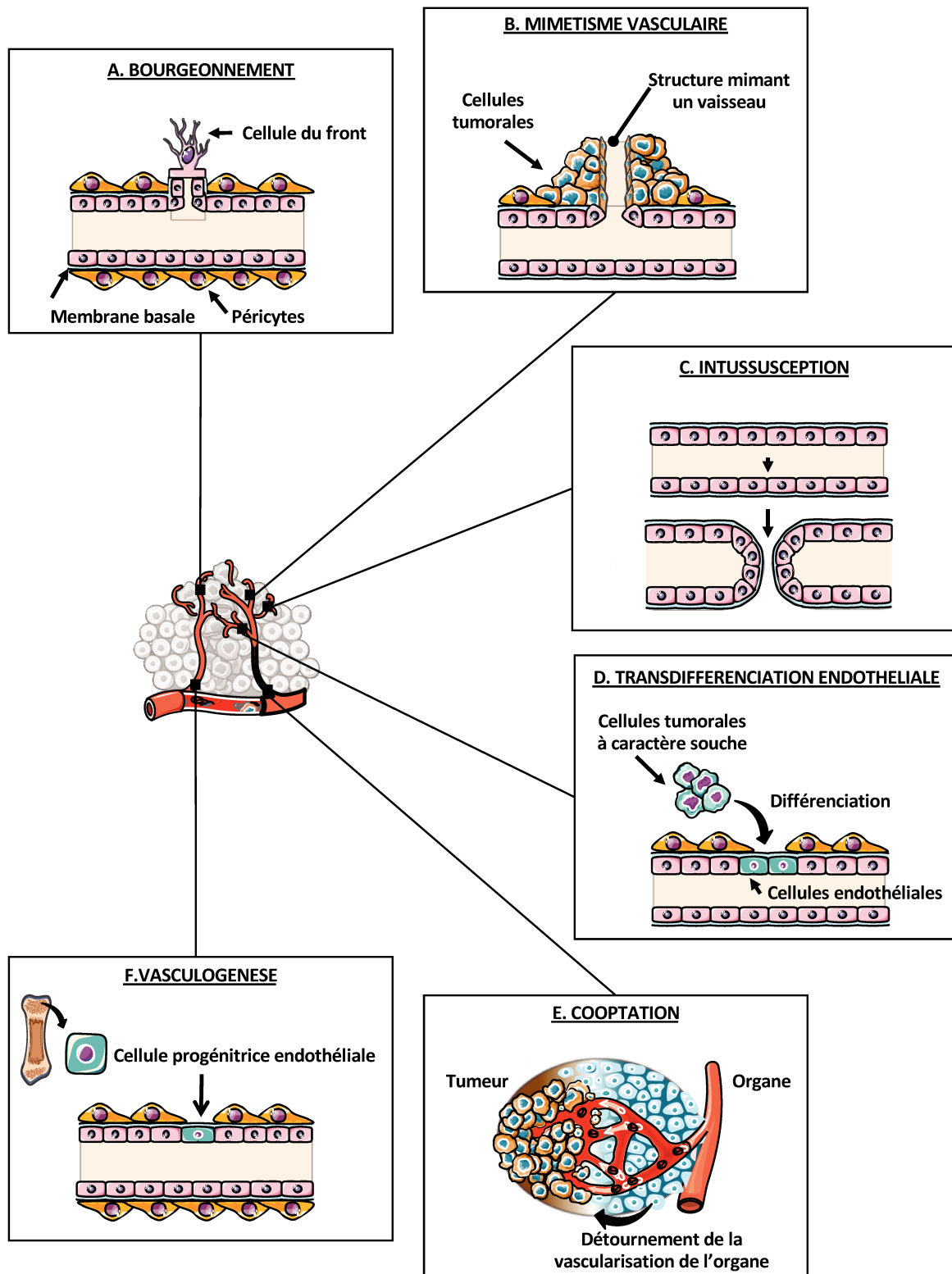


Figure 5

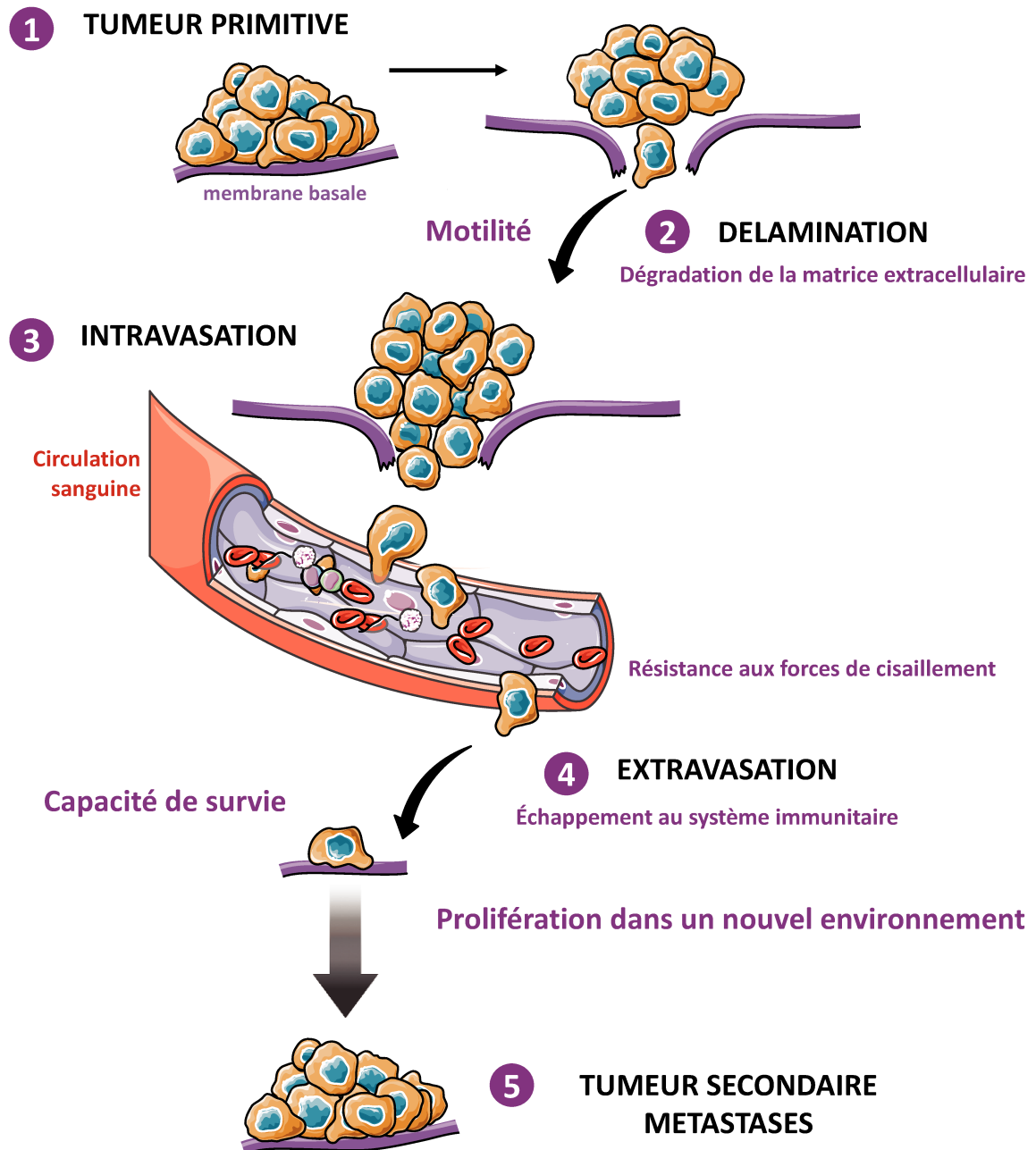
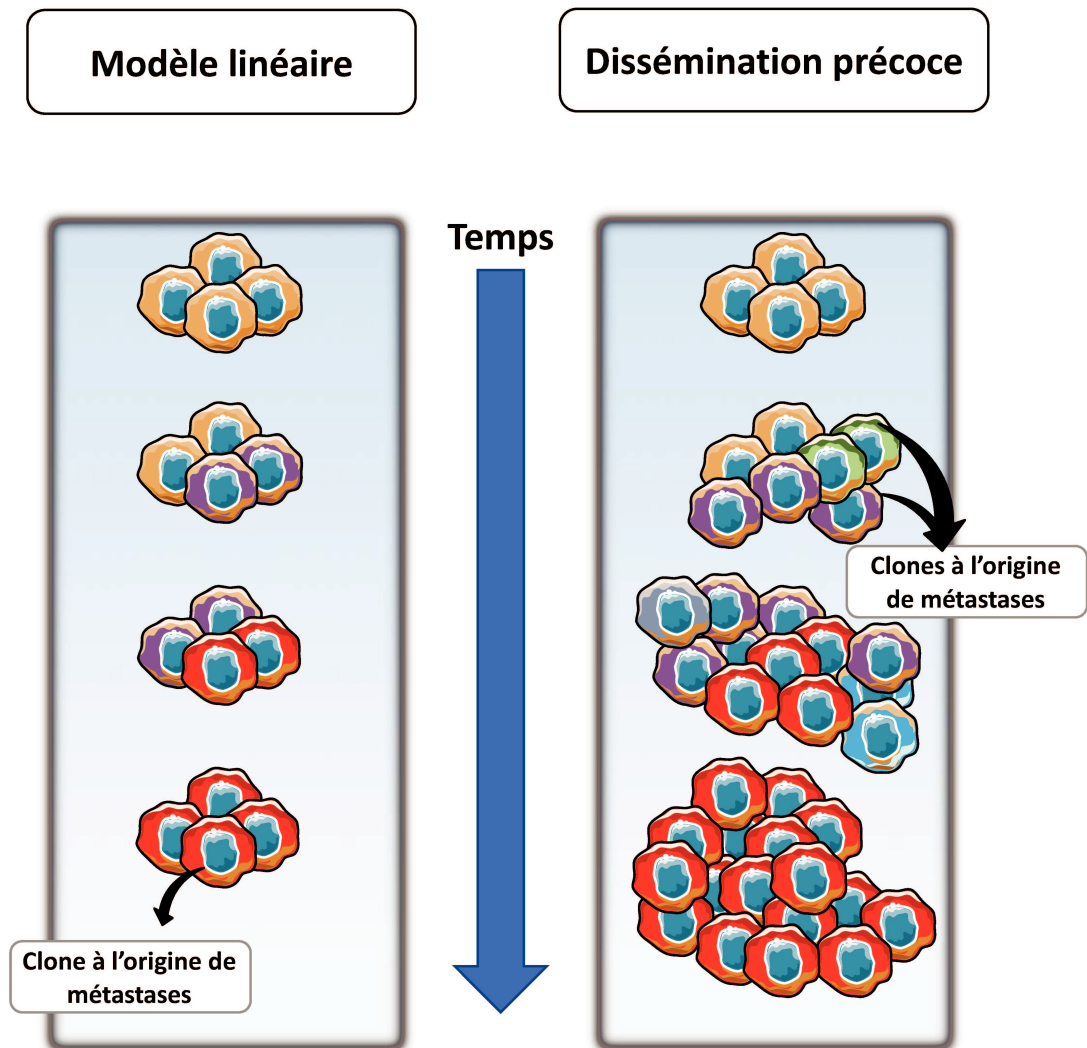


Figure 6



B. Annexe 2

Lemaire, J. ; Van der Hauwaert, C. ; Savary, G. ; Dewaeles, E. ; Perrais, M. ; Lo Guidice, J.M. ;
et al. Cadmium-Induced Renal Cell Toxicity Is Associated With MicroRNA Deregulation.
International Journal of Toxicology : 109158181989903. (2020)
Doi : 10.1177/1091581819899039.

1 **Cadmium-induced renal cell toxicity is associated with microRNA**
2 **deregulation**

3 **Running title :** Cadmium-responsive miRNAs in human renal cells

4 Lemaire J^{a,*}, Van der Hauwaert C^{a,b,*}, Savary G^a, Dewaeles E^a, Perrais M^c, Lo Guidice JM^a,
5 Pottier N^{a,d}, Glowacki F^{a,e}, Cauffiez C^a

6 ^aEA 4483-IMPECS-IMPact of Environmental ChemicalS on Human Health, Univ. Lille,
7 59045, Lille Cedex, France.

8 ^bDépartement de la Recherche en Santé, CHU Lille, 59037, Lille, France.

9 ^cUMR-S 1172-JPArc-Centre de Recherche Jean-Pierre AUBERT Neurosciences et Cancer,
10 Univ. Lille, 59045, Lille, France.

11 ^dService de Toxicologie et Génopathies, CHU Lille, 59037, Lille, France.

12 ^eService de Néphrologie, CHU Lille, 59037, Lille, France.

13 * : contributed equally

14

15 **Corresponding author :** Christelle Cauffiez

16 EA 4483 – IMPECS – IMPact of Environmental ChemicalS on Human Health,
17 Faculté de Médecine / Pôle Recherche
18 1, place de Verdun
19 59045 Lille Cedex, France

20

21 **Abstract**

22

23 Cadmium is an environmental pollutant well known for its nephrotoxic effects. Nevertheless,
24 mechanisms underlying nephrotoxicity continue to be elucidated. MicroRNAs (miRNAs)
25 have emerged in recent years as modulators of xenobiotic-induced toxicity. In this context,
26 our study aimed at elucidating whether miRNAs are involved in renal proximal tubular
27 toxicity induced by cadmium exposure. We showed that cadmium exposure, in two distinct
28 renal proximal tubular cell models (RPTEC/hTERT and HK-2), resulted in cytotoxicity
29 associated with morphological changes, overexpression of renal injury markers and induction
30 of apoptosis and inflammation processes. Cadmium exposure also resulted in miRNA
31 modulation, including the significant upregulation of 38 miRNAs in RPTEC/hTERT cells.
32 Most of these miRNAs are known to target genes whose coding proteins are involved in
33 oxidative stress, inflammation and apoptosis, leading to tissue remodeling. In conclusion, this
34 study provides a list of dysregulated miRNAs which may play a role in the pathophysiology
35 of cadmium-induced kidney damages and highlights promising cadmium molecular
36 biomarkers that warrants to be further evaluated.

37

38 **Keywords**

39 Cadmium ; nephrotoxicity ; microRNA

40

41 Introduction

42

43 Environmental chemical exposure remains a major public health matter worldwide. In
44 particular, cadmium is a serious environmental pollutant emanating from industrial and
45 agricultural sources ¹. Cadmium is a natural earth's crust element, usually found as a mineral,
46 and widely found as a byproduct of mining, smelting and refining zinc, lead and copper ores
47 ². For the two last decades, despite a decreased production and use of cadmium, it is still
48 found in nickel-cadmium batteries, cadmium telluride photovoltaics, plastic stabilizers or
49 paint pigments ³. The general population exposure to cadmium predominantly results thus
50 from air pollution, consumption of cadmium-contaminated foods and water, but also from
51 smoking ⁴.

52 Cadmium, which is poorly metabolized, is filtered and reabsorbed in the renal proximal
53 tubules, resulting in its bioaccumulation in target organs with a half-life of about 10–30 years
54 ^{5,6}. Intra-renal cadmium concentration increases over time until it reaches a cellular threshold
55 associated with progressive renal cell injury ⁷. Cadmium is thus known to induce kidney
56 injury in the general population as well as in particular occupational populations ^{8–10}. Tubular
57 proteinuria, the first clinical sign of cadmium-induced kidney injury, occurs even after a low
58 exposure to cadmium. For example, Jarup *et al.* (2000) ¹¹ reported, in a population of workers
59 and people environmentally or occupationally exposed to low cadmium levels, a 10%
60 increase prevalence of tubular proteinuria. At a later stage, tubular dysfunction has been
61 shown to progress with non-specific glomerular damages, and finally to a reduced glomerular
62 filtration rate ¹². Furthermore, for women with type 2 diabetes, cadmium exposure was
63 reported to be associated with a larger amount of albuminuria, suggesting that glomerular
64 integrity of this subgroup of patients is particularly vulnerable to cadmium exposure ¹³.
65 Epidemiological studies have also reported an association between cadmium exposure and
66 chronic kidney diseases ^{14–16} or end-stage kidney diseases ¹⁷. Cadmium has also been

67 implicated in renal carcinogenesis¹⁸ and has been classified as a Category I carcinogen by the
68 International Agency for Research on Cancer¹⁹.

69 The mechanisms underlying renal cadmium toxicity are quite well understood. Briefly, at the
70 cellular level, cadmium increases the production of reactive oxidative species (ROS) leading
71 to oxidative stress, DNA damage, lipid peroxidation and apoptosis^{7,20}. Cadmium has also
72 been shown to activate several proto-oncogenes or genes associated with cell proliferation,
73 such as c-myc or c-jun, both *in vitro* and in animal models^{21,22}. However, the elucidation of
74 novel regulatory mechanisms underlying cadmium injury remains a priority issue to allow
75 better assessment of the risk associated with this common environmental contaminant and to
76 develop novel pertinent biomarkers of cadmium exposure. In particular, the recently
77 discovered importance of microRNAs (miRNAs) during kidney development²³ or in renal
78 pathogenesis^{24–28} emphasizes the key role played by miRNAs in renal injury²⁹. miRNAs are
79 small endogenous, single-stranded, RNA molecules without protein-coding capacity, which
80 act as powerful negative regulators of gene expression at the post-transcriptional level³⁰.

81 Generally, the inhibition of target gene expression by miRNAs requires the binding of
82 miRNA to the 3'-untranslated region (3'-UTR) of its target genes, resulting in mRNA
83 cleavage or suppressed translation³¹. Since their first discovery in *Caenorhabditis elegans*³²,
84 miRNAs have gained significant attention these last years with the understanding of their
85 important modulatory role in cellular processes, such as proliferation, differentiation or
86 apoptosis^{33,34}. In addition, the remarkable stability of miRNAs in biofluids has underscored
87 their powerful value as a new class of non-invasive biomarkers for diagnosis, prognosis or
88 disease activity^{35,36}.

89

90 Thus, the present work aimed at identifying the miRNAs differentially expressed in renal
91 proximal tubular cells in response to cadmium exposure. To establish a list of confident

92 miRNAs that were modulated upon cadmium exposure, two cell models were used (i) the
93 RPTEC/hTERT cells as a “discovery” cell model and (ii) the HK2 cells as a “validation” cell
94 model.
95

96 **Material and methods**

97

98 **Cell culture**

99 Primary human Renal Proximal Tubular Epithelial Cells (RPTEC) immortalized with
100 pLXSN-hTERT retroviral transfection (RPTEC/hTERT, ATCC® CRL-4031™) were cultured
101 supplemented with 1% Penicillin/Streptomycin, 5 pmol/L triiodo-L-thyronine, 10 ng/mL
102 recombinant human EGF, 3.5 µg/mL ascorbic acid, 5.0 µg/mL human transferrin, 5.0 µg/mL
103 insulin, 25 ng/mL prostaglandin E1, 25 ng/mL hydrocortisone, 8.65 ng/mL sodium selenite,
104 0.1 mg/mL G418 and 1.2 g/L sodium bicarbonate (Sigma) as previously described ^{37,38}.
105 Human Kidney-2 (HK-2) cell line (ATCC® CRL-2190™) was cultured in Keratinocyte-
106 Serum Free medium (Thermofisher) supplemented with 0.05 mg/mL BPE (Bovine Pituitary
107 Extract, Thermofisher), 5 ng/mL EGF (Epidermal Growth Factor, Thermofisher) and 1%
108 Penicillin/Streptomycin (Sigma). Both cell lines were cultured in a humidified, 5%-CO2
109 incubator at 37°C.

110

111 **Cadmium exposure**

112 Twenty-four hours after seeding in 96-well plates (20 000 cells / well), RPTEC/hTERT and
113 HK-2 cells were exposed to 0-1000 µM CdCl₂ (Sigma) for 24 hours. Cell viability was
114 evaluated using the CellTiterGlo kit (Promega), based on ATP quantitation, to determine
115 subsequent exposure treatment. Subconfluent cells (200 000 cells seeded in 6-well plates)
116 were then subjected either to vehicle (untreated cells) or CdCl₂ (20 µM for HK-2 and 10 µM
117 for RPTEC/hTERT, corresponding to IC20) for 24 hours.

118

119

120 **RNA extraction**

121 Total RNAs were extracted from two wells of a 6-well plate, using the miRNeasy Mini kit
122 (Qiagen), according to the supplier's recommendations. RNAs integrity was evaluated using
123 an Experion (BioRad) automat.

124

125 **Open Array analysis**

126 Three independent exposures (10 μ M CdCl₂) were used for miRNA profiling in
127 RPTEC/hTERT cells with the QuantStudio 12K Flex Open Array Real-Time PCR system
128 (Thermofisher). The OpenArray reverse transcription reaction was performed, according to
129 the manufacturer's protocol, using Megaplex™ RT Primers Pool A v2.1 and Pool B v3.0
130 following pre-amplification reaction. Then, TaqMan Open Array® Real Time PCR was
131 performed on a QuantStudio 12K Flex Real-Time PCR System (Thermofisher) according to
132 the supplier's recommendations.

133 Relative Quantification was evaluated using the Thermofisher Cloud Data Analysis Apps
134 (Thermofisher) and the comparative threshold cycle method (Crt). 754 miRNAs and 4
135 internal controls were analyzed. Low expressed miRNAs (Crt > 26) and miRNAs with poor
136 amplification quality (<1.24) were excluded from the study. The expression of each miRNA
137 was calculated after normalization to the levels of U6 snRNA and finally expressed as Fold
138 Change (FC) as compared to the control samples.

139

140 **Pathway analysis**

141 Enriched Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway analysis was
142 performed using DNA Intelligent Analysis (DIANA)-miRPath v3.0 software

143 (<http://diana.cslab.ece.ntua.gr>),³⁹ based on predicted targets by DIANA-microT-CDS. Targets
144 of miRNAs with a score of more than 0.8 were selected. Only KEGG pathways with a p-value
145 <0.05 and a false discovery rate (FDR) <0.05 were retained.

146

147 **Quantitative RT-PCR**

148 miRNAs retro-transcription was performed using Taqman[®] microRNA Reverse Transcription
149 Kit (Thermofisher). Quantitative PCR was performed using a StepOnePlus[™] Real-Time PCR
150 System (Thermofisher) with Taqman[®] Universal Master Mix II, no UNG[™] (Thermofisher)
151 and with the following Taqman[®] assays: miR-21-5p (assay ID 000397), miR-29c-3p (assay
152 ID 000587), miR-193a-5p (assay ID 002281), miR-27a-3p (assay ID 000408), miR-30b-5p
153 (assay ID 000602) and miR-30c-5p (assay ID 00019). snRNA U6 (assay ID 001973) was
154 used as normalizer.

155 mRNAs retro-transcription was performed using the high capacity cDNA reverse
156 transcription kit (Thermofisher) according to manufacturer's instructions. Quantitative PCR
157 was performed on a StepOnePlus[™] Real-Time PCR System (Thermofisher) with Taqman[®]
158 Universal Master Mix II, no UNG[™] (Thermofisher) and with the following Taqman[®]
159 assays: NGAL (assay ID hs01008571), HO-1 (assay ID hs01110250) and IL-6 (assay ID
160 hs00174131). PPIA (cyclophilin A ; assay ID hs99999904) was used as normalizer.

161 Relative expression levels of mRNAs and miRNAs were assessed using the comparative
162 threshold cycle method ($2^{-\Delta\Delta CT}$)⁴⁰.

163

164

165 **Western blot**

166 Total proteins, from three wells of a 6-well plate, were lysed in RIPA buffer (Sigma)
167 containing protease and phosphatase inhibitors cocktail (Roche) and were sonicated for 20 s.
168 Lysates were quantified for protein concentration using the BCA protein assay kit (Pierce).
169 Twenty µg of proteins were separated by electrophoresis on a 4–12% BisTris NuPAGE gel
170 (Thermofisher) or 7% Tris acetate NuPAGE gel (Thermofisher) and were transferred onto
171 nitrocellulose membrane using the Trans-Blot® Turbo™ Transfer System (Biorad). After
172 blocking, the membranes were incubated with their respective primary antibodies (anti-
173 caspase 3 (sc7148; Santa Cruz ; 1/1000), anti-cleaved caspase 3 (9661; Cell Signaling ;
174 1/1000), anti-PARP-1 (9542P; Cell Signaling ; 1/1000), anti-HO-1 (5853S, Cell Signaling ;
175 1/1000) and anti-HSP60 (sc-1052; Santa Cruz ; 1/4000)) overnight at 4°C. Membranes were
176 further incubated with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody (Sigma Aldrich
177 ; 1/10000) for 45 min at room temperature. Protein bands were visualized with the Amersham
178 ECL™ Western Blotting Detection Reagents (GE Healthcare) using a Fusion FX Spectra
179 imager (Vilber Lourmat). Image analysis was performed using ImageJ.

180

181 **Statistical analysis**

182 Statistical analyses were performed with GraphPad Prism version 6.00 for Windows
183 (GraphPad Software). Results are given as mean ± Standard Error of the Mean (SEM). Two-
184 tailed student t-test was used for single comparisons. One-Way ANOVA was used for multi-
185 comparison following by Bonferroni *post hoc* test. p-value < 0.05 was considered statistically
186 significant.

187

188 **Results**

189

190 **Cadmium affects renal cell survival and induces cell toxicity**

191 We first assessed cadmium-induced toxicity *in vitro* using immortalized proximal tubular
192 epithelial cells (RPTEC/hTERT). As expected, cadmium exposure induced RPTEC/hTERT
193 toxicity in a dose-response manner ($IC_{50} = 26.01 \pm 6.38 \mu M$) (**Figure 1A**). Dose-dependent
194 cadmium-induced cell injury was also confirmed by microscopy. Indeed, exposure to $CdCl_2$
195 for 24 h caused RPTEC/hTERT cells to separate from each other and switch from epithelioid
196 to rounded shape (**Figure 1B**). Subsequent $CdCl_2$ exposure was then conducted using a mild
197 $10 \mu M$ $CdCl_2$ concentration.

198 In addition, we confirmed that the relative expression of NGAL (Neutrophil Gelatinase
199 Associated Lipocalin), a renal injury marker ⁴¹, was increased following cadmium exposure
200 (**Figure 1C**). Furthermore, cadmium increased the expression of inflammatory genes such as
201 interleukine 6 (IL-6) (**Figure 1D**). Finally, we observed a significant induction of Heme
202 Oxygenase-1 (HO-1), a well-recognized biomarker for oxidative stress ⁴², at mRNA (**Figure**
203 **1E**) and protein levels (**Figure 1F**).

204 (Insert Figure 1)

205

206 **Cadmium exposure triggers a modulation of miRNA expression in renal cells**

207 As previously described, proximal tubular epithelial cells, such as RPTEC/hTERT, display
208 high metabolism and xenobiotic disposition capacity⁴³ and are among the most relevant *in*
209 *vitro* models to evaluate xenobiotic deleterious effects^{28,44,45}. As described above,
210 RPTEC/hTERT cell model closely recapitulates cadmium toxicity *in vitro*. We then aimed to
211 identify key microRNAs potentially involved in cadmium deleterious effects.

212 A miRNA was considered as non-expressed when its adjusted Crt value was higher than 26,
213 according to the supplier's recommendations. Using this criterion, of the 754 miRNAs that we
214 studied, 150 miRNAs were regarded as expressed in RPTEC/hTERT cells. Among them, the
215 most expressed miRNAs were miR-222-3p, miR-21-5p, miR-146a-5p, miR-30c-5p and miR-
216 30b-5p. In addition, cadmium induced the significant upregulation of 38 miRNAs (**Figure 2**).
217 (Insert Figure 2)

218

219 Of note, none of the studied miRNAs was found to be significantly down-regulated in cells
220 exposed to cadmium. These data were validated for five out of the six miRNAs that were
221 selected according to their basal expression, upregulation level and p-value (miR-21-5p, miR-
222 27a-3p, miR-29c-3p, miR-30b-5p and miR-30c-5p) in independent RPTEC/hTERT cell
223 samples (**Figure 3**).

224 (Insert Figure 3)

225

226 **Validation of miRNA modulation induced by cadmium in HK-2 cell line**

227 We also aimed to further assess the relevance of the cadmium-induced miRNA dysregulation
228 that we observed in RPTEC/hTERT cells in the commonly used HK-2 cell line⁴⁶⁻⁵⁴. HK-2
229 cells also exhibited typical features of cadmium toxicity, including a decreased cell viability
230 and a morphological modification. However, HK-2 cells were less sensitive to cadmium than

231 RPTEC/hTERT, as suggested by a higher IC₅₀ (IC₅₀ = 36.42 ± 7.10 µM *versus* IC₅₀ = 26.01
232 ± 6.38 µM) (**Supplemental Figure 1**).

233 Expression of the previously selected miRNAs (miR-21-5p, miR-27a-3p, miR-29c-3p, miR-
234 30b-5p, miR-30c-5p and miR-193a-5p) was further evaluated following cadmium exposure
235 (IC₂₀ = 20 µM). We observed a similar miRNA response to cadmium with the significantly
236 upregulation of five out the six selected miRNAs in this cell line (**Figure 4**).

237 (Insert Figure 4)

238

239 **Prediction of miRNA targeted genes and pathways**

240 A thorough review of the literature was in favor of the involvement of these upregulated
241 miRNAs in key cellular processes such as apoptosis and cancer (**Supplemental Table 1**).
242 Moreover, a bioinformatic analysis revealed that about 80% of the upregulated miRNAs have
243 been previously experimentally shown to target genes involved in the apoptotic process
244 (**Table 1**).

245 The relevance of the cadmium-induced miRNA pattern was further assessed. As expected,
246 apoptosis was observed in cadmium-treated cells, as shown by the cleavage of caspase 3 and
247 PARP-1, two key proteins of the apoptotic process (**Figure 5**).

248 (Insert Figure 5)

249

250 Moreover, the miR-Path analysis tool highlighted that the direct targets of the upregulated
251 genes were enriched in KEGG network processes involved in tissue remodelling, including
252 fibrogenesis and cancer. These pathways included PI3K-AKT, MAPK, Ras, Rap1 and Hippo
253 signaling pathways (**Figure 6**).

254 (Insert Figure 6)

255

256 **Discussion**
257

258 MiRNAs have emerged in the two past decades as powerful gene repressors and are involved
259 in various cellular and biological key processes ⁵⁵. As metals are widely present in the
260 environment, they are prone to be absorbed, to accumulate and to interfere with cell fate. In
261 particular, cadmium is a widespread environmental and industrial compound that induces
262 various deleterious effects including nephrotoxicity ⁵⁶. To date, there are few reports
263 describing miRNA expression changes due to other metal exposure. In particular, arsenic, one
264 of the most common environmental carcinogenic pollutants ⁵⁷, has been shown to alter
265 miRNA expression, leading to malignant transformation and tumorigenesis in human
266 bronchial epithelial cells ⁵⁸.

267 Cadmium exposure in human is then postulated to modify miRNA expression, leading to
268 deregulation of gene expression and toxic effects. However, studies related to the modulation
269 of miRNAs in response to cadmium exposure are lacking, especially in renal cells. Indeed, as
270 environmental cadmium may accumulate in soils and water, previous studies have mainly
271 focused on plants or aquatic organisms ⁵⁹. For example, the plant adaptive response to heavy
272 metal stress has been demonstrated to be notably modulated by miRNAs in rice, soybean or
273 wheat ⁶⁰⁻⁶².

274 To our knowledge, our study allowed for the first time a comprehensive analysis of miRNA
275 modulation following cadmium exposure in human renal proximal tubular epithelial cells.
276 Our data are in favour of an association between cadmium cytotoxicity and altered miRNA
277 expression in human renal tubular proximal cells. In order to clarify mechanisms underlying
278 miRNA relevance, we have first chosen to explore miRNA expression profile in
279 RPTEC/hTERT, a cellular model that has been proven to be reliable in several nephrotoxicity
280 studies ^{28,44,45,63}. In particular, this cell line may be viewed as an improved tool for *in vitro*
281 nephrotoxicity assessments ⁴⁵. Indeed, by using only the catalytic subunit of the endogenous

282 human telomerase reverse transcriptase (hTERT) enzyme for immortalization, telomere
 283 length is stabilized, and then, the RPTEC/hTERT cell line does not undergo replicative
 284 senescence ³⁷, a well-known limitation of primary RPTECs. Moreover, the RPTEC/hTERT
 285 cell line exhibits a similar metallothioneines activity and stress-induced gene over-expression
 286 compared to healthy primary human kidney cells ^{45,64}. We used a CdCl₂ concentration of 10
 287 μM, corresponding to the IC₂₀ in the RPTEC/hTERT cell line, which is in line with previous
 288 studies ^{65, 66, 67}.
 289 More precisely, we observed that cadmium treatment for 24h induces the up-regulation of 38
 290 miRNAs in RPTEC/hTERT cells. The fact that the modulation of miRNA expression is quite
 291 pronounced in our experimental conditions, when the cytotoxicity is mild (10 μM CdCl₂ that
 292 corresponds to about IC₂₀), suggests that miRNA modulation could represent an early event
 293 in the pathophysiology of cadmium-induced renal injury. Similar early effect was recently
 294 reported in a rat sub-chronic model of cadmium exposure, in which animals were treated with
 295 subcutaneous injections of CdCl₂ (0.6 mg/kg) 5 days a week for 12 weeks. MicroRNA high-
 296 throughput analysis allowed the identification of 44 miRNAs significantly up-regulated after
 297 cadmium administration ⁶⁸. In particular, despite some expected discrepancies, five miRNAs
 298 (miR-222-3p, miR-146b-5p, miR-20a-5p, miR146a-5p, miR-21-5p, and miR-132-3p) are
 299 upregulated here and in Fay's study. In addition, to assess the robustness of the data observed
 300 in RPTEC/hTERT cells and to further support the validity of our profiling approach, the
 301 miRNA deregulation of six miRNAs was evaluated in the widely-used HK-2 cell line ⁵⁴.
 302 Interestingly, despite limited differences that may be caused by basal miRNA expression and
 303 cadmium concentrations, a similar miRNA up-regulation was also globally observed. Taken
 304 together and with acknowledgement of intrinsic limitations of *in vitro* studies, these findings
 305 demonstrate that cadmium significantly modulates the miRNA expression profile in renal

306 proximal tubular cells and suggest that miRNA dysregulation may participate in the
 307 pathogenesis of cadmium-induced kidney injury.

308

309 Considering their known targets, our study pointed out that the significantly deregulated
 310 miRNAs mentioned above are involved in key cellular processes including oxidative stress,
 311 inflammation, and cell death (**Supplemental Table 1**). In particular, evidences favor a role
 312 for miR-182-5p and miR-27a-3p in oxidative stress. Indeed, miR-182-5p has been shown to
 313 repress oxidative stress in RAW264.7 cells, an atherosclerosis model, exposed to ox-LDL ⁶⁹.
 314 In addition, miR-27a-3p has been recently described to potentially target NRF2, a master
 315 regulator of oxidative stress ⁷⁰. Moreover, in our study, a large proportion of the cadmium-
 316 modulated miRNAs targets genes are related to apoptosis. Among them, miR-21-5p has been
 317 suggested to act as a negative regulator in the apoptosis of tubular epithelial cells ⁷¹. miR-30
 318 family members have been also shown to alter the balance between cell proliferation and
 319 apoptosis in myocardial ^{72,73} and renal cells ⁷⁴.

320 Altogether, these cellular processes promote tissue remodeling, including fibrosis and cancer
 321 (**Supplemental Table 1**). More precisely, it is well known that a large number of miRNAs
 322 may act as either oncogenes or tumor suppressors under certain conditions and that miRNA
 323 modulation contributes to cancer-associated processes such as proliferation, invasion,
 324 metabolic reprogramming or resistance to cell death. ⁷⁵. In particular, miR-27a-3p, which is
 325 one of the most deregulated miRNAs in the present study, has been previously demonstrated
 326 to be involved in malignant transformation in lung ⁷⁶ and liver ⁷⁷ after cadmium exposure.
 327 Interestingly, KEGG pathway analysis, based on miR-Path 3.0, revealed that out the 38
 328 cadmium-responsive miRNAs we described, 34 are involved in cancer pathways.

329 The expression of several miRNAs, termed as “fibromiRs” ⁷⁸ and whose involvement in
 330 kidney fibrosis has been extensively demonstrated ^{25,29,79}, is also significantly modulated by

331 cadmium exposure. For example, among the miRNAs we have validated, the well-
332 characterized miR-21-5p has been previously reported to be increased in several experimental
333 models of renal fibrosis, such as folic acid-induced kidney injury, ischemia/reperfusion
334 injury, unilateral ureteral obstruction and Alport nephropathy models ^{80,81}. Translational
335 relevance of miR-21-5p has been also confirmed in patients with chronic kidney diseases or
336 exhibiting several renal fibrotic lesions ^{24,26,82}.

337

338 The purpose of our work was to determine whether cadmium-induced nephrotoxicity was
339 associated with aberrant miRNA expression in kidney to potentially highlight miRNAs as
340 biomarkers of cadmium exposure. Indeed, upon tissue injury, miRNAs have been shown to be
341 released into the bloodstream ⁸³. miRNA propensity to be highly stable in biofluids ⁸⁴⁻⁸⁶ has
342 allowed seminal studies to demonstrate their potential interest as new non-invasive
343 biomarkers. Here, we highlighted several miRNAs of interest that deserve to be further
344 evaluated. In particular, the versatile role of miR-21-5p has previously led to propose this
345 miRNA as a valuable biomarker in the context of renal cancer ⁸⁷ and kidney injury ^{24,88}.

346

347 In conclusion, our findings demonstrate that cadmium profoundly alters miRNA expression of
348 proximal tubular epithelial cells and suggests that dysregulated miRNA expression may play a
349 role in the pathogenic molecular events occurring during cadmium-induced kidney injury. In
350 the future, the characterization of miRNAs and mRNAs interactions will provide better
351 insight into cadmium-induced mechanisms and could allow the identification of miRNAs as
352 promising markers of environmental stress.

353

354 **Funding**

355 The authors would like to thanks the “Conseil Régional des Hauts-de-France” for their
356 valuable support.

357

358 **Declaration of Conflicting Interests**

359 The Authors declare that there is no conflict of interest.

360

361 **References**

- 362 1. Satarug S, Garrett SH, Sens MA, et al. Cadmium, Environmental Exposure, and
363 Health Outcomes. *Environ Health Perspect* 2009; 118: 182–190.
- 364 2. Vangronsveld J, Van Assche F, Clijsters H. Reclamation of a bare industrial area
365 contaminated by non-ferrous metals: in situ metal immobilization and revegetation. *Environ*
366 *Pollut Barking Essex* 1987 1995; 87: 51–9.
- 367 3. Nogawa K. Cadmium. *Handb Toxicol Met* 2015; 667–716.
- 368 4. Honda R, Swaddiwudhipong W, Nishijo M, et al. Cadmium induced renal dysfunction
369 among residents of rice farming area downstream from a zinc-mineralized belt in Thailand.
370 *Toxicol Lett* 2010; 198: 26–32.
- 371 5. Satarug S, Baker JR, Urbenjapol S, et al. A global perspective on cadmium pollution
372 and toxicity in non-occupationally exposed population. *Toxicol Lett* 2003; 137: 65–83.
- 373 6. Wallin M, Sallsten G, Fabricius-Lagging E, et al. Kidney cadmium levels and
374 associations with urinary calcium and bone mineral density: a cross-sectional study in
375 Sweden. *Environ Health Glob Access Sci Source* 2013; 12: 22.
- 376 7. Rani A, Kumar A, Lal A, et al. Cellular mechanisms of cadmium-induced toxicity: a
377 review. *Int J Environ Health Res* 2014; 24: 378–399.
- 378 8. Sabolić I, Breljak D, Skarica M, et al. Role of metallothionein in cadmium traffic and
379 toxicity in kidneys and other mammalian organs. *Biometals Int J Role Met Ions Biol Biochem*
380 *Med* 2010; 23: 897–926.
- 381 9. Thévenod F. Nephrotoxicity and the Proximal Tubule. *Nephron Physiol* 2003; 93:
382 p87–p93.
- 383 10. Vesey DA. Transport pathways for cadmium in the intestine and kidney proximal
384 tubule: focus on the interaction with essential metals. *Toxicol Lett* 2010; 198: 13–9.
- 385 11. Jarup L. Low level exposure to cadmium and early kidney damage: the OSCAR study.
386 *Occup Environ Med* 2000; 57: 668–672.
- 387 12. Järup L, Berglund M, Elinder CG, et al. Health effects of cadmium exposure--a review
388 of the literature and a risk estimate. *Scand J Work Environ Health* 1998; 24 Suppl 1: 1–51.
- 389 13. Barregard L, Bergström G, Fagerberg B. Cadmium, type 2 diabetes, and kidney
390 damage in a cohort of middle-aged women. *Environ Res* 2014; 135: 311–6.
- 391 14. Ferraro PM, Costanzi S, Naticchia A, et al. Low level exposure to cadmium increases
392 the risk of chronic kidney disease: Analysis of the NHANES 1999–2006. *BMC Public Health*
393 2010; 10: 304.
- 394 15. Ginsberg GL. Cadmium risk assessment in relation to background risk of chronic
395 kidney disease. *J Toxicol Environ Health A* 2012; 75: 374–90.
- 396 16. Hwangbo Y, Weaver VM, Tellez-Plaza M, et al. Blood cadmium and estimated
397 glomerular filtration rate in Korean adults. *Environ Health Perspect* 2011; 119: 1800–5.
- 398 17. Hellström L, Elinder CG, Dahlberg B, et al. Cadmium exposure and end-stage renal
399 disease. *Am J Kidney Dis Off J Natl Kidney Found* 2001; 38: 1001–8.
- 400 18. Waalkes M. Cadmium carcinogenesis. *Mutat Res Mol Mech Mutagen* 2003; 533: 107–
401 120.
- 402 19. Straif K, Benbrahim-Tallaa L, Baan R, et al. A review of human carcinogens--Part C:
403 metals, arsenic, dusts, and fibres. *Lancet Oncol* 2009; 10: 453–4.
- 404 20. Hideaki Shimada Yih-Horng Shiao Mas. CADMIUM SUPPRESSES APOPTOSIS
405 INDUCED BY CHROMIUM. *J Toxicol Environ Health A* 1998; 54: 159–168.
- 406 21. Siewit CL, Gengler B, Vegas E, et al. Cadmium promotes breast cancer cell
407 proliferation by potentiating the interaction between ERalpha and c-Jun. *Mol Endocrinol*
408 *Baltim Md* 2010; 24: 981–92.
- 409 22. Yu R-A, He L-F, Chen X-M. Effects of cadmium on hepatocellular DNA damage,

410 proto-oncogene expression and apoptosis in rats. *Biomed Environ Sci BES* 2007; 20: 146–53.

411 23. Ma L, Qu L. The function of microRNAs in renal development and pathophysiology.

412 *J Genet Genomics Yi Chuan Xue Bao* 2013; 40: 143–52.

413 24. Glowacki F, Savary G, Gnemmi V, et al. Increased circulating miR-21 levels are

414 associated with kidney fibrosis. *PloS One* 2013; 8: e58014.

415 25. Gomez IG, Grafals M, Portilla D, et al. MicroRNAs as potential therapeutic targets in

416 kidney disease. *J Formos Med Assoc Taiwan Yi Zhi* 2013; 112: 237–43.

417 26. Hennino M-F, Buob D, Van der Hauwaert C, et al. miR-21-5p renal expression is

418 associated with fibrosis and renal survival in patients with IgA nephropathy. *Sci Rep* 2016; 6:

419 27209.

420 27. Khella HWZ, Bakhet M, Lichner Z, et al. MicroRNAs in kidney disease: an emerging

421 understanding. *Am J Kidney Dis Off J Natl Kidney Found* 2013; 61: 798–808.

422 28. Vandenbussche C, Van der Hauwaert C, Dewaeles E, et al. Tacrolimus-induced

423 nephrotoxicity in mice is associated with microRNA deregulation. *Arch Toxicol* 2018; 92:

424 1539–1550.

425 29. Van der Hauwaert C, Savary G, Hennino M-F, et al. [MicroRNAs in kidney fibrosis].

426 *Nephrol Ther* 2015; 11: 474–82.

427 30. Friedman RC, Farh KKH, Burge CB, et al. Most mammalian mRNAs are conserved

428 targets of microRNAs. *Genome Res* 2009; 19: 92–105.

429 31. Jonas S, Izaurralde E. Towards a molecular understanding of microRNA-mediated

430 gene silencing. *Nat Rev Genet* 2015; 16: 421–33.

431 32. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes

432 small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* 1993; 75: 843–54.

433 33. Xu J, Xiao X, Yang D. In Vitro Methods for Analyzing miRNA Roles in Cancer Cell

434 Proliferation, Invasion, and Metastasis. *Methods Mol Biol Clifton NJ* 2018; 1733: 159–171.

435 34. Cai B, Ma M, Chen B, et al. MiR-16-5p targets SESN1 to regulate the p53 signaling

436 pathway, affecting myoblast proliferation and apoptosis, and is involved in myoblast

437 differentiation. *Cell Death Dis* 2018; 9: 367.

438 35. Tili E, Michaille J-J, Gandhi V, et al. miRNAs and their potential for use against

439 cancer and other diseases. *Future Oncol Lond Engl* 2007; 3: 521–37.

440 36. Yokoi T, Nakajima M. Toxicological implications of modulation of gene expression

441 by microRNAs. *Toxicol Sci Off J Soc Toxicol* 2011; 123: 1–14.

442 37. Wieser M, Stadler G, Jennings P, et al. hTERT alone immortalizes epithelial cells of

443 renal proximal tubules without changing their functional characteristics. *Am J Physiol-Ren*

444 *Physiol* 2008; 295: F1365–F1375.

445 38. Vandenbussche C, Van der Hauwaert C, Dewaeles E, et al. Tacrolimus-induced

446 nephrotoxicity in mice is associated with microRNA deregulation. *Arch Toxicol* 2018; 92:

447 1539–1550.

448 39. Vlachos IS, Zagganas K, Paraskevopoulou MD, et al. DIANA-miRPath v3.0:

449 deciphering microRNA function with experimental support. *Nucleic Acids Res* 2015; 43:

450 W460–6.

451 40. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-

452 Time Quantitative PCR and the 2– $\Delta\Delta$ CT Method. *Methods* 2001; 25: 402–408.

453 41. Devarajan P. Neutrophil gelatinase-associated lipocalin (NGAL): A new marker of

454 kidney disease. *Scand J Clin Lab Invest* 2008; 68: 89–94.

455 42. Jun S-Y, Hong S-M, Bae YK, et al. Clinicopathological and prognostic significance of

456 heme oxygenase-1 expression in small intestinal adenocarcinomas. *Pathol Int* 2018; 68: 294–

457 300.

458 43. Van der Hauwaert C, Savary G, Buob D, et al. Expression profiles of genes involved

459 in xenobiotic metabolism and disposition in human renal tissues and renal cell models.

460 *Toxicol Appl Pharmacol* 2014; 279: 409–418.

461 44. Aschauer L, Carta G, Vogelsang N, et al. Expression of xenobiotic transporters in the
462 human renal proximal tubule cell line RPTEC/TERT1. *Toxicol In Vitro* 2015; 30: 95–105.

463 45. Simon-Friedt BR, Wilson MJ, Blake DA, et al. The RPTEC/TERT1 Cell Line as an
464 Improved Tool for In Vitro Nephrotoxicity Assessments. *Biol Trace Elem Res* 2015; 166: 66–
465 71.

466 46. Kondo M, Inamura H, Matsumura K, et al. Cadmium activates extracellular signal-
467 regulated kinase 5 in HK-2 human renal proximal tubular cells. *Biochem Biophys Res*
468 *Commun* 2012; 421: 490–493.

469 47. Komoike Y, Inamura H, Matsuoka M. Effects of salubrinal on cadmium-induced
470 apoptosis in HK-2 human renal proximal tubular cells. *Arch Toxicol* 2012; 86: 37–44.

471 48. Fujiki K, Inamura H, Matsuoka M. Phosphorylation of FOXO3a by PI3K/Akt
472 pathway in HK-2 renal proximal tubular epithelial cells exposed to cadmium. *Arch Toxicol*
473 2013; 87: 2119–2127.

474 49. Fujiki K, Inamura H, Matsuoka M. PI3K signaling mediates diverse regulation of
475 ATF4 expression for the survival of HK-2 cells exposed to cadmium. *Arch Toxicol* 2014; 88:
476 403–414.

477 50. Fujiki K, Inamura H, Matsuoka M. Detrimental effects of Notch1 signaling activated
478 by cadmium in renal proximal tubular epithelial cells. *Cell Death Dis* 2014; 5: e1378–e1378.

479 51. Kim SY, Lee HM, Kim KS, et al. Noninvasive Biomarker Candidates for Cadmium-
480 Induced Nephrotoxicity by 2DE/MALDI-TOF-MS and SILAC/LC-MS Proteomic Analyses.
481 *Toxicol Sci* 2015; 148: 167–182.

482 52. Lee J-Y, Tokumoto M, Fujiwara Y, et al. Accumulation of p53 via down-regulation of
483 UBE2D family genes is a critical pathway for cadmium-induced renal toxicity. *Sci Rep*; 6.
484 Epub ahead of print April 2016. DOI: 10.1038/srep21968.

485 53. Gu J, Dai S, Liu Y, et al. Activation of Ca²⁺-sensing receptor as a protective pathway
486 to reduce Cadmium-induced cytotoxicity in renal proximal tubular cells. *Sci Rep*; 8. Epub
487 ahead of print December 2018. DOI: 10.1038/s41598-018-19327-9.

488 54. Handl J, Ćapek J, Majtnerová P, et al. Transient Increase in Cellular Dehydrogenase
489 Activity After Cadmium Treatment Precedes Enhanced Production of Reactive Oxygen
490 Species in Human Proximal Tubular Kidney Cells. *Physiol Res* 2019; 481–490.

491 55. Stahlhut C, Slack FJ. MicroRNAs and the cancer phenotype: profiling, signatures and
492 clinical implications. *Genome Med* 2013; 5: 111.

493 56. Yang H, Shu Y. Cadmium transporters in the kidney and cadmium-induced
494 nephrotoxicity. *Int J Mol Sci* 2015; 16: 1484–94.

495 57. Humphries B, Wang Z, Yang C. The role of microRNAs in metal carcinogen-induced
496 cell malignant transformation and tumorigenesis. *Food Chem Toxicol Int J Publ Br Ind Biol*
497 *Res Assoc* 2016; 98: 58–65.

498 58. He J, Wang M, Jiang Y, et al. Chronic arsenic exposure and angiogenesis in human
499 bronchial epithelial cells via the ROS/miR-199a-5p/HIF-1 α /COX-2 pathway. *Environ Health*
500 *Perspect* 2014; 122: 255–61.

501 59. Li J, Yu H, Luan Y. Meta-Analysis of the Copper, Zinc, and Cadmium Absorption
502 Capacities of Aquatic Plants in Heavy Metal-Polluted Water. *Int J Environ Res Public Health*
503 2015; 12: 14958–73.

504 60. Ding YF, Zhu C. The role of microRNAs in copper and cadmium homeostasis.
505 *Biochem Biophys Res Commun* 2009; 386: 6–10.

506 61. Ding Y, Chen Z, Zhu C. Microarray-based analysis of cadmium-responsive
507 microRNAs in rice (*Oryza sativa*). *J Exp Bot* 2011; 62: 3563–3573.

508 62. Tang M, Mao D, Xu L, et al. Integrated analysis of miRNA and mRNA expression
509 profiles in response to Cd exposure in rice seedlings. *BMC Genomics* 2014; 15: 835.

510 63. Secker P. RPTEC/TERT1 cells form highly differentiated tubules when cultured in a
511 3D matrix. *ALTEX* 2018; 223–234.

512 64. Cucu D, D’Haese PC, De Beuf A, et al. Low Doses of Cadmium Chloride and
513 Methallothionein-1-Bound Cadmium Display Different Accumulation Kinetics and Induce
514 Different Genes in Cells of the Human Nephron. *Nephron Extra* 2011; 1: 24–37.

515 65. Mao W, Zhang N, Zhou F, et al. Cadmium directly induced mitochondrial dysfunction
516 of human embryonic kidney cells. *Hum Exp Toxicol* 2011; 30: 920–929.

517 66. Lee W-K, Bork U, Gholamrezaei F, et al. Cd²⁺-induced cytochrome *c* release in
518 apoptotic proximal tubule cells: role of mitochondrial permeability transition pore and Ca²⁺
519 uniporter. *Am J Physiol-Ren Physiol* 2005; 288: F27–F39.

520 67. Simon BR, Wilson MJ, Wickliffe JK. The RPTEC/TERT1 cell line models key renal
521 cell responses to the environmental toxicants, benzo[a]pyrene and cadmium. *Toxicol Rep*
522 2014; 1: 231–242.

523 68. Fay MJ, Alt LAC, Ryba D, et al. Cadmium Nephrotoxicity Is Associated with Altered
524 MicroRNA Expression in the Rat Renal Cortex. *Toxics* 2018; 6: 16.

525 69. Qin S-B, Peng D-Y, Lu J-M, et al. MiR-182-5p inhibited oxidative stress and
526 apoptosis triggered by oxidized low-density lipoprotein via targeting toll-like receptor 4. *J*
527 *Cell Physiol* 2018; 233: 6630–6637.

528 70. Zhao Y, Dong D, Reece EA, et al. Oxidative stress-induced miR-27a targets the redox
529 gene nuclear factor erythroid 2-related factor 2 in diabetic embryopathy. *Am J Obstet Gynecol*
530 2018; 218: 136.e1-136.e10.

531 71. Li Y-F, Jing Y, Hao J, et al. MicroRNA-21 in the pathogenesis of acute kidney injury.
532 *Protein Cell* 2013; 4: 813–819.

533 72. Liu X, Li M, Peng Y, et al. miR-30c regulates proliferation, apoptosis and
534 differentiation via the Shh signaling pathway in P19 cells. *Exp Mol Med* 2016; 48: e248–
535 e248.

536 73. Wei C, Li L, Gupta S. NF-κB-mediated miR-30b regulation in cardiomyocytes cell
537 death by targeting Bcl-2. *Mol Cell Biochem* 2014; 387: 135–141.

538 74. Du B, Dai X, Li S, et al. MiR-30c regulates cisplatin-induced apoptosis of renal
539 tubular epithelial cells by targeting Bnip3L and Hspa5. *Cell Death Dis* 2017; 8: e2987.

540 75. Peng Y, Croce CM. The role of MicroRNAs in human cancer. *Signal Transduct*
541 *Target Ther* 2016; 1: 15004.

542 76. Chae D-K, Ban E, Yoo YS, et al. MIR-27a regulates the TGF-β signaling pathway by
543 targeting SMAD2 and SMAD4 in lung cancer. *Mol Carcinog* 2017; 56: 1992–1998.

544 77. Fabbri M, Urani C, Sacco MG, et al. Whole genome analysis and microRNAs
545 regulation in HepG2 cells exposed to cadmium. *Altex* 2012; 29: 173–82.

546 78. Pottier N, Cauffiez C, Perrais M, et al. FibromiRs: translating molecular discoveries
547 into new anti-fibrotic drugs. *Trends Pharmacol Sci* 2014; 35: 119–26.

548 79. Wang B, Ricardo S. Role of microRNA machinery in kidney fibrosis. *Clin Exp*
549 *Pharmacol Physiol* 2014; 41: 543–50.

550 80. Gomez IG, MacKenna DA, Johnson BG, et al. Anti-microRNA-21 oligonucleotides
551 prevent Alport nephropathy progression by stimulating metabolic pathways. *J Clin Invest*
552 2015; 125: 141–56.

553 81. Pellegrini KL, Gerlach C V, Craciun FL, et al. Application of small RNA sequencing
554 to identify microRNAs in acute kidney injury and fibrosis. *Toxicol Appl Pharmacol* 2016;
555 312: 42–52.

556 82. Wang G, Kwan BC-H, Lai FM-M, et al. Urinary miR-21, miR-29, and miR-93: novel
557 biomarkers of fibrosis. *Am J Nephrol* 2012; 36: 412–8.

558 83. Mitchell PS, Parkin RK, Kroh EM, et al. Circulating microRNAs as stable blood-
559 based markers for cancer detection. *Proc Natl Acad Sci* 2008; 105: 10513–10518.

560 84. Blondal T, Jensby Nielsen S, Baker A, et al. Assessing sample and miRNA profile
561 quality in serum and plasma or other biofluids. *Methods San Diego Calif* 2013; 59: S1-6.
562 85. Chen X, Ba Y, Ma L, et al. Characterization of microRNAs in serum: a novel class of
563 biomarkers for diagnosis of cancer and other diseases. *Cell Res* 2008; 18: 997–1006.
564 86. Cortez MA, Calin GA. MicroRNA identification in plasma and serum: a new tool to
565 diagnose and monitor diseases. *Expert Opin Biol Ther* 2009; 9: 703–711.
566 87. Zhao W, Zhao J-J, Zhang L, et al. Serum miR-21 level: a potential diagnostic and
567 prognostic biomarker for non-small cell lung cancer. *Int J Clin Exp Med* 2015; 8: 14759–63.
568 88. Tusong H, Maolakuerban N, Guan J, et al. Functional analysis of serum microRNAs
569 miR-21 and miR-106a in renal cell carcinoma. *Cancer Biomark Sect Dis Markers* 2017; 18:
570 79–85.
571
572

573 **Figure Legends**

574

575 **Figure 1: Cell death and cytotoxicity induced by cadmium in RPTEC/hTERT cells (A)**

576 Cell viability was measured after treatment with CdCl₂ (0 to 1000 µM) for 24 hours using the
577 CellTiterGlo kit (Promega). Values are the means ± SEM of four independent experiments. p-
578 value <0.0001. **(B)** Representative bright field microscopy under 40x magnification. Cells
579 were treated for 24 hours with 0-40 µM CdCl₂. **(C-E)** Relative expression of Neutrophil
580 Gelatinase Associated Lipocalin (NGAL), IL-6 and Heme oxygenase 1 (HO-1). Values are
581 the means ± SEM of five independent experiments. *: p-value<0.05; **: p-value<0.01. PPIA
582 was used as an internal control. **(F)** Representative western blot out of three independent
583 experiments. Cells exposed to 10 µM CdCl₂ *versus* untreated cells. Blots were incubated with
584 antibodies against HO-1. The HSP60 protein was used as an internal control.

585

586 **Figure 2: Significantly deregulated miRNAs in RPTEC/hTERT cell model of cadmium-**

587 **induced cytotoxicity. (A)** Volcano plot showing the 38 significantly differentially expressed
588 miRNAs in RPTEC/hTERT cells exposed to 10 µM CdCl₂ *versus* untreated cells (n = 3
589 independent experiments). **(B)** List of the miRNAs significantly modulated by cadmium
590 treatment.

591

592 **Figure 3: Validation of the cadmium-induced upregulation of miR-21-5p, miR-27a-3p,**
593 **miR-29c-3p, miR-30b-5p, miR-30c-5p and miR-193a-5p in RPTEC/hTERT cells**

594 Relative expression of miRNAs. Values are the means ± SEM of five independent
595 experiments. *: p-value<0.05; **: p-value<0.01. U6 snRNA was used as an internal control.

596

597 **Figure 4: Validation of the cadmium-induced upregulation of miR-21-5p, miR-27a-3p,**
598 **miR-29c-3p, miR-30b-5p, miR-30c-5p and miR-193a-5p in HK-2 cells**

599 Relative expression of miRNAs following CdCl₂ exposure. Values are the means ± SEM of four
600 independent experiments. *: p-value<0.05; **: p-value<0.01. U6 snRNA was used as an
601 internal control.

602

603 **Figure 5: Apoptosis induced by cadmium in RPTEC/hTERT cell model.**

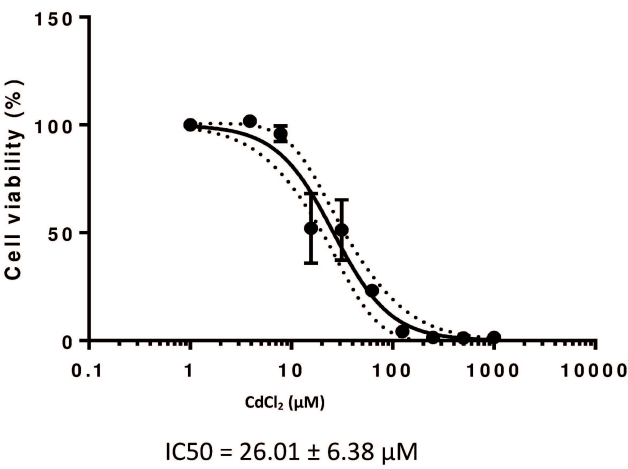
604 Representative western blot out of three independent experiments for cells exposed to 10 µM CdCl₂ *versus*
605 untreated cells. Blots were incubated with antibodies against cleaved caspase 3 and PARP-1.
606 The HSP60 protein was used as an internal control.

607

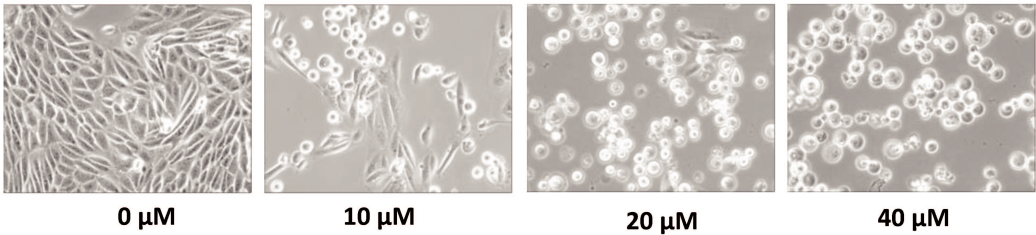
608 **Figure 6: Pathway prediction for the differentially upregulated miRNAs in**
609 **RPTEC/hTERT cells treated with cadmium *versus* untreated cells according to mirPath**
610 **v.3 (Diana Tools).** The number of miRNAs associated with each pathway and number of
611 genes involved in each pathway are indicated. The top 20 pathways are listed ($p \leq 0.005$).
612

Figure 1

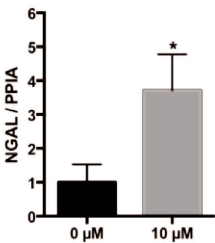
A



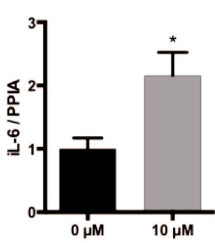
B



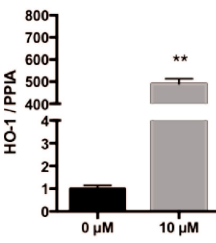
C



D



E



F

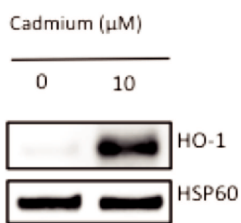
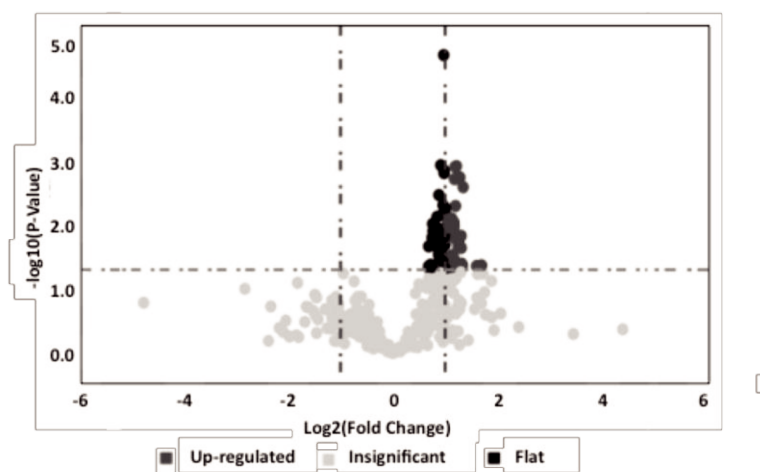


Figure 2

A



B

	Fold Change	p-value		Fold Change	p-value
miR-29c-3p	3.233	0.043	miR-181a-5p	2.243	0.011
miR-376c-3p	3.035	0.044	miR-362-5p	2.242	0.04
miR-185-5p	2.538	0.003	miR-15a-5p	2.24	0.033
miR-203a-3p	2.513	0.042	miR-28-3p	2.23	0.033
miR-132-3p	2.485	0.04	miR-328-3p	2.21	0.03
miR-27a-3p	2.475	0.023	miR-455-5p	2.193	0.046
miR-125b-5p	2.468	0.015	miR-20a-5p	2.183	0.008
miR-301a-3p	2.426	0.002	miR-34a-5p	2.18	0.03
miR-222-3p	2.398	0.018	miR-652-3p	2.149	0.049
miR-886-3p	2.379	0.021	miR-30c-5p	2.138	0.008
miR-193a-5p	2.378	0.023	miR-26b-5p	2.121	0.011
miR-99a-5p	2.34	0.017	miR-183-5p	2.081	0.011
miR-182-5p	2.335	0.015	miR-708-5p	2.079	0.032
miR-146b-5p	2.321	0.001	miR-130a-3p	2.064	0.01
miR-21-5p	2.292	0.005	miR-886-5p	2.06	0.008
miR-324-5p	2.281	0.001	miR-99b-5p	2.052	0.007
let-7a-5p	2.266	0.002	miR-31-5p	2.051	0.016
miR-146a-5p	2.25	0.01	miR-660-5p	2.027	0.016
let-7b-5p	2.246	0.009	miR-30b-5p	2.008	0.007

Figure 3

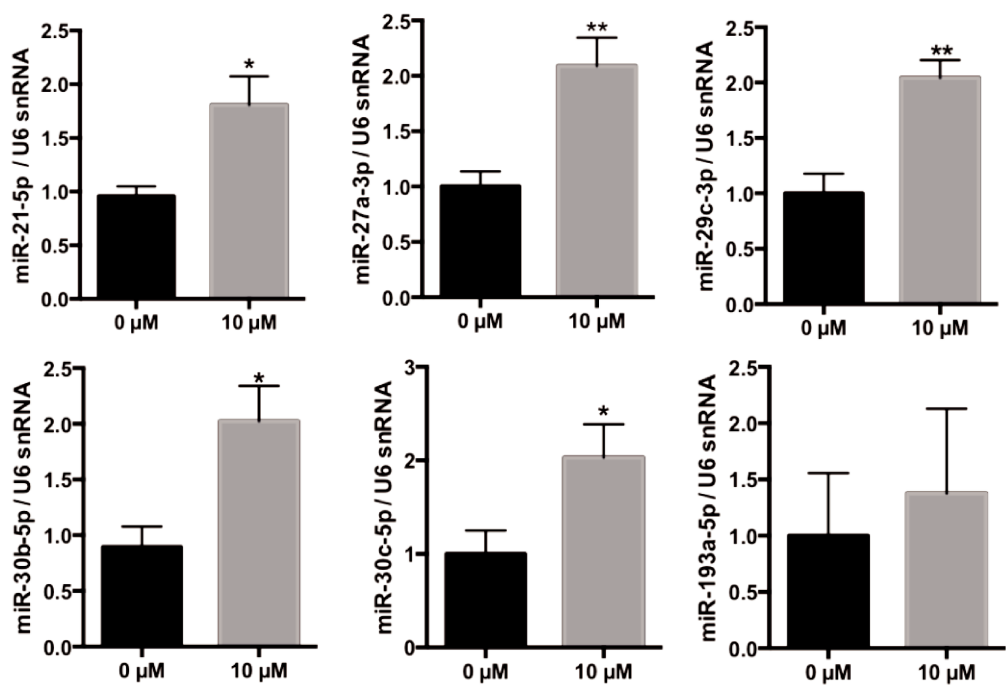


Figure 4

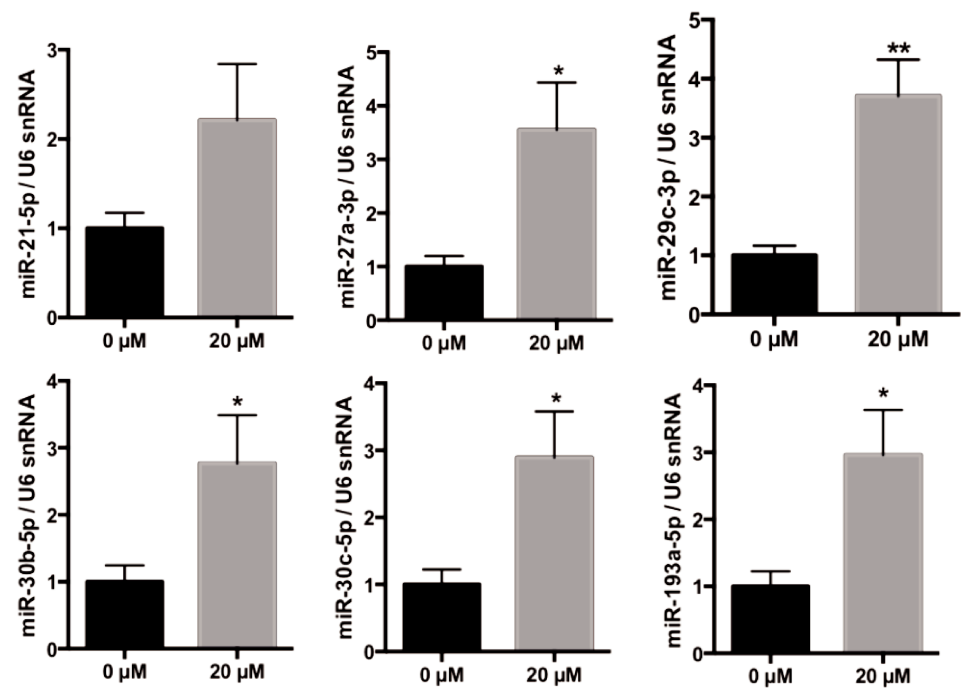
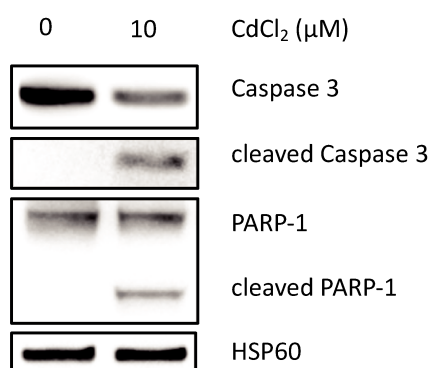


Figure 5



1 **Supplemental Data**

2

3 **Supplemental figure 1**

4 (Insert Supplemental Figure 1)

5 **Supplemental figure 1: Cell death and cytotoxicity induced by cadmium in HK-2 cells**

6 **(A)** Cell viability was measured after treatment with CdCl₂ (0 to 1000 µM) for 24 hours using
7 the CellTiterGlo kit (Promega). Values are the means ± SEM of two independent
8 experiments. NS. **(B)** Representative bright field microscopy under 40x magnification. Cells
9 were treated for 24 hours with 0-40 µM CdCl₂. **(C-E)** Relative expression of Neutrophil
10 Gelatinase Associated Lipocalin (NGAL), IL-6 and Heme oxygenase 1 (HO-1). Values are
11 the means ± SEM of four independent experiments. **: p-value<0.01. PPIA was used as an
12 internal control. **(F)** Representative western blot for cells exposed to 20 µM CdCl₂ *versus*
13 untreated cells. Blots were incubated with antibodies against HO-1. The HSP60 protein was
14 used as an internal control.
15

16 **Supplemental Table 1: Significantly deregulated miRNAs in RPTEC/hTERT cells model of cadmium-induced toxicity**
 17

miRNA	Targets (validated/ <i>unvalidated</i>)	associated processes	References
miR-29c-3p	CDK6, TGFB, DNMT3, NFKB, TNFAIP3, ZFP36, COL2A1, TPM1	cancer, apoptosis, inflammation, fibrosis	1–5
miR-376c-3p	HOXB7	Cancer, apoptosis, inflammation	6
miR-185-5p	DDIT3, CCND2, PDIA3P1, RICTOR, ABCC1, BCL2, BCL2L1, RHEB	cancer, inflammation, apoptosis, fibrosis	7–12
miR-203a-3p	<i>E2</i> , <i>MTOR</i> , <i>FOXO1</i> , <i>MAPK</i> , HOXD3	cellular stress, cancer	13,14
miR-132-3p	ADAMTS5, YAP1, FOXO1, SOX4	cancer, cellular stress, apoptosis	15–18
miR-27a-3p	DUSP16, RXRA, SMAD2, SMAD4, BTG2, TLR4, ACTA2, <i>NFE2L2</i>	cancer, inflammation, fibrosis, oxidative stress	19–2425
miR-125b-5p	KEAP1, BCL2, VTCN1, STARD13	cancer, apoptosis, inflammation, fibrosis	26–29
miR-301a-3p	SMAD4, DLC1, RUNX3	cancer, apoptosis	30–32
miR-222-3p	GAS5, HIPK2, KIT, CDKN1B	cancer, fibrosis, senescence, apoptosis	33–36
miR-886-3p	AKT2, MAPK3, PITX1	cancer, apoptosis	37,38
miR-193a-5p	KRAS, KIT, E2F6, JNK1, BACH2	cancer, apoptosis	39–42
miR-99a-5p	MTOR, NOX4	cancer, apoptosis	43,44
miR-182-5p	BCL2L12, MET, EPAS1, PPP1R1C, TLR4, FOXO3	cancer, apoptosis, inflammation, oxidative stress	45–48
miR-146b-5p	RARB, ZNRF3, TRAF6, TIMP4	cancer, apoptosis, inflammation, fibrosis	49–52
miR-21-5p	MSH2, DRP1, MSLN, SESN1, CAB39L, RASA1, SMAD7, PTEN, PDCD4, BCL2,	cancer, senescence, apoptosis, inflammation, fibrosis	53–69

	PPARA, RECK, TPM1, TSP1, PHD2, MKK3, RAB11A, TIMP3, FASL, IL12A, NOTCH2		
miR-324-5p	ELAVL1, GLI1, TSPAN8, CUEDC2	cancer, apoptosis, inflammation	70–73
let-7a-5p	<i>CASP3</i> , IL13	cancer, apoptosis, inflammation	74,75
miR-146a-5p	ZNRF3, IRAK-1, NOTCH2, SMAD4, CCND1, CCND2, ROCK1, WNT1, WNT5A	cancer, EMT, endothelial inflammation, apoptosis, fibrosis	76–82
let-7b-5p	IGF1R	cancer, apoptosis	83
miR-181a-5p	TNF, PTPN9, SMAD7, TCF7L2, MMP14, <i>RASSF6</i> , WIF1	cancer, immunological disorders	84–90
miR-362-5p	GADD45A, CASC2	cancer	91,92
miR-15a-5p	<i>WNT3A</i> , CXCL10, BDNF, <i>VEGFA</i>	Cancer, apoptosis, inflammation, fibrosis	93–96
miR-28-3p	NME1, IL34	HTLV-1 infection, cancer, apoptosis	97–99
miR-328-3p	H2AFX, <i>CD44</i>	cancer	100,101
miR-455-5p	UBE2B, <i>RAB18</i>	cancer	102,103
miR-20a-5p	ATG7, TP63, E2F1, ATG16L1, KIF26B, SMAD4, <i>RAB27B</i> , MAPK9, MAPK9, JNK2, SIRPA	cancer, muscle development, autophagia, chemoresistance, apoptosis, inflammation	104–110 ; 111
miR-34a-5p	MDM4, XIST, KIT, AGTR1, DLL1, BCL2, NEAT1, SIRT1	cancer, apoptosis, fibrosis	112–118
miR-652-3p	LLGL1	cancer	119
miR-30c-5p	EIF2A, CASP3, MTA1, SNAIL, DNMT1, SERPINE1	cancer, apoptosis	120–123
miR-26b-5p	PLOD2, S100A7, EZH2, <i>CCND2</i> , <i>TRPS1</i>	cancer	124–127
miR-183-5p	SRSF2, PDCD4, <i>MTUS1</i> , <i>SOC6</i>	cancer	128–131

miR-708-5p	FOXO3, CDKN2B, AKT2	cancer, apoptosis	132–134
miR-130a-3p	SMAD4, BACH2, RAB5A, TNF, TBL1XR1	Cancer, apoptosis	135–139
miR-886-5p	<i>BAX</i>	cancer, senescence, apoptosis	140,141
miR-99b-5p	TGFB1, MTOR, FGFR3, CLDN11	cancer, EMT	142–145
miR-31-5p	SP1, MLH1, ACOX1	cancer	146–148
miR-660-5p	TFCP2, EPAS1	cancer	149,150
miR-30b-5p	DNMT3A, USP37, SERPINE1, SIX1, KRAS, PIK3CD, BCL2, ATG12, GNA13, EIF2A	cancer, apoptosis, EMT	151–156

18 *Note. Unvalidated targets are italicized*

19

References Supplemental Table 1

1. Fang Y, Yu X, Liu Y, et al. miR-29c is downregulated in renal interstitial fibrosis in humans and rats and restored by HIF- α activation. *Am J Physiol-Ren Physiol* 2013; 304: F1274–F1282.
2. Guo J, Li J, Zhao J, et al. MiRNA-29c regulates the expression of inflammatory cytokines in diabetic nephropathy by targeting tristetraprolin. *Sci Rep* 2017; 7: 2314.
3. Wang C-M, Wang Y, Fan C-G, et al. miR-29c targets TNFAIP3, inhibits cell proliferation and induces apoptosis in hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma. *Biochem Biophys Res Commun* 2011; 411: 586–592.
4. Wang Y, Zhang X, Li H, et al. The role of miRNA-29 family in cancer. *Eur J Cell Biol* 2013; 92: 123–8.
5. Yan B, Guo Q, Fu F-J, et al. The role of miR-29b in cancer: regulation, function, and signaling. *OncoTargets Ther* 2015; 8: 539–48.
6. Wang K, Jin J, Ma T, et al. MiR-376c-3p regulates the proliferation, invasion, migration, cell cycle and apoptosis of human oral squamous cancer cells by suppressing HOXB7. *Biomed Pharmacother Biomedecine Pharmacother* 2017; 91: 517–525.
7. Chen P, Shen T, Wang H, et al. MicroRNA-185-5p restores glucocorticoid sensitivity by suppressing the mammalian target of rapamycin complex (mTORC) signaling pathway to enhance glucocorticoid receptor autoregulation. *Leuk Lymphoma* 2017; 58: 2657–2667.
8. Ostadrahimi S, Abedi-Valugerdi M, Hassan M, et al. miR-1266-5p and miR-185-5p Promote Cell Apoptosis in Human Prostate Cancer Cell Lines. *Asian Pac J Cancer Prev* 2018; 19: 2305–2311.
9. Pei K, Zhu J-J, Wang C-E, et al. MicroRNA-185-5p modulates chemosensitivity of human non-small cell lung cancer to cisplatin via targeting ABCC1. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2016; 20: 4697–4704.
10. Shang W, Tang Z, Gao Y, et al. LncRNA RNCR3 promotes Chop expression by sponging miR-185-5p during MDSC differentiation. *Oncotarget* 2017; 8: 111754–111769.
11. Sun C-C, Zhang L, Li G, et al. The lncRNA PDIA3P Interacts with miR-185-5p to Modulate Oral Squamous Cell Carcinoma Progression by Targeting Cyclin D2. *Mol Ther Nucleic Acids* 2017; 9: 100–110.
12. Zhou L, Liu S, Han M, et al. miR-185 Inhibits Fibrogenic Activation of Hepatic Stellate Cells and Prevents Liver Fibrosis. *Mol Ther - Nucleic Acids* 2018; 10: 91–102.

13. Wang L, Sun H, Wang X, et al. EGR1 mediates miR-203a suppress the hepatocellular carcinoma cells progression by targeting HOXD3 through EGFR signaling pathway. *Oncotarget* 2016; 7: 45302–45316.
14. Zierau O, Helle J, Schadyew S, et al. Role of miR-203 in estrogen receptor-mediated signaling in the rat uterus and endometrial carcinoma. *J Cell Biochem* 2018; 119: 5359–5372.
15. Zhou X, Luo D, Sun H, et al. MiR-132-3p regulates ADAMTS-5 expression and promotes chondrogenic differentiation of rat mesenchymal stem cells. *J Cell Biochem* 2018; 119: 2579–2587.
16. Kim H-Y, Kwon HY, Ha Thi HT, et al. MicroRNA-132 and microRNA-223 control positive feedback circuit by regulating FOXO3a in inflammatory bowel disease. *J Gastroenterol Hepatol* 2016; 31: 1727–1735.
17. Kim HR, Hwang SJ, Shin CH, et al. SRSF3-regulated miR-132/212 controls cell migration and invasion by targeting YAP1. *Exp Cell Res* 2017; 358: 161–170.
18. Li G, Liu K, Du X. Long Non-Coding RNA TUG1 Promotes Proliferation and Inhibits Apoptosis of Osteosarcoma Cells by Sponging miR-132-3p and Upregulating SOX4 Expression. *Yonsei Med J* 2018; 59: 226–235.
19. Chae D-K, Ban E, Yoo YS, et al. MIR-27a regulates the TGF- β signaling pathway by targeting SMAD2 and SMAD4 in lung cancer. *Mol Carcinog* 2017; 56: 1992–1998.
20. Cui H, Banerjee S, Xie N, et al. MicroRNA-27a-3p Is a Negative Regulator of Lung Fibrosis by Targeting Myofibroblast Differentiation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2016; 54: 843–852.
21. Li J-M, Zhou J, Xu Z, et al. MicroRNA-27a-3p inhibits cell viability and migration through down-regulating DUSP16 in hepatocellular carcinoma. *J Cell Biochem* 2018; 119: 5143–5152.
22. Liang J, Tang J, Shi H, et al. miR-27a-3p targeting RXR α promotes colorectal cancer progression by activating Wnt/ β -catenin pathway. *Oncotarget* 2017; 8: 82991–83008.
23. Zhang P, Li L-Q, Zhang D, et al. Over-expressed miR-27a-3p inhibits inflammatory response to spinal cord injury by decreasing TLR4. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2018; 22: 5416–5423.
24. Zhou L, Liang X, Zhang L, et al. MiR-27a-3p functions as an oncogene in gastric cancer by targeting BTG2. *Oncotarget* 2016; 7: 51943–51954.
25. Zhao Y, Dong D, Reece EA, et al. Oxidative stress-induced miR-27a targets the redox gene nuclear factor erythroid 2-related factor 2 in diabetic embryopathy. *Am J Obstet Gynecol* 2018; 218: 136.e1-136.e10.

26. Diao W, Lu L, Li S, et al. MicroRNA-125b-5p modulates the inflammatory state of macrophages via targeting B7-H4. *Biochem Biophys Res Commun* 2017; 491: 912–918.
27. Yang D, Yuan Q, Balakrishnan A, et al. MicroRNA-125b-5p mimic inhibits acute liver failure. *Nat Commun* 2016; 7: 11916.
28. Yang D, Zhan M, Chen T, et al. miR-125b-5p enhances chemotherapy sensitivity to cisplatin by down-regulating Bcl2 in gallbladder cancer. *Sci Rep* 2017; 7: 43109.
29. You K, Li S-Y, Gong J, et al. MicroRNA-125b Promotes Hepatic Stellate Cell Activation and Liver Fibrosis by Activating RhoA Signaling. *Mol Ther - Nucleic Acids* 2018; 12: 57–66.
30. Lu Y, Gao W, Zhang C, et al. Hsa-miR-301a-3p Acts as an Oncogene in Laryngeal Squamous Cell Carcinoma via Target Regulation of Smad4. *J Cancer* 2015; 6: 1260–75.
31. Xia X, Zhang K, Cen G, et al. MicroRNA-301a-3p promotes pancreatic cancer progression via negative regulation of SMAD4. *Oncotarget* 2015; 6: 21046–63.
32. Zhang L, Zhang Y, Zhu H, et al. Overexpression of miR-301a-3p promotes colorectal cancer cell proliferation and metastasis by targeting deleted in liver cancer-1 and runt-related transcription factor 3. *J Cell Biochem*. Epub ahead of print 25 October 2018. DOI: 10.1002/jcb.27894.
33. Gits CMM, van Kuijk PF, Jonkers MBE, et al. MiR-17-92 and miR-221/222 cluster members target KIT and ETV1 in human gastrointestinal stromal tumours. *Br J Cancer* 2013; 109: 1625–1635.
34. Markopoulos GS, Roupakia E, Tokamani M, et al. Senescence-associated microRNAs target cell cycle regulatory genes in normal human lung fibroblasts. *Exp Gerontol* 2017; 96: 110–122.
35. Tan X, Tang H, Bi J, et al. MicroRNA-222-3p associated with *Helicobacter pylori* targets HIPK2 to promote cell proliferation, invasion, and inhibits apoptosis in gastric cancer. *J Cell Biochem* 2018; 119: 5153–5162.
36. Zhang X-F, Ye Y, Zhao S-J. LncRNA Gas5 acts as a ceRNA to regulate PTEN expression by sponging miR-222-3p in papillary thyroid carcinoma. *Oncotarget* 2018; 9: 3519–3530.
37. Xiong Y, Zhang L, Holloway AK, et al. MiR-886-3p regulates cell proliferation and migration, and is dysregulated in familial non-medullary thyroid cancer. *PLoS One* 2011; 6: e24717.
38. YU Z, CHEN D, SU Z, et al. miR-886-3p upregulation in clear cell renal cell carcinoma regulates cell migration, proliferation and apoptosis by targeting PITX1. *Int J Mol Med* 2014; 34: 1409–1416.

39. Gao XN, Lin J, Li YH, et al. MicroRNA-193a represses c-kit expression and functions as a methylation-silenced tumor suppressor in acute myeloid leukemia. *Oncogene* 2011; 30: 3416–3428.
40. Iliopoulos D, Rotem A, Struhl K. Inhibition of miR-193a expression by Max and RXR α activates K-Ras and PLA2 to mediate distinct aspects of cellular transformation. *Cancer Res* 2011; 71: 5144–53.
41. Uhlmann S, Mannsperger H, Zhang JD, et al. Global microRNA level regulation of EGFR-driven cell-cycle protein network in breast cancer. *Mol Syst Biol* 2012; 8: 570.
42. Yang Z, Chen J-S, Wen J-K, et al. Silencing of miR-193a-5p increases the chemosensitivity of prostate cancer cells to docetaxel. *J Exp Clin Cancer Res* 2017; 36: 178.
43. Tsai T-F, Lin J-F, Chou K-Y, et al. miR-99a-5p acts as tumor suppressor via targeting to mTOR and enhances RAD001-induced apoptosis in human urinary bladder urothelial carcinoma cells. *OncoTargets Ther* 2018; Volume 11: 239–252.
44. Shi Y, Bo Z, Pang G, et al. MiR-99a-5p regulates proliferation, migration and invasion abilities of human oral carcinoma cells by targeting NOX4. *Neoplasma* 2017; 64: 666–673.
45. Kouri FM, Hurley LA, Daniel WL, et al. miR-182 integrates apoptosis, growth, and differentiation programs in glioblastoma. *Genes Dev* 2015; 29: 732–45.
46. Liu L, Zhang X, Nan C, et al. MicroRNA-182 targets protein phosphatase 1 regulatory inhibitor subunit 1C in glioblastoma. *Oncotarget* 2017; 8: 114677–114684.
47. Qin S-B, Peng D-Y, Lu J-M, et al. MiR-182-5p inhibited oxidative stress and apoptosis triggered by oxidized low-density lipoprotein via targeting toll-like receptor 4. *J Cell Physiol* 2018; 233: 6630–6637.
48. Cao M-Q, You A-B, Zhu X-D, et al. miR-182-5p promotes hepatocellular carcinoma progression by repressing FOXO3a. *J Hematol Oncol J Hematol Oncol* 2018; 11: 12.
49. Czajka AA, Wójcicka A, Kubiak A, et al. Family of microRNA-146 regulates RAR β in papillary thyroid carcinoma. *PLoS ONE* 2016; 11: e0151968.
50. Xu E, Zhao J, Ma J, et al. miR-146b-5p promotes invasion and metastasis contributing to chemoresistance in osteosarcoma by targeting zinc and ring finger 3. *Oncol Rep* 2016; 35: 275–83.
51. Liu J, Xu J, Li H, et al. miR-146b-5p functions as a tumor suppressor by targeting TRAF6 and predicts the prognosis of human gliomas. *Oncotarget* 2015; 6: 29129–29142.

52. Wang J, Wang Y, Han J, et al. Integrated analysis of microRNA and mRNA expression profiles in the left atrium of patients with nonvalvular paroxysmal atrial fibrillation: Role of miR-146b-5p in atrial fibrosis. *Heart Rhythm* 2015; 12: 1018–1026.
53. Song Y, Zuo Y, Qian X-L, et al. Inhibition of MicroRNA-21-5p Promotes the Radiation Sensitivity of Non-Small Cell Lung Cancer Through HMSH2. *Cell Physiol Biochem Int J Exp Cell Physiol Biochem Pharmacol* 2017; 43: 1258–1272.
54. Zhang J, Wang J, Zhao F, et al. MicroRNA-21 (miR-21) represses tumor suppressor PTEN and promotes growth and invasion in non-small cell lung cancer (NSCLC). *Clin Chim Acta Int J Clin Chem* 2010; 411: 846–52.
55. Xu L, Xu Q, Li X, et al. MicroRNA-21 regulates the proliferation and apoptosis of cervical cancer cells via tumor necrosis factor- α . *Mol Med Rep* 2017; 16: 4659–4663.
56. Jiao X, Xu X, Fang Y, et al. miR-21 contributes to renal protection by targeting prolyl hydroxylase domain protein 2 in delayed ischaemic preconditioning. *Nephrol Carlton Vic* 2017; 22: 366–373.
57. Li Z, Deng X, Kang Z, et al. Elevation of miR-21, through targeting MKK3, may be involved in ischemia pretreatment protection from ischemia-reperfusion induced kidney injury. *J Nephrol* 2016; 29: 27–36.
58. Liu X, Hong Q, Wang Z, et al. MiR-21 inhibits autophagy by targeting Rab11a in renal ischemia/reperfusion. *Exp Cell Res* 2015; 338: 64–9.
59. Wang N, Zhang C-Q, He J-H, et al. MiR-21 down-regulation suppresses cell growth, invasion and induces cell apoptosis by targeting FASL, TIMP3, and RECK genes in esophageal carcinoma. *Dig Dis Sci* 2013; 58: 1863–70.
60. Zhang J-J, Liu W-Q, Peng J-J, et al. miR-21-5p/203a-3p promote ox-LDL-induced endothelial cell senescence through down-regulation of mitochondrial fission protein Drp1. *Mech Ageing Dev* 2017; 164: 8–19.
61. De Santi C, Vencken S, Blake J, et al. Identification of MiR-21-5p as a functional regulator of mesothelin expression using microRNA capture affinity coupled with next generation sequencing. *PLoS ONE* 2017; 12: e0170999.
62. Bica-Pop C, Cojocneanu-Petric R, Magdo L, et al. Overview upon miR-21 in lung cancer: focus on NSCLC. *Cell Mol Life Sci CMLS*. Epub ahead of print 20 July 2018. DOI: 10.1007/s00018-018-2877-x.
63. Zhong X, Chung ACK, Chen HY, et al. miR-21 is a key therapeutic target for renal injury in a mouse model of type 2 diabetes. *Diabetologia* 2013; 56: 663–74.
64. Lu Z, Liu M, Stribinskis V, et al. MicroRNA-21 promotes cell transformation by

targeting the programmed cell death 4 gene. *Oncogene* 2008; 27: 4373–9.

65. Wickramasinghe NS, Manavalan TT, Dougherty SM, et al. Estradiol downregulates miR-21 expression and increases miR-21 target gene expression in MCF-7 breast cancer cells. *Nucleic Acids Res* 2009; 37: 2584–95.
66. Sarkar J, Gou D, Turaka P, et al. MicroRNA-21 plays a role in hypoxia-mediated pulmonary artery smooth muscle cell proliferation and migration. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2010; 299: L861–71.
67. Markou A, Zavridou M, Lianidou ES. miRNA-21 as a novel therapeutic target in lung cancer. *Lung Cancer Auckl NZ* 2016; 7: 19–27.
68. Lu TX, Munitz A, Rothenberg ME. MicroRNA-21 is up-regulated in allergic airway inflammation and regulates IL-12p35 expression. *J Immunol Baltim Md 1950* 2009; 182: 4994–5002.
69. Schauerte C, Hübner A, Rong S, et al. Antagonism of profibrotic microRNA-21 improves outcome of murine chronic renal allograft dysfunction. *Kidney Int* 2017; 92: 646–656.
70. Gu C, Zhang M, Sun W, et al. Up-regulation of miR-324-5p inhibits proliferation and invasion of colorectal cancer cells by targeting ELAVL1. *Oncol Res*. Epub ahead of print 31 January 2018. DOI: 10.3727/096504018X15166183598572.
71. Xu H-S, Zong H-L, Shang M, et al. MiR-324-5p inhibits proliferation of glioma by target regulation of GLI1. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2014; 18: 828–32.
72. Lin H, Zhou A-J, Zhang J-Y, et al. MiR-324-5p reduces viability and induces apoptosis in gastric cancer cells through modulating TSPAN8. *J Pharm Pharmacol* 2018; 70: 1513–1520.
73. Chen Y, Wang S-X, Mu R, et al. Dysregulation of the MiR-324-5p-CUEDC2 Axis Leads to Macrophage Dysfunction and Is Associated with Colon Cancer. *Cell Rep* 2014; 7: 1982–1993.
74. Fasihi-Ramandi M, Moridnia A, Najafi A, et al. Inducing Apoptosis and Decreasing Cell Proliferation in Human Acute Promyelocytic Leukemia Through Regulation Expression of CASP3 by Let-7a-5p Blockage. *Indian J Hematol Blood Transfus* 2018; 34: 70–77.
75. Polikepahad S, Knight JM, Naghavi AO, et al. Proinflammatory role for let-7 microRNAs in experimental asthma. *J Biol Chem* 2010; 285: 30139–49.
76. Zhou C, Jiang C-Q, Zong Z, et al. miR-146a promotes growth of osteosarcoma cells by targeting ZNRF3/GSK-3 β / β -catenin signaling pathway. *Oncotarget* 2017; 8: 74276–74286.
77. Lo W-Y, Peng C-T, Wang H-J. MicroRNA-146a-5p Mediates High Glucose-

Induced Endothelial Inflammation via Targeting Interleukin-1 Receptor-Associated Kinase 1 Expression. *Front Physiol* 2017; 8: 551.

78. Wang C, Zhang W, Zhang L, et al. miR-146a-5p mediates epithelial–mesenchymal transition of oesophageal squamous cell carcinoma via targeting Notch2. *Br J Cancer* 2016; 115: 1548–1554.
79. Li Y-L, Wang J, Zhang C-Y, et al. MiR-146a-5p inhibits cell proliferation and cell cycle progression in NSCLC cell lines by targeting CCND1 and CCND2. *Oncotarget* 2016; 7: 59287–59298.
80. Sun Y, Li Y, Wang H, et al. miR-146a-5p acts as a negative regulator of TGF- β signaling in skeletal muscle after acute contusion. *Acta Biochim Biophys Sin* 2017; 49: 628–634.
81. Xu B, Huang Y, Niu X, et al. Hsa-miR-146a-5p modulates androgen-independent prostate cancer cells apoptosis by targeting ROCK1. *The Prostate* 2015; 75: 1896–1903.
82. Du J, Niu X, Wang Y, et al. MiR-146a-5p suppresses activation and proliferation of hepatic stellate cells in nonalcoholic fibrosing steatohepatitis through directly targeting Wnt1 and Wnt5a. *Sci Rep* 2015; 5: 16163.
83. Xu H, Liu C, Zhang Y, et al. Let-7b-5p regulates proliferation and apoptosis in multiple myeloma by targeting IGF1R. *Acta Biochim Biophys Sin* 2014; 46: 965–72.
84. Zhu J, Wang F-L, Wang H-B, et al. TNF- α mRNA is negatively regulated by microRNA-181a-5p in maturation of dendritic cells induced by high mobility group box-1 protein. *Sci Rep* 2017; 7: 12239.
85. Liu Z, Sun F, Hong Y, et al. MEG2 is regulated by miR-181a-5p and functions as a tumour suppressor gene to suppress the proliferation and migration of gastric cancer cells. *Mol Cancer* 2017; 16: 133.
86. Li Y, Kuscü C, Banach A, et al. miR-181a-5p Inhibits Cancer Cell Migration and Angiogenesis via Downregulation of Matrix Metalloproteinase-14. *Cancer Res* 2015; 75: 2674–85.
87. Mi Y, Zhang D, Jiang W, et al. miR-181a-5p promotes the progression of gastric cancer via RASSF6-mediated MAPK signalling activation. *Cancer Lett* 2017; 389: 11–22.
88. Lyu X, Li J, Yun X, et al. miR-181a-5p, an inducer of Wnt-signaling, facilitates cell proliferation in acute lymphoblastic leukemia. *Oncol Rep* 2017; 37: 1469–1476.
89. Ouyang D, Xu L, Zhang L, et al. MiR-181a-5p regulates 3T3-L1 cell adipogenesis by targeting Smad7 and Tcf7l2. *Acta Biochim Biophys Sin* 2016; 48: 1034–1041.

90. Parikh A, Lee C, Joseph P, et al. microRNA-181a has a critical role in ovarian cancer progression through the regulation of the epithelial-mesenchymal transition. *Nat Commun* 2014; 5: 2977.
91. Yang P, Ni F, Deng R-Q, et al. MiR-362-5p promotes the malignancy of chronic myelocytic leukaemia via down-regulation of GADD45a. *Mol Cancer* 2015; 14: 190.
92. Zhao L, Zhang Y, Zhang Y. Long noncoding RNA CASC2 regulates hepatocellular carcinoma cell oncogenesis through miR-362-5p/Nf- κ B axis. *J Cell Physiol* 2018; 233: 6661–6670.
93. Wang Z-M, Wan X-H, Sang G-Y, et al. miR-15a-5p suppresses endometrial cancer cell growth via Wnt/ β -catenin signaling pathway by inhibiting WNT3A. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2017; 21: 4810–4818.
94. Chen D, Wu D, Shao K, et al. MiR-15a-5p negatively regulates cell survival and metastasis by targeting CXCL10 in chronic myeloid leukemia. *Am J Transl Res* 2017; 9: 4308–4316.
95. Long J, Jiang C, Liu B, et al. MicroRNA-15a-5p suppresses cancer proliferation and division in human hepatocellular carcinoma by targeting BDNF. *Tumour Biol J Int Soc Oncodevelopmental Biol Med* 2016; 37: 5821–8.
96. Shang J, He Q, Chen Y, et al. miR-15a-5p suppresses inflammation and fibrosis of peritoneal mesothelial cells induced by peritoneal dialysis via targeting VEGFA. *J Cell Physiol*. Epub ahead of print 26 October 2018. DOI: 10.1002/jcp.27660.
97. Bai XT, Nicot C. miR-28-3p is a cellular restriction factor that inhibits human T cell leukemia virus, type 1 (HTLV-1) replication and virus infection. *J Biol Chem* 2015; 290: 5381–90.
98. Almeida MI, Nicoloso MS, Zeng L, et al. Strand-Specific miR-28-5p and miR-28-3p Have Distinct Effects in Colorectal Cancer Cells. *Gastroenterology* 2012; 142: 886–896.e9.
99. Zhou X, Wen W, Shan X, et al. MiR-28-3p as a potential plasma marker in diagnosis of pulmonary embolism. *Thromb Res* 2016; 138: 91–95.
100. Ma W, Ma C-N, Zhou N-N, et al. Up- regulation of miR-328-3p sensitizes non-small cell lung cancer to radiotherapy. *Sci Rep* 2016; 6: 31651.
101. Al-Othman N, Hammad H, Ahram M. Dihydrotestosterone regulates expression of CD44 via miR-328-3p in triple-negative breast cancer cells. *Gene* 2018; 675: 128–135.
102. Cheng CM, Shiah SG, Huang CC, et al. Up-regulation of miR-455-5p by the TGF- β –SMAD signalling axis promotes the proliferation of oral squamous cancer cells by targeting UBE2B. *J Pathol* 2016; 240: 38–49.

103. Liu J, Zhang J, Li Y, et al. MiR-455-5p acts as a novel tumor suppressor in gastric cancer by down-regulating RAB18. *Gene* 2016; 592: 308–15.
104. Yu Y, Zhang J, Jin Y, et al. MiR-20a-5p suppresses tumor proliferation by targeting autophagy-related gene 7 in neuroblastoma. *Cancer Cell Int* 2018; 18: 5.
105. Fang W, Guo J, Cao Y, et al. MicroRNA-20a-5p contributes to hepatic glycogen synthesis through targeting p63 to regulate p53 and PTEN expression. *J Cell Mol Med* 2016; 20: 1467–1480.
106. Luo W, Li G, Yi Z, et al. E2F1-miR-20a-5p/20b-5p auto-regulatory feedback loop involved in myoblast proliferation and differentiation. *Sci Rep* 2016; 6: 27904.
107. Pu Y, Yi Q, Zhao F, et al. MiR-20a-5p represses multi-drug resistance in osteosarcoma by targeting the KIF26B gene. *Cancer Cell Int* 2016; 16: 64.
108. Cheng D, Zhao S, Tang H, et al. MicroRNA-20a-5p promotes colorectal cancer invasion and metastasis by downregulating Smad4. *Oncotarget* 2016; 7: 45199–45213.
109. Huang D, Bian G, Pan Y, et al. MiR-20a-5p promotes radio-resistance by targeting Rab27B in nasopharyngeal cancer cells. *Cancer Cell Int* 2017; 17: 32.
110. Zhang G, Liu X, Wang W, et al. Down-regulation of miR-20a-5p triggers cell apoptosis to facilitate mycobacterial clearance through targeting JNK2 in human macrophages. *Cell Cycle Georget Tex* 2016; 15: 2527–38.
111. Zhu D, Pan C, Li L, et al. MicroRNA-17/20a/106a modulate macrophage inflammatory responses through targeting signal-regulatory protein α . *J Allergy Clin Immunol* 2013; 132: 426–436.e8.
112. Jiang Z-Q, Li M-H, Qin Y-M, et al. Luteolin Inhibits Tumorigenesis and Induces Apoptosis of Non-Small Cell Lung Cancer Cells via Regulation of MicroRNA-34a-5p. *Int J Mol Sci* 2018; 19: 447.
113. Sun Z, Zhang B, Cui T. Long non-coding RNA XIST exerts oncogenic functions in pancreatic cancer via miR-34a-5p. *Oncol Rep* 2018; 39: 1591–1600.
114. Pu Y, Zhao F, Wang H, et al. MiR-34a-5p promotes the multi-drug resistance of osteosarcoma by targeting the CD117 gene. *Oncotarget* 2016; 7: 28420–34.
115. Pu Y, Zhao F, Li Y, et al. The miR-34a-5p promotes the multi-chemoresistance of osteosarcoma via repression of the AGTR1 gene. *BMC Cancer* 2017; 17: 45.
116. Pu Y, Zhao F, Wang H, et al. MiR-34a-5p promotes multi-chemoresistance of osteosarcoma through down-regulation of the DLL1 gene. *Sci Rep* 2017; 7: 44218.

117. Ding N, Wu H, Tao T, et al. NEAT1 regulates cell proliferation and apoptosis of ovarian cancer by miR-34a-5p/BCL2. *OncoTargets Ther* 2017; 10: 4905–4915.
118. Xue M, Li Y, Hu F, et al. High glucose up-regulates microRNA-34a-5p to aggravate fibrosis by targeting SIRT1 in HK-2 cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2018; 498: 38–44.
119. Yang W, Zhou C, Luo M, et al. MiR-652-3p is upregulated in non-small cell lung cancer and promotes proliferation and metastasis by directly targeting Lgl1. *Oncotarget* 2016; 7: 16703–15.
120. Jiang L, Zang D, Yi S, et al. A microRNA-mediated decrease in eukaryotic initiation factor 2 α promotes cell survival during PS-341 treatment. *Sci Rep* 2016; 6: 21565.
121. Ceolotto G, Giannella A, Albiero M, et al. miR-30c-5p regulates macrophage-mediated inflammation and pro-atherosclerosis pathways. *Cardiovasc Res* 2017; 113: 1627–1638.
122. Cao J-M, Li G-Z, Han M, et al. MiR-30c-5p suppresses migration, invasion and epithelial to mesenchymal transition of gastric cancer via targeting MTA1. *Biomed Pharmacother Biomedecine Pharmacother* 2017; 93: 554–560.
123. Luo M, Li R, Ren M, et al. Hyperglycaemia-induced reciprocal changes in miR-30c and PAI-1 expression in platelets. *Sci Rep* 2016; 6: 36687.
124. Miyamoto K, Seki N, Matsushita R, et al. Tumour-suppressive miRNA-26a-5p and miR-26b-5p inhibit cell aggressiveness by regulating PLOD2 in bladder cancer. *Br J Cancer* 2016; 115: 354–63.
125. Liu Y, Liu W-B, Liu K-J, et al. Overexpression of miR-26b-5p regulates the cell cycle by targeting CCND2 in GC-2 cells under exposure to extremely low frequency electromagnetic fields. *Cell Cycle Georget Tex* 2016; 15: 357–67.
126. Fan F, Lu J, Yu W, et al. MicroRNA-26b-5p regulates cell proliferation, invasion and metastasis in human intrahepatic cholangiocarcinoma by targeting S100A7. *Oncol Lett* 2017; 15: 386–392.
127. Wilke CM, Hess J, Klymenko S V, et al. Expression of miRNA-26b-5p and its target TRPS1 is associated with radiation exposure in post-Chernobyl breast cancer. *Int J Cancer* 2018; 142: 573–583.
128. Sokół E, Kędzierska H, Czuby A, et al. microRNA-mediated regulation of splicing factors SRSF1, SRSF2 and hnRNP A1 in context of their alternatively spliced 3'UTRs. *Exp Cell Res* 2018; 363: 208–217.
129. Cheng Y, Xiang G, Meng Y, et al. MiRNA-183-5p promotes cell proliferation and inhibits apoptosis in human breast cancer by targeting the PDCD4. *Reprod Biol* 2016; 16: 225–233.

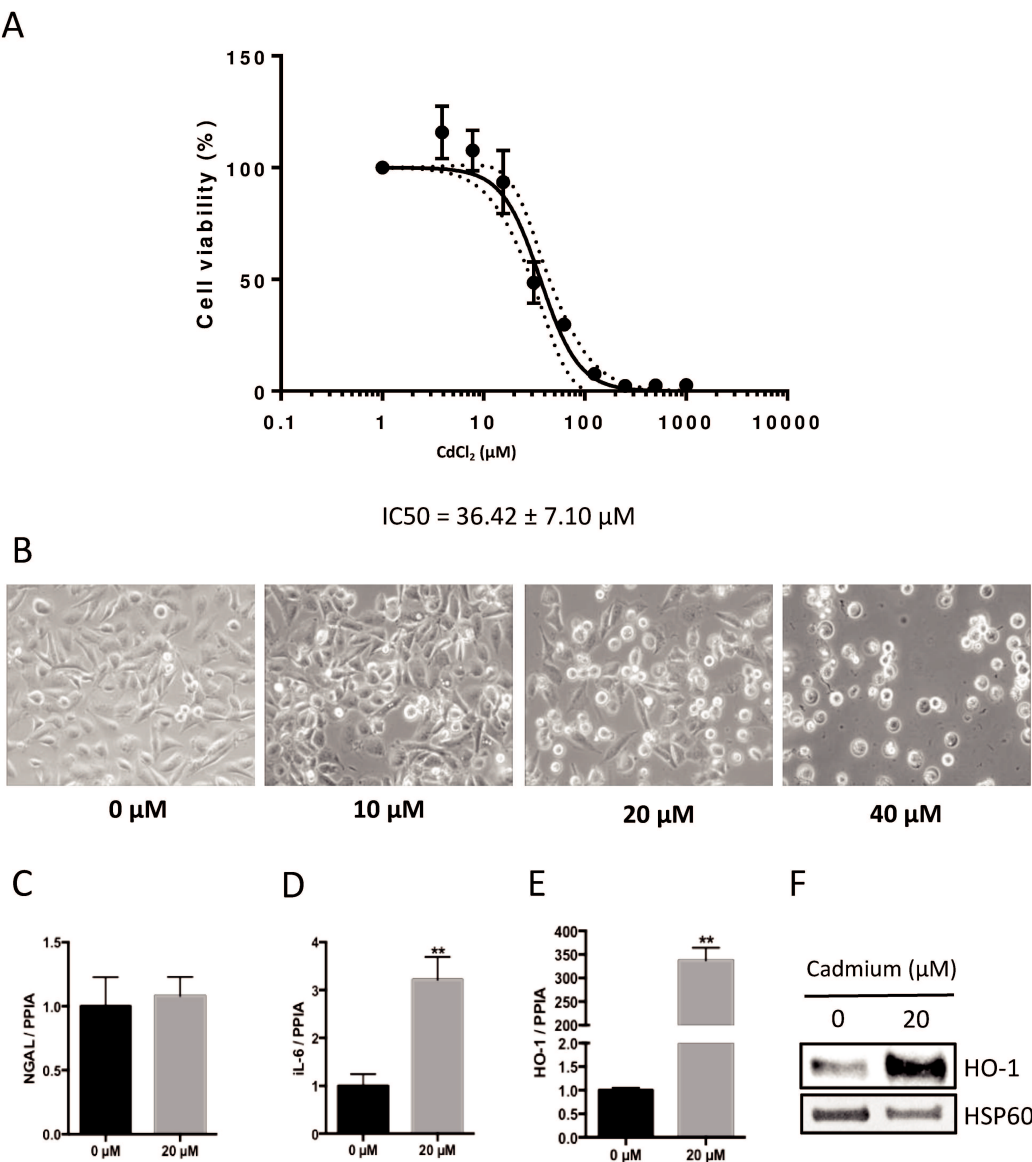
130. Kara M, Kaplan M, Bozgeyik I, et al. MTUS1 tumor suppressor and its miRNA regulators in fibroadenoma and breast cancer. *Gene* 2016; 587: 173–7.
131. Miao F, Zhu J, Chen Y, et al. MicroRNA-183-5p promotes the proliferation, invasion and metastasis of human pancreatic adenocarcinoma cells. *Oncol Lett* 2016; 11: 134–140.
132. Han B-W, Feng D-D, Li Z-G, et al. A set of miRNAs that involve in the pathways of drug resistance and leukemic stem-cell differentiation is associated with the risk of relapse and glucocorticoid response in childhood ALL. *Hum Mol Genet* 2011; 20: 4903–15.
133. Lei S-L, Zhao H, Yao H-L, et al. Regulatory roles of microRNA-708 and microRNA-31 in proliferation, apoptosis and invasion of colorectal cancer cells. *Oncol Lett* 2014; 8: 1768–1774.
134. Saini S, Majid S, Shahryari V, et al. miRNA-708 control of CD44(+) prostate cancer-initiating cells. *Cancer Res* 2012; 72: 3618–30.
135. Liu Y, Li Y, Wang R, et al. MiR-130a-3p regulates cell migration and invasion via inhibition of Smad4 in gemcitabine resistant hepatoma cells. *J Exp Clin Cancer Res CR* 2016; 35: 19.
136. Chen X, Yue B, Zhang C, et al. *MiR-130a-3p* inhibits the viability, proliferation, invasion, and cell cycle, and promotes apoptosis of nasopharyngeal carcinoma cells by suppressing BACH2 expression. *Biosci Rep* 2017; 37: BSR20160576.
137. Pan Y, Wang R, Zhang F, et al. MicroRNA-130a inhibits cell proliferation, invasion and migration in human breast cancer by targeting the RAB5A. *Int J Clin Exp Pathol* 2015; 8: 384–93.
138. Jiang Y, Wang W, Liu Z-Y, et al. Overexpression of miR-130a-3p/301a-3p attenuates high glucose-induced MPC5 podocyte dysfunction through suppression of TNF- α signaling. *Exp Ther Med* 2018; 15: 1021–1028.
139. Wang S, Han H, Hu Y, et al. MicroRNA-130a-3p suppresses cell migration and invasion by inhibition of TBL1XR1-mediated EMT in human gastric carcinoma. *Mol Carcinog* 2018; 57: 383–392.
140. Li J-H, Xiao X, Zhang Y-N, et al. MicroRNA miR-886-5p inhibits apoptosis by down-regulating Bax expression in human cervical carcinoma cells. *Gynecol Oncol* 2011; 120: 145–51.
141. Yentrapalli R, Azimzadeh O, Kraemer A, et al. Quantitative and integrated proteome and microRNA analysis of endothelial replicative senescence. *J Proteomics* 2015; 126: 12–23.
142. Turcatel G, Rubin N, El-Hashash A, et al. MIR-99a and MIR-99b modulate TGF- β induced epithelial to mesenchymal plasticity in normal murine mammary gland cells. *PloS One* 2012; 7: e31032.

143. Cao F, Liu T, Sun S, et al. The role of the miR-99b-5p/mTOR signaling pathway in neuroregeneration in mice following spinal cord injury. *Mol Med Rep* 2017; 16: 9355–9360.
144. Kang J, Lee SY, Lee SY, et al. microRNA-99b acts as a tumor suppressor in non-small cell lung cancer by directly targeting fibroblast growth factor receptor 3. *Exp Ther Med* 2012; 3: 149–153.
145. Yang J, Liu X, Yuan X, et al. miR-99b promotes metastasis of hepatocellular carcinoma through inhibition of claudin 11 expression and may serve as a prognostic marker. *Oncol Rep* 2015; 34: 1415–23.
146. Zhao G, Han C, Zhang Z, et al. Increased expression of microRNA-31-5p inhibits cell proliferation, migration, and invasion via regulating Sp1 transcription factor in HepG2 hepatocellular carcinoma cell line. *Biochem Biophys Res Commun* 2017; 490: 371–377.
147. Zhong Z, Dong Z, Yang L, et al. MicroRNA-31-5p modulates cell cycle by targeting human mutL homolog 1 in human cancer cells. *Tumour Biol J Int Soc Oncodevelopmental Biol Med* 2013; 34: 1959–65.
148. Lai Y-H, Liu H, Chiang W-F, et al. MiR-31-5p-ACOX1 Axis Enhances Tumorigenic Fitness in Oral Squamous Cell Carcinoma Via the Promigratory Prostaglandin E2. *Theranostics* 2018; 8: 486–504.
149. Shen Y, Ye YF, Ruan LW, et al. Inhibition of miR-660-5p expression suppresses tumor development and metastasis in human breast cancer. *Genet Mol Res GMR*; 16. Epub ahead of print 23 February 2017. DOI: 10.4238/gmr16019479.
150. Salati S, Salvestrini V, Carretta C, et al. Deregulated expression of miR-29a-3p, miR-494-3p and miR-660-5p affects sensitivity to tyrosine kinase inhibitors in CML leukemic stem cells. *Oncotarget* 2017; 8: 49451–49469.
151. Qin X, Chen J, Wu L, et al. MiR-30b-5p acts as a tumor suppressor, repressing cell proliferation and cell cycle in human hepatocellular carcinoma. *Biomed Pharmacother Biomedecine Pharmacother* 2017; 89: 742–750.
152. Zhu E-D, Li N, Li B-S, et al. miR-30b, down-regulated in gastric cancer, promotes apoptosis and suppresses tumor growth by targeting plasminogen activator inhibitor-1. *PloS One* 2014; 9: e106049.
153. Zhao H, Xu Z, Qin H, et al. miR-30b regulates migration and invasion of human colorectal cancer via SIX1. *Biochem J* 2014; 460: 117–25.
154. Liao W-T, Ye Y-P, Zhang N-J, et al. MicroRNA-30b functions as a tumour suppressor in human colorectal cancer by targeting KRAS, PIK3CD and BCL2. *J Pathol* 2014; 232: 415–27.
155. Li S-P, He J-D, Wang Z, et al. miR-30b inhibits autophagy to alleviate hepatic

ischemia-reperfusion injury via decreasing the Atg12-Atg5 conjugate. *World J Gastroenterol* 2016; 22: 4501–14.

156. Liu W, Li H, Wang Y, et al. MiR-30b-5p functions as a tumor suppressor in cell proliferation, metastasis and epithelial-to-mesenchymal transition by targeting G-protein subunit α -13 in renal cell carcinoma. *Gene* 2017; 626: 275–281.

Supplemental Data : Figure 1



Les microARN (miARN) représentent une classe de petits ARN non codant régulateurs de l'expression génique. Ils sont impliqués dans de nombreuses fonctions cellulaires et moléculaires essentielles. De plus, leur dérégulation joue un rôle important dans le processus de tumorigenèse. En effet, certains miARN ont été décrits comme des oncogènes ou des gènes suppresseurs de tumeur. Ces travaux de thèse s'inscrivent dans ce contexte. Ainsi, une première étude a consisté à identifier les miARN exprimés de manière différentielle dans les cellules tubulaires rénales proximales en réponse à une exposition au cadmium, un composé environnemental présentant des propriétés carcinogènes. Cette étude permet de suggérer que certains de ces miARN pourrait présenter un intérêt en tant que biomarqueurs d'exposition au cadmium.

Dans une seconde étude, nous avons évalué les propriétés pro-tumorales de miR-92a-3p dans les cancers pulmonaires non à petites cellules. Nos données obtenues *in vitro* suggèrent que le ciblage de miR-92a-3p par des oligonucléotides antisens pourrait représenter une stratégie thérapeutique pertinente. Un modèle murin d'adénocarcinome pulmonaire (modèle CCSP-Cre-LSL-Kras^{G12D}) a été mis en place et permettra de tester l'effet pharmacologique de ce type d'inhibiteurs.

Au total, ces travaux soulignent l'importance des miARN en tant que biomarqueurs et cibles thérapeutiques dans le domaine du cancer.

MicroRNAs (miRNAs) represent a class of small non-coding RNAs that regulate gene expression. They are involved in many essential cellular and molecular processes such as cell death or differentiation. In addition, their deregulation plays an important role in the tumorigenesis. Indeed, many miRNAs have been described as oncogenes or tumor suppressor genes. In this context, this thesis work focused on the potential role played by miRNAs in kidney and lung cancers. Indeed, a first part consisted in identifying miRNAs differentially expressed in proximal renal tubular cells in response to cadmium exposure, an environmental compound with carcinogenic properties. This data suggests that some of these miRNAs could be of interest as biomarkers of cadmium exposure.

In the second part of this thesis, we evaluated the tumorigenic properties of miR-92a-3p in non-small cell lung cancers. Our *in vitro* data suggests that targeting miR-92a-3p by antisense oligonucleotides could represent a relevant anticancer therapeutic strategy. Furthermore, a mouse model of pulmonary adenocarcinoma (CCSP-Cre-LSL-Kras^{G12D} model) has been developed to test the pharmacological effect of this therapeutic strategy.

Overall, this work highlights the importance of miRNAs as biomarkers and therapeutic targets in the field of cancer.

